



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 7, Abril 2008

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

El Papel Del Oxido Nitrico En La Tolerancia Oral

Franco, L., Feledi, C. y Massouh, E.

Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

E-mail: emassouh@qb.fcen.uba.ar

Resumen

Para estudiar el papel del óxido nítrico en la tolerización oral con bajas dosis de antígeno, preguntamos si existe en los animales tolerizados una polarización preferencial hacia TH1 o TH2 en la respuesta de memoria hacia el antígeno tolerizante oral OVA. Al cabo de 47 días post-desafío subcutáneo (DPI) con OVA adyuvada en Freund completo (AFC), se evalúa cómo se alteró dicho perfil cuando la tolerancia oral fue inducida en presencia o ausencia de Aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de la iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible), que se aplica intraperitonealmente durante la tolerización. Se utilizaron ratas Wistar distribuidas en cuatro grupos experimentales: C, controles no tolerizados ni tratados con AG; CAG, no tolerizados pero tratados con AG, T, los tolerizados oralmente, y TAG, ratas tolerizadas y tratadas con AG. Obtuvimos por ELISA indirecto los títulos séricos de las subclases de Ig anti-OVA (IgG2a: perfil TH1, vs IgG1: perfil TH2) y por ELISA de captura las concentraciones de IL-10 en sobrenadantes de 48 horas de cultivo de esplenocitos estimulados "in vitro" con OVA. Asimismo, medimos la actividad de los macrófagos a través del óxido nítrico (ON) producido por ellos en estos cultivos dosando la concentración de nitritos con Griess. Nuestros resultados mostraron que en los animales tolerizados los títulos de IgG2a (TH1) estaban reducidos significativamente, mientras que la concentración de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo estaba significativamente aumentada, y los nitritos no diferían de los controles. Por el contrario, las respuestas tipo TH2 eran similares a las de los controles. En los animales tolerizados bajo el efecto de la AG, la tolerización fue menos efectiva, de manera que los títulos de IgG2a eran intermedios: resultaron significativamente mayores que los de las ratas tolerizadas, pero menores que los controles. La respuesta tipo TH2 permaneció sin cambios, similar a los controles. La producción de IL-10 en los cultivos resultó menor que la de ratas tolerizadas, pero similar a la de los controles. Los niveles de nitrito fueron significativamente mayores que los de controles y tolerizados, indicando que estaba ocurriendo una estimulación efectiva "in

vitro". El estudio de la cinética de los títulos de IgG2a y de IgG1 entre los 20 y 47 dpi en los controles no tratados con AG reveló que si bien en ellos no se registran variaciones significativas del título de IgG1 (TH2), IgG2a (TH1) aumenta significativamente, una respuesta típica al AFC. Pero la respuesta TH1 anti- OVA de los animales CAG (no tolerizados tratados con AG) va aumentando entre los 20 y 47 DPI, y también TH2 crece. Esto parecería indicar que la AG incide en la respuesta sistémica de los controles, aumentando la respuesta TH2, de una manera no relacionada con la tolerización. La relación TH1/TH2 aumentó significativamente con el tiempo en los animales no tratados con AG, pero disminuyó en los que recibieron AG, debido a la incorporación de respuestas mediadas por TH2, cuya contribución es mayor a medida que el tiempo pasa. Esto significaría que por efecto de la AG, se anula la polarización hacia una respuesta TH1 durante el desafío con el antígeno en AFC. Considerando entonces estos resultados, podemos suponer que el óxido nítrico, como molécula reguladora, colabora en el establecimiento del tipo de perfil TH1/TH2 y que su ausencia altera el balance normal.

Palabras clave: Tolerancia oral, óxido nítrico, aminoguanidina, ratas, OVA, TH1/TH2, Freund completo.

The Role Of Nitric Oxide In Oral Tolerance

Summary

In order to investigate the role of nitric oxide in low-dose oral tolerance to OVA in Wistar rats, we ask whether TH1/TH2 ratio is altered at 47 days post-challenge (dpi) with OVA injected subcutaneously in Freund's Complete adjuvant (FCA). Aminoguanidine (AG), a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase (40 mg/rat, 160 mg/kg) or Saline was administered intraperitoneally every day for five days (groups CAG and C respectively) simultaneously with OVA or PBS, delivered intragastrically in five doses every other day (groups TAG and T respectively). Anti-OVA titres measuring TH1 response (IgG2a) or TH2 response (IgG1) in serum obtained at 47 dpi were determined by indirect ELISA. IL-10 concentrations in the 48 hour supernatants of spleen cultures at 47 dpi were determined by sandwich ELISA. Nitrites present in these supernatants, originated from the nitric oxide produced by activated APC in vitro were measured with the Griess reagent. Our results show that in tolerized animals, IgG2a titres were significantly reduced, while IL-10 in spleen supernatants was significantly augmented, and nitrites did not differ from controls. On the other hand, TH2 responses were similar to controls. In animals tolerized under the effect of AG, tolerization was less effective, so that Ig2a titres were significantly higher than those of T rats, although they were lower than non-tolerized controls. The IgG1 response remained unchanged, similar to controls. The production of IL-10 in OVA-stimulated spleen cultures was significantly lower than in T rats, but similar to

controls. Nitrite levels were significantly higher than in T cells and all controls, indicating effective stimulation in vitro. In addition, kinetics of IgG2a and IgG1 from 20 through 47 dpi in Controls not treated with AG show that, after OVA-FCA challenge, while the TH1 response rises steadily, TH2 response does not, as a typical FCA-induced response. However, when Control animals are treated with AG, TH2 responses rise parallel to TH1 ones. This indicates that nitric oxide has an effect on systemic response, unrelated to tolerization, which inhibits TH2 responses. Therefore, if this effect is also present in the tolerized+AG animals, the net effect of AG is a rise in TH2, thus lowering the TH1/TH2 ratio because the TH1 response is inhibited by tolerization, and TH2 response is stimulated by aminoguanidine. Considering these results, we can speculate that nitric oxide acts as a regulatory molecule, and is involved in the establishment of a TH1/TH2 profile, and that its absence alters the normal balance.

Key words: oral tolerization, nitric oxide, aminoguanidine, rats, OVA, TH1/TH2 ratio, FCA

Introducción

Un gran número de proteínas del ambiente penetran en un individuo a través de la mucosa intestinal y respiratoria, y el sistema inmune debe enfrentar continuamente el desafío de discriminar entre antígenos inocuos y potencialmente patogénicos, para desencadenar el tipo de respuesta inmune adecuado.

En circunstancias normales, las proteínas solubles administradas a través de una mucosa intacta no provocan reacciones inmunes marcadas, sino que por el contrario, se produce un estado de hiporespuesta específica al antígeno (tolerancia). La desregulación de este proceso homeostático puede conducir a una hiper-reactividad sostenida frente a la ingestión o la inhalación de una variedad de antígenos ubicuos. Este tipo de respuesta aberrante se desarrolla generalmente con las características de una inflamación tipo TH2 (T helper2), y constituye la base de las enfermedades alérgicas. La comprensión de los mecanismos que regulan la tolerancia en las mucosas dará una idea más completa de la fisiopatología de las alergias, y podrá contribuir a desarrollar mejores estrategias para tratar enfermedades en las que sería beneficiosa la supresión de la respuesta inmune.

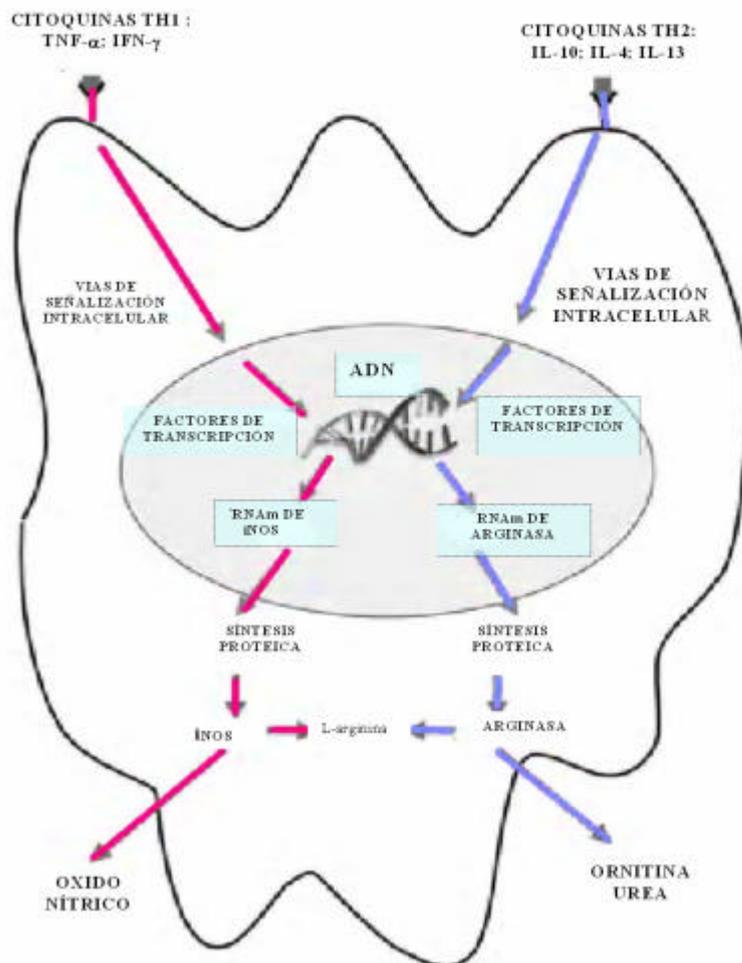
Durante su evolución, el sistema inmune ha generado varios mecanismos para mantener una tolerancia periférica a los antígenos inocuos. Se sabe que estos mecanismos disminuyen la respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal de una manera dependiente de la dosis de antígeno. En especial, están involucrados la delección clonal y la anergia cuando la dosis de antígeno es alta, y la supresión activa mediada por células reguladoras que secretan TGF- β y citocinas tipo TH2 cuando la dosis es baja.

Se ha demostrado que un gran número de moléculas distintas modulan la respuesta inmune, o actúan como efectoras en el sistema inmune. Entre ellas, el NO atrajo la atención porque sus niveles se encontraban elevados regularmente en varias situaciones inmunopatológicas.

El Oxido Nítrico (NO) es una pequeña molécula sintetizada en el cuerpo a partir de la Arginina mediante una familia de enzimas, las óxido nítrico sintetasas (NOS). Se han identificado al menos tres isoformas de NOS. Dos de ellas sintetizan NO de manera constitutiva en una gran variedad de células (nNOS, en el sistema nervioso y eNOS en el endotelio vascular). La tercer isoforma, llamada NOS inducible (iNOS, o NOS-2) se activa con varios estímulos, y puede producir grandes cantidades de NO.

Una de las mayores fuentes de NO inducible son los macrófagos. Se encontraron niveles elevados de NO en enfermedades infecciosas, inflamatorias, autoinmunes, y durante la reacción a antígenos tumorales y de transplante. Se sugirió que la sobre-expresión de NO era la causa de la depresión inmunológica sistémica en los portadores de tumores, y en animales con desórdenes autoinmunes e inflamatorios. Dado que los macrófagos pueden modular la proliferación de los linfocitos estimulados con mitógenos o con antígeno, se consideró que el NO podría ser la molécula regulatoria también en estos sistemas.

Característicamente, los macrófagos poseen dos enzimas inducibles, la NOS-2 y la arginasa (Arg-1), que comparten a la L-arginina como sustrato. Las citocinas asociadas a TH1 (T helper 1), IFN- γ y TNF- β , activan la NOS-2, mientras que las citocinas tipo TH2, IL-4, IL-10 e IL-13, inducen Arg-1.



Modificado de J. MoranLife, *Sciences Education*, Vol 5: 287-296, 2006

Es interesante remarcar que durante la presentación de antígeno a linfocitos CD4+ TH1 ó TH2 por macrófagos o células dendríticas, también se observa la activación preferencial de estas enzimas. Por lo tanto, de una manera similar a la del paradigma TH1 vs TH2, la activación mediada por citocinas de una de las enzimas se acompaña de la activa supresión de la otra.

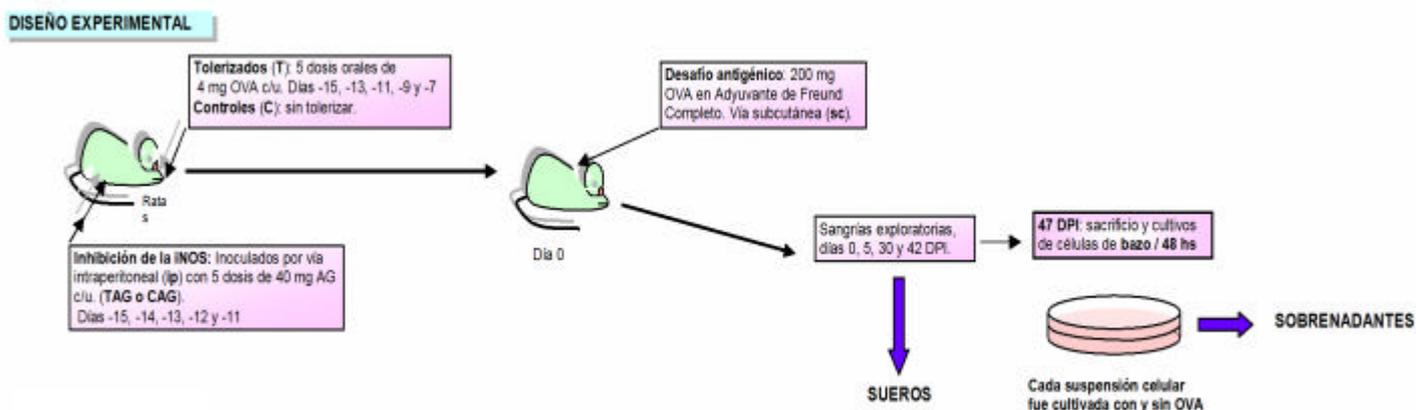
Debido a que las citocinas TH2 se asocian generalmente a estados de tolerancia y a varias formas de inhibición de la respuesta inmune, nosotros sugerimos que un corrimiento de la respuesta hacia el tipo TH2 por inhibición de la iNOS podría contribuir al desarrollo de tolerancia al antígeno OVA administrado oralmente.

Nuestra hipótesis es que el NO podría estar involucrado en la regulación de la respuesta inmune a antígenos ingeridos, actuando como inmunomodulador del nivel de producción de citocinas, influenciando el balance entre las citocinas TH1 y TH2. Su síntesis se regula dentro de la célula presentadora (APC: dendrítica o macrófago), según el perfil de citocinas predominante en el entorno.

Materiales y Métodos

Dado que las células TH1 producen entre otras, inmunoglobulina G2a, e interleucina 12, mientras que las TH2 producen inmunoglobulina G1 e interleucina 10, podemos determinar el tipo de respuesta mediante el dosaje por ELISA directo de dichas inmunoglobulinas a partir del suero de los animales tratados. Por otra parte, en el cultivo de células de bazo de estos animales, estimuladas “in vitro” con el antígeno correspondiente mediremos interleucinas. Para esto último se utiliza la técnica de ELISA de captura que permite determinar la masa de interleucina en la muestra.

El esquema experimental utilizado es el siguiente:



Resultados

Parte I

Para establecer la relación TH1/TH2 en animales tolerizados por vía oral, dosamos primero la subclase de anticuerpos producidos en respuesta a un desafío sistémico con el antígeno tolerizante, la OVA. Lo analizamos en suero de ratas tratadas y no tratadas con AG por vía intraperitoneal.

Por la técnica de ELISA obtuvimos por separado los títulos de ambas subclases de IgG (IgG2a: perfil TH1vs IgG1: perfil TH2)

1- Tratar con AG mientras los animales se tolerizan ¿tiene efecto sobre el perfil de su respuesta sistémica al antígeno?

La consecuencia de la tolerización oral en ausencia de AG fue la inhibición significativa de la respuesta tipo TH1, comparada con la de los Controles (no tolerizados) : CONT vs TOL, $p=0.00083$, medida como IgG2a a 47 DPI (días post-desafío subcutáneo con OVA en AFC).

No se observó diferencia significativa en la respuesta tipo TH2, medida como IgG1, después de la maniobra de tolerización oral.

Significa que la tolerización con bajas dosis de antígeno oral cambia la relación TH1/TH2 hacia el perfil TH2, debido a la inhibición de la respuesta por la vía TH1.

Por otra parte, el tratamiento con AG revela una diferencia de sensibilidad al inhibidor de la iNOS. La respuesta TH1, medida a partir del título de IgG2a, era menor en los tolerizados que no fueron tratados con AG: TOLvsTAG, $p=0.041$, mientras la respuesta TH2, medida a partir del título de IgG1, era prácticamente la misma en tres de los cuatro grupos. **Fig.1 y 2**

Fig.1

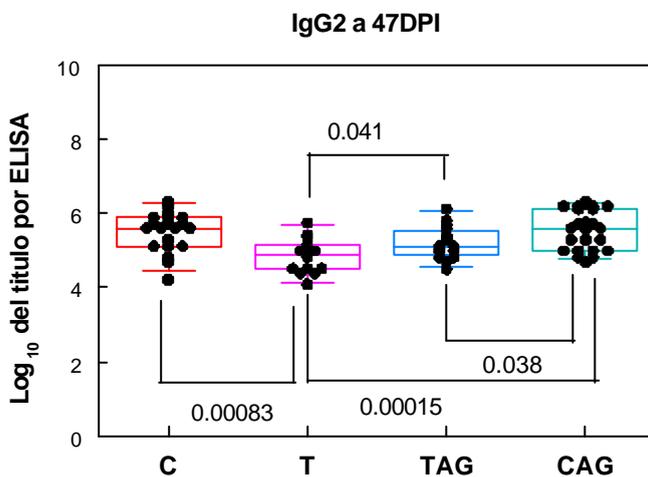
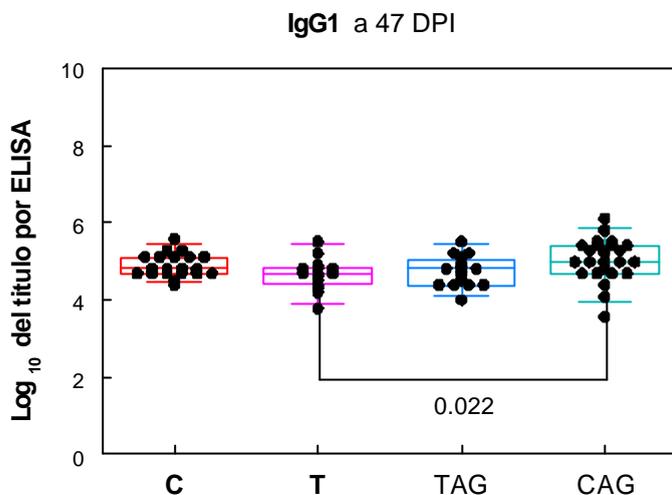


Fig.2



Se representa el Log de los títulos a punto final por ELISA indirecto de los sueros de ratas de los grupos experimentales descriptos, tomados a 47 días post-desafío con FCA.

La tolerización fue más efectiva en ausencia de AG: es como si la AG estuviera contrarrestando la tolerancia oral. ¿Significa entonces que el Oxido Nítrico, que en el tipo de perfil de una tolerancia oral se produce en menor cantidad, colabora en el establecimiento de la tolerancia oral?

Para asegurar esto, hace falta analizar cómo se comportan los controles, qué sucede cuando reciben AG los animales no tolerizados.

2- Tratar con AG ¿tiene efecto sobre la cinética del perfil de la respuesta sistémica al antígeno en los animales no tolerizados (controles)?

Al analizar la variación en función del tiempo (a los 20, 34 y 47 dpi) de los títulos de cada subclase por separado, se vio que en los animales controles tratados con AG, tanto la respuesta TH1 como la TH2, muestran un crecimiento de magnitud similar, resultando el perfil semejante.

Por el contrario, en los animales controles no tratados con AG, se registran variaciones significativas de los títulos de de IgG2a (TH1), que van aumentando (C_{20DPI} vs C_{47DPI}: (p=0.0037), pero no hay variación en los de IgG1 (TH2) durante el tiempo analizado.

Por lo tanto, la relación TH1/TH2 aumentó significativamente con el tiempo en los animales no tratados con AG, y esto se debía al aumento relativo de la respuesta TH1. En cambio, aquellos tratados con AG no mostraban diferencia en el balance entre tiempos extremos.

Estos resultados indican por un lado, que la inmunización con FCA resulta en una respuesta tipo TH1, como se describe. Por otro lado, la AG incide en la respuesta sistémica de los controles induciendo respuestas TH2 junto con las esperadas TH1. De esta manera altera el perfil de respuesta de una manera no relacionada con la tolerización .

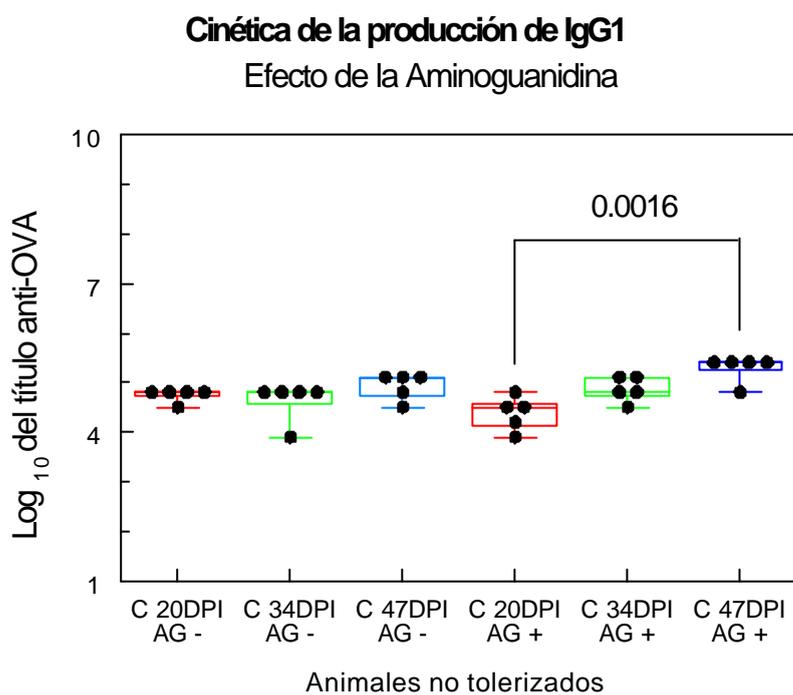


Fig. 3

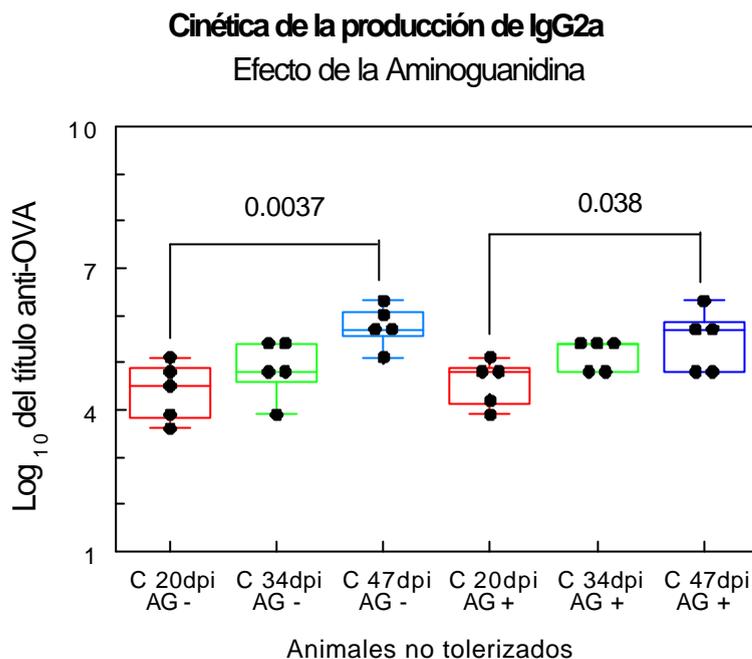


Fig. 3 y 4. Se representa el Log de los títulos a punto final por ELISA indirecto de los sueros de ratas de los grupos experimentales descritos, tomados a distintos tiempos post-desafío con FCA.

La AG no altera las respuestas TH1 pero sí las TH2, aumentándolas, en los animales no tolerizados .

Esto significaría que por efecto de la AG, en los animales no tolerizados se anula la polarización hacia una respuesta TH1, debido a la posibilidad de incorporar respuestas mediadas por TH2, cuya contribución es mayor a medida que el tiempo pasa

¿Quiere esto decir que el Oxido Nítrico está actuando como inhibidor de la respuesta TH2? En nuestros experimentos, la tolerización oral a bajas dosis no modifica la respuesta TH2 (ver Fig 2). Entonces ¿se puede decir que el Oxido Nítrico es un mediador en la tolerancia oral a bajas dosis?

Veamos si la respuesta de memoria en cultivo arroja más información que permita aclarar este punto....

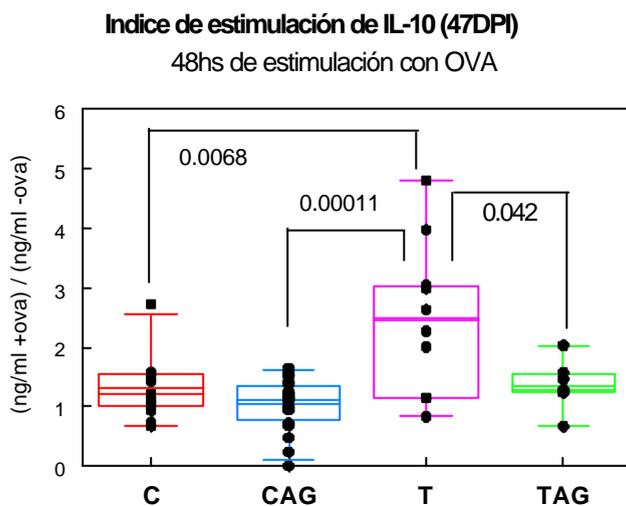
Parte II

En segundo término se estudiaron algunos marcadores producidos *in vitro* en respuesta a la estimulación por OVA de un cultivo de esplenocitos de ratas tolerizadas y no tolerizadas desafiadas por vía subcutánea con el antígeno tolerizante, la OVA en Freund Completo. Lo analizamos en ratas tratadas y no tratadas con AG por vía intraperitoneal.

Medimos en los sobrenadantes de dichos cultivos la concentración de **IL-10** como marcador del perfil TH2, y la concentración de nitritos como marcador de la producción de **Oxido Nítrico** por macrófagos activados.

3- Tratar con AG ¿cambia en algo la producción de citocinas de perfil TH2 “in vitro”?

La producción *in vitro* de **IL-10**, medida en sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con OVA, mostró aumento significativo sólo en los animales tolerizados no tratados con AG. (**Fig. 5**)



Cuantificación de IL-10 por ELISA de captura, usando IL-10 recombinante de rata como estándar de la curva de calibración (ng IL-10/ml). Se evalúan los sobrenadantes después de 48 horas de cultivo.

Esto significa que la producción de esta citocina inhibitoria (perfil TH2) podría estar favorecida por el Oxido Nítrico en animales tolerizados, los cuales efectivamente han disminuido su capacidad para producir anticuerpos específicos IgG2a (perfil TH1) anti -OVA.

Podríamos suponer que el control negativo ejercido por la vía TH2 sobre la vía TH1 podría usar, entre otros posibles factores, al Oxido Nítrico como mediador (inhibitorio).

4- Tratar con AG, ¿influye sobre la producción de Oxido Nítrico durante la re-estimulación “in vitro”?:

La producción de **nitritos** en los sobrenadante de cultivo de células de bazo estimuladas con OVA se vio significativamente aumentada sólo en los animales tolerizados y tratados con AG. (**Fig. 6**)

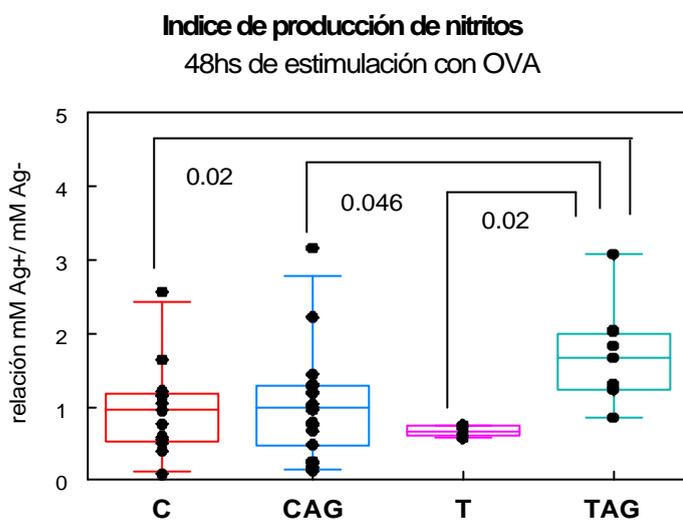


Fig. 6. Cuantificación de Nitrito en sobrenadantes de cultivo de bazo: ensayo en microplaca con el Reactivo de Griess (Britania). Curva estándar con nitrito de sodio. Se informa el índice de estimulación: (NO)⁺ova / (NO)⁻ova de los esplenocitos cultivados durante 48 horas.

Esto significaría que el efecto de la aminoguanidina, inhibitorio de la iNOS durante la inducción de la tolerización, al permitir un predominio de respuesta TH2, hace que las células originadas en el GALT que pueblan el bazo luego de 47 dpi puedan, estimulados por citocinas de la vía TH2, responder al antígeno in vitro con mayor producción de ON.

Esta población TH2 (capaz de activar a los macrófagos mediante las citocinas estimuladoras para la producción de ON) no se encontraría en los bazos de los animales tolerizados cuya iNOS no fue inhibida durante la tolerización.

Para poder definir mejor el papel del óxido nítrico y su regulación en la Tolerancia oral a bajas dosis, continuaremos dosando las citocinas Interferón gamma (del perfil TH1), y la IL-12 (del perfil TH2) . Dicha investigación está en curso.

Conclusiones

∅ El perfil de citocinas de los animales tolerizados con baja dosis de Ag oral es predominantemente TH2, debido a la tolerización de la población TH1. Esto no solo se reflejó en los niveles de anticuerpos de cada subclase sino también en el nivel de IL-10 encontrado en el sobrenadante de cultivo de bazo estimulado con el antígeno específico.

∅ Cuando se administra AG conjuntamente con el Ag oral, el perfil cambia a TH1. Los no tolerizados no presentaban alteraciones del perfil TH1, ya sea que hubieran recibido o no AG. Sin embargo los controles que sí recibieron AG mostraron una variación significativa del nivel de IgG1 con respecto a los que no la recibieron .

∅ Por otro lado, la producción de nitritos *in vitro* sólo se vió aumentada en las células provenientes de los animales tolerizados y tratados con AG. En éstos, la inhibición de la producción de óxido nítrico en la fase de inducción de tolerancia fue doble, ya que por un lado la AG compete con la Arginina como sustrato de la enzima iNOS, y por otro, el perfil de la tolerancia oral (TH2) estaría facilitando la metabolización de la Arginina por la vía de la urea. Para explicar esta aparente contradicción, podríamos suponer el disparo de algún mecanismo compensatorio que haya aumentado la producción basal de ON de esas células una vez en cultivo.

∅ Suponemos que el óxido nítrico, como molécula regulatoria, colabora en el establecimiento del tipo de perfil TH1/TH2 y que su ausencia altera el balance normal .

Bibliografía

1. Corbett, JA & McDaniel, ML (1996) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Methods Enzymol* **268**, 398-408.
2. Franco, L, Benedetti, R, Ferek, GA, Massouh, E & Flo, J (1998) Priming or tolerization of the B- and TH2-dependent immune response by the oral administration of OVA-DNP is determined by the antigen dosage. *Cell Immunol* **190**, 1-11.
3. Gutcher, I & Becher, B (2007) APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* **117**, 1119-27.
4. Kidd, P (2003) TH1/TH2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**, 223-46.
5. Niedbala, W, Wei, XQ, Campbell, C, Thomson, D, Komai-Koma, M & Liew, FY (2002) Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16186-91.
6. Rizzo, LV, Morawetz, RA, Miller-Rivero, NE, Choi, R, Wiggert, B, Chan, CC, Morse, HC 3rd, Nussenblatt, RB & Caspi, RR (1999) IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J Immunol* **162**, 2613-22.
7. van der Veen, RC (2001) Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol* **1**, 1491-500.
8. Zhang, X, Izikson, L, Liu, L & Weiner, HL (2001) Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* **167**, 4245-53.

Agradecimiento

Este trabajo fue realizado con fondos del subsidio UBACyT X120.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 7, Abril 2008

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar