

AUMENTO DE LINFOCITOS T REGULATORIOS EN LOS GANGLIOS LINFOIDES DE RATONES MUTANTES PARA CATEPSINA L

GABRIELA CAMICIA, MARIA NOEL BADANO, ANDREA MAGLIOCO, GABRIEL CABRERA, HECTOR COSTA, ISABEL PIAZZON, IRENE NEPOMNASCHY

División Medicina Experimental (ILEX-CONICET) Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen Las células T regulatorias CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) han sido implicadas en el rechazo al trasplante de órganos alogeneicos, en cáncer, infecciones y enfermedades autoinmunes. Así, su modulación posee un enorme potencial para el tratamiento de estas enfermedades. En este trabajo se evaluó la influencia de la catepsina L (CTSL) sobre la homeostasis de las células Treg. Los ratones CTSL^{nkt/nkt}-mutantes para CTSL presentaron una reducción en el número de células Treg en el timo. Contrariamente, en los ganglios linfáticos el número de células Treg y su frecuencia dentro de la población CD4+ se incrementaron. La ausencia de actividad de CTSL en las células CD4+ de los ganglios linfoides -y no en su entorno- incrementó su tasa de proliferación. Las células Treg y las T CD4+ convencionales (CD4+CD25-Foxp3-) de los ratones mutantes mostraron aumentos similares en su tasa de proliferación, sugiriendo que la proliferación contribuye al incremento en el número de células Treg, pero el aumento en su frecuencia no derivaría exclusivamente del incremento en su proliferación. Por otra parte, no se observó una disminución en los niveles de apoptosis de células Treg. Teniendo en cuenta que la producción diaria de timocitos CD4+ está disminuida en los ratones CTSL^{nkt/nkt}, estos resultados sugieren que el incremento de células Treg en los ganglios linfoides de estos mutantes no derivaría de una mayor exportación tímica, y permiten hipotetizar que la ausencia de actividad de CTSL favorecería la adquisición del fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ a partir de células CD4+CD25-Foxp3- en la periferia.

Palabras clave: catepsina L, células T regulatorias CD4+

Abstract *Increase of regulatory T cells in the lymph node of cathepsin L mutant mice.* Regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T cells (Treg) have been implicated in different pathologies including cancer, infections and autoimmune diseases and in the rejection of allogeneic organ transplantation. Thus, modulation of Treg activity has a great potential in the treatment of these pathologies. Herein, we evaluated the influence of cathepsin L (CTSL) on Treg homeostasis. CTSL mutant mice (CTSL^{nkt/nkt}) showed a decrease in the absolute number of thymic Treg cells. In contrast, the absolute number of lymph node Treg cells and their frequency within CD4+ cells were increased. The absence of CTSL activity in CD4+ T cells –and not in their environment– increased the proliferation rate of lymph node CD4+ T cells. Treg and T CD4+ conventional (CD4+CD25-Foxp3-) cells from mutant mice showed similar increases in their proliferative levels as compared with control mice, suggesting that although proliferation contributes to the increases in their number, the augmentation in the frequency of Treg cells is not only associated to increases in proliferation. Furthermore, the Treg apoptosis rate was not decreased in the lymph node of CTSL^{nkt/nkt} mice. Taking into account that the daily CD4+ thymic production is diminished in mutant mice, our results suggest that peripheral Treg increases are probably not the result of increased thymic output and raise the possibility that a conversion to Treg phenotype would be favored in the CD4+ T cells peripheral pool of CTSL mutant mice.

Key words: cathepsin L, regulatory CD4+ T cells

En los últimos años las células T regulatorias (Treg) han sido implicadas en diversos procesos patológicos, observándose altos niveles de estas células en ciertos tipos de

cáncer¹ y enfermedades infecciosas y una reducción en su número en enfermedades autoinmunes y procesos alérgicos². Las terapias basadas en la modulación del número y la actividad de las células Treg poseen un gran potencial para el tratamiento de estas enfermedades así como para disminuir el rechazo en los trasplantes de órganos alogeneicos. En este sentido, la identificación de los factores involucrados en la homeostasis de las células Treg resulta de gran interés para avanzar en estrategias que permitan modular su generación, expansión o disminución con fines terapéuticos.

Recibido: 6-IV-2011

Aceptado: 31-V-2011

Dirección postal: Dra. Irene Nepomnaschy, ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina
Fax (54-11) 4803 9475 e-mail: irenepo@hematologia.anm.edu.ar

Las células Treg se caracterizan por la expresión de la cadena alfa del receptor para la interleukina 2 (CD25) en la superficie celular y la expresión intracelular del factor de transcripción *Foxp3* (*forkhead box protein P3*). Estas células, que comprenden del 5 al 10% del pool de células T CD4+ periféricas, constituyen una población linfocítica clave para el control de la respuesta inmune adaptativa y la tolerancia periférica hacia lo propio². La presencia de mutaciones en el gen que codifica para *Foxp3* causa una profunda desregulación del sistema inmune y está asociada a la aparición de enfermedades autoinmunes y alergia⁴. Las células Treg CD4+CD25+Foxp3+ denominadas naturales se originan en el timo mientras que la inducción de células CD4+CD25+Foxp3+ a partir de células CD4+ vírgenes en la periferia da lugar a las denominadas Treg adaptativas o inducidas. La funcionalidad y la supervivencia de las células Treg naturales e inducidas dependen de la estimulación del receptor para el antígeno (TCR), de receptores coestimuladores como el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y de diversos factores como el factor de crecimiento tumoral (TGF β) y citoquinas como la IL-2 e IL-10⁵.

La cathepsina L (CTSL) es una endoproteasa de expresión ubicua que pertenece a la familia de las papaínas. Su presencia en los endolisosomas y su capacidad para

degradar un amplio espectro de proteínas intracelulares indican su participación en el recambio proteico general, mientras que diversos reportes muestran su participación en funciones altamente específicas⁶⁻⁸.

Utilizando ratones CTSL^{nkt/nkt}, portadores de una delección en el gen que codifica para CTSL⁹, demostramos anteriormente que la CTSL posee una amplia influencia sobre el sistema inmune, interviniendo en la regulación del número y la composición de las poblaciones T linfocíticas centrales y periféricas¹⁰. En estos mutantes -así como en los ratones KO para esta proteasa⁷- la selección positiva de las células T CD4+ se encuentra alterada, lo que se evidencia en una severa disminución del número de timocitos CD4 simple positivos (SP)⁸. Sin embargo, determinamos que en los ganglios linfoides (GL) de los ratones CTSL^{nkt/nkt} el número absoluto de células CD4+ alcanza niveles normales, mientras que el número de linfocitos CD8+ se encuentra aumentado¹⁰. Observamos además un aumento significativo en el número absoluto de células CD4+CD25+ en los GL de estos mutantes.

En este trabajo investigamos si la ausencia de actividad para CTSL correlaciona con aumentos en el número de células Treg y comenzamos a estudiar los mecanismos que intervienen en el mantenimiento de la homeosta-

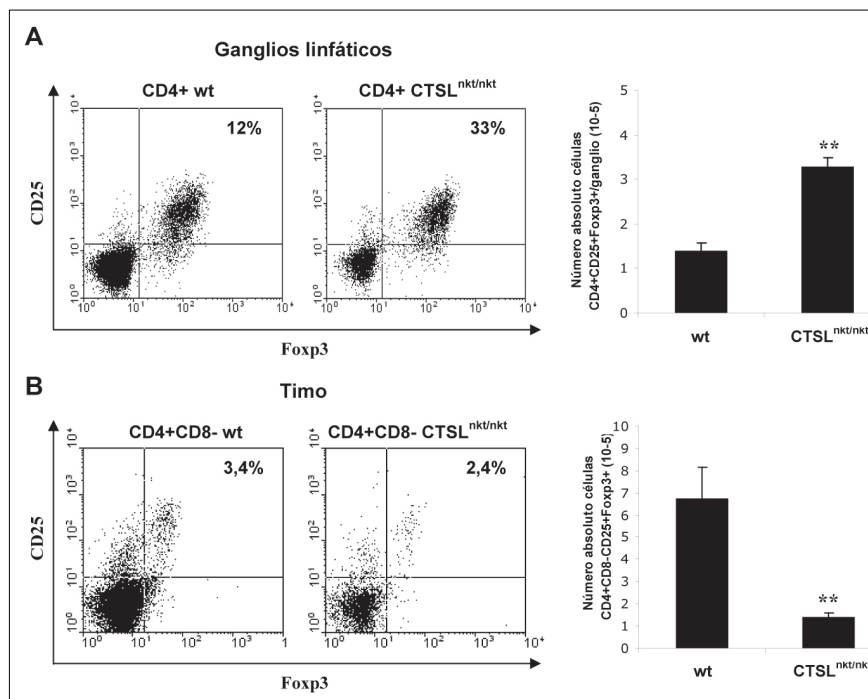


Fig. 1.- La mutación *nkt* induce alteraciones contrapuestas en el número de células Treg en el timo y los GL. Células de GL y timo de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD8 y anti-Foxp3 conjugados a distintos fluorocromos y analizadas por FACS. Se muestran dot plots representativos de la expresión de CD25 y Foxp3 en la población T CD4+ de GL (A) y en la CD4 SP del timo (B). Los gráficos de barras indican el número absoluto de células CD4+CD25+Foxp3+. Los datos se presentan como la media \pm SD; n = 4. **p < 0.005. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

sis de las poblaciones CD4+ Treg y T convencionales (CD4+CD25-Foxp3-) en estos mutantes.

Mediante el uso de citometría de flujo (FACS) y marcación con anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos determinamos que en los GL de los mutantes para CTSL tanto el porcentaje de células CD25+Foxp3+ dentro de la población CD4+ como el número absoluto de células CD4+CD25+Foxp3+ están significativamente aumentados (Fig.1A). Sin embargo, el porcentaje de timocitos CD4 SP que expresan CD25 y Foxp3 no difirió significativamente del de los ratones control (Fig. 1B) y el número absoluto de timocitos CD4+CD25+Foxp3+ resultó

un tercio de los valores normales. Estos datos, junto con resultados anteriores que indican que la exportación diaria de timocitos CD4+ a la periferia está disminuida¹⁰, sugieren que el aumento en la frecuencia y el número de células Treg en los GL de los ratones CTSL^{nkt/nkt} no dependería de una mayor producción tímica de dichas células.

Investigamos entonces si los niveles de supervivencia y/o proliferación de las células Treg se encontraban incrementados en la periferia. Mediante tinción con anexina V y análisis por FACS determinamos el porcentaje de apoptosis basal de las células Treg CD4+CD25+ en los GL. Cabe señalar que en nuestras condiciones

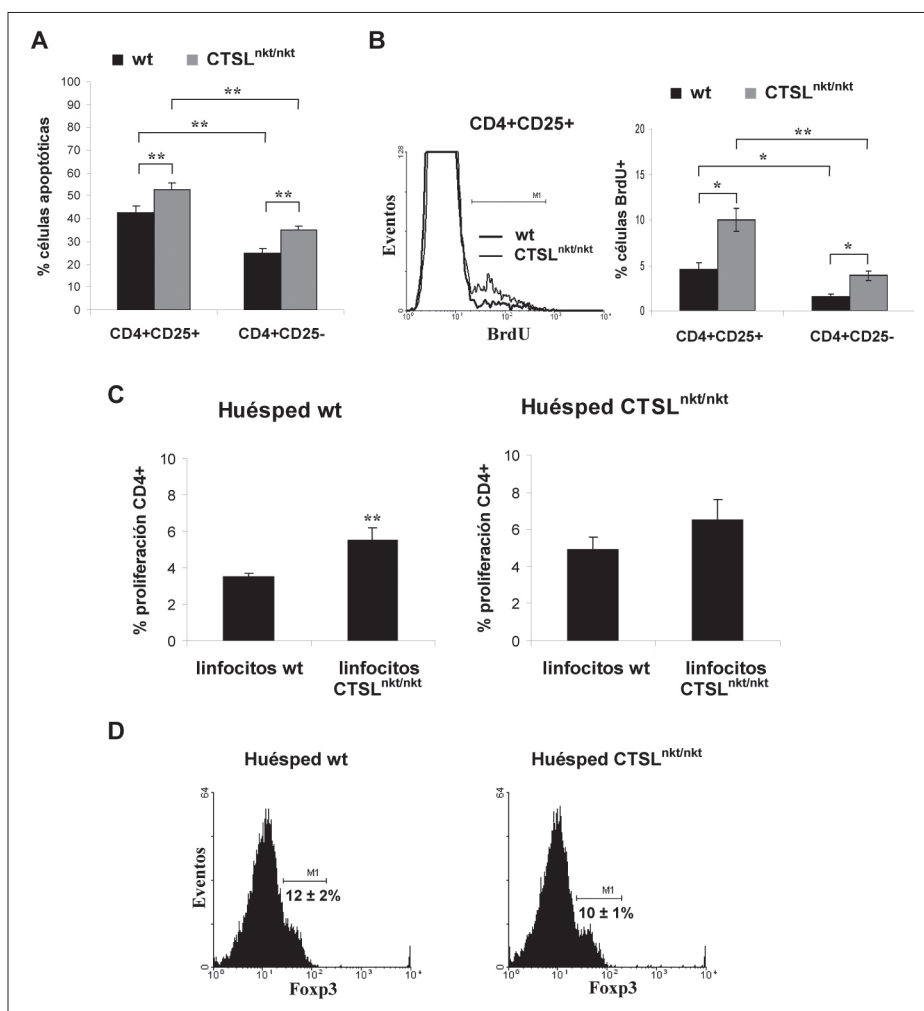


Fig. 2.- Células de GL de ratones mutantes y wt fueron marcadas en superficie con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25. Los niveles de apoptosis fueron determinados por tinción con anexina V y análisis por FACS (A). Ratones CTSL^{nkt/nkt} y wt fueron inoculados i.p. con 2 mg de BrdU durante 2 días consecutivos. Al día siguiente de la última inoculación los ratones fueron sacrificados y el porcentaje de incorporación de BrdU en las poblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- de los GL determinado por FACS (B). Células de GL de ratones CTSL^{nkt/nkt} y wt fueron marcadas con CFSE e inoculadas en huéspedes mutantes y normales. Siete días después los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron células de GL. Se analizó por FACS el nivel de proliferación de la población CD4+CFSE+ por dilución de la marca del CFSE (C) y la expresión de Foxp3+ dentro de la población CD4+CFSE+ (D). Los datos representan la media ± SD; n = 4. *p < 0.05; **p < 0.005. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

experimentales (ratones criados en ambientes libres de patógenos específicos) un 90% de los linfocitos CD4+CD25+ expresan Foxp3. Como puede observarse en la Fig. 2A, no sólo no se observó una disminución en los niveles de apoptosis de las células Treg CTSL^{nkt/nkt} sino que los mismos se encontraron significativamente aumentados.

Con el objeto de determinar los niveles de proliferación *in vivo* de las células Treg, se inoculó 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) durante dos días consecutivos en ratones normales y mutantes. Tanto las células Treg CD4+CD25+ como las T convencionales CD4+CD25- de los ratones CTSL^{nkt/nkt} mostraron niveles de proliferación basal 2 a 3 veces mayores que los de los ratones normales (Fig 2B). Determinamos además, en ensayos de cultivo mixto de linfocitos alogeneico, que las células CD4+CD25+ mutantes poseen una actividad regulatoria similar a la de los ratones control (datos no mostrados).

Con el objeto de investigar si es la ausencia de actividad de CTSL en los linfocitos CD4+ o en el microambiente de los GL la que afecta la tasa de proliferación de las células CD4+, células de GL de ratones mutantes y normales fueron marcadas con carboxyfluorescein-succinimidi éster (CFSE) e inoculadas en forma endovenosa en huéspedes normales y mutantes. Al día 7 post-inoculación analizamos la tasa de proliferación en la población CD4+CFSE+. La proliferación de los linfocitos CD4+ provenientes de ratones mutantes fue significativamente mayor independientemente del fenotipo wt o CTSL^{nkt/nkt} del huésped (Fig 2C), indicando que la ausencia de actividad de CTSL en los linfocitos CD4+ afecta su nivel de proliferación. Por otra parte, analizamos la expresión de Foxp3 dentro de la población CD4+CFSE+ para evaluar si el microambiente de los GL CTSL^{nkt/nkt} era capaz de inducir la expresión de Foxp3 en la población CD4+. Observamos que los linfocitos CD4+CFSE+ provenientes de ratones wt mostraron el mismo porcentaje de células Foxp3 cuando fueron inoculados en huéspedes normales o mutantes (Fig 2D), sugiriendo que al menos en nuestras condiciones experimentales, el microambiente CTSL^{nkt/nkt} de los GL no influenciaría la expresión de Foxp3.

Discusión

El estado de inmunocompetencia de un individuo depende del mantenimiento de un conjunto estable de linfocitos vírgenes, regulatorios y de memoria y del equilibrio numérico entre estas poblaciones. Una mejor comprensión de los factores que coadyuvan en el mantenimiento de la homeostasis de estas poblaciones linfoides puede resultar de gran ayuda para comprender la génesis de los procesos patológicos donde se pierde este equilibrio (desde procesos linfoproliferativos hasta inmunodeficiencias y procesos de alergia) y, en última instancia, aportar

elementos que contribuyan al mejoramiento del manejo clínico de estas enfermedades.

En este trabajo mostramos que ratones deficientes en CTSL funcional presentan un aumento en el número absoluto de células Treg y en la frecuencia de linfocitos CD25+Foxp3+ dentro de la población CD4+ de los GL. Sin embargo, en el timo de estos mutantes la frecuencia de las células CD25+Foxp3+ dentro de la población CD4+ es normal, mientras que el número absoluto de células Treg se encuentra significativamente disminuido. Habíamos determinado previamente que la exportación diaria de timocitos CD4+ a la periferia está disminuida en los ratones mutantes¹⁰. Aunque no puede descartarse la existencia de una emigración diferencial de timocitos CD4+CD25+Foxp3+ en los ratones CTSL^{nkt/nkt}, su número total alcanza solo a un tercio del de los ratones normales. Estos datos sugieren que una alteración en la exportación de timocitos Treg no sería responsable del aumento en la frecuencia y el número de células Treg periféricas en los mutantes para CTSL. Sugieren además que tanto la normalización del número de células CD4+ como el aumento del número y la frecuencia de las células Treg dentro de la población CD4+ ocurrirían a través de mecanismos homeostáticos actuantes en la periferia de los mutantes CTSL^{nkt/nkt}.

Utilizando ratones KO para CTSL se ha determinado que la proporción de células Foxp3+ dentro de la población CD4+ está aumentada tanto en la periferia¹¹⁻¹² como en el timo¹². La mutación *nkt* abarca el fin del exón 6 y casi todo el exón 7 del gen *Ctst*; de acuerdo a las secuencias reportadas, el extremo carboxi-terminal de la proteína debería estar ausente en los ratones portadores de esta mutación⁹. Se ha sugerido¹³ que la ausencia de los 15 aminoácidos terminales en la CTSL humana determinaría la retención de la proteína en el retículo endoplásmico, probablemente debido a un plegamiento impropio. Anteriormente demostramos que los mutantes CTSL^{nkt/nkt} efectivamente expresan la forma mutada de la proteína¹⁰; este hecho abre la posibilidad de la existencia de diferencias –por ejemplo en la maduración tímica–, entre los ratones KO para CTSL y los mutantes CTSL^{nkt/nkt}.

Nuestros resultados muestran un notable aumento en los niveles de proliferación basal de las células Treg en los GL de los mutantes CTSL^{nkt/nkt}. No obstante, se observaron también incrementos en la tasa de proliferación de las células T convencionales, lo que sugiere que si bien el aumento en los niveles de proliferación de las células Treg incide en el número de células Treg de los GL, no sería el principal responsable del aumento en su proporción.

Los datos obtenidos por transferencia cruzada de linfocitos sugieren que el aumento en los niveles de proliferación de las células CD4+ derivaría del efecto de la mutación *nkt* en el gen *Ctst* en las células CD4+. Además, se observó que independientemente del huésped al que se transfieren los linfocitos, la frecuencia de células que

expresa Foxp3 no se modifica. Conjuntamente, estos resultados permiten hipotetizar que es la ausencia de actividad de CTSL en las células CD4+, y no el microambiente de los GL mutantes, lo que induciría el incremento en la expresión de Foxp3.

Recientemente Sugita y col. determinaron mediante ensayos *in vitro* que el epitelio pigmentario de la retina induce aumentos en el número de células Treg¹⁴. Estos aumentos estarían asociados a la producción de CTLA-2 α , un inhibidor específico de la CTSL que induciría la conversión de células T convencionales en células Treg, estando implicada la señalización a través del TGF β . En este trabajo demostramos que los GL de los mutantes para CTSL presentan un aumento significativo en el número absoluto de células Treg y en su porcentaje dentro de la población CD4+ que no derivaría de un aumento en la producción de estas células por el timo. Teniendo en cuenta además que no se observó un aumento diferencial en la tasa proliferativa de las Treg respecto de las T convencionales, y que los niveles de apoptosis de las células Treg no están disminuidos, los resultados obtenidos permiten hipotetizar que la ausencia de actividad de CTSL favorecería la adquisición de un fenotipo Treg a partir de células T CD4+ convencionales en la periferia.

Entre las proteasas que actualmente se consideran blancos terapéuticos potenciales para el tratamiento del cáncer, la CTSL ocupa un lugar prominente. Diferentes protocolos proponen el uso de CTSL o sus inhibidores como parte de tratamientos frente a diversas neoplasias¹⁵. Las células Treg han sido implicadas en ciertos procesos patológicos, incluyendo la presencia de niveles elevados de células Treg en ciertos tipos de cáncer y actualmente se acepta que las células Treg participan en la tolerancia frente a tumores¹. En particular, se ha propuesto que las células Treg inducidas constituirían una de las barreras más importantes para la erradicación de los tumores³. El aumento del número y la frecuencia de las células Treg determinado por la ausencia de actividad de CTSL deberían ser tomados en cuenta como un posible efecto no deseado cuando se evalúa la aplicación de tratamientos antineoplásicos que incluyen la inhibición de la actividad de esta proteasa.

Agradecimientos: a Gabriela Camerano por la cría de ratones mutantes en condiciones libres de patógenos específicos.

Financiamiento: Este trabajo ha sido financiado por el CONICET (PIP 6027 (IN) y 2494 (IP)) y por FUNDALEU.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010; 127: 759–67.
2. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775–87.
3. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626–35.
4. Lyon MF, Peters J, Glenister PH, Ball S, Wright E. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2433–7.
5. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009; 21: 1105–11.
6. Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* 2010; 120: 3421–31.
7. Nakagawa T, Roth W, Wong P, et al. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 1998; 280: 450–3.
8. Nepomnaschy I, Lombardi G, Bekinschtein P, et al. Alterations during positive selection in the thymus of nact CD4-deficient mice. *Scand J Immunol* 2000; 52: 555–62.
9. Benavides F, Venables A, Poetschke Klug H, et al. The CD4 T cell-deficient mouse mutation nact (nkt) involves a deletion in the cathepsin L (CtSL) gene. *Immunogenetics* 2001; 53: 233–342.
10. Lombardi G, Burzyn D, Mundiñano J, et al. Cathepsin-L influences the expression of extracellular matrix in lymphoid organs and plays a role in the regulation of thymic output and of peripheral T cell number. *J Immunol* 2005; 174: 7022–32.
11. Maehr R, Mintern JD, Herman AE, et al. Cathepsin L is essential for onset of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Clin Invest* 2005; 115: 2934–43.
12. Hsing LC, Kirk EA, McMillen TS, et al. Roles for cathepsins S, L, and B in insulinitis and diabetes in the NOD mouse. *J Autoimmun* 2010; 34: 96–104.
13. Chauhan SS, Ray D, Kane SE, Willingham MC, Gottesman MM. Involvement of carboxy-terminal amino acids in secretion of human lysosomal protease cathepsin L. *Biochemistry* 1998; 37: 8584–94.
14. Sugita S, Horie S, Nakamura O, et al. Acquisition of T regulatory function in cathepsin L-inhibited T cells by eye-derived CTLA-2 α during inflammatory conditions. *J Immunol* 2009; 183: 5013–22.
15. Lankelma JM, Voorend DM, Barwari T, et al. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci* 2010; 86: 225–33.

¿Qué sería el hombre descrito por el mono? Probablemente un caso deplorable de degeneración, caracterizada por las manías contagiosas de hablar, de pensar y de creer.

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Charlas de café. Madrid: Colección Austral, Espasa Calpe, S.A., 1978, p 256