

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**REGULACIÓN DE LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T  
REGULADORES POR INTERFERÓN-GAMMA EN  
ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE)**

**GABRIEL ALEJANDRO DE JESÚS ARELLANO LORCA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Director de Tesis: Dr. Rodrigo Naves Pichuante  
Prof. Dra. Marcela Hermoso Ramello**

**2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

**GABRIEL ALEJANDRO DE JESÚS ARELLANO LORCA**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Diciembre del 2017.

---

**Dr. Rodrigo Naves Pichuante**  
Director de Tesis  
Programa de Inmunología,  
Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile

---

**Prof. Dra. Marcela Hermoso Ramello**  
Director de Tesis  
Programa de Inmunología,  
Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

---

**DRA. KARINA PINO**

---

**DRA. MIRENTXU IRURETAGOYENA**

---

**DR. RODRIGO PACHECO**

---

**PROF. DR. JUAN CARLOS AGUILLÓN**  
Presidente Comisión de Examen

*“Dedicado a mi madre María Isabel Lorca y hermano Javier Arellano, quienes me han brindado su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida, confiando en mis capacidades para lograr finalizar este proyecto. Al recuerdo de mi padre David Arellano, que de igual manera, fue parte importante en el desarrollo mi vida.*

*A mis sobrinos, Matías y Laura Arellano, cuya alegría fue fundamental para no decaer en los momentos difíciles.*

*Finalmente, a Daniela Retamales, por apoyarme durante estos 5 años de arduo trabajo, acompañandome en los buenos y malos momentos. Gracias por tu amor y paciencia.*

*Los Quiero y Amo mucho.”*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia, Madre y Hermano, quienes son el pilar fundamental de mi vida, por su apoyo y amor incondicional. A Daniela, por estar a mi lado, y acompañarme durante este proceso con amor y cariño. A mis sobrinos que siempre me hacen sonreír ¡Son lo mejor! Los amo.

Agradezco a mis tutores, el Dr. Rodrigo Naves y la gente del laboratorio de Neuroinmunología, por guiarme, la confianza y abrirme las puertas para desarrollar este proyecto. A la Dra. Marcela Hermoso y la gente del laboratorio de Inmunidad Innata, por el apoyo y facilitarme sus instalaciones.

Al Dr. Stephen Miller, de Northwestern University, y todo el equipo de su laboratorio, que me brindaron enseñanzas y por la generosidad de acogerme durante mi pasantía.

A mi comisión de Tesis, por ayudarme a la discusión y por el tiempo invertido en la evaluación de este proyecto.

A mis amigos y amigas de la vida, del colegio, de *Warlike*, de Bioquímica, así como mis compañeros y amigos del PDCBM, y de Chicago.

Agradezco al PDCBM, en particular a Cecy, por su ayuda y apoyo, y a toda la gente que, de alguna u otra manera, estuvo conmigo durante el desarrollo de esta tesis.

¡Gracias por todo!.

**ESTA TESIS CONTO CON EL FINANCIAMIENTO DE:**

Beca CONICYT de doctorado nacional 2013 (21130452).

FONDECYT 1140049

MECESUP UCH 1304

Laboratorio de Neuroinmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Miller Lab, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, USA.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>Esclerosis Múltiple .....</b>	<b>12</b>
<b>Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE).....</b>	<b>13</b>
<b>Inmunopatogénesis de la EM y EAE: Contribución de linfocitos T helper (h)-1 y Th17. 14</b>	<b>14</b>
<b>Células presentadoras de antígeno (APC). .....</b>	<b>15</b>
<b>Linfocitos T reguladores (Tregs).....</b>	<b>17</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>19</b>
<b>Rol de IFN-<math>\gamma</math> en la EM y EAE .....</b>	<b>19</b>
<b>Regulación de linfocitos Treg por IFN-<math>\gamma</math> .....</b>	<b>23</b>
<b>II. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo general.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>26</b>
1. Determinar el efecto de IFN- $\gamma$ sobre distintas poblaciones de linfocitos T reguladores periféricos e infiltrantes en el SNC.....	26
2. Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$ <i>in vitro</i> sobre linfocitos T reguladores y su capacidad supresora sobre linfocitos T efectoras.....	26
3. Identificar el mecanismo por el cual IFN- $\gamma$ favorece la inducción de linfocitos T reguladores supresores de la EAE. ....	27
<b>IV. METODOLOGÍA .....</b>	<b>28</b>
<b>Cepas de ratones .....</b>	<b>28</b>
<b>Inducción de la EAE .....</b>	<b>28</b>
<b>Tratamientos y grupos experimentales .....</b>	<b>29</b>
<b>Extracción de células infiltrantes del SNC .....</b>	<b>30</b>
<b>Extracción de esplenocitos y células mononucleares de nódulos linfáticos.....</b>	<b>30</b>
<b>Análisis de expresión de mRNA por PCR en tiempo Real. ....</b>	<b>30</b>
<b>Separación de células.....</b>	<b>31</b>
<b>Cultivo Celular.....</b>	<b>32</b>
<b>Estimulación con IFN-<math>\gamma</math> <i>ex vivo</i> de células totales.....</b>	<b>32</b>
<b>Estimulación con IFN-<math>\gamma</math> <i>in vitro</i> de linfocitos CD4+CD25-, CD4+CD25+ y células CD11b+. ....</b>	<b>33</b>
<b>Proliferación y Apoptosis celular.....</b>	<b>33</b>
<b>Análisis de citometría de flujo .....</b>	<b>34</b>
<b>Análisis de secreción de citoquinas.....</b>	<b>35</b>
<b>Ensayo de inhibición de la proliferación de linfocitos T efectoras .....</b>	<b>35</b>
<b>Ensayo de inducción de linfocitos Tregs por células CD11b+ estimuladas con IFN-<math>\gamma</math>...35</b>	<b>35</b>
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>Objetivo específico 1: Determinar el efecto de IFN-<math>\gamma</math> sobre distintas poblaciones de linfocitos T reguladores periféricos e infiltrantes en el SNC.....</b>	<b>37</b>
<i>Determinar si el efecto protector de IFN-<math>\gamma</math> <i>in vivo</i> depende de linfocitos T reguladores .....</i>	<i>37</i>

<i>Determinar el efecto de IFN-<math>\gamma</math> sobre las distintas sub-poblaciones de linfocitos T reguladores.</i> .....	41
<i>Evaluar si el efecto de IFN-<math>\gamma</math> depende de moléculas reguladoras (IL-10 y TGF-<math>\beta</math>).</i> .....	50
<b>Objetivo específico 2: Evaluar el efecto de IFN-<math>\gamma</math> in vitro sobre linfocitos T reguladores y su capacidad supresora sobre linfocitos T efectores.</b> .....	<b>53</b>
<i>Evaluar el efecto de IFN-<math>\gamma</math> ex vivo sobre la inducción de linfocitos Tregs en células infiltrantes del SNC, nódulos linfáticos cervicales y del bazo.</i> .....	53
<i>Evaluar el efecto de IFN-<math>\gamma</math> in vitro sobre la inducción de linfocitos Tregs y evaluar su capacidad supresora.</i> .....	59
<i>Evaluar el efecto de IFN-<math>\gamma</math> in vitro sobre la funcionalidad de linfocitos Tregs convencionales provenientes de animales con EAE.</i> .....	67
<b>Objetivo específico 3: Identificar el mecanismo por el cual IFN-<math>\gamma</math> favorece la inducción de linfocitos T reguladores supresores de la EAE.</b> .....	<b>71</b>
<i>Identificar el efecto in vivo de IFN-<math>\gamma</math> sobre la inducción de moléculas reguladoras en linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APC).</i> .....	71
<i>Evaluar el efecto ex vivo e in vitro de IFN-<math>\gamma</math> sobre la inducción de TGF-<math>\beta</math> y PD-L1 en células CD11b+.</i> .....	77
<i>Evaluar la capacidad de células CD11b+ estimuladas con IFN-<math>\gamma</math> sobre la inducción de linfocitos Tregs.</i> .....	84
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>90</b>
<b>VII. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>97</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>99</b>
<b>IX. ANEXO</b> .....	<b>115</b>

## RESUMEN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune y crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC), caracterizada por una pérdida de la de tolerancia inmunológica, que incluye la inactivación funcional de los linfocitos T reguladores (Tregs). Estudios recientes han descrito diversos mecanismos por los cuales el Interferón (IFN)- $\gamma$ , una citoquina conocida clásicamente como inflamatoria, posee efectos reguladores y protectores en el modelo animal de la EM, la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE induce una mejoría significativa de los síntomas, asociado con un aumento significativo de linfocitos Tregs en el SNC de los animales. En esta tesis, se investigó los mecanismos por los cuales IFN- $\gamma$  induce dicho aumento de linfocitos Tregs supresores de la EAE.

Los resultados obtenidos mostraron que la depleción de células expresando FOXP3 antagonizó los efectos protectores de IFN- $\gamma$ , corroborando que el efecto terapéutico de esta citoquina es dependiente de los linfocitos Tregs. Ensayos realizados *in vitro* con linfocitos T CD4+CD25- provenientes de ratones con EAE, revelaron que IFN- $\gamma$  no ejerce un efecto directo sobre la inducción ni funcionalidad de linfocitos Tregs. Además, se determinó que IFN- $\gamma$  inhibe la expresión de FOXP3+ en condiciones de diferenciación de linfocitos Tregs inducibles (TGF- $\beta$  + IL-2). Tampoco se observó un efecto directo de IFN- $\gamma$  sobre la expresión de moléculas reguladoras, expresión de FOXP3+ o funcionalidad de linfocitos Tregs obtenidos de ratones con EAE.

La administración *in vivo* conjunta de IFN- $\gamma$  y anticuerpos neutralizantes contra IL-10, TGF- $\beta$  o PD-1, mostró que el efecto terapéutico de IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE depende de TGF- $\beta$  y de la vía PD-1/PD-Ls, pero no así de IL-10. Análisis de la expresión de moléculas regulatorias en diferentes subpoblaciones celulares provenientes de ratones con EAE, determinó que IFN- $\gamma$  indujo un incremento en la expresión de TGF- $\beta$  y PD-L1 en diferentes subgrupos de células CD11b+ (células presentadoras de antígeno) y de TGF- $\beta$  en linfocitos T CD8+. Además, se encontró que células CD11b+ estimuladas



con IFN- $\gamma$  *in vivo* o *in vitro* son capaces de inducir, de manera dependiente de TGF- $\beta$  y PD-L1, un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs a partir de linfocitos T CD4+ naïve provenientes de animales sanos (sin EAE) wild type o 2D2 (expresando un TCR específico para el péptido de mielina).

En resumen, el conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis revela que los efectos benéficos de IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE se deben a un aumento de linfocitos Tregs en el SNC mediado por la expresión de FOXP3, TGF- $\beta$  y la vía PD-1/PD-Ls, y asociado a un aumento en la expresión de TGF- $\beta$  y PD-L1 en células CD11b+ y de TGF- $\beta$  en linfocitos T CD8+.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease affecting the central nervous system (CNS), characterized by a loss of immune tolerance, that includes a functional inactivation of regulatory T lymphocytes (Tregs). Recent studies have described different mechanisms by which Interferon (IFN)- $\gamma$ , known classically as a pro-inflammatory cytokine, has regulatory and protective effects in the animal model of MS, the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). Previous results of our laboratory have shown that in vivo treatment with IFN- $\gamma$  during the chronic phase of EAE induced a significant amelioration of symptoms, associated with a significant increase of Tregs lymphocytes in the SNC of these mice. In this thesis, the mechanisms by which IFN- $\gamma$  induced the increase of Tregs suppressing EAE was investigated.

The results obtained shown that depletion of cells expressing FOXP3 suppressed the protective effects of IFN- $\gamma$ , supporting the notion that the therapeutic effect of this cytokine is Tregs-dependent. Assays performed in vitro with T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> lymphocytes obtained from EAE mice revealed that IFN- $\gamma$  did not exert a direct effect on the induction or functionality of Tregs. In addition, IFN- $\gamma$  inhibited FOXP3 expression in conditions of iTregs differentiation (TGF- $\beta$  + IL-2). Likewise, IFN- $\gamma$  did not affect the expression of regulatory molecules, FOXP3 expression, or functionality of Tregs obtained from EAE mice.

The in vivo combined administration of IFN- $\gamma$  and neutralizing antibodies against IL-10, TGF- $\beta$  or PD-1, showed that the protective effect of IFN- $\gamma$  in the chronic phase of EAE depends of TGF- $\beta$  or PD-1/PD-Ls pathway, but not on IL-10. Analysis of regulatory molecules expression in different cell subpopulations obtained from EAE mice determined that IFN- $\gamma$  induced an increased expression of TGF- $\beta$  and PD-L1 on different subgroups of CD11b<sup>+</sup> cells (antigen presenting cells) and TGF- $\beta$  on CD8<sup>+</sup> T cells. In addition, it was found that in vivo and in vitro IFN- $\gamma$ -stimulated CD11b<sup>+</sup> cells were able to induce, in a TGF- $\beta$  and PD-L1-dependent manner, an increase of Tregs frequency starting from naïve T CD4<sup>+</sup> cells obtained from healthy (without EAE) wild type or 2D2 (expressing a specific TCR for myelin peptide)) mice.

Overall, all results obtained in this thesis reveal that the beneficial effects of IFN- $\gamma$  in the chronic phase of EAE are related with an increase of Tregs in the SNC mediated by the expression of FOXP3, TGF- $\beta$  and PD-1/PD-Ls pathway, and associated with an enhance in the expression of TGF- $\beta$  and PD-L1 on CD11b<sup>+</sup> cells and TGF- $\beta$  on T CD8<sup>+</sup> cells.

## I. INTRODUCCIÓN

### Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad neuroinflamatoria crónica que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC), y que consiste en una reacción autoinmune principalmente en contra de diversos péptidos de la mielina, generando lesiones desmielinizantes asociadas a un deterioro neuronal [1]. Los síntomas de la EM, dependerán del sitio donde se originen las lesiones y van desde parálisis parcial, problemas a la visión, espasticidad, disfunción urinaria y depresión [2], pudiendo afectar cualquiera de las funciones del SNC.

La EM es una de las principales causas de discapacidad neuronal en el mundo, con cerca de 2.5 millones de personas afectadas [3], en su mayoría adultos jóvenes de entre 20 a 50 años, siendo 2-3 veces más frecuentes en mujeres que en hombres. Existe una distribución geográfica particular de la EM en el planeta, con una incidencia mayor en regiones lejanas a la línea del Ecuador, presentándose especialmente en personas de origen caucásico [4], [5]. Si bien en Chile existen pocos estudios epidemiológicos de la EM, se ha podido estimar una prevalencia de 11,7/100.000 habitantes [6]–[8].

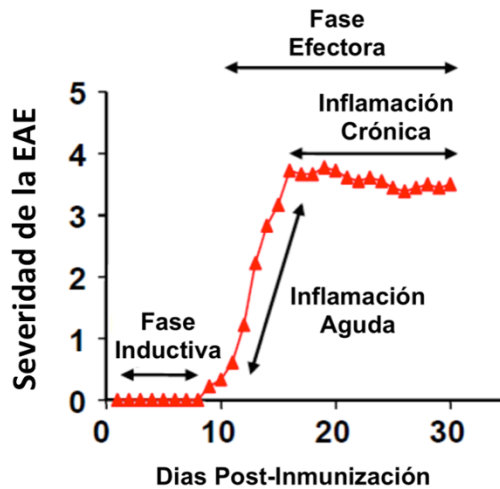
La etiología de la EM aún es desconocida, aunque se ha descrito que confluyen tanto factores ambientales como genéticos, los que inducirían un quiebre de la tolerancia inmunológica favoreciendo el inicio del proceso autoinmune [2], [9], [10]. La progresión de la EM es variable entre los distintos pacientes, presentándose en diversas formas clínicas que se agrupan en recurrente-remitente (EMRR), caracterizada por episodios de neuroinflamación agudos, seguidos por periodos de recuperación cada vez menos frecuente, y las formas progresivas (primaria y secundaria), en donde la inflamación del SNC es crónica e irreversible a través del tiempo [11]. Por más de 30 años, el Interferón (IFN)- $\beta$  ha sido utilizado como la principal terapia para la EM, sin embargo, hasta la fecha no existe tratamiento curativo y las terapias inmunomoduladoras aprobadas (incluyendo el IFN- $\beta$ ) retrasan la progresión de la enfermedad en un 70% de los pacientes con EMRR, pero no tienen efecto sobre las formas progresivas [9], [10], [12]. Por lo tanto, es crucial

y necesario investigar e identificar nuevos blancos celulares y moleculares que sirvan de base para el desarrollo de nuevas terapias para estos pacientes.

### **Encefalomiелitis Autoimmune Experimental (EAE)**

La comprensión de la inmunopatogénesis de la EM ha sido posible en gran parte gracias a su modelo animal, la EAE, que ha servido durante más de 70 años para estudiar los mecanismos inmunopatológicos de la enfermedad y para el diseño de terapias para estos pacientes [13]–[15]. El modelo de EAE más utilizado, se basa en la inducción de la enfermedad en la cepa de ratones C57BL/6J, mediante un proceso de inmunización activa con una emulsión que contiene péptidos de proteínas presentes en la mielina y adyuvante. El proceso de inmunización también puede ser pasivo mediante transferencia de linfocitos T encefalitogénicos provenientes de un ratón con EAE a otro ratón singéneo sano [16]. En cualquiera de los dos casos, se induce la activación del Sistema Inmune (SI) generando una respuesta autoinmune desmielinizante en el SNC, que provoca una parálisis ascendente irreversible desde la cola hasta las extremidades superiores en los ratones.

Como resultado del proceso de inmunización activa, los animales desarrollan una enfermedad crónica y monofásica con 3 etapas claramente distinguibles (**Figura 1**). Una vez inmunizado el animal, comienza la fase inductiva en la cual se inician todos los procesos inmunológicos de procesamiento y presentación de los antígenos mielínicos que inducirán una activación del SI. Posteriormente, se produce una infiltración de linfocitos al SNC, iniciando la fase efectora de la EAE, con una inflamación aguda que provoca los primeros síntomas de discapacidad en los animales (fase aguda). Luego, en el SNC se produce una inflamación crónica en el tiempo, que compromete una desmielinización mantenida por una constante liberación de moléculas proinflamatorias y que con el transcurso del tiempo generarán un daño axonal (fase crónica) [17].



**Figura 1. Modelo de la progresión de la EAE crónica-monofásica en ratones C57BL/6J.** La EAE crónica-monofásica posee una etapa inductiva sin síntomas, seguido por una etapa efectora en donde los síntomas aparecen al inicio de la fase aguda, y seguido por una fase crónica prolongada.

### **Inmunopatogénesis de la EM y EAE: Contribución de linfocitos T helper (h)-1 y Th17.**

El modelo de inmunopatogénesis de la EM y EAE actual propone que el procesamiento y presentación de antígenos propios se vería favorecido por una deficiente regulación de los mecanismos de tolerancia [9], [18]. Si bien el antígeno inicial que generaría la respuesta autoinmune en la EM se desconoce, estudios realizados en el modelo EAE han identificado diferentes proteínas y péptidos derivados de proteínas mielínicas como antígenos inductores de la enfermedad. Entre estos antígenos se encuentran la proteína básica de la mielina (MBP), la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG) y la proteína proteolipídica (PLP). La activación de la respuesta inmune específica contra éstos antígenos ocurre en los órganos linfoides primarios y en nódulos linfáticos, permitiendo la diferenciación y activación de linfocitos Th1 y Th17 con una producción de citoquinas y receptores de quimioquinas características [17], [19], adquiriendo la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) hacia el SNC. Una vez alcanzado el SNC, estas células serían reactivadas por células presentadoras

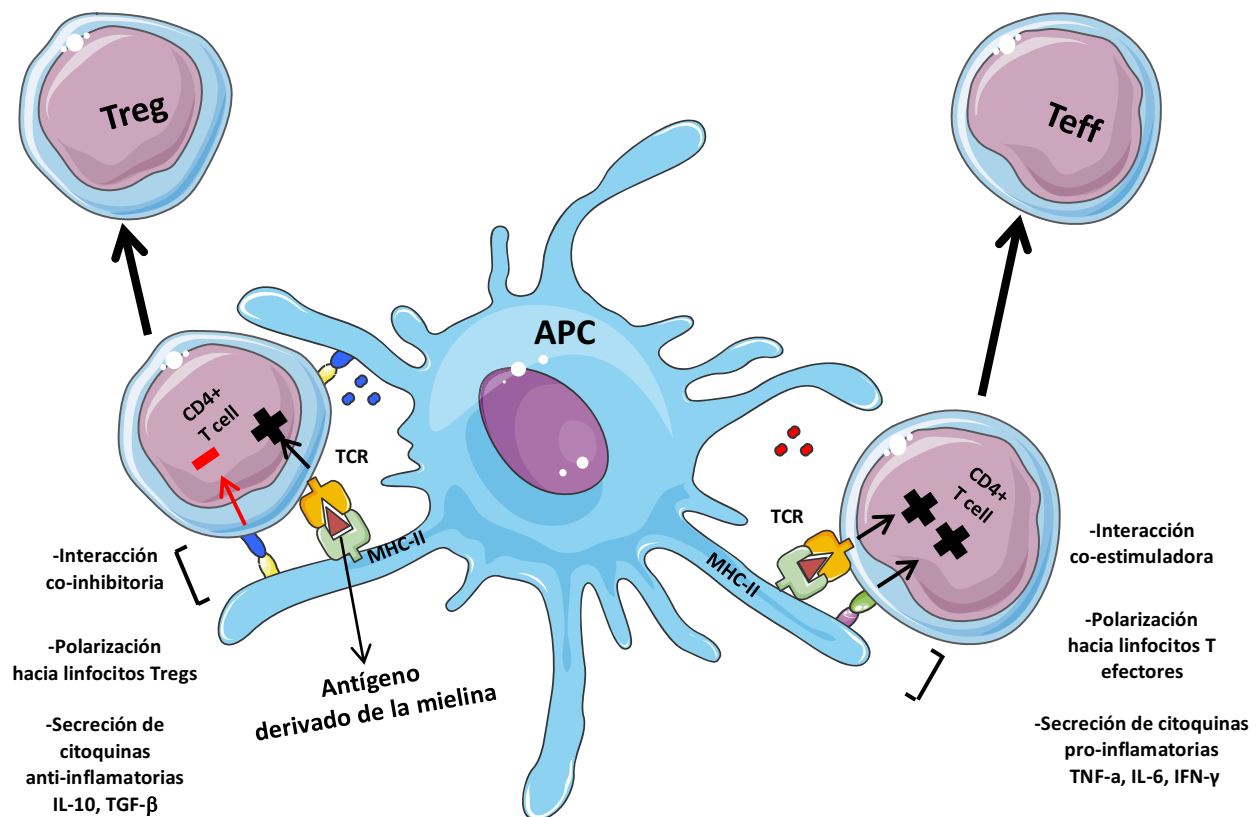
de antígenos residentes (microglía y astrocitos) favoreciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias.

Los linfocitos Th1 constituyen una de las fuentes celulares principales de producción de IFN- $\gamma$ , una citoquina pro-inflamatoria que activa principalmente a macrófagos y microglía. Por otro lado, la población de linfocitos Th17 caracterizada por la liberación de interleuquina (IL)-17, activa e induce la infiltración de neutrófilos y granulocitos hacia el SNC [9], [20]. El conjunto de éstas células infiltrantes reaccionan contra la mielina generando desmielinización y daño axonal, liberando nuevos antígenos al microambiente, los que amplían la respuesta autoinmune, creando un ciclo de activación continuo de inflamación en el SNC [1].

### **Células presentadoras de antígeno (APC).**

El procesamiento y presentación de antígenos mencionado anteriormente, está dirigido principalmente por las APC, que se clasifican principalmente en dos grandes grupos: profesionales (linfocitos B, monocitos/macrófagos, y células dendríticas) y no profesionales (todas las células nucleadas). Las APC profesionales, son las encargadas de la presentación de antígenos y activación de linfocitos T, cumpliendo un rol tanto patogénico como protector en la EAE/EM [21]. En la EAE, monocitos/macrófagos y células dendríticas (DCs) son fundamentales para la activación de linfocitos T, siendo capaces de polarizar a los fenotipos de linfocitos T efectores o reguladores [22], [23], mientras que los linfocitos B son incapaces de actuar como APC cuando la EAE es inducida con el péptido MOG<sub>35-55</sub> [24]. Los monocitos/macrófagos (caracterizados por la expresión del marcador CD11b+) se encuentran en gran cantidad durante los periodos de inflamación en el SNC [25], [26] siendo los únicos tipos celulares encontrados en todos los diferentes tipos de lesiones desmielinizantes de pacientes con EM [26]. Estas células, en conjunto con la microglía (fagocitos residentes del SNC), se encuentran altamente activadas durante los periodos activos de la enfermedad, con un perfil pro-inflamatorio elevado (denominado perfil M1) de expresión de moléculas co-estimuladoras (MHC-II, CD86 entre otros) y secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN-

y entre otros) [12], [27]. Por último, las DCs (caracterizadas por la expresión del marcador CD11c+), son las principales APC, encargados de polarizar linfocitos T naïve hacia un perfil efector o regulador [28], siendo capaces de potenciar [29] o regular la EAE [30]. Por lo tanto, el balance entre linfocitos T efector versus linfocitos T regulador dependerá del estado de activación de las APC, tolerogénico o inflamatorio (**Figura 2**).



**Figura 2. Rol de las células presentadoras de antígenos en la polarización de linfocitos T efectores versus T reguladores.** La polarización de linfocitos T efectores o reguladores está estrictamente controlada, dependiendo del balance de expresión tanto de moléculas co-estimuladoras versus co-inhibitorias, y de citoquinas pro-inflamatorias versus reguladoras.

Las APC como macrófagos, DC y microglía también pueden presentar un perfil regulador denominado M2, caracterizado por la secreción de citoquinas reguladoras como IL-10,



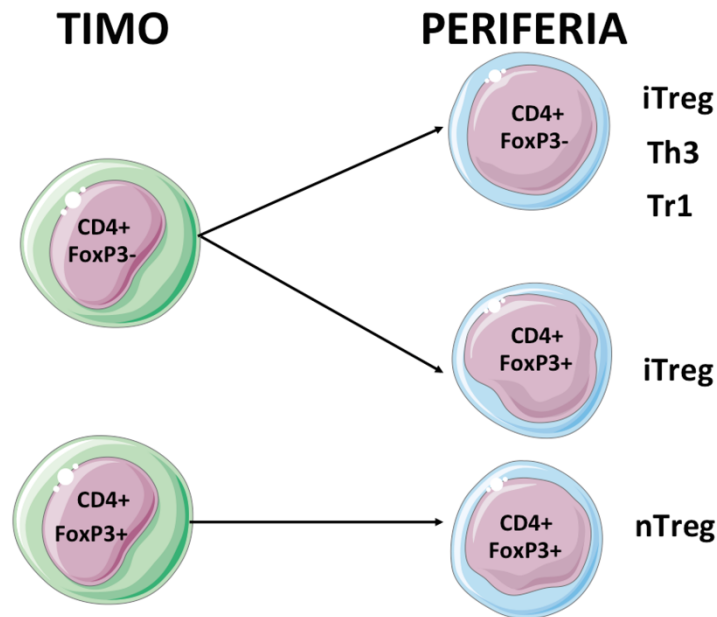
TGF- $\beta$  [31] y la expresión de moléculas co-inhibitorias como PD-L1 y PD-L2; con la capacidad para suprimir los síntomas de la EAE [12], [27].

### **Linfocitos T reguladores (Tregs)**

Dentro de los mecanismos que regulan y controlan la respuesta inmune, los linfocitos Tregs corresponden a uno de los principales tipos celulares encargados de la mantención de la tolerancia contra antígenos propios y de la homeostasis inmunológica [32]. Los linfocitos Tregs pueden suprimir la respuesta inmune, actuando directamente sobre otros linfocitos T efectores o mediante la inactivación de las APC. Los mecanismos de acción de los linfocitos Tregs incluyen contacto célula-célula, secreción de citoquinas anti-inflamatorias principalmente IL-10 y *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$ , expresión de moléculas co-inhibidoras en su superficie celular y/o restringiendo nutrientes y moléculas que favorecen la proliferación celular [33].

Los linfocitos Tregs se clasifican en dos grandes grupos (**Figura 3**), naturales (nTreg), llamados así porque se desarrollan en el timo, y los linfocitos Treg inducibles (iTreg) diferenciados en la periferia a partir de linfocitos T vírgenes o “naïve” [34], [35]. Los linfocitos nTreg se caracterizan por la expresión de las moléculas CD4 y CD25 (IL-2R $\alpha$ ) en su superficie celular y la expresión del factor de transcripción *Forkhead box P3* (FOXP3), que es fundamental para su función reguladora y cuya expresión está presente en más del 90% de la población total de linfocitos Tregs [35], [36].

Por otro lado, los linfocitos iTreg, a partir de la exposición al antígeno son diferenciados en la periferia a partir de linfocitos T naive mediante la estimulación de su receptor de células T (TCR) y la presencia de TGF- $\beta$  o ácido retinoico e IL-2. Los linfocitos iTreg, a su vez, se diferencian en otros subtipos dependiendo de la función que posean y el perfil de citoquinas característico, mientras que la expresión de FOXP3 por parte de estas células puede ser transitoria. Así, los linfocitos T reguladores de tipo 1 (Tr1), ejercen su función moduladora mediante la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, mientras que los linfocitos Th3 secretan altos niveles de TGF- $\beta$  [32]–[34].



**Figura 3: Principales subtipos de linfocitos T reguladores.** Linfocitos Treg naturales (nTreg) o inducibles (iTreg), se generan en el timo o en la periferia respectivamente. nTreg se caracterizan por una expresión constitutiva del factor de transcripción FOXP3, mientras que en los iTregs la expresión de FOXP3 puede ser transitoria. Linfocitos Th3 y Tr1, son linfocitos iTregs caracterizados por una elevada secreción de TGF- $\beta$  e IL-10, respectivamente.

La evidencia que apoya la participación de linfocitos Tregs en la EM y EAE es contundente y han destacado la importancia de esta población para prevenir el inicio y desarrollo de la enfermedad: 1) en la EM y EAE existe un aumento de la frecuencia de linfocitos Tregs durante períodos de remisión [37]; 2) en la EAE, linfocitos Tregs se acumulan en el SNC de ratones, lo cual se asocia con un aumento de los niveles de IL-10 y recuperación de los síntomas [38]; 3) el tratamiento de ratones inducidos con EAE con anticuerpos anti-CD25 (descrito como neutralización de linfocitos Tregs), o la depleción de células FOXP3+ exacerba la enfermedad [39]–[42]; 4) la transferencia adoptiva de linfocitos Tregs de ratones sanos a enfermos disminuye los síntomas de la EAE [40], [43], [44]; 5) linfocitos Tregs provenientes de pacientes con EM, son deficientes en la supresión de linfocitos T efectores en comparación a linfocitos Tregs de controles

sanos [45], [46]. A pesar de lo anterior, aún se desconocen con exactitud los mecanismos moleculares que conducen a la inducción, activación, diferenciación y función de los linfocitos Tregs y sus diferentes subpoblaciones en la EAE y EM.

## **IFN- $\gamma$**

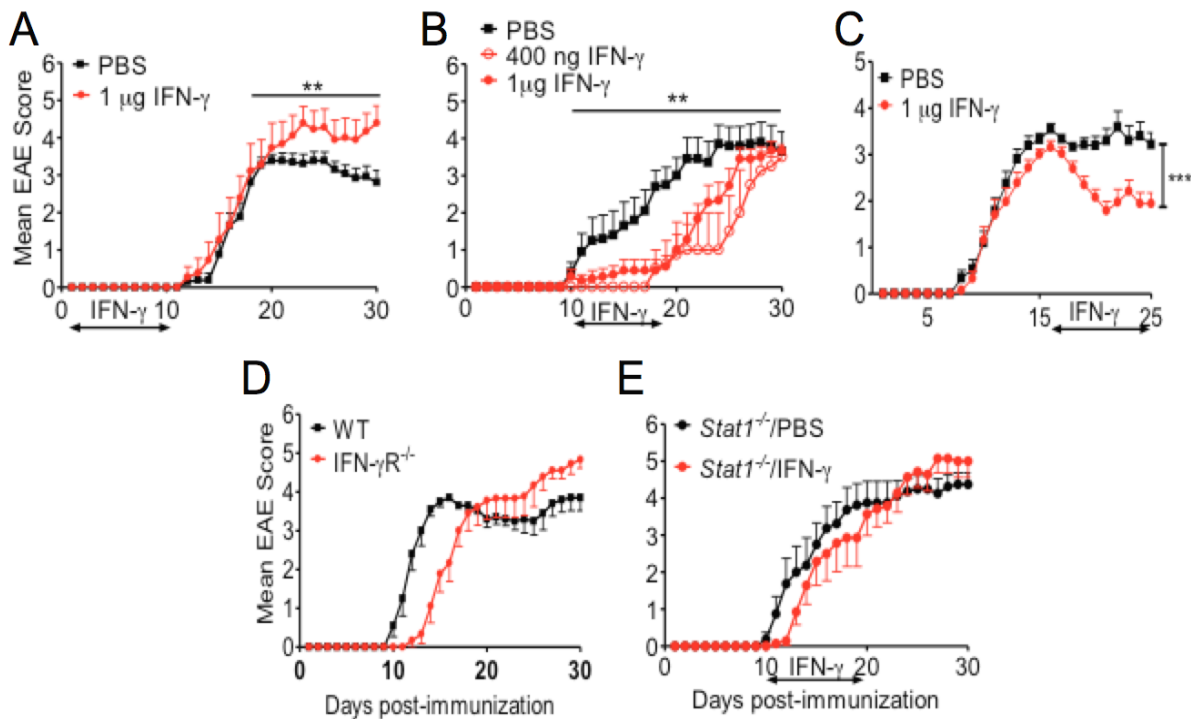
IFN- $\gamma$  ha sido descrito clásicamente como una citoquina pro-inflamatoria debido a que es producida mayoritariamente por linfocitos Th1, células NK (*natural killer*) y linfocitos CD8+ [47]. IFN- $\gamma$  es el único miembro de la familia de IFNs Tipo II, e interactúa con su receptor específico IFNGR. La forma biológicamente activa es un homodímero de 34 kDa que reacciona con su receptor heterodimérico, el cual está compuesto por dos sub-unidades: IFNGRa y IFNGRb [48]. El receptor de IFN- $\gamma$  es expresado en forma ubicua en casi todas las células del organismo [49], por lo cual, los efectos de esta citoquina dependerán del tipo celular al cual afecte [50]–[52]. La señalización celular de IFN- $\gamma$  está mediada principalmente por la vía de las proteínas JAK (*Janus Kinases*) y STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)-1 [53], regulando la expresión de diversos genes y factores de transcripción que median los efectos IFN- $\gamma$ , tales como IRF (*interferon regulatory factor*)-1, MIG (*monokine induced by IFN- $\gamma$* ) e ICAM (*intracelular adhesion molecule*)-1 [47], [54].

## **Rol de IFN- $\gamma$ en la EM y EAE**

La función que cumple IFN- $\gamma$  en la EM y EAE es controversial [55]–[57], ya que inicialmente esta citoquina fue relacionada con la función patológica de la población Th1, asociándose con una mayor severidad de la enfermedad [58]. Recientemente, nuestro grupo de investigación (Arellano *et al*, *Front. Immunol.* 2017) ha publicado que tanto los niveles de IFN- $\gamma$  en el plasma, como la frecuencia de linfocitos Th1 en sangre de pacientes con EM, es diferente entre las distintas formas clínicas EM y sirve como predictor de la progresión de la enfermedad [59]. Hasta la fecha, el único estudio piloto en el cual se trató con IFN- $\gamma$  a pacientes con EMRR, arrojó resultados discordantes, en el sentido de que algunos empeoraron los síntomas, mientras otros no respondieron o

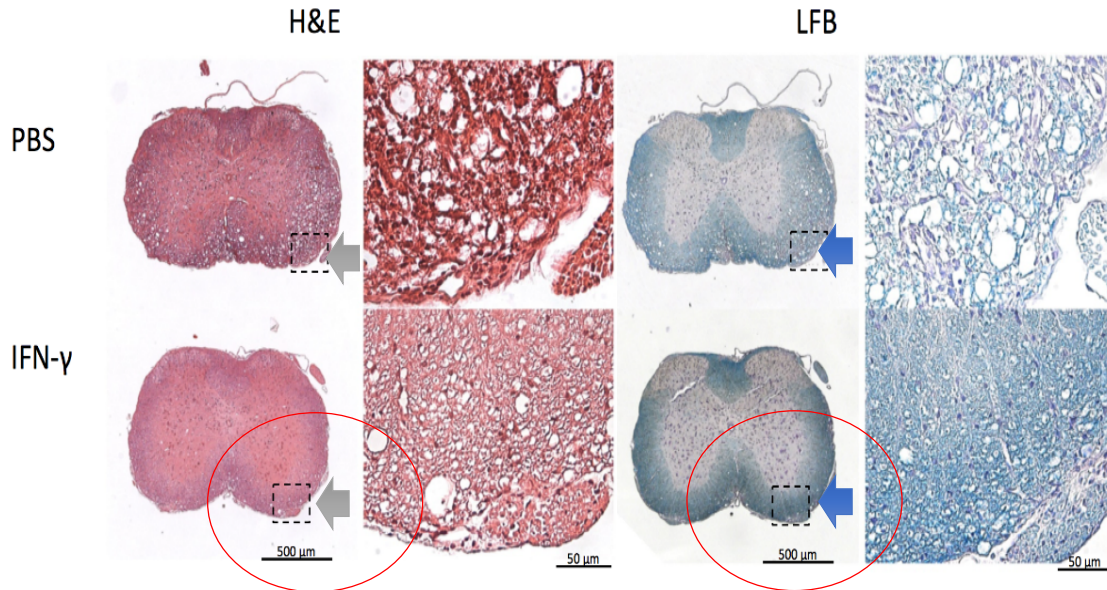
vieron leves mejoras [60]. Además, al tratar con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  a pacientes con EM progresiva, se observó una reducción de los síntomas de la enfermedad [61]. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en pacientes con EM, trabajos en EAE han demostrado ampliamente que la señalización de IFN- $\gamma$  es necesaria para suprimir la EAE, y que un tratamiento con IFN- $\gamma$  tiene un efecto anti-inflamatorio y tolerogénico en la enfermedad [55]–[57], [62]–[65]. Asimismo, Axtell *et al* (Nat Med, 2010) [66], demostraron que el efecto terapéutico de IFN- $\beta$ , la principal terapia utilizada en pacientes con EM, depende de la señalización de IFN- $\gamma$ , ya que al administrar IFN- $\beta$  en ratones con EAE deficientes de IFN $\gamma$ R, éste exacerba la enfermedad [66].

Nuestro laboratorio ha contribuido a aclarar esta discrepancia (Naves *et al.*, JCI, 2013) [67], demostrando que IFN- $\gamma$  tiene una actividad dual dependiente de la fase de desarrollo de la EAE [67]. La administración de IFN- $\gamma$  durante la fase inductiva (**Figura 4 A**) de la EAE provoca un aumento en la severidad de los síntomas, mientras que si se administra durante la fase aguda (**Figura 4 B**) o crónica (**Figura 4 C**) (ambas etapas parte de la fase efectora de la EAE) suprime el desarrollo de la enfermedad. Además, este rol dual de IFN- $\gamma$  se comprueba en animales con EAE deficientes de IFN $\gamma$ R, que demuestran que la señalización del receptor IFN- $\gamma$  posee una función patogénica en la fase inductiva, o protectora en la fase efectora (**Figura 4 D**). Por último, encuentran que el efecto protector de IFN- $\gamma$  es dependiente de STAT-1, dado que ratones con EAE deficientes para STAT-1 son refractarios al tratamiento con esta citoquina (**Figura 4 E**). Estos resultados indican que el efecto de IFN- $\gamma$  depende del estado inflamatorio de la EAE, y ofrecen una explicación a los paradójicos resultados encontrados en el estudio piloto de tratamiento con IFN- $\gamma$  de pacientes con EMRR.

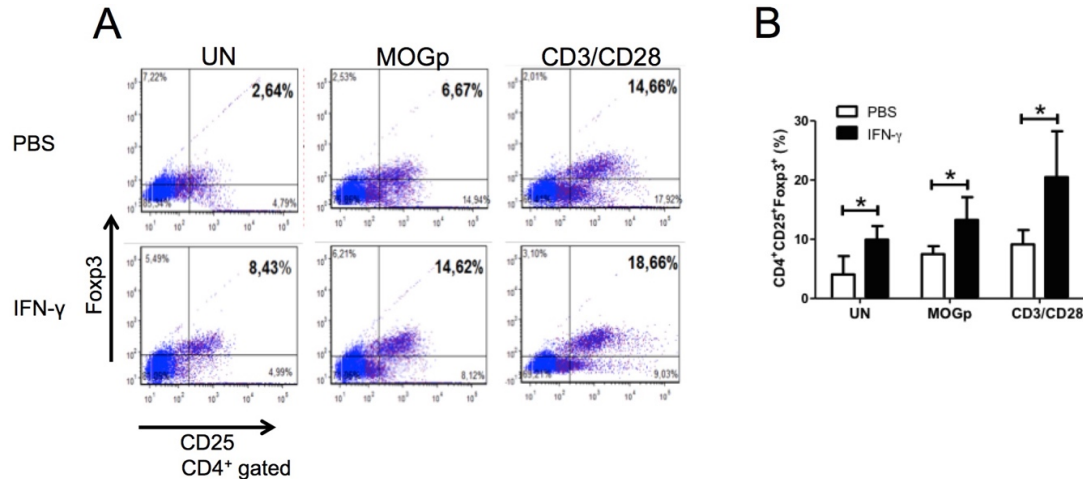


**Figura 4: El efecto dual de IFN- $\gamma$  en la EAE y su dependencia de STAT-1.** Progresión de la enfermedad en ratones con EAE tratados con 1  $\mu$ g de IFN- $\gamma$  en **A)** la fase inductiva (días 0-10), **B)** fase aguda (días 10-18) y **C)** crónica de la enfermedad (días 15-25). **D)** Ratones deficientes para IFNGR inducidos con EAE presentan un retraso de la fase aguda pero una más severa fase crónica de la enfermedad. **E)** Progresión de la enfermedad en ratones deficientes para STAT-1 inducidos con EAE y tratados con IFN- $\gamma$  durante la fase aguda (días 10-20). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 [67].

Siguiendo esta línea de investigación, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio, muestran que el tratamiento con IFN- $\gamma$  de ratones durante la fase crónica de la EAE se asocia con una reducción en el número de focos inflamatorios y lesiones desmielinizantes en el SNC (**Figura 5**). De manera interesante, IFN- $\gamma$  indujo un aumento de la frecuencia de linfocitos Tregs infiltrantes en el SNC, de forma antígeno-específico e inespecífica (**Figura 6**).



**Figura 5: El tratamiento con IFN- $\gamma$  reduce la infiltración de células mononucleares y desmielinización en el SNC.** Cortes histológicos de la médula espinal de animales tratados durante la fase crónica de la EAE con 1ug de IFN- $\gamma$  o PBS (controles) fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) para determinar el grado de infiltración de células mononucleares, y LuxolFast Blue (LFB) para evaluar el nivel de desmielinización en el SNC de estos animales. (resultados no publicados).



**Figura 6. El tratamiento de la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$  induce un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs en la médula espinal.** Células mononucleares infiltrantes en la médula espinal de ratones con EAE tratados con 1ug IFN- $\gamma$  o PBS fueron cultivadas *ex vivo* por 18 horas sin o con estimulación de 10ug/mL de MOG (MOGp) o 1ug/mL de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (CD3/CD28). Luego, la población de linfocitos Tregs fue analizada mediante citometría de flujo. (A) Análisis de citometría de flujo representativo de un experimento. (B) Frecuencia de linfocitos Tregs. Barras de error representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ . (resultados no publicados).

Por lo tanto, estos resultados indican que uno de los mecanismos por el cual IFN- $\gamma$  ejerce una función protectora en la fase crónica de la EAE, reduciendo la severidad de la enfermedad, podría estar mediado por un efecto sobre los linfocitos Tregs. Sin embargo, desconocemos si IFN- $\gamma$  afecta de manera directa o indirecta la inducción de esta población reguladora.

### **Regulación de linfocitos Treg por IFN- $\gamma$**

El efecto de protector de IFN- $\gamma$  en la EAE, además de la etapa de la enfermedad, depende del sitio, la concentración y del tipo celular al cual estaría afectando [56], [57]. De manera interesante, ha sido demostrado, tanto en humano como en ratones, y en diversos modelos de enfermedades, que IFN- $\gamma$ , en presencia de diversos estímulos, es capaz de inducir linfocitos iTregs [68]–[73]. En EAE, Wang *et al* (JCI, 2006), demostró que la estimulación *in vitro* de linfocitos de ratón TCD4+CD25- con IFN- $\gamma$ , induce de manera directa la conversión a linfocitos iTreg expresando CD25 y FOXP3, con una capacidad supresora elevada sobre la proliferación de linfocitos T efectores [68]. El porcentaje de células inducidas aumentó de un 6% a un 26% aproximadamente al co-estimular con IFN- $\gamma$  y un activador inespecífico de TCR (anticuerpos anti-CD3/CD28). Estos experimentos fueron replicados en linfocitos T CD4+ humanos obteniendo similares resultados. Además, la transferencia pasiva de estas células iTreg inducidas por IFN- $\gamma$  a ratones con EAE disminuyó los síntomas de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con lo observado en trabajos realizados en modelos experimentales de otras enfermedades inflamatorias crónicas tales como Artritis Reumatoide y rechazo a trasplante, en los que utilizando ratones deficientes para la expresión de IFN- $\gamma$  o su receptor se reportó que esta citoquina es fundamental para la función tolerogénica de los linfocitos Tregs [70], [74]–[77].

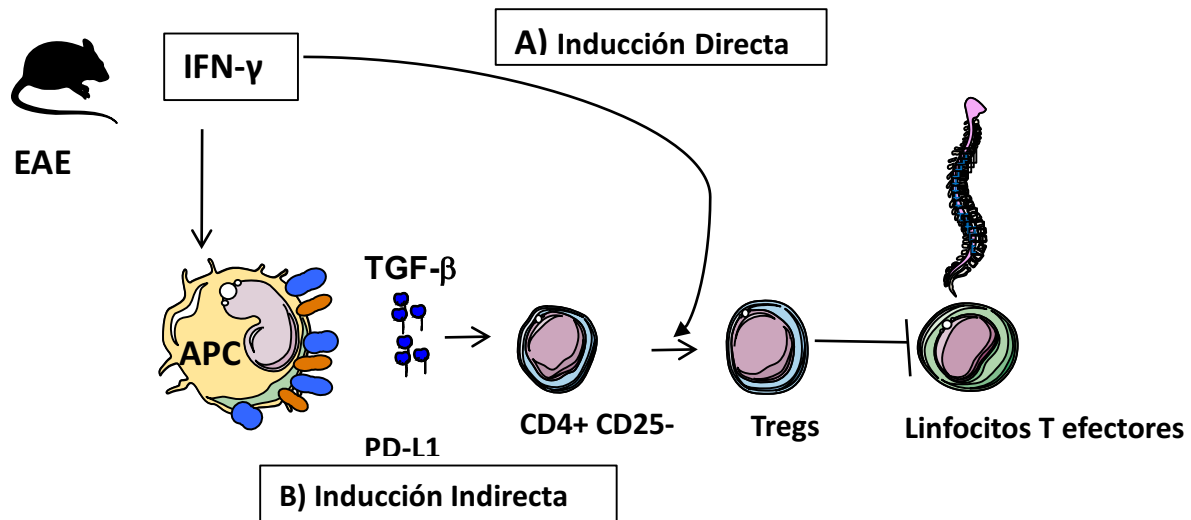
Más recientemente, se ha reportado la existencia de una nueva subpoblación de linfocitos Tregs inducidos por IFN- $\gamma$  o IL-27, denominada Treg Th1-*like* (Treg-Th1) [78]. Hay que hacer notar que IL-27 es una citoquina de la familia de IL-12 que induce la

expansión y diferenciación de linfocitos Th1 a través de la expresión del factor de transcripción T-bet (*T-box transcription factor*). Como es de esperar, los linfocitos Treg-Th1 se caracterizan por la expresión de T-bet, la que promueve a su vez, la expresión de IFN- $\gamma$  y quimioquinas que favorecen la migración de estos linfocitos Tregs hacia el sitio de la inflamación [79]. De acuerdo a estos estudios, los linfocitos Treg-Th1 inducidos por IFN- $\gamma$  y caracterizados por la expresión de IFN- $\gamma$  y T-bet, corresponden a una población particular de linfocitos Treg especializados en limitar enfermedades inflamatorias infecciosas que suscitan una respuesta inmune Th1 [80]–[82]. Notablemente, pacientes con EM [83], [84] y diabetes tipo I [85] exhibieron una mayor frecuencia de linfocitos Treg-Th1, comparado con individuos sanos y su presencia se ha asociado con una buena aceptación de trasplante de órganos [86]. Sin embargo, la presencia y/o la participación de esta población de linfocitos Treg-Th1 en EAE, no ha sido estudiado hasta ahora.

Por otro lado, los linfocitos Tregs pueden ser inducidos por la interacción con APC. Tal como fue mencionado anteriormente, la expresión de moléculas como PD-L1, secreción de TGF- $\beta$  o IL-10, por las APC, favorece la inducción de linfocitos Tregs [87]. Particularmente, la molécula co-inhibitoria PD-L1, es altamente regulada por IFN- $\gamma$ . Se ha demostrado que los efectos protectores de IL-12 en EAE dependen de la activación de PD-1/PD-L1, mediado por IFN- $\gamma$  [88]. Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia de que este mecanismo estaría favoreciendo una inducción de linfocitos Tregs supresores en EAE. De manera interesante, IFN- $\gamma$  es capaz de inducir linfocitos Tregs capaces de reducir los síntomas de la EAE de manera indirecta, mediante la inducción de TGF- $\beta$  por neuronas [43]. No obstante, no existe evidencia de que IFN- $\gamma$  sea capaz de inducir la expresión de TGF- $\beta$  en APC, es más, se ha observado que IFN- $\gamma$  sólo induce la expresión de esta citoquina en neuronas y células epiteliales de retina [89].

Basados en todas estas evidencias, esta tesis tiene como principal propósito identificar el mecanismo, ya sea directo o indirecto, por el cual IFN- $\gamma$  induce un incremento de linfocitos Tregs en la EAE, reduciendo los síntomas de la enfermedad (**Figura 7**).





**Figura 7. Mecanismo directo o indirecto por el cual IFN- $\gamma$  induciría un incremento en la población de linfocitos Tregs en la EAE. A) IFN- $\gamma$  induciría linfocitos Tregs de manera directa a partir de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. B) IFN- $\gamma$  induciría de manera indirecta un incremento de linfocitos Tregs, dependiente de PD-L1 y TGF- $\beta$  en APC.**

## II. HIPÓTESIS

*“Interferón- $\gamma$  promueve la inducción de linfocitos T reguladores supresores de la EAE actuando directamente sobre linfocitos CD4+CD25- y/o indirectamente a través de la inducción de TGF- $\beta$  y PD-L1 en células presentadoras de antígeno”*

## III. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Determinar el mecanismo celular y molecular por el cual IFN- $\gamma$  favorece la respuesta de linfocitos T reguladores supresores de la EAE.

### 3.2 Objetivos específicos

**1. Determinar el efecto de IFN- $\gamma$  sobre distintas poblaciones de linfocitos T reguladores periféricos e infiltrantes en el SNC.**

- a. Determinar si el efecto protector de IFN- $\gamma$  *in vivo* depende de linfocitos T reguladores
- b. Determinar el efecto de IFN- $\gamma$  sobre las distintas sub-poblaciones de linfocitos T reguladores.
- c. Evaluar si el efecto de IFN- $\gamma$  depende de moléculas reguladoras (IL-10 y TGF- $\beta$ ).

**2. Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  *in vitro* sobre linfocitos T reguladores y su capacidad supresora sobre linfocitos T efectores.**

- a. Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  *ex vivo* sobre la inducción de linfocitos

Tregs en células infiltrantes del SNC, nódulos linfáticos cervicales y del bazo.

- b. Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  *in vitro* sobre la inducción de linfocitos Tregs y evaluar su capacidad supresora.
- c. Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  *in vitro* sobre la funcionalidad de linfocitos Tregs convencionales provenientes de animales con EAE.

**3. Identificar el mecanismo por el cual IFN- $\gamma$  favorece la inducción de linfocitos T reguladores supresores de la EAE.**

- a. Identificar el efecto *in vivo* de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de moléculas reguladoras en linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APC).
- b. Evaluar el efecto *ex vivo* e *in vitro* de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de TGF- $\beta$  y PD-L1 en APC.
- c. Evaluar la capacidad de APC estimuladas con IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos Tregs.

## IV. METODOLOGÍA

### Cepas de ratones

En este trabajo se utilizaron diferentes cepas de ratones machos de entre 8-12 semanas de edad: C57BL/6J (naïve), C57BL/6J-FOXP3<sup>GFP</sup> (FOXP3-GFP), C57BL/6J-FOXP3<sup>GFP-DTR</sup> (FOXP3-DTR) C57BL/6J-Ptprc<sup>a</sup> (CD45.1) y C57BL/6J-2D2-TCR<sup>MOG</sup> (2D2). Todos los animales fueron adquiridos desde “*The Jackson Laboratory*”. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio SPF libre de patógenos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile o en “*Feingberg School of Medicine*” de “*Northwestern University*”, con un ciclo de luz de 12 horas a una temperatura promedio de 20°C. Todos los procedimientos en animales, fueron aprobados por el comité de Bioética animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### Inducción de la EAE

La EAE fue inducida en ratones machos de 8-12 semanas de edad mediante inmunización activa. A cada ratón se inyectó subcutáneamente (SC) 200µL de una solución que contiene 150 µg péptido de MOG<sub>35-55</sub> (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (CPC) y 500 µg del extracto “H37 Ra de *Mycobacterium tuberculosis*” (Difco), disuelto en adyuvante Incompleto de Freund (IFA) (Difco). El día 0 y 2 post inmunización, se agregó una inyección intraperitoneal (i.p.) de 200 ng de toxina de pertussis (PT) (Calbiochem). Una vez generada la enfermedad, la progresión fue evaluada y monitoreada cada día siguiendo una escala de severidad de la EAE que va del 0 al 6: 0, sin signos de enfermedad; 1, pérdida del tono en la cola; 2, cola flácida; 3, parálisis parcial de las extremidades inferiores; 4, parálisis completa de las extremidades inferiores; 5, moribundo; 6, muerto. Simultáneamente, se midió el peso de cada ratón, como indicador del inicio y progresión de la enfermedad. Por razones de bienestar animal, y de acuerdo a los protocolos de bioética, todo ratón en nivel 5 de severidad fue eutanasiado.

## Tratamientos y grupos experimentales

### Administración de IFN- $\gamma$ .

El tratamiento consistió en inyecciones intraperitoneales (i.p) diarias de 1 $\mu$ g IFN- $\gamma$  recombinante (eBioscience) o buffer fosfato salino (PBS, vehículo del IFN- $\gamma$ ) (GIBCO), en el inicio de la fase crónica de la enfermedad durante 5 días (día 15 al 20 post inmunización aproximadamente), tiempo que hemos determinado suficiente del tratamiento para inducir una disminución significativa en la severidad de la EAE entre ratones tratados y su control.

### Administración de anticuerpos neutralizantes y bloqueantes.

Anticuerpos anti-ratón anti-CD25 (clon PC-61.5.3), anti-PD-1 (clon RMP1-14), anti-TGF- $\beta$  (clon 1D11.16.18), anti-IL-10 (clon JES5-2A5) y control de isotipo IgG1 de ratón (clon MOPC-21, isotipo del anti-TGF- $\beta$ ), IgG1 de rata (clon HRPN, isotipo del anti-CD25 y anti-IL-10) e IgG2a de rata (clon 2A3, isotipo del anti-PD-1) fueron adquiridos en “*Bio X Cell*”. Los anticuerpos fueron inyectados i.p. en 200 $\mu$ L de PBS. En el caso de los anticuerpos anti-CD25 y anti-PD-1 y sus respectivos controles de isotipos, se inyectaron dos dosis de 500  $\mu$ g. La primera dos días antes, y la segunda el mismo día del inicio de tratamiento con IFN- $\gamma$ . Los anticuerpos anti-IL-10, anti TGF- $\beta$ , y sus respectivos controles de isotipos, fueron inyectados día por medio, iniciando el mismo día del tratamiento con IFN- $\gamma$  hasta el fin del tratamiento con esta citoquina.

### Depleción de células expresando FOXP3.

Ratones FOXP3-DTR fueron inducidos con la EAE y 1 día previo al tratamiento con IFN- $\gamma$  en la fase crónica, fueron inyectados i.p. con una dosis de 2.5  $\mu$ g de toxina diftérica (DT) (Sigma). Una segunda dosis de DT fue inyectada el día del inicio del tratamiento con IFN- $\gamma$ . Se analizó la frecuencia de células FOXP3+ mediante análisis de citometría de flujo de PBMC de sangre de los animales antes y después de tratar con DT. A modo de control negativo se incluyó en la determinación PBMC de animales *wild type* (sin FOXP3 GFP), y control positivo animales FOXP3-GFP.

## **Extracción de células infiltrantes del SNC**

Para el análisis de linfocitos infiltrantes del SNC, ratones fueron anestesiados con isoflurano, y perfundidos con 50 mL de PBS mediante punción intraventricular, y se extrajo la médula espinal de cada animal. El procedimiento para aislar las células mononucleares infiltrantes, se inició con un macerado de las médulas espinales, las cuales incubadas con 5U/mL DNAsa I (New England Biolabs) y 2mg/mL Colagenasa D (Roche) durante 1 hora a 37°C. La suspensión resultante fue posteriormente pasada por filtros con poros de 70µm de diámetro (BD Falcon). Luego, se realizó una gradiente de Percoll (GE Healthcare) de 40% y 70%, para extraer las células mononucleares infiltrantes por diferencia de densidad, retirando el anillo de células polimorfonucleares. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en medio de cultivo.

## **Extracción de esplenocitos y células mononucleares de nódulos linfáticos**

El bazo y los nódulos linfáticos axilares y cervicales fueron extraídos quirúrgicamente y recolectados en PBS. Los nódulos linfáticos fueron macerados y la suspensión se pasó por un filtro con poros de 70µm de diámetro, donde luego fueron resuspendidos en medio de cultivo. El bazo de cada ratón también fue macerado y filtrado, y luego incubados con 2mL/bazo de una solución de lisis de eritrocitos o ACK (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, y 1mM EDTA, pH 7.3) durante 1 min a T° ambiente. Finalmente, las células obtenidas fueron lavadas y resuspendidas en medio de cultivo.

## **Análisis de expresión de mRNA por PCR en tiempo Real.**

Se realizó una extracción de RNA total de las medulas espinales de ratones EAE tratados con IFN-γ y PBS, utilizando TRIzol (5-10x10<sup>6</sup> células) (Life Technologies), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se determinó la concentración de RNA, en función de la absorbancia a 260 y 280 nm. Finalmente, se comprobó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 1%.

A través de la tecnología de *TaqMan* de LifeTechnologies, el cual utiliza sondas específicas para el mRNA a analizar, se estudió la expresión de RNA mensajeros y se realizó un análisis semicuantitativo de PCR en tiempo real de los siguientes mRNA: *foxp3*, *t-bet*, *roryt*, *ifn- $\gamma$* , *il-10*, *tgf- $\beta$*  e *il-17a*, *il-17f*, utilizando el equipo “*StepOne Plus de Life Technologies*”.

## **Separación de células**

### Linfocitos T CD4+CD25- y CD4+CD25+

Esplenocitos y nódulos linfáticos de ratones no inmunizados o con EAE en fase crónica e inductiva fueron extraídos y las células CD4+CD25- y CD4+CD25+ fueron purificados con el kit “*EasySep™ Mouse CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit II*” (Stem Cell). Las células CD3+CD4+CD25- obtenidas tenían una pureza mayor al 95% y mayor al 80% en el caso de las células CD3+CD4+CD25+, en donde la expresión de FOXP3+ fue determinada por citometría de flujo.

### Linfocitos T CD4+naïve

Esplenocitos de ratones con EAE y 2D2 fueron extraídos y linfocitos T CD4+ naïve fueron purificados con el kit “*EasySep™ Mouse CD4+ T Cell Isolation Kit*” (Stem Cell). Las células CD3+CD4+CD62L+CD44- obtenidas presentaron una pureza mayor al 95%, determinado por citometría de flujo.

### Células CD11b+

Esplenocitos de ratones en fase crónica de la EAE fueron extraídos y se purificaron las células CD11b+ con el kit “*EasySep™ Mouse CD11b Positive Selection Kit II*” (Stem Cell). Las células CD11b+ obtenidas presentaron una pureza mayor al 90% determinado por citometría de flujo.

## **Cultivo Celular**

### **Análisis de sub-poblaciones de linfocitos Tregs y APC**

Se realizaron análisis multiparamétrico de citometría de flujo de los subtipos de linfocitos Tregs y APC provenientes del SNC, de los nódulos linfáticos y del bazo, de animales tratados con IFN- $\gamma$  durante la fase crónica de la EAE. Para ello, las células totales se cultivaron 18 horas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL en medio de cultivo IMDM (Invitrogen) complementado con 2mM L-Glutamina (GIBCO), 1% Aminoácidos no esenciales (GIBCO), 1% Piruvato de sodio (GIBCO), 0,2 $\mu$ M 2-Mercaptoetanol (GIBCO), 1% Penicilina/Estreptomina (GIBCO), y 10% Suero Fetal Bovino (FBS) (GIBCO), en un ambiente de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron estimuladas con 10  $\mu$ g/mL del péptido MOG<sub>35-55</sub> o con 1  $\mu$ g/mL de anticuerpos anti-CD3/ anti-CD28 (CD3/CD28) (eBioscience), durante 18 horas. Durante las 4 últimas horas de cultivo se estimuló con 50 ng/mL PMA, 500 ng/mL Ionomicina y 5  $\mu$ g/mL Brefeldina A (Sigma) promoviendo la producción y acumulación de citoquinas intracelulares. En el caso del análisis de las APC, sólo se consideró la condición sin estímulos, y debido a que sólo se utilizó un marcaje superficial, no se añadió PMA, Ionomicina, ni BFA. El sobrenadante de los cultivos sin estímulos, fue guardado y congelado a -80°C para posterior análisis de citoquinas mediante ensayo de multiplex.

### **Estimulación con IFN- $\gamma$ ex vivo de células totales**

Dependiendo del experimento, células totales del SNC, nódulos linfáticos y/o bazo, de animales no inmunizados, en la fase inductiva o crónica de la EAE, fueron cultivadas a 1 millón de células/mL y estimuladas en presencia de 0, 0.1, 1, 10, 25, 50 y 100 ng/mL de IFN- $\gamma$ , 5  $\mu$ g/mL de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  (eBioscience) o 5  $\mu$ g/mL de anticuerpo isotipo de Ig (eBioscience), durante 16 horas (para determinar apoptosis celular) o 3 días (para determinar marcadores de linfocitos Tregs, APC y proliferación celular) en un ambiente de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. En este caso, se utilizó el medio de cultivo X-VIVO 20 (Lonza) libre de suero.



## **Estimulación con IFN- $\gamma$ *in vitro* de linfocitos CD4+CD25-, CD4+CD25+ y células CD11b+.**

Células purificadas CD4+CD25-, CD4+CD25+ y CD11b+ fueron cultivadas a 1 millón de células/mL, y estimuladas en presencia de 0, 0.1, 1, 10, 25, 50 y 100 ng/mL de IFN- $\gamma$ , 5  $\mu$ g/mL de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  (eBioscience) o 5  $\mu$ g/mL de anticuerpo isotipo de Ig (eBioscience), durante 1 o 3 días en un ambiente de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El sobrenadante de los cultivos, fue guardado y congelado a -80°C para posterior análisis de citoquinas mediante ensayo de multiplex.

Las células CD4+CD25-, CD4+CD25+ fueron cultivadas en presencia de 2  $\mu$ g/mL de anticuerpos anti-CD3 (pegado a la placa) y 1  $\mu$ g/mL de anti-CD28, durante 3 días. Se agregó 10 ng/mL de IL-2 para las células CD4+CD25+. El efecto de IFN- $\gamma$  se evaluó también en condiciones de inducción de linfocitos Tregs con 2 ng/mL de TGF- $\beta$  (eBioscience) y 10 ng/mL de IL-2, y de linfocitos Tr1 con 50 ng/mL de IL-27 (eBioscience). En el caso de las células CD11b+, estas fueron cultivadas en presencia de 10  $\mu$ g/mL pMOG durante 1 o 3 días. Se utilizó el medio X-VIVO 20 (Lonza) libre de suero.

Posteriormente el análisis de marcadores de linfocitos Tregs o CD11b+ se realizó mediante citometría de flujo.

## **Proliferación y Apoptosis celular**

### **Proliferación celular**

Células totales infiltrantes del SNC, de nódulos linfáticos y del bazo, de animales en fase crónica de la EAE fueron cultivadas en presencia de 2  $\mu$ g/mL de anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL aCD28 o 10  $\mu$ g/mL pMOG en presencia de diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (0, 1, 10, 25, 50 y 100 ng/mL), 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  o 5  $\mu$ g/mL del control de isotipo, durante 72 horas. Después de las primeras 24 horas, las células fueron pulsadas con 1  $\mu$ Ci de timidina triteada, y al término de las 72 horas, se determinó las cuentas por millón (cpm).

## Apoptosis celular

Las células fueron estimuladas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, sólo que esta vez por 16 horas y marcadas con anticuerpo anti-Anexina-V, utilizando el kit de apoptosis celular “Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit” (Thermofisher) y analizadas por citometría de flujo.

## Análisis de citometría de flujo

El análisis simultáneo de la expresión de múltiples marcadores celulares fue realizado en el citómetro de flujo FACS LSR Fortessa de “Becton Dickinson”, que permite el análisis combinado de 16 parámetros. Se utilizó la sonda de viabilidad “*LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit*” (Thermofisher) para marcar las células vivas. Los receptores Fc fueron bloqueados con 0.25 µg de anticuerpos anti-CD16/32 (eBioscience). En algunos casos, las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando el kit “*eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set*” (eBioscience) para el marcaje intracelular de antígenos. Finalmente, las células fueron resuspendidas en PBS 2% FBS, para luego ser analizadas por citometría de flujo.

Las siguientes subpoblaciones celulares fueron analizadas, dentro de la ventana de selección para células vivas: linfocitos T CD4+ efectores Th1 (IFN-γ+), Th2 (IL-4+), Th17 (IL-17A+), CD4+GM-CSF+, reguladores Tr1 (IL-10+ o CD49b+LAG-3+) y Th3 (LAP+), linfocitos Tregs (CD25<sup>hi</sup> FOXP3+), nTregs (naturales, NRP-1+), iTregs (inducibles, NRP-1-), Treg-Th1 like (CD25<sup>hi</sup> FOXP3+TBET+IFN-γ+) y Treg-Th17 like (CD25<sup>hi</sup> FOXP3+RORyt+-IL-17A+), linfocitos T CD8 TGF-β (LAP+) y T CD8+FOXP3+.

En algunos ensayos, se determinó la frecuencia celular de diferentes subgrupos de células CD11b+: CD11b+CD11c-, células dendríticas (CD11b+CD11c+), y microglía (CD45+CD11b+CD39+). En ellas, se analizó además la expresión de las moléculas MHC-II, CD80, CD86, LAP (TGF-β), PD-L1 y PD-L2. Los resultados de citometría de flujo fueron analizados con el software FlowJo version X 10.6.

## **Análisis de secreción de citoquinas**

Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron ensayados para determinar la concentración de citoquinas y otros factores secretados. Se evaluó un panel de citoquinas pro- y anti-inflamatorias incluyendo: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17A, y TGF- $\beta$ , y otro panel con IL-10, Granzima B y sFASL mediante inmunoensayos de Multiplex “MILLIPLEX® Multiplex Assays”. Los análisis fueron realizados en el equipo “Luminex® 200™ System” (Merk Millipore).

## **Ensayo de inhibición de la proliferación de linfocitos T efectores**

La función supresora de los linfocitos CD4+CD25- o CD4+CD25+ previamente estimulados durante 72 con 25ng/mL de IFN- $\gamma$  fue evaluada realizando un ensayo de inhibición sobre la proliferación de linfocitos T efectores (Teff). Para ello,  $5 \times 10^4$  de linfocitos T (CD45.2) CD4+CD25- o CD4+CD25+ tratados con IFN- $\gamma$  fueron co-cultivados en diferentes proporciones (2/1, 4/1, 8/1, 16/1 y 32/1) con linfocitos T efectores (CD4+CD25-, provenientes de ratón CD45.1) previamente marcados con 5uM de “*Violet-proliferation Dye kit*” (Thermofisher). Los co-cultivos fueron estimulados con 2  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-CD3 (pegado a la placa) y 1  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-CD28, por 72 horas. Finalmente, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD45.1 y anti-CD45.2 y la proliferación monitoreada (sobre células vivas) por citometría de flujo.

## **Ensayo de inducción de linfocitos Tregs por células CD11b+ estimuladas con IFN- $\gamma$**

Inducción con células CD11b+ obtenidas de ratones EAE tratados con IFN- $\gamma$  *in vivo*

Células CD11b+ purificadas del bazo de animales en fase crónica de la EAE, tratados durante 5 días con 1  $\mu$ g de IFN- $\gamma$  o PBS, fueron cultivadas durante 4 días en una razón 1:1 con linfocitos T CD4+ naïve obtenidas del bazo de animales no inmunizados, en presencia de 2  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-CD3 soluble, o con 10  $\mu$ g/mL

de MOG cuando se cultivaron con linfocitos T CD4+ naïve del bazo de animales 2D2. Además, se evaluó una condición en la que se adicionó 5 µg/mL de anticuerpo anti-TGF-β y su respectivo control de isotipo. Posteriormente, se analizó la frecuencia de linfocitos Tregs mediante citometría de flujo.

#### Inducción con células CD11b+ estimuladas con IFN-γ in vitro

Células CD11b+ purificadas del bazo de animales en fase crónica de la EAE, fueron cultivadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de IFN-γ (0, 1, 10, 25, 50 y 100 ng/mL) en presencia de 10 µg/mL del péptido MOG. Luego, las células fueron lavadas, y co-cultivadas con linfocitos T CD4+ naïve provenientes de animales no inmunizados o 2D2 y con 2 µg/mL anti-CD3 soluble o 10 µg/mL del péptido MOG, respectivamente. Además, se evaluaron condiciones en presencia de 5 µg/mL de anticuerpos anti-TGF-β, anti-PD-L1(eBioscience) y anti-PD-L2 (eBioscience), y sus respectivos controles de isotipo. La frecuencia de linfocitos Tregs se determinó mediante citometría de flujo.

## V. RESULTADOS

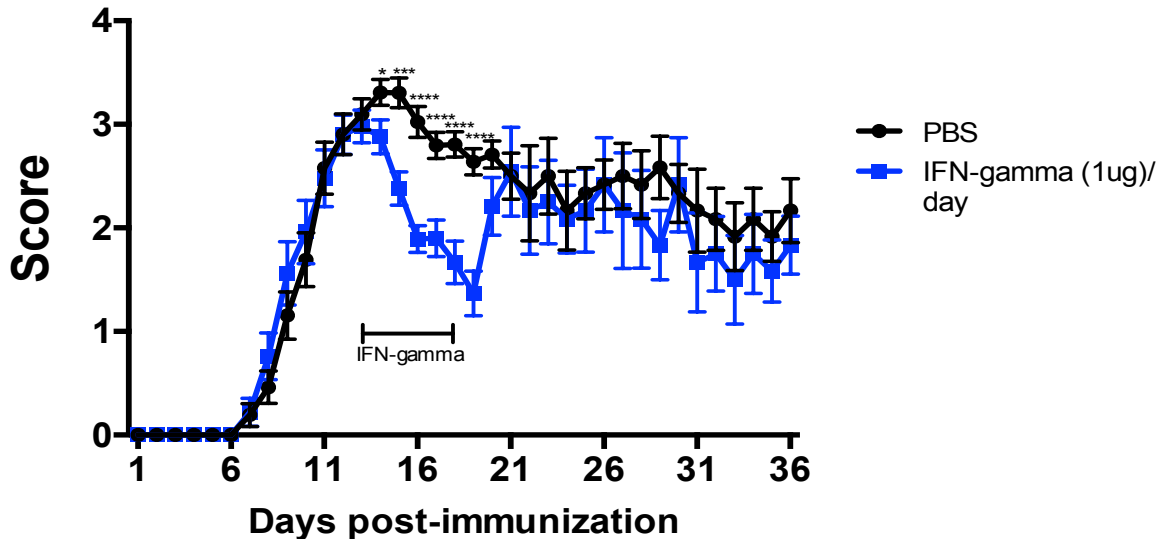
### **Objetivo específico 1: Determinar el efecto de IFN- $\gamma$ sobre distintas poblaciones de linfocitos T reguladores periféricos e infiltrantes en el SNC.**

*Determinar si el efecto protector de IFN- $\gamma$  in vivo depende de linfocitos T reguladores*

Hasta ahora, no se conocen muy bien los mecanismos protectores de IFN- $\gamma$  en la EAE y EM. El primer objetivo de esta tesis, parte con el establecimiento del modelo animal de EAE, y caracterizar el efecto de un tratamiento con IFN- $\gamma$  sobre diferentes poblaciones de linfocitos Tregs en el inicio de la fase crónica. Nuestros primeros resultados concuerdan con lo descrito previamente en la literatura [56], [57], [67]: IFN- $\gamma$  es capaz de reducir los síntomas de la EAE en fase crónica mientras dura el tratamiento (**Figura 8**). De manera interesante, una vez finalizado el tratamiento, los animales se enferman rápidamente al mismo nivel que el grupo control (PBS), por lo que la administración exógena de IFN- $\gamma$  ejerce una función reguladora fundamental durante la fase crónica de la EAE.

Con el fin de confirmar si el efecto protector de IFN- $\gamma$ , disminuyendo los síntomas de la EAE depende de los linfocitos Tregs tratamos ratones durante la fase crónica de la EAE con dos dosis del anticuerpo neutralizante anti-CD25, previo al inicio de la administración de IFN- $\gamma$ . El tratamiento con el anticuerpo anti-CD25 ha sido utilizado por varios grupos de investigadores para depletar la población de linfocitos Tregs y ha sido mostrado particularmente que su administración durante la fase inductiva de la EAE empeora los síntomas de la enfermedad [40], [41], [44], [90], [91]. Sorprendentemente para nosotros, los resultados mostraron que el tratamiento con anti-CD25 tuvo efectos protectores por sí solo y no afectó significativamente la inmunosupresión inducida por IFN- $\gamma$  (**Figura 9 A**). Una posible explicación a este resultado inesperado es que durante la fase crónica de la EAE existe una mayor proporción de linfocitos T efectoros (CD4+CD25+FOXP3-) versus linfocitos Tregs (**Figura 9 B**), por lo que el tratamiento con anti-CD25 podría estar depletando la población de linfocitos T efectoros. De manera interesante, el tratamiento con IFN- $\gamma$  inclina la proporción Tefector/Treg hacia un perfil más regulador (**Figura 9 B**).

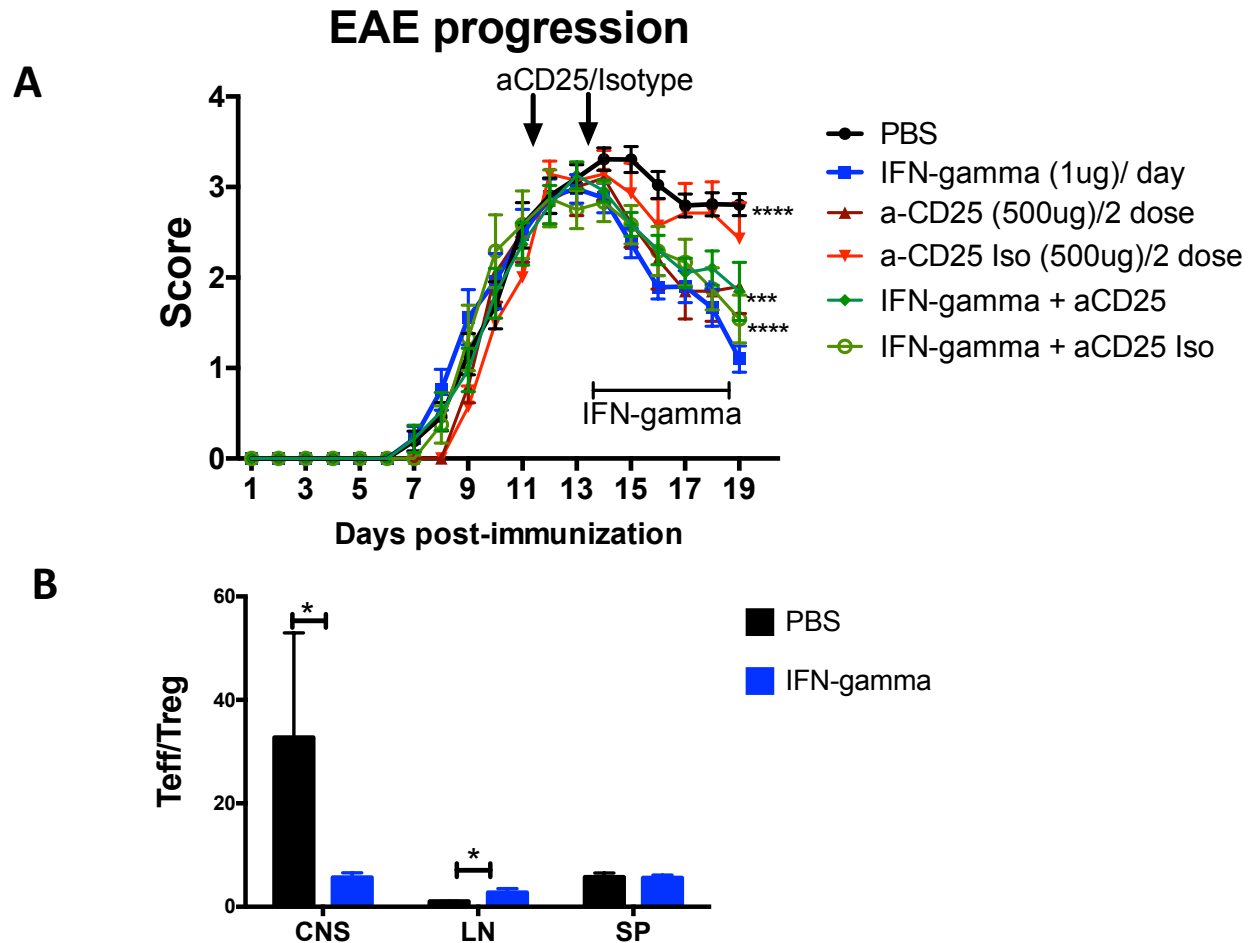
## EAE progression



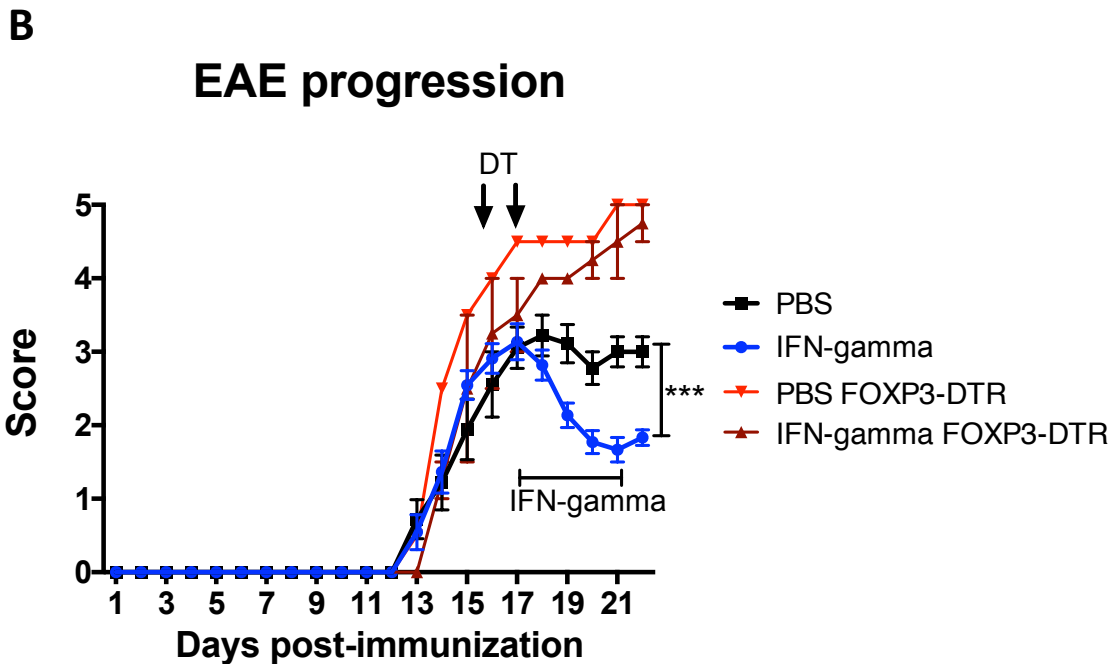
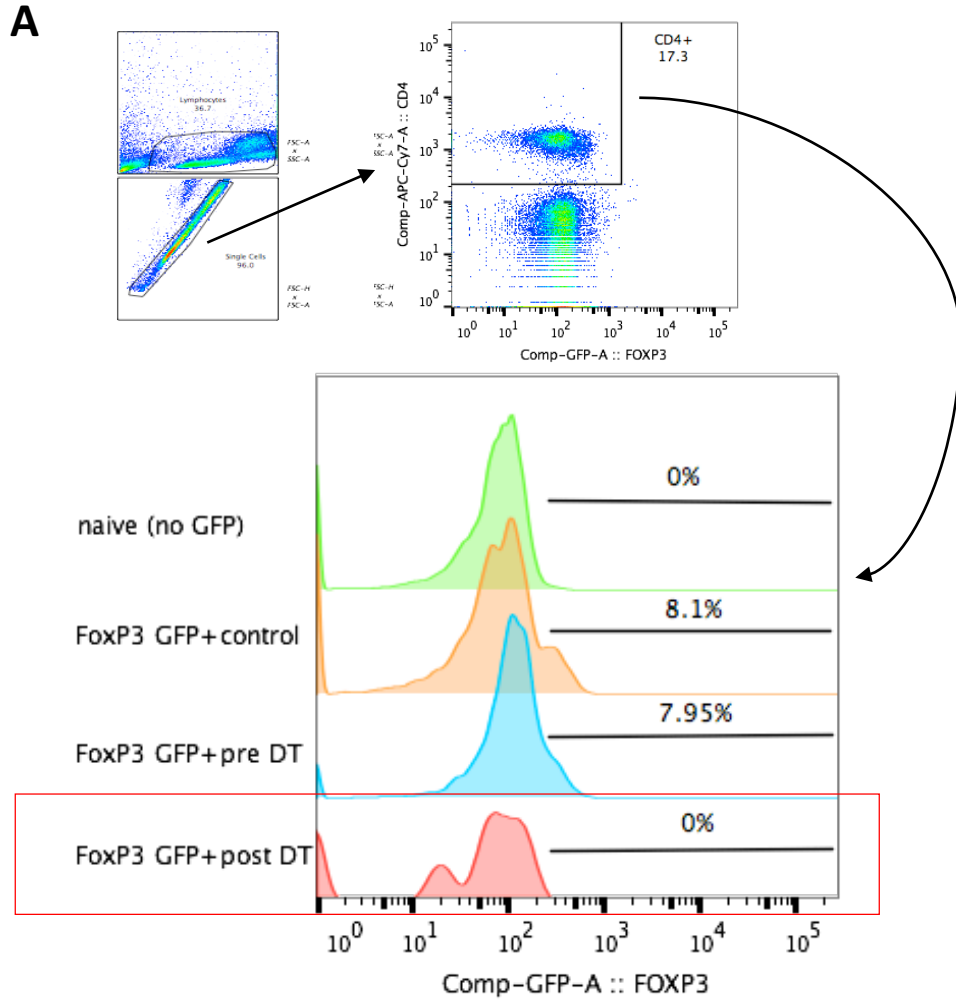
**Figura 8. Efecto de la administración *in vivo* de IFN- $\gamma$  durante la fase crónica de la EAE.** Dos grupos de ratones C57BL/6J fueron inmunizados con el péptido encefalitogénico MOG (150  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub>; 500  $\mu$ g MT; 200 ng PT) para inducir EAE crónica. Se inició el tratamiento (IP) en el *peak* de la fase crónica de la EAE (día 14 post-inmunización) con 1  $\mu$ g de IFN- $\gamma$  diario (cuadrados azules) o PBS (control, círculos negros) durante 5 días (hasta el día 19). La enfermedad fue monitoreada diariamente durante 36 días post-inmunización. Barras de error representan promedio $\pm$ SEM de 6 experimentos independientes, n total IFN- $\gamma$  = 26, n PBS= 25. \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\*<0.0001.

Lo inesperado del resultado anterior, nos llevó a utilizar el modelo animal C57BL/6J FOXP3<sup>GFP-DTR</sup>, en los cuales, mediante la administración de la toxina diftérica humana, se induce una ablación de las células que expresan FOXP3. Un grupo de animales C57BL/6J FOXP3<sup>GFP-DTR</sup> fue inducido con EAE, y al llegar al inicio de la fase crónica fueron tratados con toxina diftérica para depletar la población FOXP3+ (**Figura 10 A**), lo que fue seguido por la administración de IFN- $\gamma$  durante 5 días (**Figura 10 B**). Luego de eliminar los linfocitos Tregs en esta fase crónica de la EAE se encontró que la enfermedad empeora, concordando con lo descrito por Koutrolos *et al* (Acta Neuropathol Commun, 2014) [42]. Por lo tanto, los resultados muestran que los efectos terapéuticos de IFN- $\gamma$  durante la fase crónica de la EAE dependen de los linfocitos Tregs y que, en

ausencia de estas células reguladoras, IFN- $\gamma$  es incapaz de reducir los síntomas de la enfermedad. Además, estos resultados comprueban que el tratamiento con IFN- $\gamma$ , depende de la expresión *in vivo* de FOXP3 (linfocitos Tregs), pero no así de CD25.



**Figura 9. Efecto de la administración *in vivo* de IFN- $\gamma$  y anticuerpos anti-CD25, durante la fase crónica de la EAE.** Grupos de ratones C57BL/6J fueron inmunizados con el péptido MOG (150  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub>; 500  $\mu$ g MT; 200 ng PT) para inducir EAE crónica y se inició tratamiento (IP) en el *peak* de la fase crónica de la EAE (día 13). **A)** Se trató con 1  $\mu$ g de IFN- $\gamma$  diario (cuadrados azules) o PBS (control, círculos negros), 500  $\mu$ g de anti-CD25 dos día pre-tratamiento con IFN- $\gamma$  (día 11), y una segunda dosis dos días después de la primera (triángulo marrón), 500  $\mu$ g de anti-CD25 isotipo en las misma dosis mencionada anteriormente (triángulo rojo), IFN- $\gamma$  + anti-CD25 (igual dosis y administración) (rombo verde) e IFN- $\gamma$  + anti-CD25 isotipo (igual dosis y administración) (círculo verde), durante 6 días. **B)** Proporción de linfocitos T efector/Treg después de 5 días post-tratamiento con IFN- $\gamma$ , en el SNC (CNS), nódulos linfáticos cervicales (LN) y bazo (SP). Barras de error representan promedio $\pm$ SEM. Promedio de 3 experimentos, n = 6-10 ratones/grupo para ratones C57BL/6J. \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001.

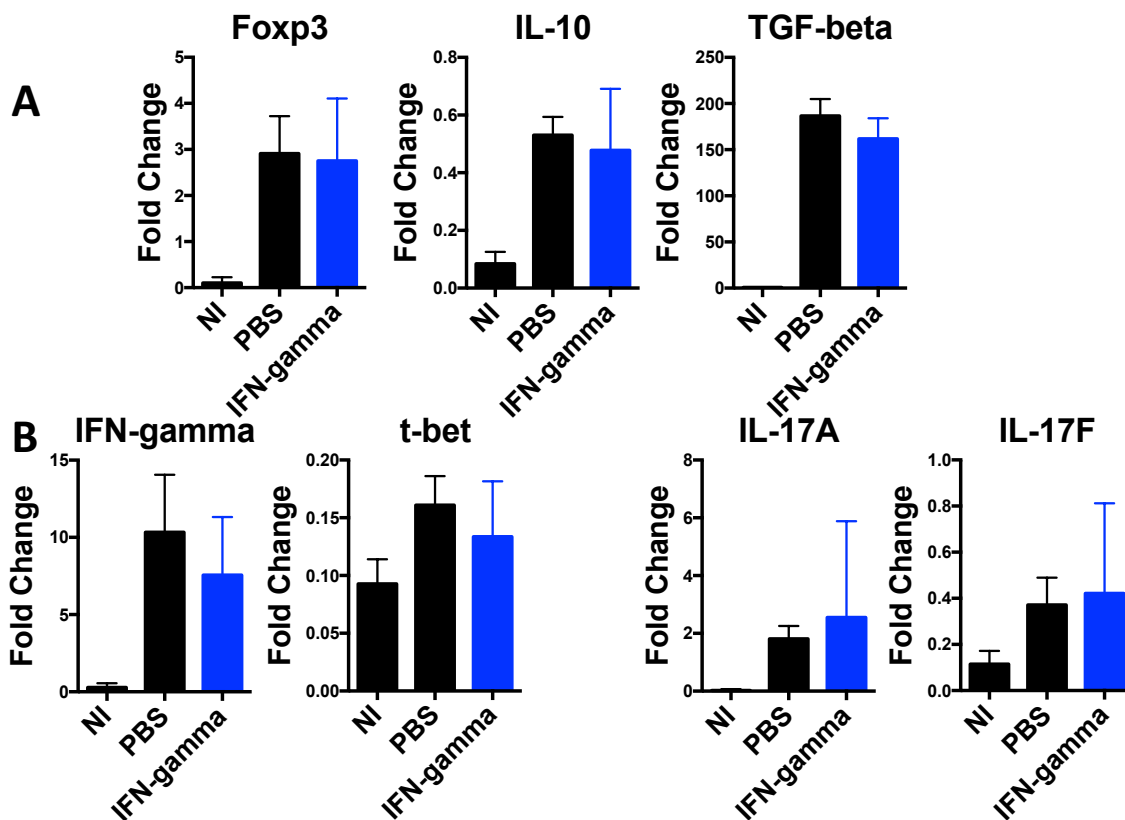




**Figura 10. Efecto de la administración *in vivo* de IFN- $\gamma$  en ausencia de linfocitos Tregs durante la fase crónica de la EAE.** Grupos de ratones C57BL/6J y C57BL/6J FOXP3<sup>GFP-DTR</sup> fueron inmunizados con el péptido MOG (150  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub>; 500  $\mu$ g MT; 200 ng PT) para inducir EAE crónica y se inició tratamiento (IP) en el peak de la fase crónica de la EAE (día 16). Se depletó la expresión de FOXP3 en los grupos de ratones C57BL/6J FOXP3<sup>GFP-DTR</sup> con dos dosis de 2.5  $\mu$ g por ratón de toxina diftérica (DT). **A)** Demostración de la depleción de linfocitos Tregs mediante la citometría de flujo al medir la frecuencia de células FOXP3<sup>GFP+</sup> en sangre. **B)** Una vez depletados los linfocitos Tregs, se inició tratamiento con 1  $\mu$ g diario (durante 5 días) de IFN- $\gamma$  (círculos azules para el grupo C57BL/6J y triángulo marrón para el grupo C57BL/6J FOXP3<sup>GFP-DTR</sup>) y PBS (cuadrado negro para el grupo C57BL/6J y triángulo rojo para el grupo C57BL/6J FOXP3<sup>GFP-DTR</sup>). Barras de error representan promedio $\pm$ SEM. Promedio de 2 experimentos independientes, 6-10 ratones/grupo para ratones C57BL/6J y 1-2 C57BL/6J FOXP3<sup>GFP-DTR</sup>. \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001.

*Determinar el efecto de IFN- $\gamma$  sobre las distintas sub-poblaciones de linfocitos T reguladores.*

Primero, buscamos determinar el estatus general del ambiente inflamatorio del SNC durante el tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$ . Para esto, se determinó la expresión de mRNA de distintos marcadores patogénicos y reguladores en médula espinal completa de ratones con EAE, tratados en fase crónica con IFN- $\gamma$  o PBS. Las moléculas analizadas fueron *foxp3*, *il-10*, *tgf-beta1*, *ifn-gamma*, *tbx21* (t-bet), *il-17a* y *IL-17f*, no observándose diferencias significativas en la expresión de estas moléculas entre los grupos de ratones estudiados (**Figura 11**).

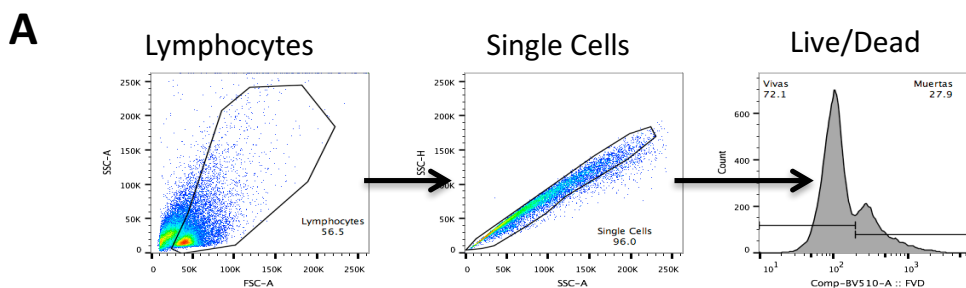


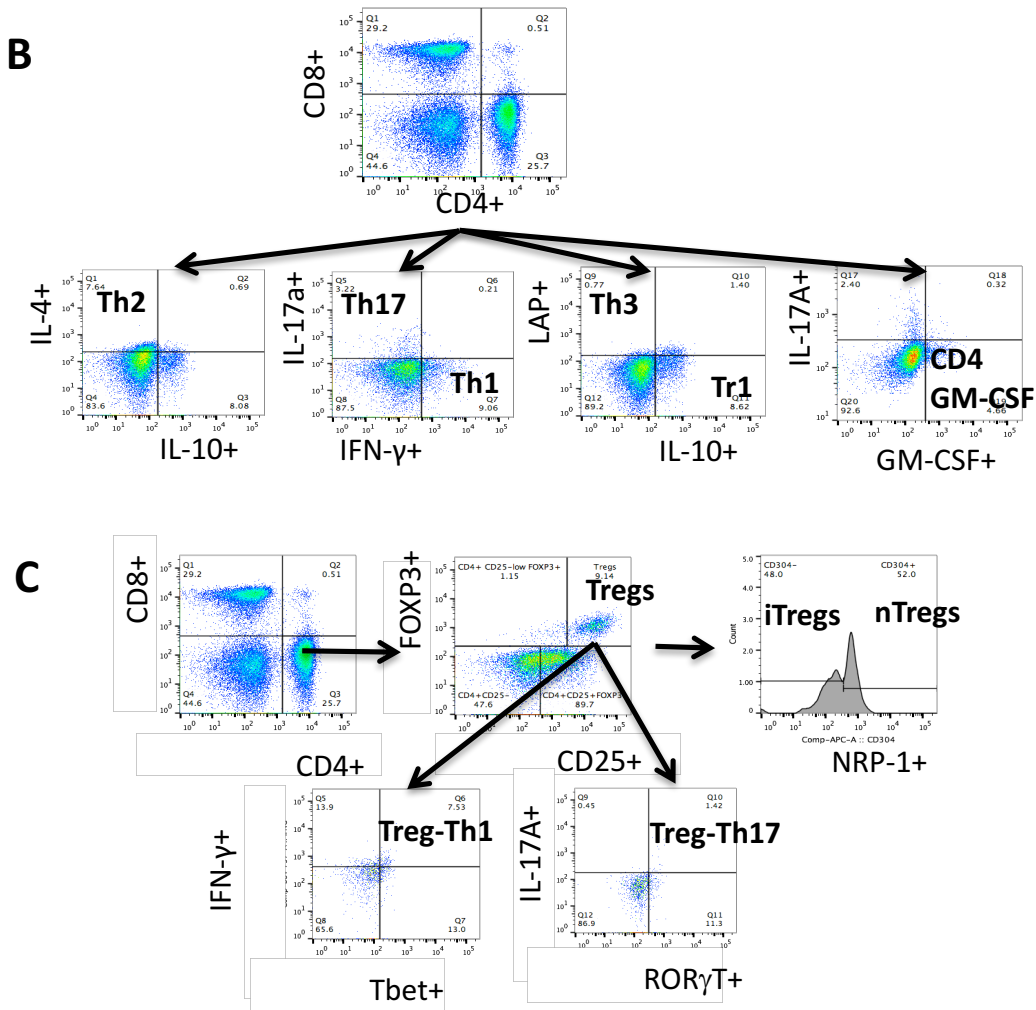
**Figura 11. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la expresión de mRNA de marcadores de regulación e inflamatorios.** Se extrajo RNA desde médula espinal de ratones tratados durante 5 días con 1  $\mu$ g/ratón de IFN- $\gamma$ , PBS y no inmunizados (NI) y se determinaron los niveles de expresión de marcadores de regulación **A)** FOXP3+, IL-10+ y TGF- $\beta$  e inflamatorios **B)** IFN- $\gamma$ , t-bet, IL-17A e IL-17F. Barras representan promedio $\pm$ SD de 5 experimentos independientes.

A continuación, se procedió a la estandarización de un panel multi-paramétrico de citometría de flujo para determinar el efecto de IFN- $\gamma$  sobre las distintas subpoblaciones de linfocitos Tregs. En este panel, se identificaron tanto poblaciones T CD4+ efectoras como reguladoras: Th1 (IFN-g+), Th2 (IL-4+), Th17 (IL-17A+), CD4+LAP+ (TGF- $\beta$ +, Th3), Tr1 (IL-10+), Tregs convencionales (CD25hiFoxP3+), nTregs (NRP-1+), iTregs (NRP-1-), Treg-Th1 like (CD25hiFoxP3+Tbet+IFN- $\gamma$ +) y Treg-Th17 like (CD25hi FoxP3+RORyt+IL-17A+) (**Figura 12**). Para caracterizar el efecto de IFN- $\gamma$  sobre estas subpoblaciones, ratones en fase crónica de la EAE fueron tratados con IFN- $\gamma$  o PBS y después de 5 días (día 19 post-inmunización) fueron eutanasiados y se procedió a

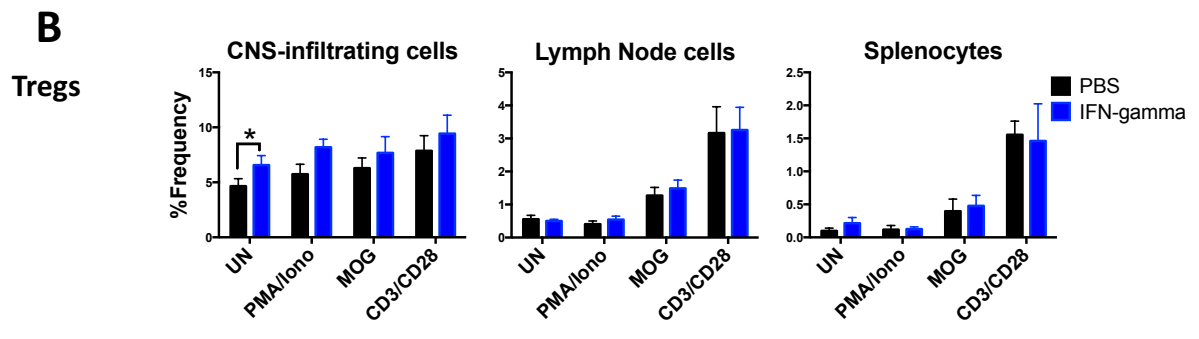
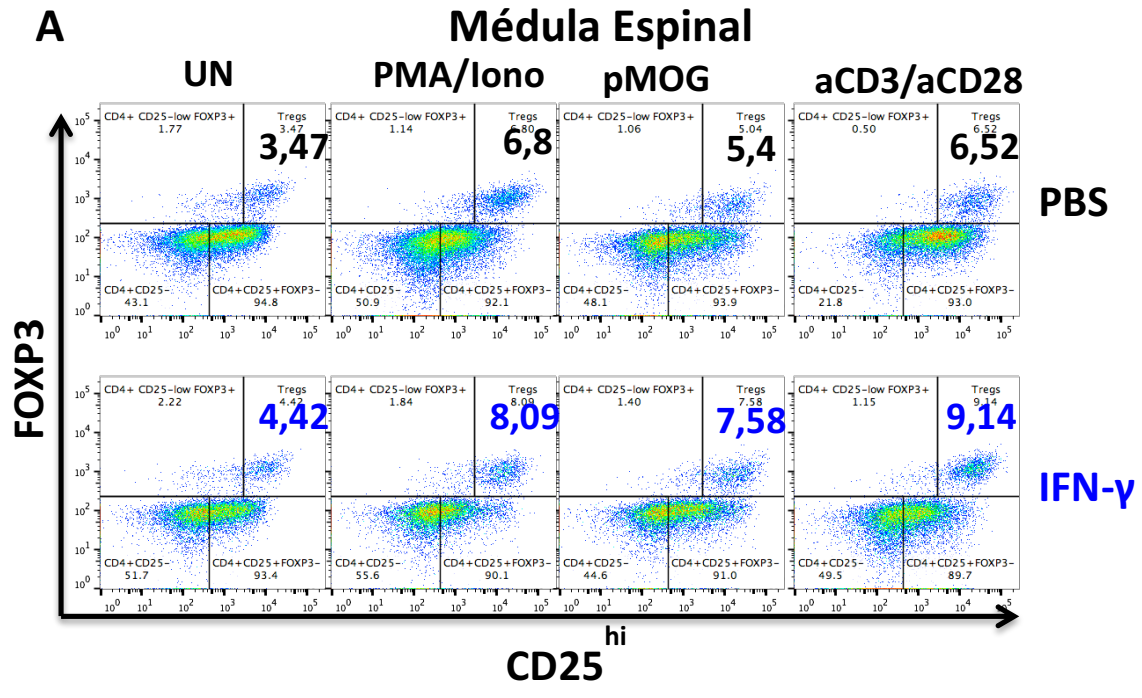
extraer células mononucleares infiltrantes del SNC y células periféricas de los nódulos linfáticos cervicales y del bazo. Las células fueron analizadas por citometría de flujo después de ser estimuladas *ex vivo* durante 18 horas con pMOG (estimulación antigénica específica) o anti-CD3/anti-CD28 (estimulación inespecífica). Los análisis mostraron que los ratones tratados con IFN- $\gamma$  presentaron una frecuencia significativamente mayor de linfocitos Tregs provenientes de células infiltrantes del SNC, en comparación con el grupo control (**Figura 13 A-B**). No se observó diferencia significativa sobre poblaciones efectoras (**Figura 14**), ni otro tipo de poblaciones reguladoras como CD4+IL-10+ (**Figura 13 C**) ni CD4+LAP+ (**Figura 13 D**). Tampoco se detectó diferencia significativa en las poblaciones de linfocitos T reguladoras, Treg-Th1 like (**Figura 15**) y Treg-Th17 like (**Figura 16**), las cuales se ha mostrado podrían estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad [78], [92], [93].

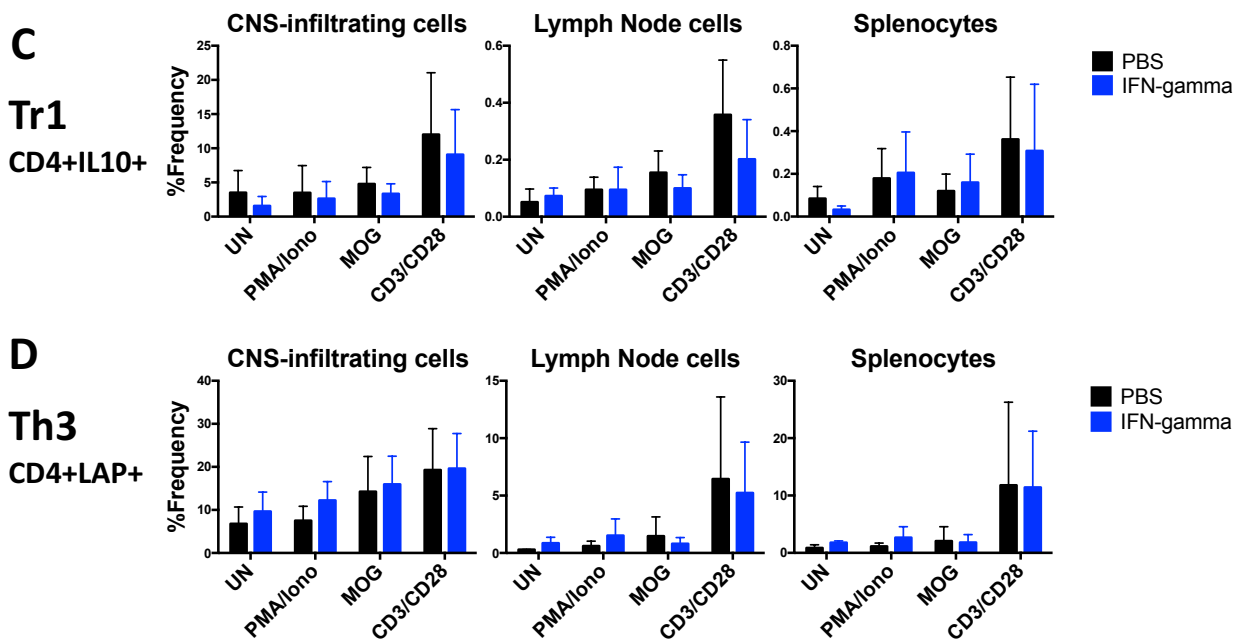
Además, se determinó mediante ensayo de multiplex, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el sobrenadante celular (de la condición no-estimulada), encontrando que las células provenientes de los nódulos linfáticos cervicales y del bazo de ratones EAE tratados con IFN- $\gamma$  expresan significativamente menores niveles de IFN- $\gamma$  e IL-10, respectivamente, que aquellas células obtenidas de ratones EAE tratados con PBS (**Figura 17**). Los niveles de TGF- $\beta$  estuvieron bajo el nivel de detección (datos no mostrados). Hasta ahora, podemos indicar que el tratamiento con IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE, genera un incremento significativo de linfocitos Tregs convencionales en el SNC, los cuales son necesarios para reducir los síntomas.



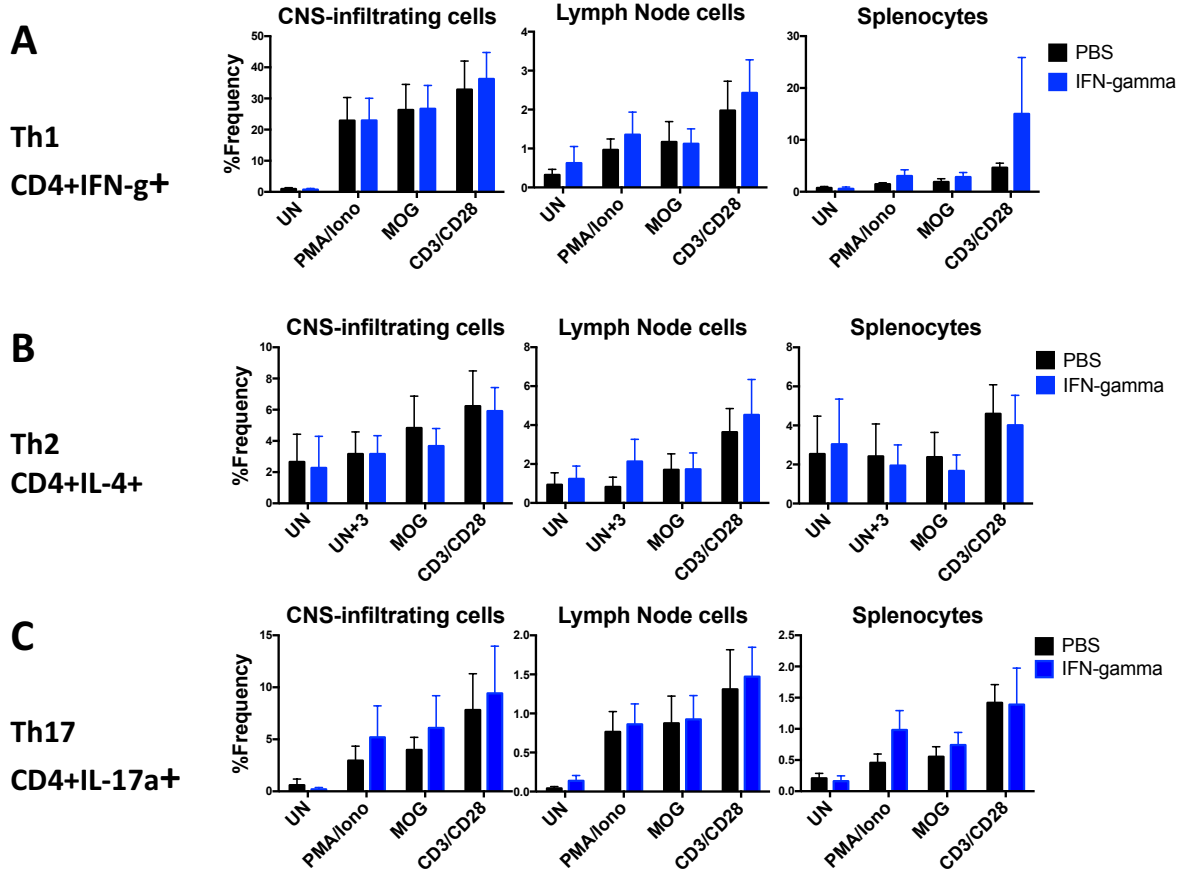


**Figura 12. Estrategia de análisis multi-paramétrico de citometría de flujo, para poblaciones de linfocitos T CD4+ efectoras y reguladoras.** Análisis multi-paramétrico para determinar frecuencia de poblaciones de linfocitos T CD4+efectoras y reguladoras. La mejor configuración de fluoróforos y dilución de anticuerpos, se realizó en esplenocitos de ratones EAE. En la figura se muestra un análisis representativo de células mononucleares infiltrantes en el SNC de ratones EAE. **A)** Gráficos de adquisición básicos para determinar frecuencia de linfocitos vivos. **B-C)** Estrategia de selección de poblaciones de linfocitos T CD4+ efectoras Th1 (IFN-γ+), Th2 (IL-4+), Th17 (IL-17A+), CD4+GM-CSF+, reguladores Tr1 (IL-10+) y Th3 (LAP+). **C)** Estrategia de selección de poblaciones de linfocitos T reguladoras (CD25<sup>hi</sup> FOXP3+), nTregs (naturales, NRP-1+), iTregs (inducibles, NRP-1-), Treg-Th1 like (CD25<sup>hi</sup> FOXP3+TBET+IFN-γ+) y Treg-Th17 like (CD25<sup>hi</sup> FOXP3+RORγT+-IL-17A+). La adquisición fue realizada en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD).

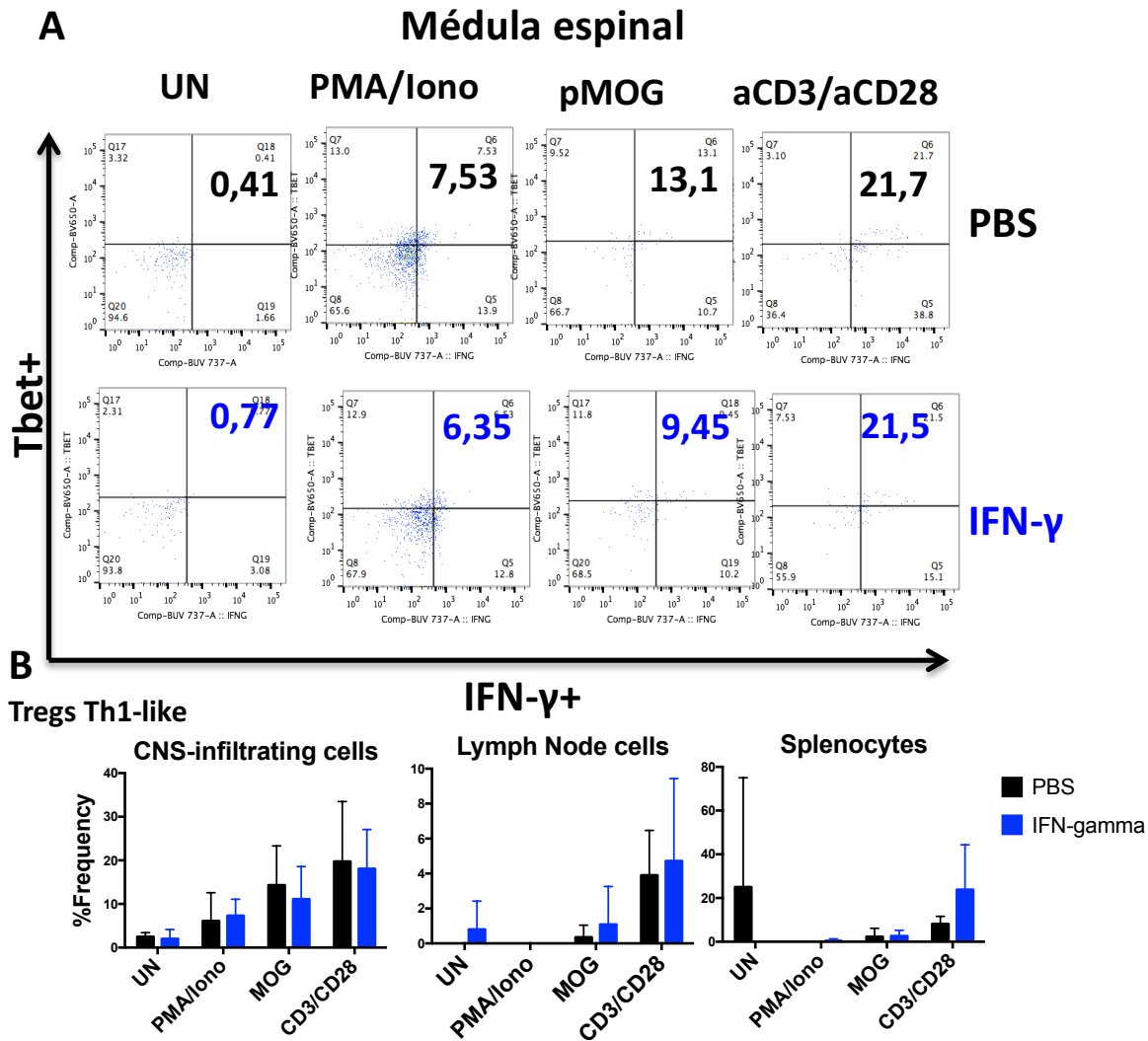




**Figura 13. El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$  induce un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs en el sistema nervioso central.** Ratones EAE iniciando la fase crónica de la enfermedad (día 14 post inmunización) fueron tratados con IFN- $\gamma$  o el vehículo (PBS) durante 5 días. Células mononucleares infiltrantes del SNC, células de los nódulos linfáticos cervicales y del bazo fueron aisladas y estimuladas *ex vivo* por 18 horas, en distintas condiciones: UN (no estimulado), pMOG (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pMOG<sub>35-55</sub>) y aCD3/aCD28 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD3 y anti-CD28). Durante las últimas 4 horas de cultivo las células (excepto la condición UN) fueron incubadas con PMA 50 ng/mL, Ionomicina 500 ng/mL y Brefeldina A 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para promover la producción y acumulación de citoquinas intra-celulares. **A)** Análisis de citometría de flujo representativo de la frecuencia de linfocitos Tregs convencionales (CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>) en el SNC de ratones tratados con PBS o IFN- $\gamma$ . **B)** Promedio de frecuencia de linfocitos Tregs convencionales (CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>), **C)** CD4+IL-10<sup>+</sup> y **D)** CD4+LAP<sup>+</sup>. Barras representan promedio $\pm$ SD de 5 experimentos independientes (n IFN- $\gamma$ =5; n PBS=5). \* $p$ <0.05.



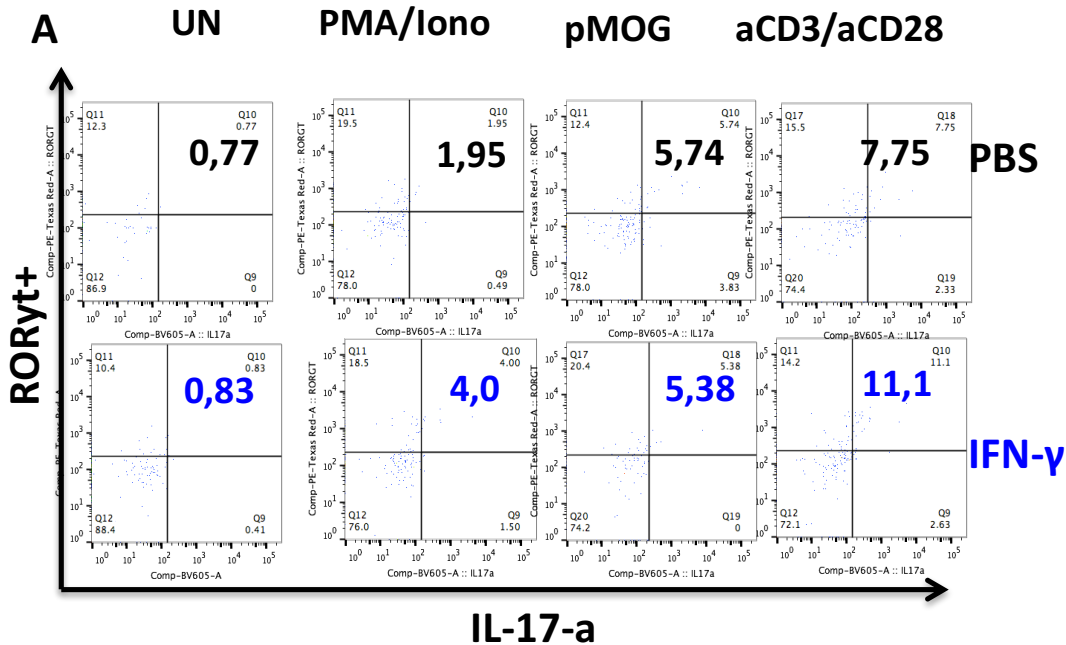
**Figura 14.** El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$  no afecta la frecuencia de linfocitos T efectores Th1, Th2, y Th17. Ratones EAE iniciando la fase crónica de la enfermedad (día 14 post inmunización) fueron tratados con IFN- $\gamma$  o el vehículo (PBS) durante 5 días. Células mononucleares infiltrantes del SNC, células de los nódulos linfáticos cervicales y del bazo fueron aisladas y estimuladas *ex vivo* por 18 horas, en distintas condiciones: UN (no estimulado), pMOG (10  $\mu$ g/mL pMOG<sub>35-55</sub>) y aCD3/aCD28 (1  $\mu$ g/mL de anti-CD3 y anti-CD28). Durante las últimas 4 horas de cultivo, las células (excepto la condición UN) fueron incubadas con PMA 50 ng/mL, Ionomicina 500 ng/mL y Brefeldina A 5  $\mu$ g/mL para promover la producción y acumulación de citoquinas intracelulares. **A)** Frecuencia de linfocitos Th1 (CD4+IFN-g+). **B)** Frecuencia de linfocitos Th2 (CD4+IL-4+), **C)** Frecuencia de linfocitos Th17 (CD4+IL-17-A+) en el SNC, nódulos linfáticos cervicales y bazo de ratones tratados con PBS (barras negras) o IFN- $\gamma$  (barras azules). Barras representan promedio $\pm$ SD de 5 experimentos independientes (n IFN- $\gamma$ =5; n PBS=5).



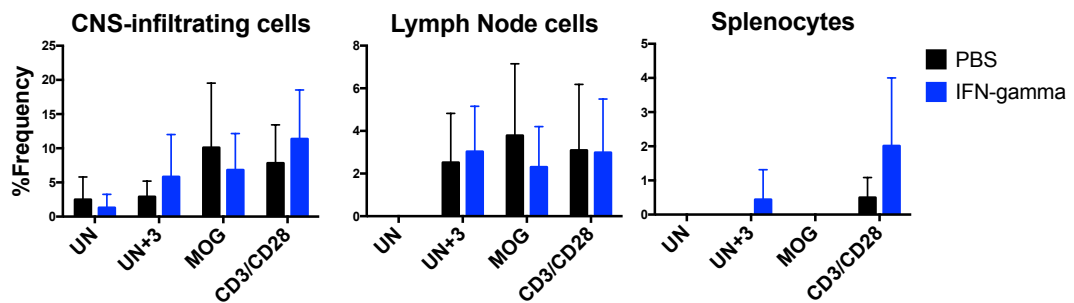
**Figura 15. El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$ , no afecta la frecuencia de linfocitos Tregs Th1-like en el sistema nervioso central.** Ratones EAE iniciando la fase crónica de la enfermedad (día 14 post inmunización) fueron tratados con IFN- $\gamma$  o el vehículo (PBS) durante 5 días. Células mononucleares infiltrantes del SNC, células de los nódulos linfáticos cervicales y del bazo fueron aisladas y estimuladas *ex vivo* por 18 horas, en distintas condiciones: UN (no estimulado), pMOG (10  $\mu$ g/mL pMOG<sub>35-55</sub>) y aCD3/aCD28 (1  $\mu$ g/mL de anti-CD3 y anti-CD28). Durante las últimas 4 horas de cultivo, las células (excepto la condición UN) fueron incubadas con PMA 50 ng/mL, Ionomicina 500 ng/mL y Brefeldina A 5  $\mu$ g/mL para promover la producción y acumulación de citoquinas intracelulares. **A**) Análisis de citometría de flujo representativo de la frecuencia de linfocitos Treg Th1-like (CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> IFN-g<sup>+</sup>) en el SNC de ratones tratados con PBS o IFN- $\gamma$ . **B**) Promedio de frecuencia de linfocitos Treg Th1-like convencionales (CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> IFN-g<sup>+</sup>). Barras representan promedio $\pm$ SD de 5 experimentos independientes (n IFN- $\gamma$ =5; n PBS=5).



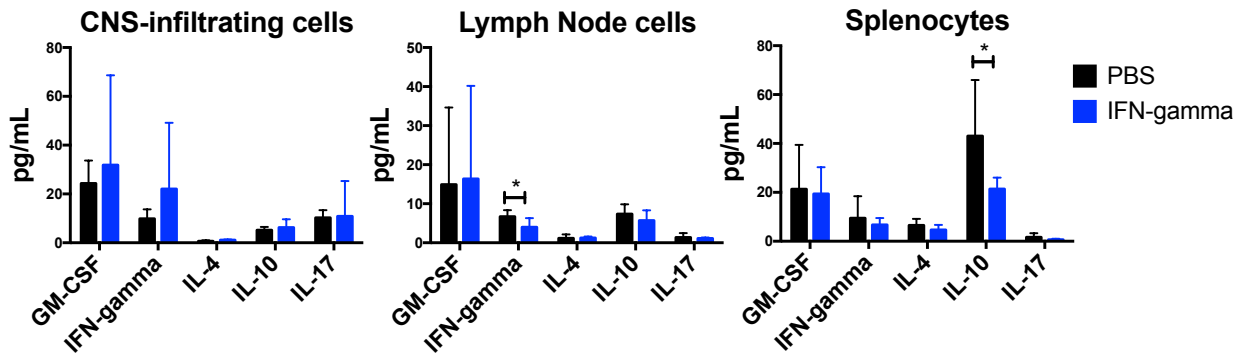
## Médula Espinal



**B**  
Tregs Th17-like



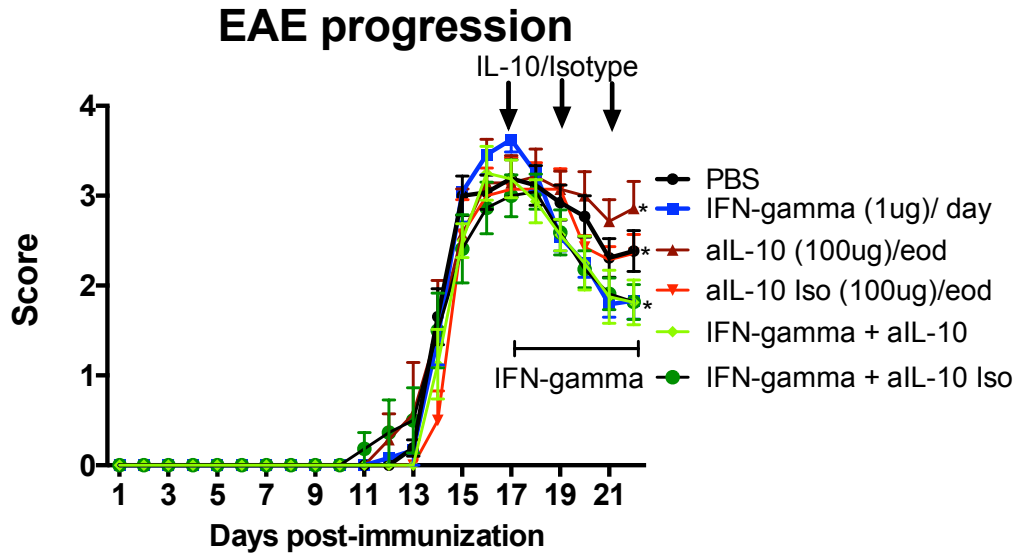
**Figura 16.** El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con IFN-γ no afecta la frecuencia de linfocitos Tregs-Th17 en el sistema nervioso central. Ratones EAE iniciando la fase crónica de la enfermedad (día 14 post inmunización) fueron tratados con IFN-γ o el vehículo (PBS) durante 5 días. Células mononucleares infiltrantes del SNC, células de los nódulos linfáticos cervicales y del bazo fueron aisladas y estimuladas *ex vivo* por 18 horas, en distintas condiciones: UN (no estimulado), pMOG (10 μg/mL pMOG<sub>35-55</sub>) y aCD3/aCD28 (1 μg/mL de anti-CD3 y anti-CD28). Durante las últimas 4 horas de cultivo las células (excepto la condición UN) fueron incubadas con PMA 50 ng/mL, Ionomicina 500 ng/mL y Brefeldina A 5 μg/mL. **A)** Análisis de citometría de flujo representativo de la frecuencia de linfocitos Tregs convencionales (CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup> IL-17a<sup>+</sup>). **B)** Promedio de frecuencia de linfocitos Tregs convencionales (CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup> IL-17a<sup>+</sup>). Barras representan promedio ± SD de 5 experimentos independientes (n IFN-γ=5; n PBS=5).



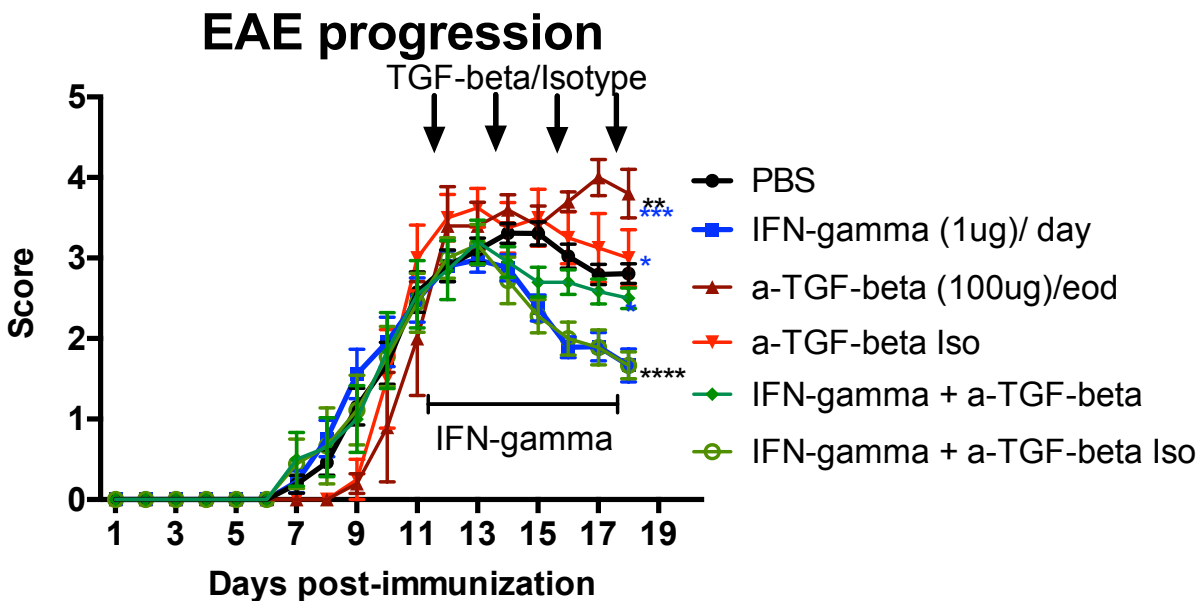
**Figura 17. El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$  induce una disminución en la secreción de IL-10 en esplenocitos e IFN- $\gamma$  en células de nódulos linfáticos cervicales.** Ratones EAE iniciando la fase crónica de la enfermedad (día 14 post inmunización) fueron tratados con IFN- $\gamma$  o el vehículo (PBS) durante 5 días. Células mononucleares infiltrantes del SNC, células de los nódulos linfáticos cervicales y del bazo fueron aisladas y cultivadas *ex vivo* por 18 horas. Se determinó en el sobrenadante, la expresión de citoquinas GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-17 mediante ensayo de multiplex. Promedio de niveles de secreción en pg/mL de las distintas citoquinas en el **A**) Sistema nervioso central (CNS) **B**) Nódulos linfáticos cervicales (Lymph node) y **C**) Bazo (Spleen) de ratones tratados con PBS (barras negras) o IFN- $\gamma$  (barras azules). Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes (n por grupo en cada experimento IFN- $\gamma$  =4; n PBS=4). \* $p$ <0.05.

*Evaluar si el efecto de IFN- $\gamma$  depende de moléculas reguladoras (IL-10 y TGF- $\beta$ ).*

Dado que IL-10[94] y TGF- $\beta$ [95] corresponden a dos moléculas reguladoras involucradas tanto en la diferenciación como en la función regulatoria de los linfocitos Tregs (Tr1 y Th3), decidimos evaluar si la capacidad protectora de IFN- $\gamma$  en la EAE es mediada por estas citoquinas. Para ello, ratones en fase crónica de la EAE fueron conjuntamente tratados con IFN- $\gamma$  y anticuerpos neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- $\beta$  durante siete días. Los resultados indican que la administración individual de anticuerpos anti-IL-10 o anti-TGF- $\beta$  muestran una exacerbación de la enfermedad (**Figuras 18-19**). El tratamiento combinado anti-IL-10 e IFN- $\gamma$  no tuvo influencia sobre los efectos protectores de IFN- $\gamma$  (**Figura 18**). En cambio, el tratamiento combinado anti-TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , suprimió los efectos protectores de IFN- $\gamma$ , sugiriendo que IFN- $\gamma$  depende de TGF- $\beta$  para mediar sus efectos terapéuticos en EAE.

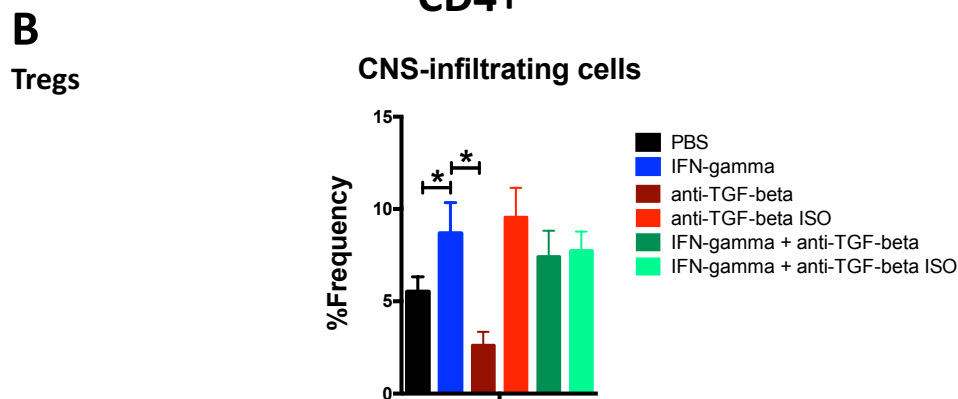
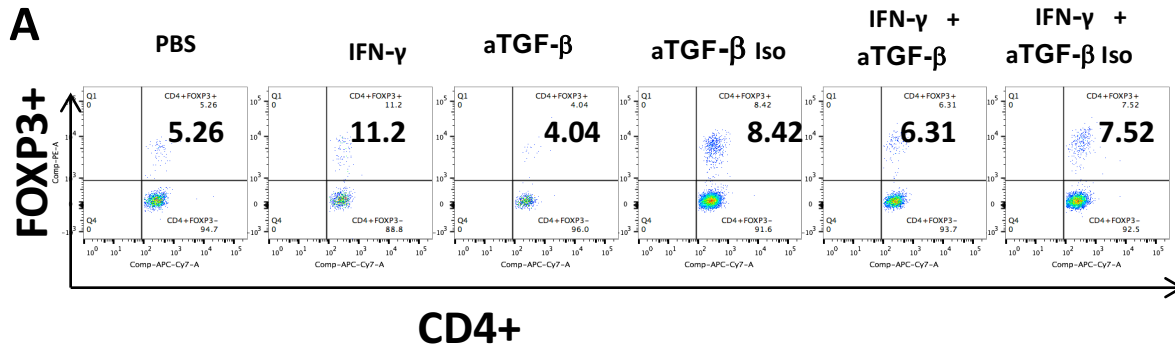


**Figura 18. Efecto de la administración *in vivo* de IFN- $\gamma$  y anti-IL-10 durante la fase crónica de la EAE.** El efecto de IFN- $\gamma$  no depende IL-10. Seis grupos de ratones C57BL/6J fueron inmunizados con el péptido MOG (150  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub>; 500  $\mu$ g MT; 200 ng PT) para inducir EAE crónica. Se inició el tratamiento (IP) en el peak de la fase crónica de la EAE (día 17 post-inmunización) con 1 $\mu$ g IFN- $\gamma$  diario (cuadrados azules) o PBS (control, círculos negros), 100  $\mu$ g anti-IL-10 día por medio (triángulo marrón), 100  $\mu$ g de anti-IL-10 isotipo día por medio (triángulo rojo), IFN- $\gamma$  + anti-IL-10 (igual dosis y administración) (rombo verde claro) e IFN- $\gamma$  + anti-IL-10 isotipo (igual dosis y administración) (círculo verde), durante 7 días. Barras de error representan mean $\pm$ SEM. Promedio de 2 experimentos independientes, n = 6-10 ratones/grupo. \* $p$ <0.05.



**Figura 19. Efecto de la administración *in vivo* de IFN- $\gamma$  y anti-TGF- $\beta$  durante la fase crónica de la EAE. El efecto de IFN- $\gamma$  depende TGF- $\beta$ .** Seis grupos de ratones C57BL/6J fueron inmunizados con el péptido MOG (150  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub>; 500  $\mu$ g MT; 200 ng PT) para inducir EAE crónica. Se inició el tratamiento (IP) en el peak de la fase crónica de la EAE (día 12 post-inmunización) con 1 $\mu$ g IFN- $\gamma$  diario (cuadrados azules) o PBS (control, círculos negros), 100  $\mu$ g de anti-TGF- $\beta$  (triángulo marrón), 100  $\mu$ g de anti-TGF- $\beta$  isotipo día por medio (triángulo rojo), IFN- $\gamma$  + anti-TGF- $\beta$  (igual dosis y administración) (cuadrado verde para **A**) e IFN- $\gamma$  + anti-TGF- $\beta$  isotipo (igual dosis y administración) (círculo verde), durante 7 días. Las barras de error representan mean $\pm$ SEM. Promedio de 2 experimentos independientes, n = 6-10 ratones/grupo. \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001 y \*\*\*\*<0.0001.

Más aún, análisis de las células infiltrantes en el SNC en los animales tratados con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  mostraron que la administración de anticuerpos anti-TGF- $\beta$  tiende a disminuir el aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs infiltrantes en el SNC inducido por IFN- $\gamma$  (**Figura 20**).



**Figura 20. El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  disminuye la frecuencia de linfocitos Tregs en el sistema nervioso central.** Células mononucleares infiltrantes del SNC, fueron extraídas de seis grupos de ratones C57BL/6J, con los cuales fueron tratados en el inicio de la fase crónica con 1  $\mu$ g IFN- $\gamma$  diario o PBS, 100  $\mu$ g de anti-TGF- $\beta$ , 100  $\mu$ g de anti-TGF- $\beta$  isotipo día por medio, IFN- $\gamma$  + anti-TGF- $\beta$  (igual dosis y administración). **A)** Análisis de citometría de flujo representativo de la frecuencia de linfocitos Tregs (CD3+CD4+FoxP3+) en el SNC. **B)** Promedio de frecuencia de linfocitos Tregs (CD3+CD4+FoxP3+). Barras representan promedio $\pm$ SD (n 3-4 ratones por grupo). \* $p$ <0.05.

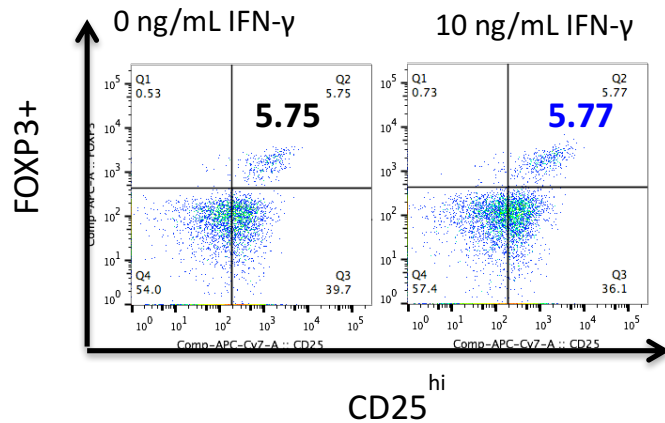
**Objetivo específico 2: Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  in vitro sobre linfocitos T reguladores y su capacidad supresora sobre linfocitos T efectores.**

*Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  ex vivo sobre la inducción de linfocitos Tregs en células infiltrantes del SNC, nódulos linfáticos cervicales y del bazo.*

Debido a que el tratamiento con IFN- $\gamma$  depende de linfocitos Tregs convencionales (CD4+CD25hiFOXP3+) y de los niveles TGF- $\beta$ , y que además induce un incremento significativo de linfocitos Tregs en el SNC, evaluamos si esta citoquina es capaz de inducir un incremento de esta población celular *ex vivo*. Para esto, determinamos el efecto de IFN- $\gamma$  en presencia de estimulación antígeno-específica (MOG) o inespecífica (anti-CD3 y anti-CD28) en células infiltrantes del SNC, de nódulos linfáticos cervicales o del bazo extraídas en el *peak* de la fase crónica de ratones EAE sin tratamiento. Los resultados presentados en la **Figura 21** muestran que IFN- $\gamma$  no es capaz de inducir un incremento de linfocitos Tregs convencionales en estas condiciones (**Figura 21 A y B**). Resultó interesante observar un incremento (no significativo) de linfocitos CD4+LAP+ en células obtenidas de nódulos linfáticos cervicales cuando son estimuladas con IFN- $\gamma$  y pMOG o anti-CD3/CD28 (**Figura 21 D**). Además, la frecuencia de linfocitos CD4+LAP+ presente en la suspensión celular obtenida de nódulos linfáticos cervicales y bazo, disminuyó notablemente al cultivar las células en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IFN- $\gamma$  (**Figura 21 C**). Importantemente, ninguna de las condiciones de estimulación con IFN- $\gamma$  de este experimento indujo cambios significativos en la apoptosis celular (**Figura 22**), aunque se apreció una tendencia a inhibir la proliferación de esplenocitos estimulados con MOG de manera concentración dependiente (**Figura 23**).

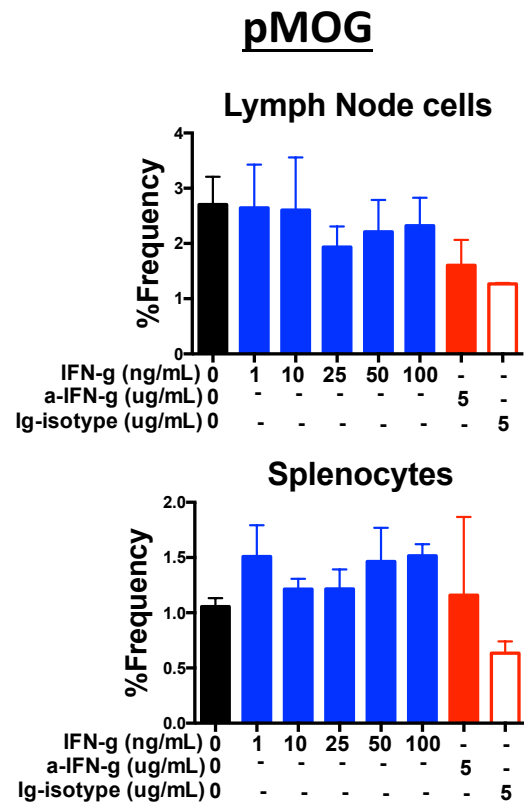
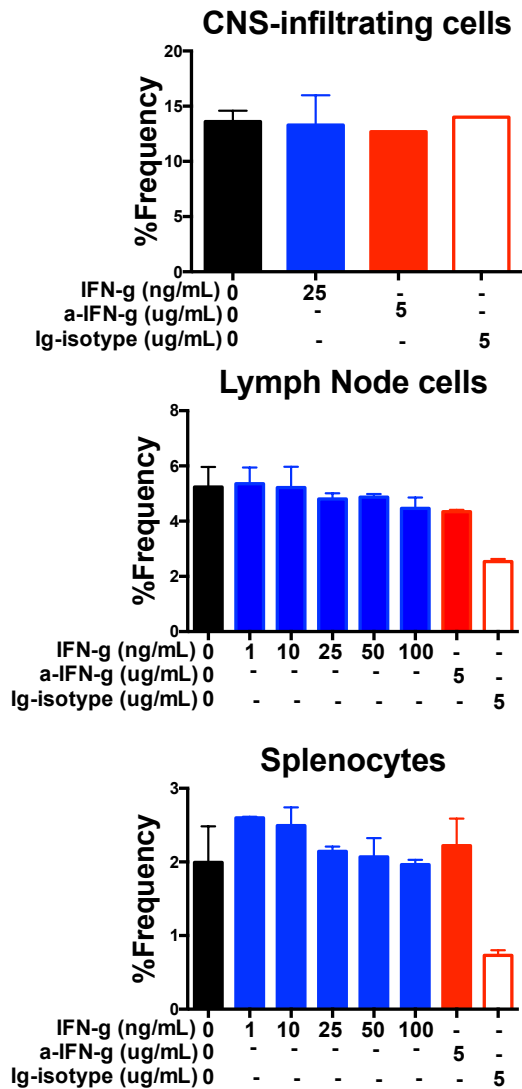
**A**

**Tregs**  
(CD3+CD4+CD25+FOXP3+)



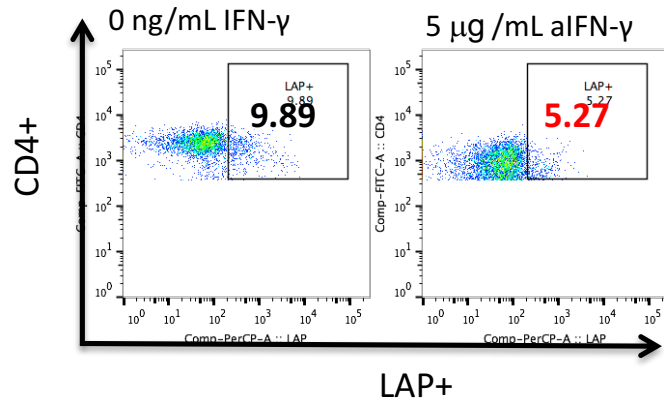
**B**

**aCD3 + aCD28**



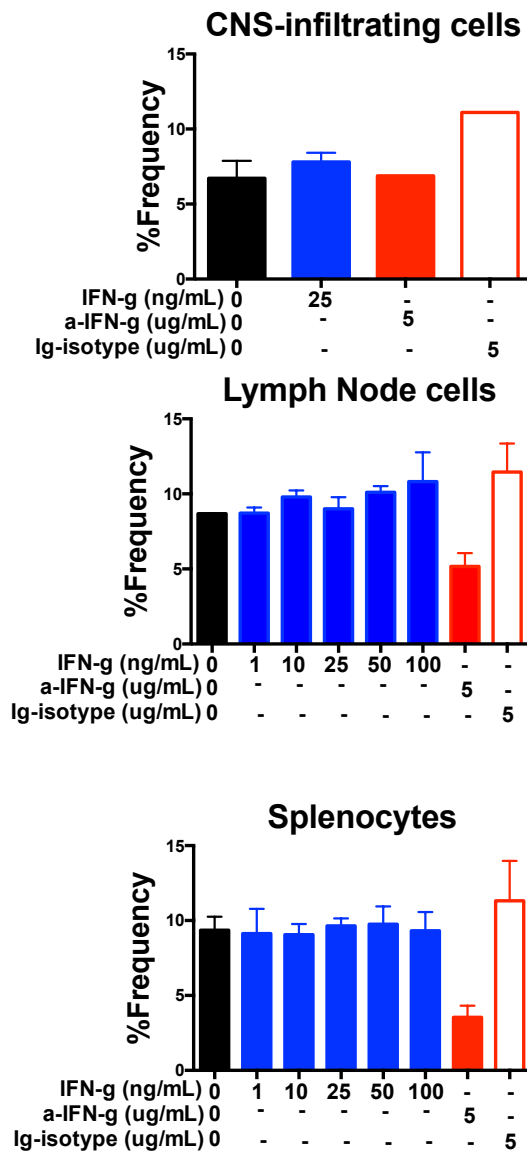
**C**

**Th3**  
(CD3+CD4+LAP+)

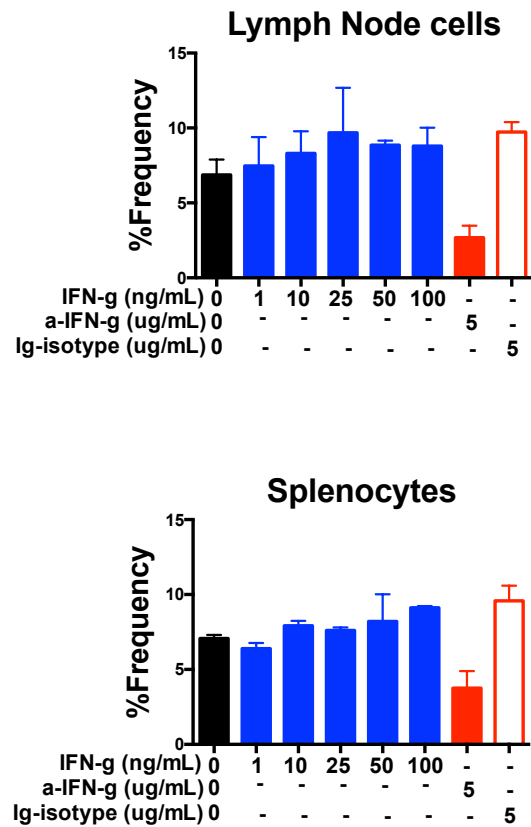


**D**

**aCD3 + aCD28**



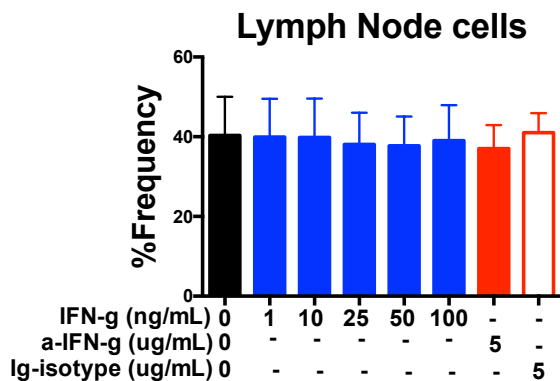
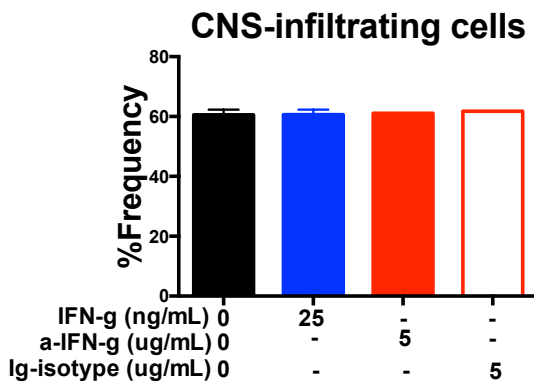
**pMOG**



**Figura 21. Efecto de IFN- $\gamma$  ex vivo sobre la inducción de linfocitos Tregs en células de la fase crónica de la EAE.** Células mononucleares infiltrantes del sistema nervioso central, nódulos linfáticos cervicales y bazo, fueron aisladas de ratones EAE sin tratamiento en el día 15 post-inmunización (**fase crónica EAE**) y cultivadas durante 16 horas en presencia de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD3 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aCD28 o 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pMOG. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (1, 10, 25, 50 y 100ng/mL, barras azules), anticuerpo bloqueante de IFN- $\gamma$  (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , barra roja) o el isotipo del anticuerpo (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , barra blanca). **A)** Análisis de citometría de flujo de linfocitos Tregs convencionales. **B)** Gráficos de la frecuencia de linfocitos Tregs convencionales. **C)** Análisis de citometría de flujo de linfocitos Th3. **D)** Gráficos de la frecuencia de linfocitos Th3. Barras representan promedio $\pm$ SD de 2 experimentos independientes.

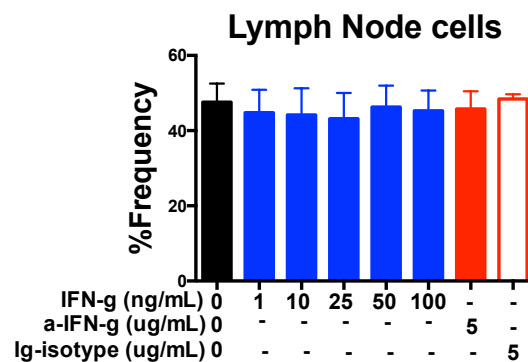
**A**

**aCD3 + aCD28**

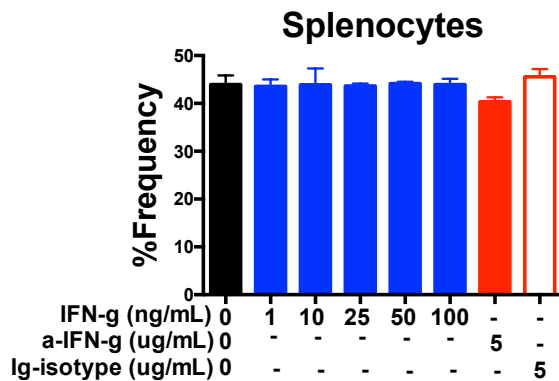
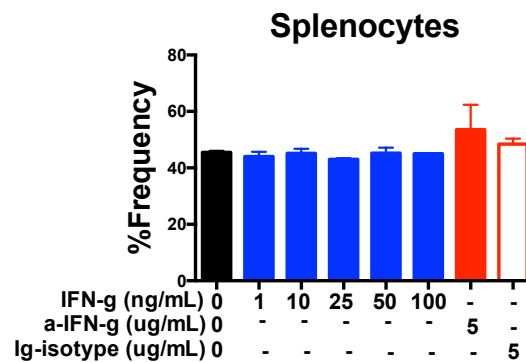


**B**

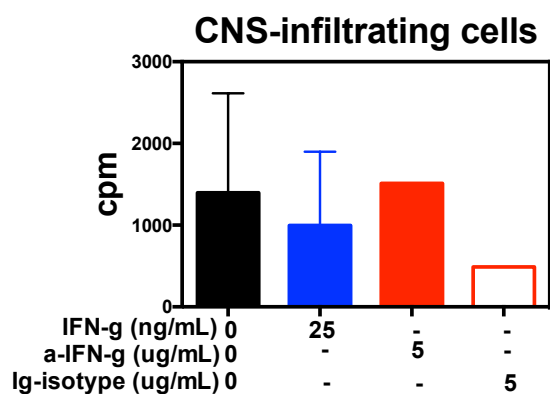
**pMOG**

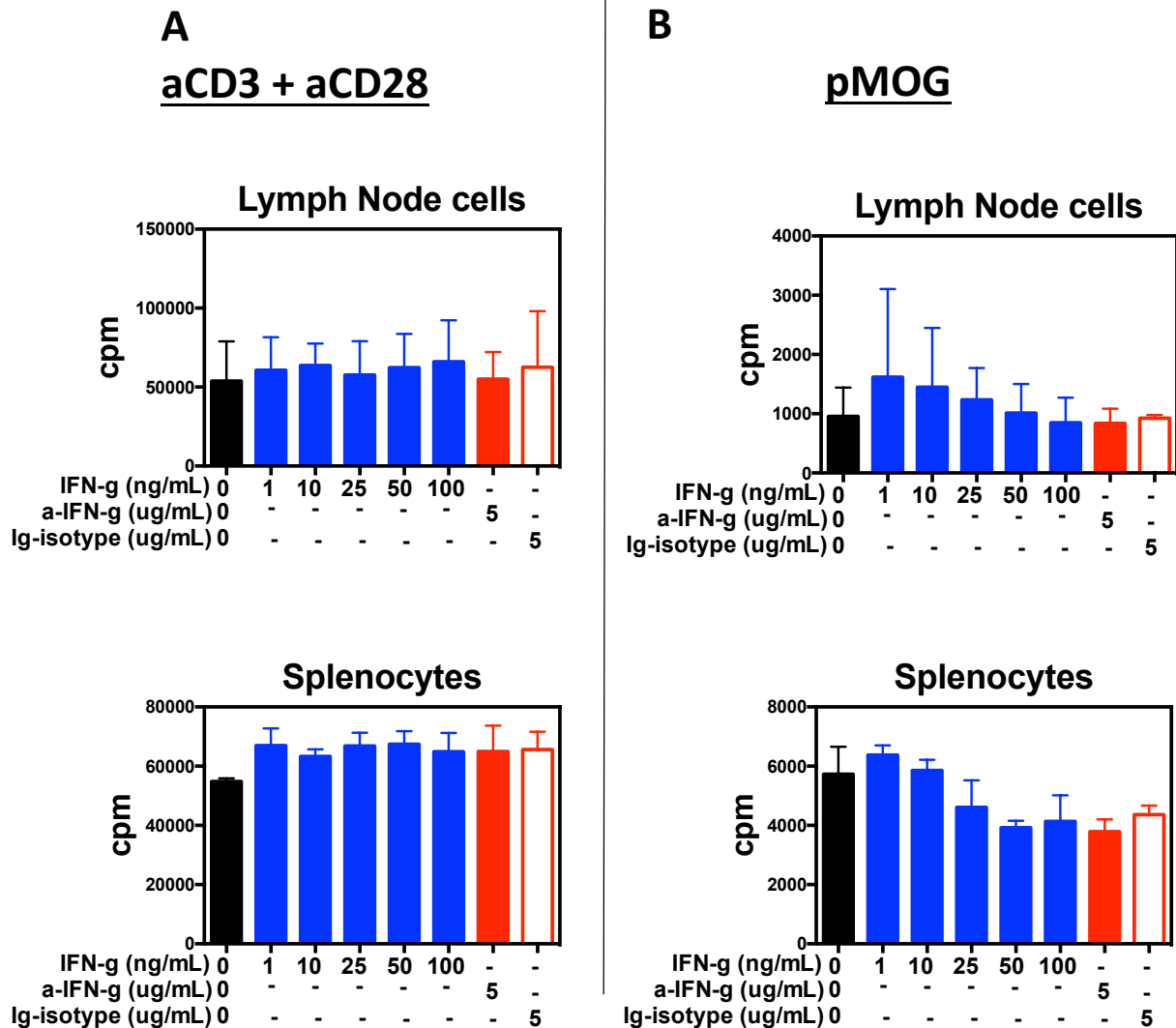




**A****aCD3 + aCD28****B****pMOG**

**Figura 22. Efecto de IFN- $\gamma$  *ex vivo* sobre la apoptosis celular en células de la fase crónica de la EAE.** Células mononucleares infiltrantes del sistema nervioso central, nódulos linfáticos cervicales y bazo, fueron aisladas de ratones EAE sin tratamiento en el día 15 post-inmunización (**fase crónica EAE**) y cultivadas durante 16 horas en presencia de **A**) 2  $\mu$ g/mL de anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL aCD28 o **B**) 10  $\mu$ g/mL pMOG. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (1, 10, 25, 50 y 100ng/mL, barras azules), anticuerpo bloqueante de IFN- $\gamma$  (5  $\mu$ g/mL, barra roja) o el isotipo del anticuerpo (5  $\mu$ g/mL, barra blanca), y se determinó la frecuencia de células apoptóticas mediante tinción de Anexina-V analizadas por citometría de flujo. Barras representan promedio $\pm$ SD de 2 experimentos independientes.

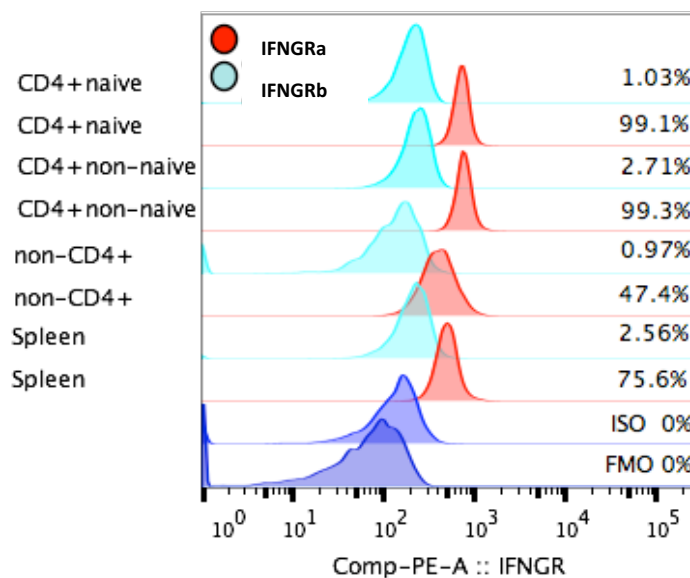
**A****aCD3 + aCD28**



**Figura 23. Efecto de IFN- $\gamma$  *ex vivo* sobre la proliferación celular en células de la fase crónica de la EAE.** Células mononucleares infiltrantes del sistema nervioso central, nódulos linfáticos cervicales y bazo fueron aisladas de ratones EAE sin tratamiento en el día 15 post-inmunización (**fase crónica EAE**) y cultivadas durante 72 horas en presencia de **A)** 2  $\mu\text{g/mL}$  de anti-CD3 y 1  $\mu\text{g/mL}$  aCD28 o **B)** 10  $\mu\text{g/mL}$  pMOG. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (1, 10, 25, 50 y 100ng/mL, barras azules), anticuerpo bloqueante de IFN- $\gamma$  (5  $\mu\text{g/mL}$ , barra roja) o el isotipo del anticuerpo (5  $\mu\text{g/mL}$ , barra blanca). Después de 24 horas, las células fueron pulsadas con 1  $\mu\text{Ci}$  de timidina triteada. Barras representan promedio $\pm$ SD de 4 experimentos independientes.

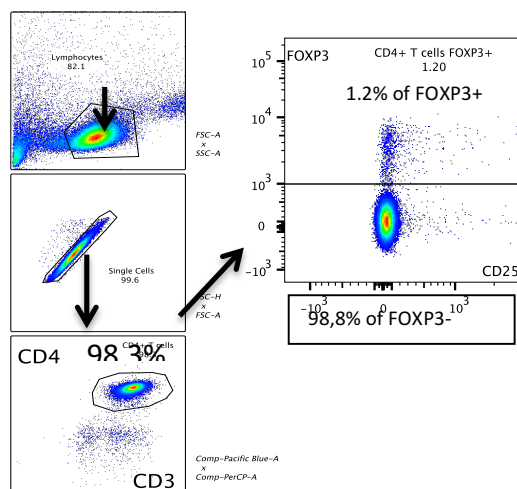
*Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  in vitro sobre la inducción de linfocitos Tregs y evaluar su capacidad supresora.*

A continuación, determinamos si IFN- $\gamma$  ejerce algún efecto directo sobre la conversión de linfocitos T CD4+CD25- en linfocitos Tregs estimulados solo con anti-CD3 y anti-CD28, o bajo condiciones de inducción de Tregs (TGF- $\beta$  +IL-2) o Tr1 (IL-27). Como ya fue mencionado anteriormente, Wang *et al* (JCI, 2006) [68] publicaron que es posible convertir linfocitos Tregs a partir de linfocitos CD4+CD25- en respuesta a IFN- $\gamma$  (72 horas). Junto con esto, otros autores también han reportado que esto es posible en respuesta a TGF- $\beta$  [71]. Primero, a manera de control, se evaluaron los niveles de expresión de las dos sub-unidades de los receptores de IFN- $\gamma$  (IFNGRa e IFNGRb) en éstas células mediante citometría de flujo, encontrando una expresión normal de las cadenas del receptor en éstas y otras poblaciones celulares evaluadas, tales como linfocitos T CD4+ no naïve, linfocitos CD4- y esplenocitos totales (**Figura 24**).

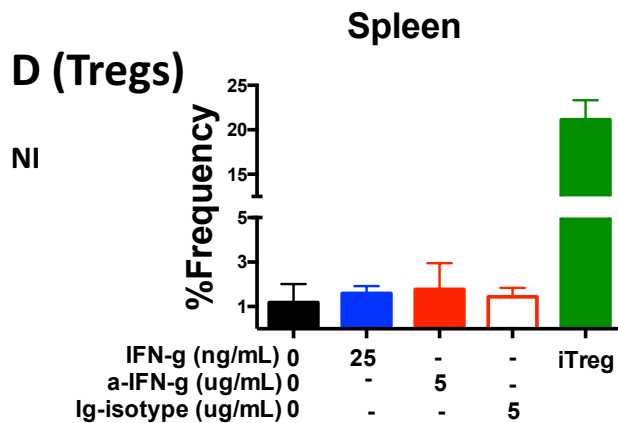
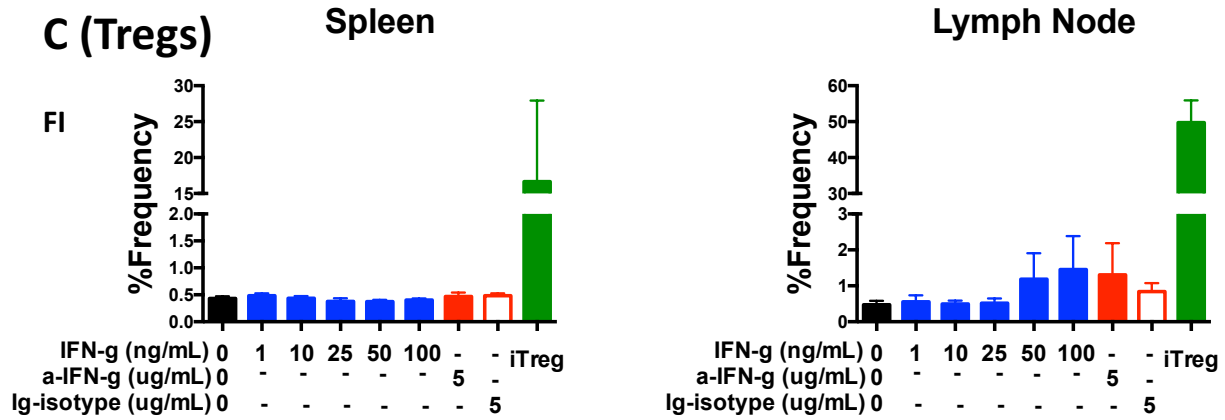
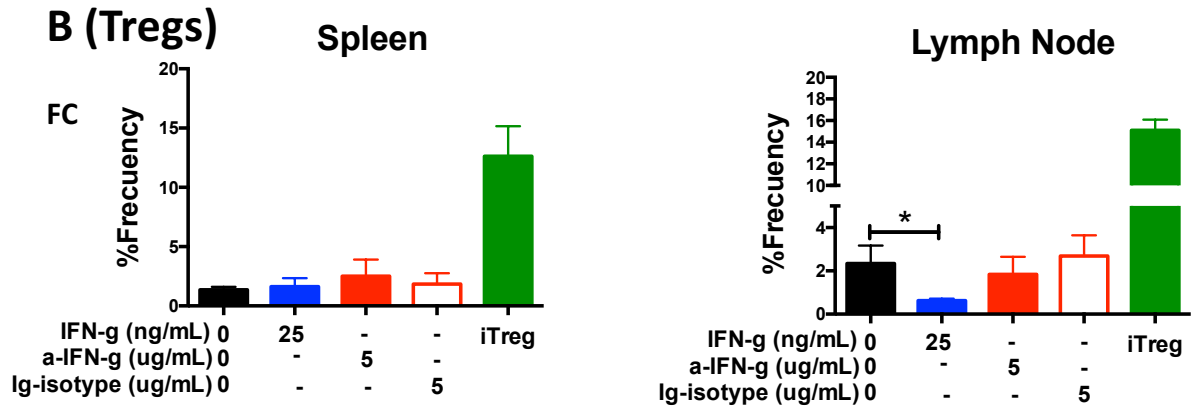
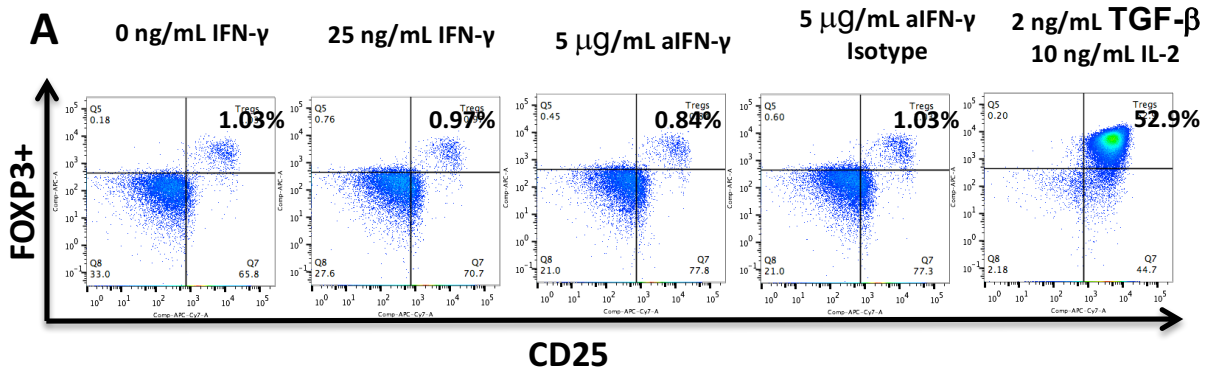


**Figura 24. Expresión de IFNGRa e IFNGRb en distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4+.** Ejemplo de la expresión de las sub-unidades del IFNGR en diferentes sub-poblaciones de linfocitos CD4+ y no CD4. IFNGRa es expresado en todas las poblaciones de linfocitos T CD4+ y no CD4+, mientras que la expresión de IFNGRb es menor. Células purificadas obtenidas de ratones sanos.

Si bien nuestro interés está enfocado en los efectos de IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE, dado que nuestro grupo de laboratorio ha demostrado que IFN- $\gamma$  tiene efectos opuestos durante el desarrollo de la EAE, comparamos el efecto de IFN- $\gamma$  en la inducción de linfocitos Tregs, a partir de células CD4+CD25- purificadas (pureza > 95%, **Figura 25**) de nódulos linfáticos y bazo, obtenidas en fase crónica (día 15 post-inmunización) y fase inductiva (día 10 post-inmunización) de la EAE, además de animales no inmunizados como control. Debido al limitado número de células mononucleares infiltrantes en el SNC (aproximadamente 300.000 a 500.000 células por animal), de los cuales un 3-10% del total corresponde a linfocitos CD4+CD25-, se procedió a purificar linfocitos CD4+CD25- del bazo y nódulos linfáticos cervicales. Una vez purificados, los linfocitos CD4+CD25- fueron estimulados durante 72 horas en presencia de aCD3/CD28, con distintas concentraciones de IFN- $\gamma$ , o con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ . Los análisis muestran que IFN- $\gamma$  no induce linfocitos Tregs (**Figura 26**), ya sea a partir de linfocitos CD4+CD25- de fase crónica (**Figura 26 B**), aguda (**Figura 26 C**) o de animales no inmunizados (**Figura 26 D**), e incluso inhibe significativamente la frecuencia de linfocitos Tregs a partir de linfocitos CD4+CD25- provenientes de los nódulos linfáticos cervicales de animales en fase crónica de la EAE (**Figura 26 B**).



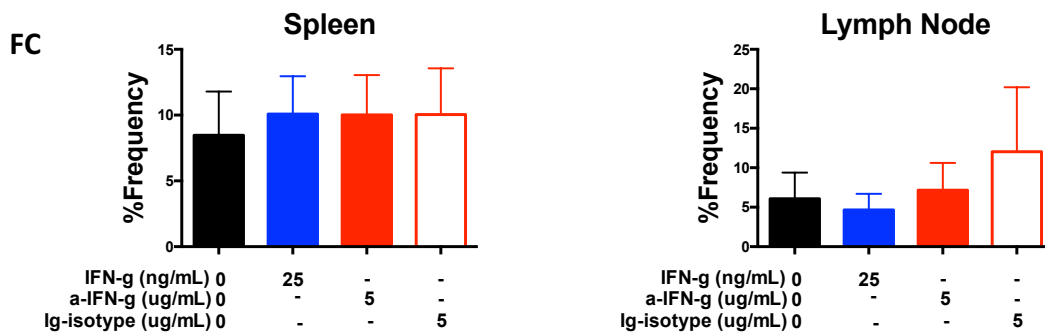
**Figura 25. Purificación de linfocitos T CD4+CD25-FoxP3-.** Análisis de citometría de flujo de linfocitos T CD4+CD25-FoxP3- purificados desde nódulos linfáticos cervicales o bazos de ratones con EAE con una pureza >95%.



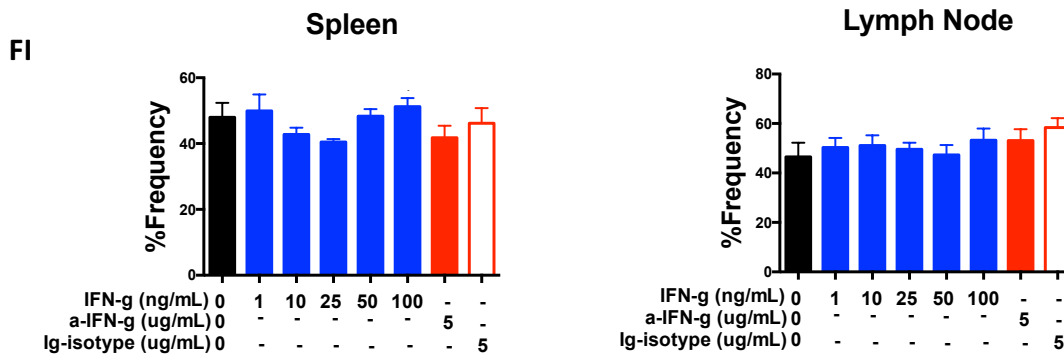
**Figura 26. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos T reguladores convencionales (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>).** **A)** Análisis de citometría de flujo representativo de frecuencia de linfocitos Tregs convencionales (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> provenientes del bazo o nódulos linfáticos cervicales de ratones EAE, **B)** fase crónica (FC), **C)** fase inductiva (FI) y **D)** no inmunizados (NI, naïve sin EAE), fueron cultivados durante 3 días con 2  $\mu$ g/mL anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL anti-CD28 en presencia de distintas concentraciones de IFN- $\gamma$  (1, 10, 25, 50, 100 ng/mL) o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  o anti-IFN- $\gamma$  isotipo. Se realizó un control positivo de inducción de linfocitos Tregs estimuladas con 2 ng/mL de TGF- $\beta$  y 10 ng/mL de IL-2 (barra verde). Barras representan promedio $\pm$ SD de 4 experimentos independientes. \* $p$ <0.05.

Debido a que estos resultados son contrarios a los publicados por Wang *et al* (JCI, 2006) [68], adicionalmente, analizamos si IFN- $\gamma$  en estas condiciones de estimulación, es capaz de modular la expresión de otros marcadores reguladores característicos de linfocitos Th3 (CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>) (**Figura 27**) o Tr1 (CD4<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> [96] y producción de IL-10) (**Figura 28**) en fase crónica, fase inductiva y animales no inmunizados. Nuestros resultados indican que IFN- $\gamma$  no induce un fenotipo Th3, ni Tr1. A pesar de esto, nos preguntamos si posiblemente IFN- $\gamma$  podría inducir un aumento en la funcionalidad de estas células, tal vez mediante la modulación de alguna molécula regulatoria que no incluimos en nuestro análisis. Para esto, evaluamos la capacidad de estas células (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) tratadas con IFN- $\gamma$  para inhibir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> provenientes de animales CD45.1, encontrando que esta citoquina no induce cambios en la posible función reguladora de estas células (**Figura 29**).

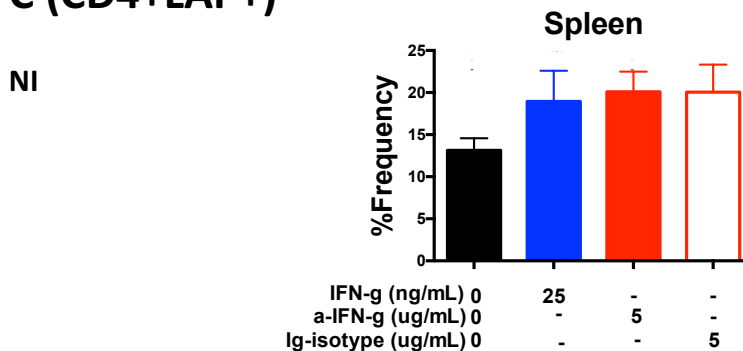
## A (CD4+LAP+)



## B (CD4+LAP+)

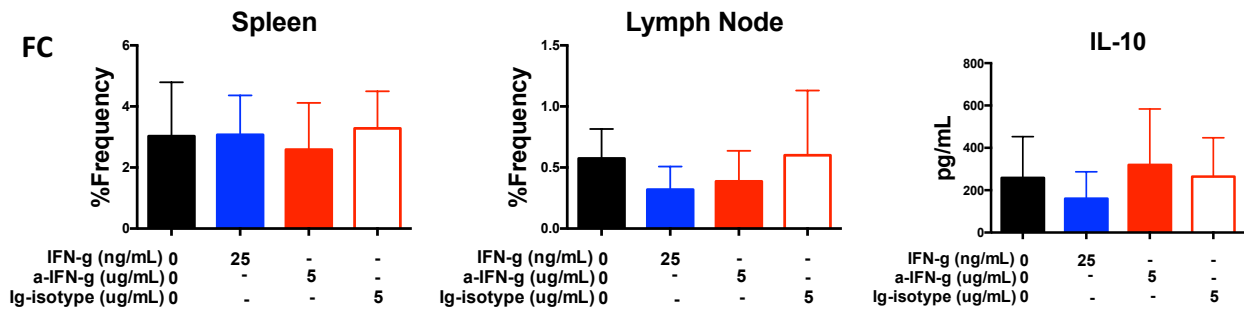


## C (CD4+LAP+)

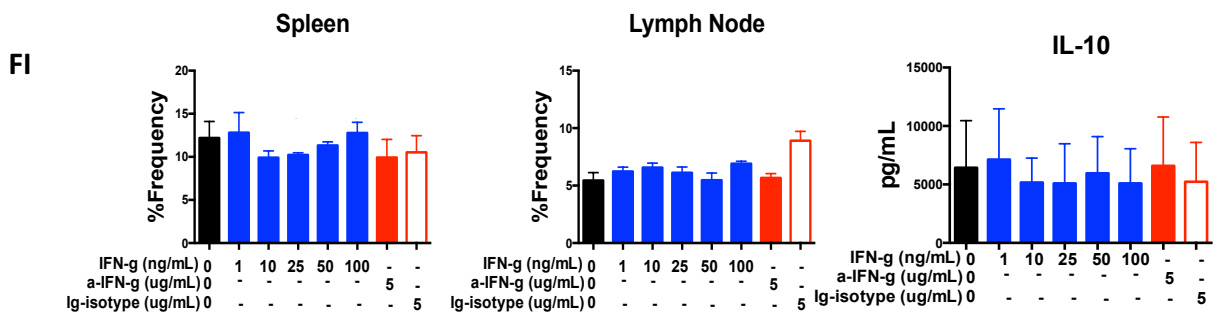


**Figura 27. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos Th3.** Linfocitos CD4+CD25- provenientes del bazo o nódulos linfáticos cervicales de ratones EAE en **A)** fase crónica (FC), **B)** fase inductiva (FI) y **C)** no inmunizados (NI, naïve sin EAE), fueron cultivados durante 3 días con 2  $\mu$ g/mL anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL anti-CD28 en presencia de distintas concentraciones de IFN- $\gamma$  (1, 10, 25, 50, 100 ng/mL) o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  o anti-IFN- $\gamma$  isotipo. Se analizó la frecuencia de linfocitos CD4+LAP+ mediante citometría de flujo. Barras representan promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes.

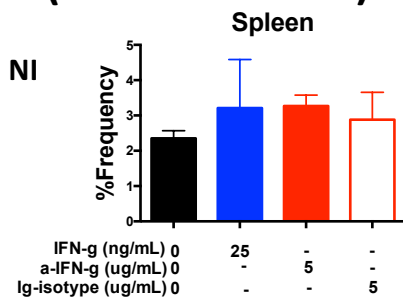
## A (CD49b+LAG-3+)



## B (CD49b+LAG-3+)

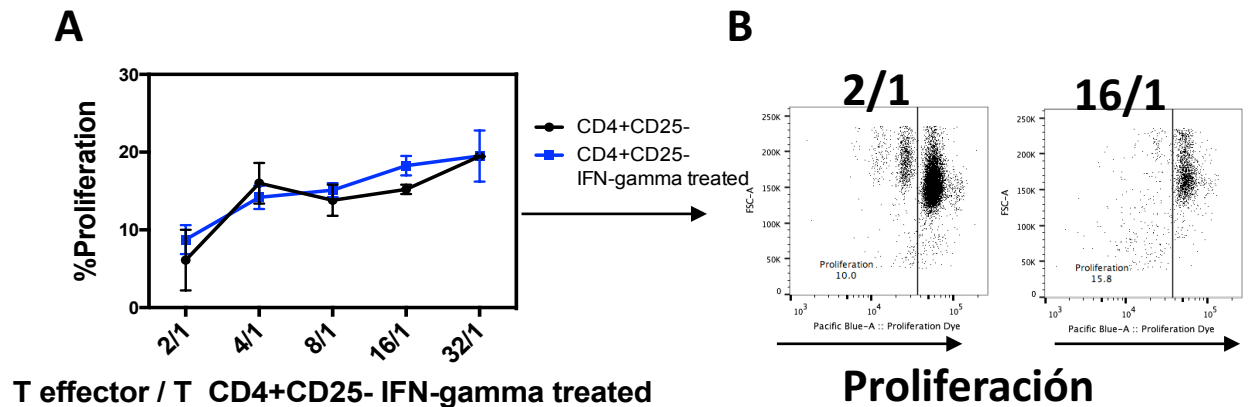


## C (CD49b+LAG-3+)



**Figura 28. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos Tr1.** Linfocitos CD4+CD25- provenientes del bazo o nódulos linfáticos cervicales de ratones EAE en **A)** fase crónica (FC), **B)** fase inductiva (FI) y **C)** no inmunizados (NI, naïve sin EAE), fueron cultivados durante 3 días con 2  $\mu\text{g/mL}$  anti-CD3 y 1  $\mu\text{g/mL}$  anti-CD28 en presencia de distintas concentraciones de IFN- $\gamma$  (1, 10, 25, 50, 100 ng/mL) o 5  $\mu\text{g/mL}$  de anti-IFN- $\gamma$  o anti-IFN- $\gamma$  isotipo. Se analizó la frecuencia de linfocitos CD4+CD49b+LAG-3+ mediante citometría de flujo y la secreción de IL-10 mediante ensayo de multiplex. Barras representan promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes.

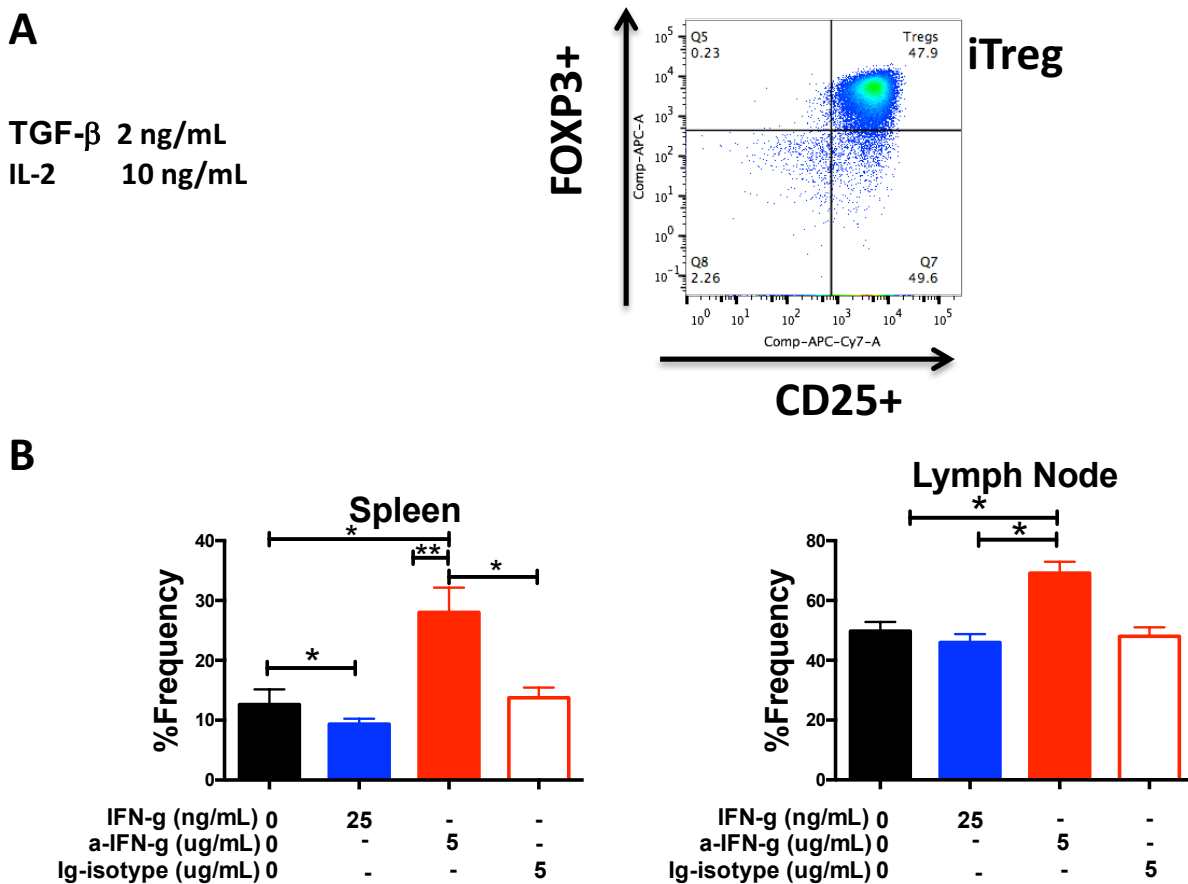




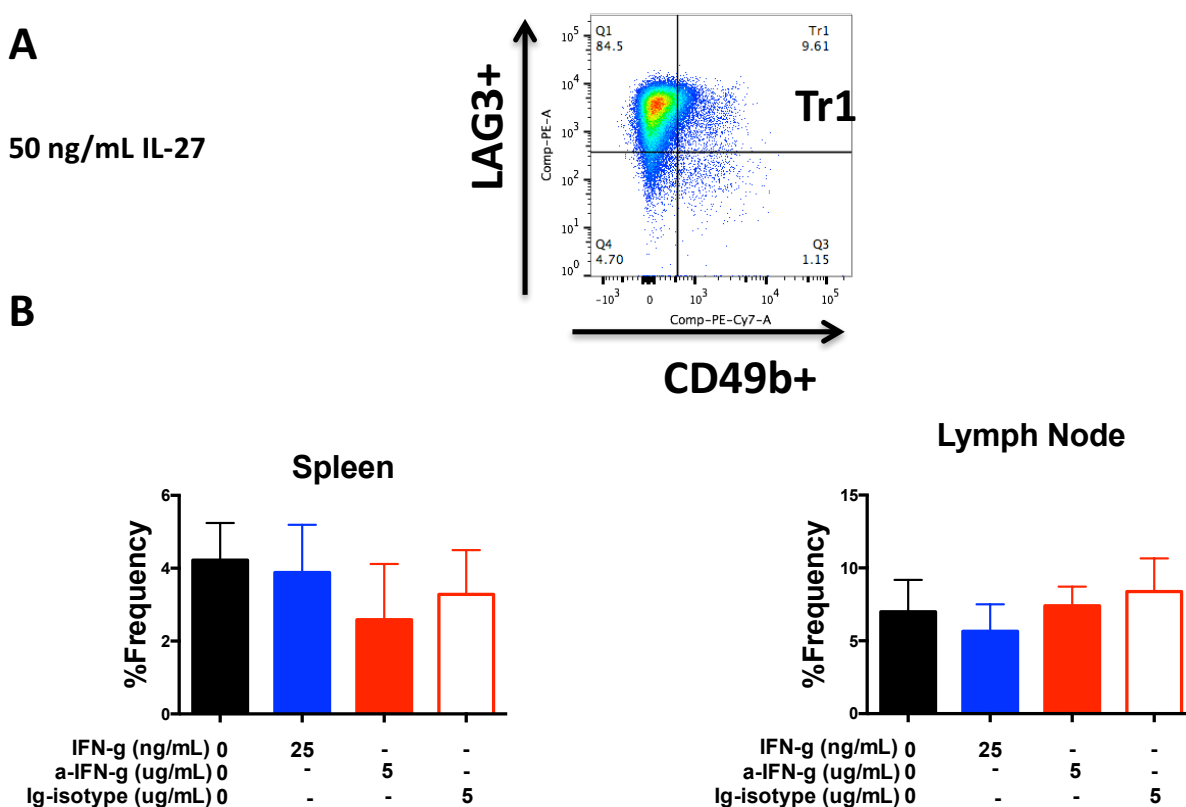
**Figura 29. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la funcionalidad reguladora de linfocitos T CD4+CD25-.** Linfocitos CD4+CD25- (CD45.2) purificados de los nódulos linfáticos de ratones con EAE en el día 10 post-inmunización (**Fase inductiva**) fueron cultivados durante 72 horas con 2  $\mu\text{g/mL}$  anti-CD3 y 1  $\mu\text{g/mL}$  anti-CD28 en presencia de 25 ng/mL de IFN- $\gamma$ . Luego,  $5 \times 10^4$  de estas células fueron co-cultivadas por 72 horas con 2  $\mu\text{g/mL}$  anti-CD3 y 1  $\mu\text{g/mL}$  anti-CD28, con linfocitos T efector (CD4+CD25-, provenientes de ratón CD45.1) previamente teñidos con 5  $\mu\text{M}$  de *Violet-proliferation Dye*, en diferentes proporciones T effector/Treg (2/1, 4/1, 8/1, 16/1 y 32/1). Finalmente, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD45.1 y anti-CD45.2 y la proliferación monitoreada por citometría de flujo (sobre células vivas). **A**) Proliferación de linfocitos T efector co-incubados con linfocitos T CD4+CD25- provenientes de nódulos linfáticos. **B**) Ejemplo de análisis de citometría de flujo del ensayo de proliferación. Barras representan promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

Por último, evaluamos el efecto que posee IFN- $\gamma$  sobre linfocitos CD4+CD25- provenientes de bazo o nódulos linfáticos cervicales de animales en fase crónica de la EAE en condiciones de diferenciación de linfocitos Tregs convencionales (TGF- $\beta$ + IL-2) (**Figura 30**) y Tr1 (IL-27) (**Figura 31**). Los análisis mostraron que en condiciones inductoras de linfocitos Tregs (iTregs), IFN- $\gamma$  indujo una significativa inhibición en la conversión de linfocitos CD4+CD25- a linfocitos Tregs, lo que es consistente con el hecho de que la neutralización de IFN- $\gamma$  en los cultivos controles (ausencia de IFN- $\gamma$  exógeno) indujo un aumento significativo en la frecuencia de linfocitos iTregs (**Figura 30 B**). Por otro lado, en condiciones de diferenciación de linfocitos Tr1 (con IL-27), IFN- $\gamma$  no posee efecto alguno sobre la diferenciación de estas células (**Figura 31 B**).

En conjunto, estos resultados indican que IFN- $\gamma$  no es capaz de inducir la conversión de linfocitos T CD4+CD25- a linfocitos Tregs, Th3, ni Tr1, independiente de la fase de la enfermedad de la cual provengan. Por el contrario, IFN- $\gamma$  inhibe la inducción de linfocitos Tregs, incluso en condiciones de diferenciación de linfocitos Tregs. Más aun, la neutralización de IFN- $\gamma$  induce un aumento significativo en la conversión de linfocitos T CD4+CD25- a linfocitos Tregs en condiciones de inducción de Tregs, por lo que podemos concluir que IFN- $\gamma$  no induce de manera directa un incremento en la frecuencia de linfocitos Tregs *in vitro*.



**Figura 30. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos T reguladores inducibles** Linfocitos CD4+CD25- proveniente del bazo o nódulos linfáticos cervicales de ratones con EAE en fase crónica, fueron cultivados durante 72 horas con 2  $\mu$ g/mL anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL anti-CD28, en presencia de 2 ng/mL de TGF- $\beta$  y 10 ng/mL de IL-2 (para inducir iTreg) y de 25 ng/mL de IFN- $\gamma$  o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  (aIFN) o 5  $\mu$ g de anti-IFN- $\gamma$  isotipo (aIFN iso). **A)** Citometría de flujo de linfocitos Tregs. **B)** Frecuencia de linfocitos Tregs inducidos. Barras representan promedio $\pm$ SEM de 3 experimentos. \* $p$ <0.05.

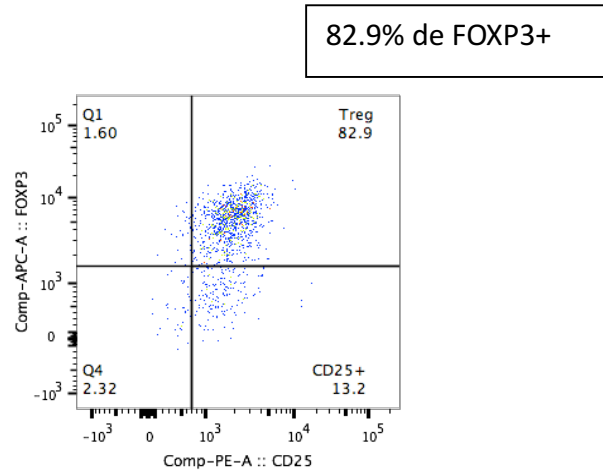


**FIGURA 31. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos Tr1.** Linfocitos CD4+CD25- proveniente del bazo o nódulos linfáticos cervicales de ratones con EAE en fase crónica, fueron cultivados durante 72 horas con 2  $\mu$ g/mL anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL anti-CD28, en presencia de 50 ng/mL de IL-27 y de 25 ng/mL de IFN- $\gamma$  o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  (aIFN) o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  isotipo (aIFN iso). **A)** Análisis de citometría de flujo de la frecuencia de linfocitos Tr1 (CD4+CD49b+LAG-3+). **B)** Análisis de frecuencia de linfocitos Tr1. Barras representan promedio $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

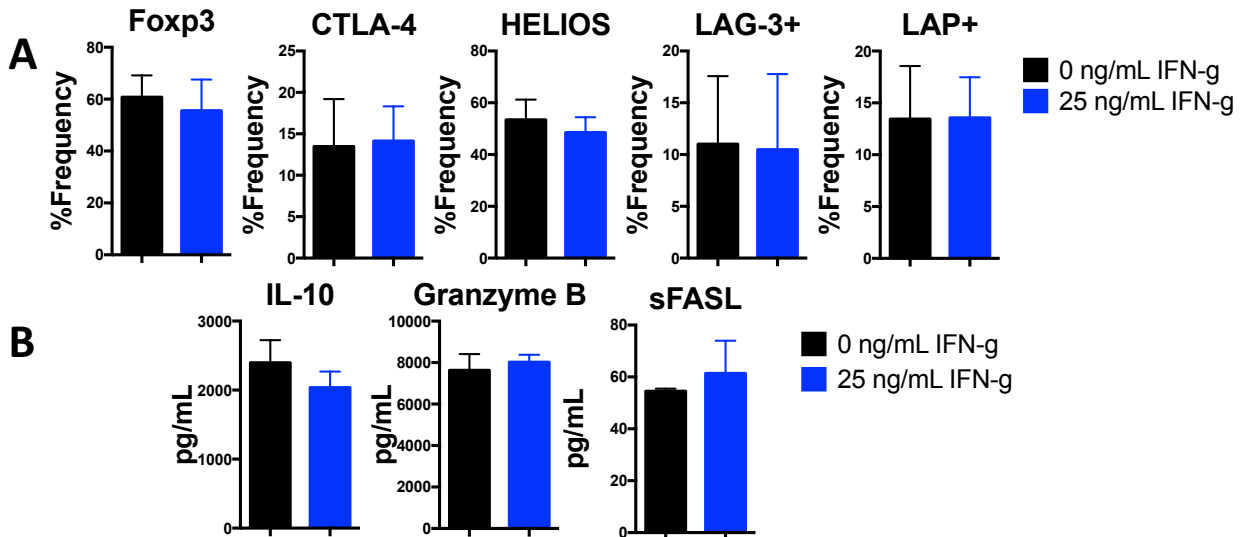
*Evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  in vitro sobre la funcionalidad de linfocitos Tregs convencionales provenientes de animales con EAE.*

Finalmente, evaluamos si IFN- $\gamma$  tendría algún efecto *ex vivo* sobre linfocitos Tregs purificados directamente desde el bazo y nódulos linfáticos cervicales de animales con EAE. Para esto, la fracción de células CD4+CD25+ expresando en más de un 80% FOXP3+ (**Figura 32**) fueron estimuladas con aCD3/CD28 e IL-2 en presencia o ausencia de IFN- $\gamma$  durante 72 horas, para evaluar diversos marcadores de regulación superficiales

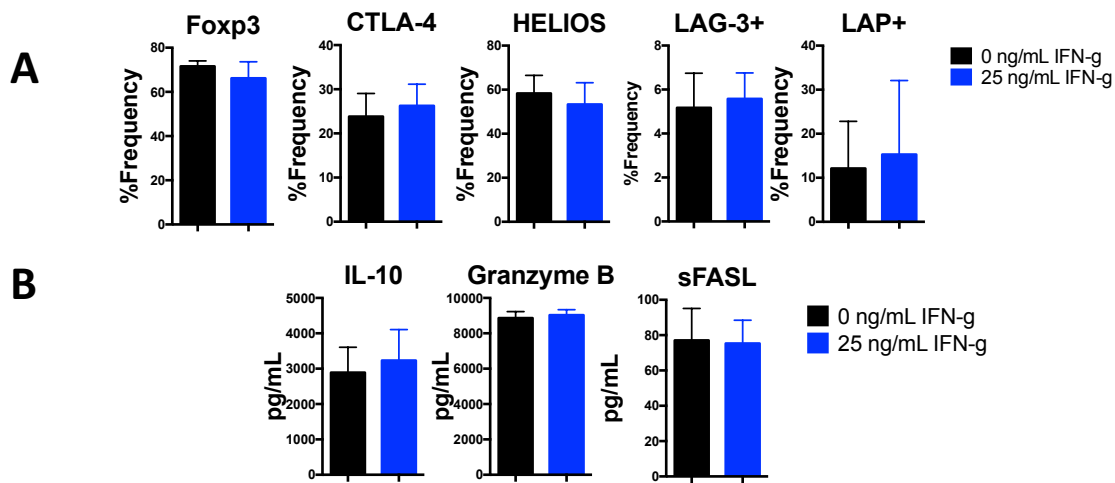
y solubles. (**Figura 33**). Los resultados mostraron que IFN- $\gamma$  no induce cambios en la frecuencia de linfocitos Tregs provenientes del bazo (**Figura 33**) o de los nódulos linfáticos (**Figura 34**) ni en la expresión (LAP, LAG-3, CTLA-4 y Helios) ni en la secreción de estas moléculas reguladoras (IL-10, Granzima B y sFasL). Mediante ensayo de funcionalidad de linfocitos Tregs, IFN- $\gamma$  tampoco indujo un cambio en la funcionalidad de estas células purificadas como linfocitos Tregs convencionales (**Figura 35**).



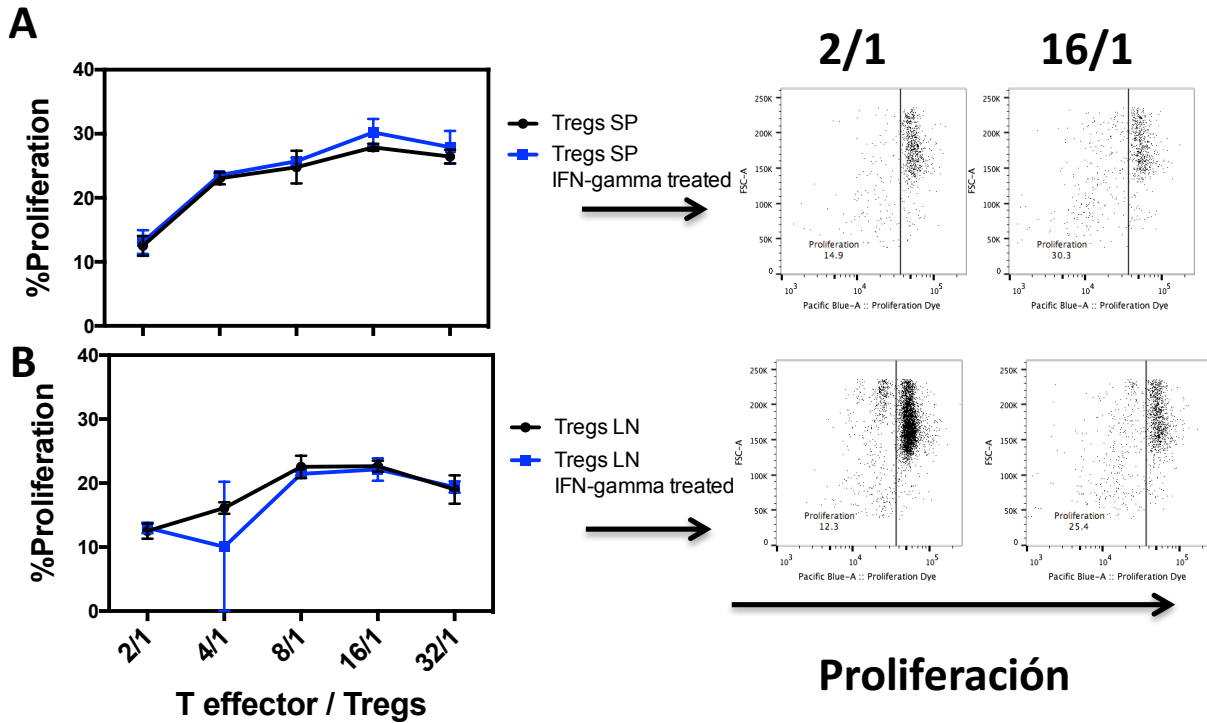
**Figura 32. Purificación de linfocitos T CD4+CD25+.** Linfocitos CD4+CD25+ proveniente del bazo o nódulos linfáticos de ratones con EAE en el día 10 post-inmunización (Fase inductiva), poseen una frecuencia mayor al 80% de FOXP3+.



**Figura 33. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la expresión de FOXP3, Helios y otras moléculas inmuno-moduladoras en linfocitos T CD4+CD25+ provenientes del bazo.** Linfocitos CD4+CD25+ (Pureza >80%) proveniente del bazo de ratones con EAE en el día 10 post-inmunización (**fase inductiva**), fueron cultivados durante 72 horas con 2  $\mu$ g/mL anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL anti-CD28 y 10 ng/mL de IL-2, en ausencia o presencia de 25 ng/mL de IFN- $\gamma$ . **A)** Frecuencia de linfocitos T CD4+CD25+ expresando FoxP3, Helios, LAP, LAG-3 o CTLA-4. **B)** Concentraciones de FAS ligando soluble (FASL), Granzyme B, IL-10 en los respectivos cultivos celulares determinados mediante ensayos de multiplex. Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.



**Figura 34. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la expresión de FOXP3, Helios y otras moléculas inmuno-moduladoras en linfocitos T CD4+CD25+ provenientes de los nódulos linfáticos.** Linfocitos CD4+CD25+ (Pureza >80%) proveniente de los nódulos linfáticos cervicales de ratones con EAE en el día 10 post-inmunización (**fase inductiva**), fueron cultivados durante 72 horas con 2  $\mu$ g/mL anti-CD3 y 1  $\mu$ g/mL anti-CD28 y 10 ng/mL de IL-2, en ausencia o presencia de 25 ng/mL de IFN- $\gamma$ . **A)** Frecuencia de linfocitos T CD4+CD25+ expresando FoxP3, Helios, LAP, LAG-3 o CTLA-4. **B)** Concentraciones de FAS ligando soluble (FASL), Granzyme B, IL-10 en los respectivos cultivos celulares determinados mediante ensayos de multiplex. Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.



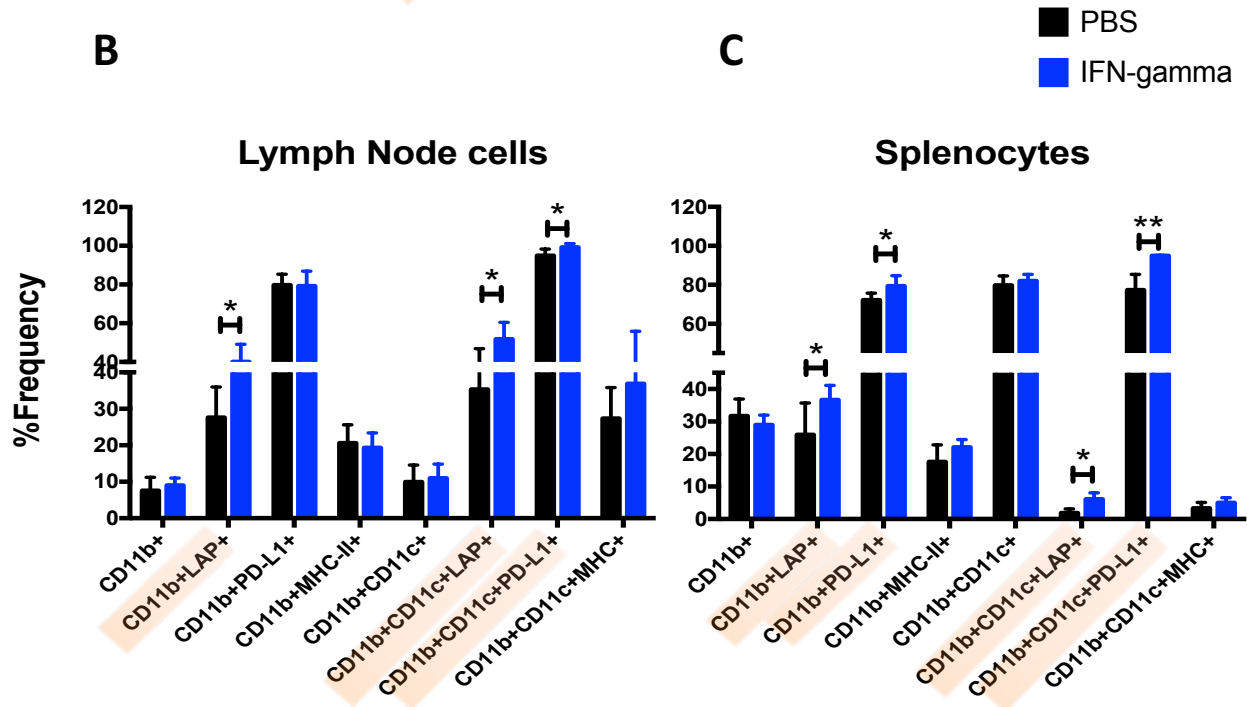
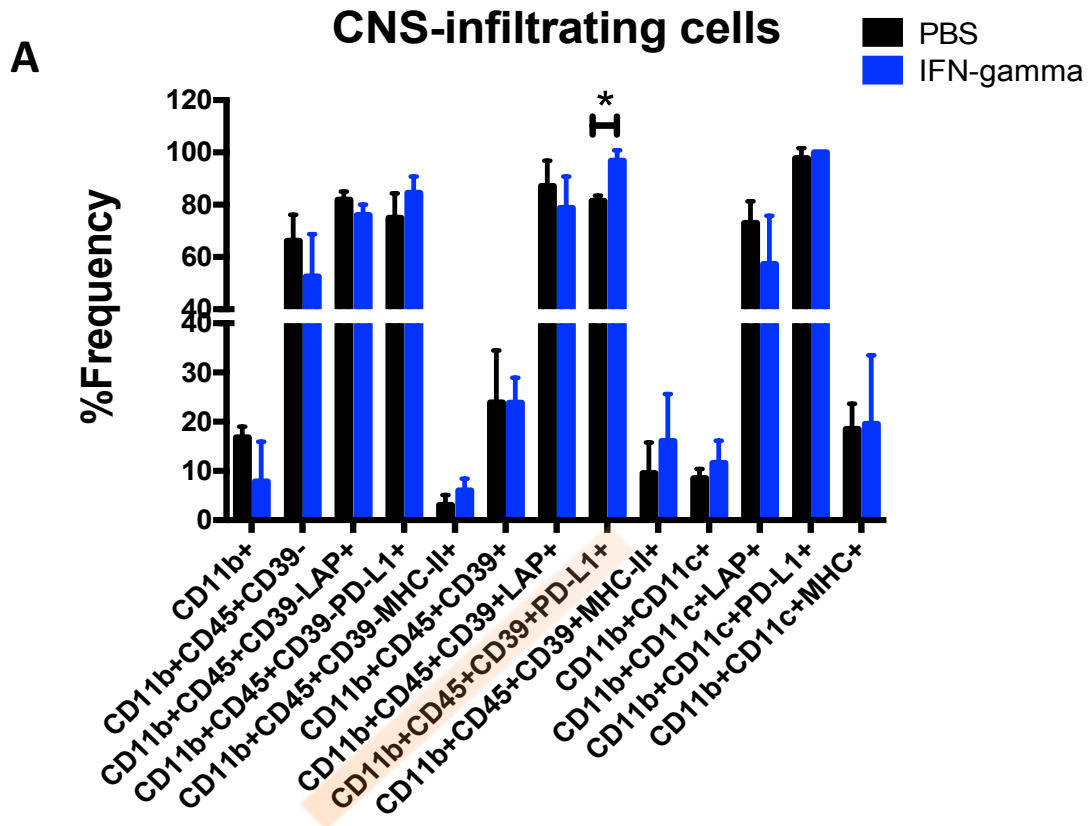
**Figura 35. Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la funcionalidad reguladora de linfocitos T CD4+CD25+ provenientes de la EAE.** Linfocitos CD4+CD25- (CD45.2) purificados de los **A**) bazo (SP) y **B**) nódulos linfáticos cervicales (LN) de ratones con EAE en el día 10 post-inmunización (**Fase inductiva**), fueron cultivados durante 72 horas con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-CD3 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-CD28 en presencia de 25 ng/mL de IFN- $\gamma$  y 10 ng/mL de IL-2. Luego,  $5 \times 10^4$  de estas células fueron co-cultivadas por 72 horas con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-CD3 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-CD28, con linfocitos T efector (CD4+CD25-, provenientes de ratón CD45.1) previamente teñidos con 5  $\mu\text{M}$  de *Violet-proliferation Dye*, en diferentes proporciones T efector/Treg (2/1, 4/1, 8/1, 16/1 y 32/1). Finalmente, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD45.1 y anti-CD45.2 y la proliferación monitoreada por citometría de flujo (sobre células vivas). Se muestra un ejemplo de análisis de citometría de flujo del ensayo de proliferación. Barras representan promedio  $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.

### **Objetivo específico 3: Identificar el mecanismo por el cual IFN- $\gamma$ favorece la inducción de linfocitos T reguladores supresores de la EAE.**

Hasta ahora, nuestros resultados indican que el tratamiento con IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE, induce un aumento de linfocitos Tregs en el SNC, y que estos son necesarios para reducir los síntomas de la enfermedad. Además, hemos determinado que el tratamiento también depende de los niveles de TGF- $\beta$ . También encontramos que, al evaluar el efecto directo de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos Tregs a partir de linfocitos CD4+CD25-, provenientes de la fase crónica o inductiva de la EAE, o incluso de animales no-inmunizados, IFN- $\gamma$  no posee efecto alguno en la inducción de linfocitos Tregs. Es más, IFN- $\gamma$  exógeno inhibió la inducción de linfocitos iTregs (TGF- $\beta$  + IL-2), mientras que al bloquear con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , la frecuencia de linfocitos Tregs aumenta de manera significativa. Por lo tanto, los resultados obtenidos apuntan a que IFN- $\gamma$  no posee un efecto directo sobre la inducción de linfocitos Treg supresores de la EAE.

*Identificar el efecto in vivo de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de moléculas reguladoras en linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APC).*

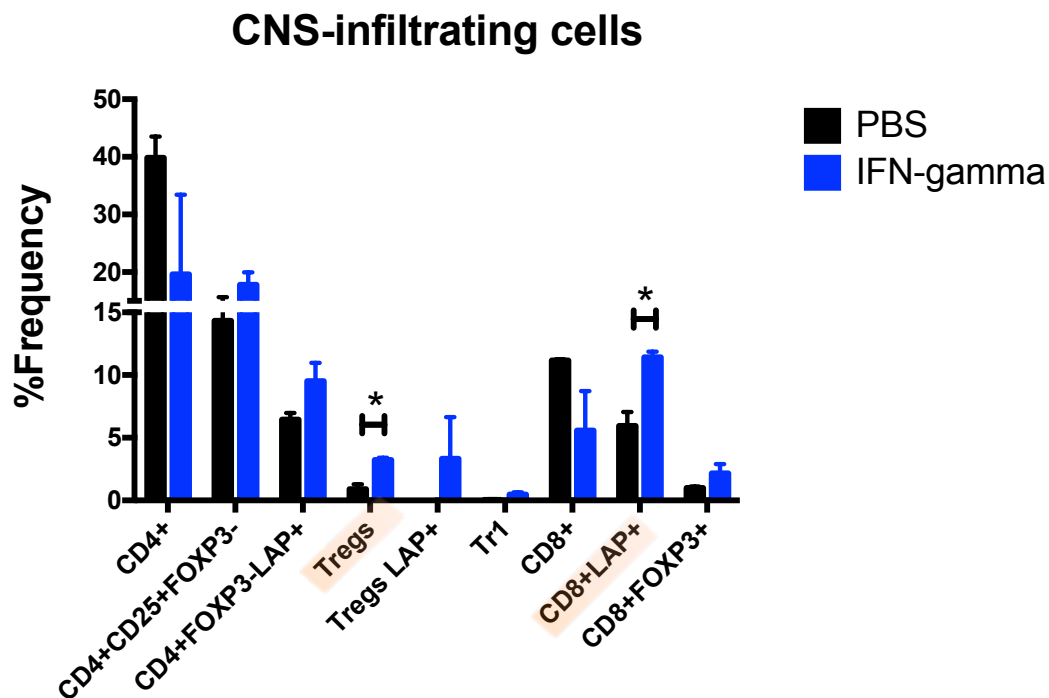
En base a lo anterior, nos preguntamos qué tipo celular podría ser blanco de IFN- $\gamma$  y aumentar su producción de TGF- $\beta$ , necesario para la inducción de linfocitos Tregs en el SNC. Para responder esta pregunta, se realizó un nuevo análisis multi-paramétrico de citometría de flujo para células presentadoras de antígeno (CD45, CD11b, CD11c) o microglía (CD45+CD11b+CD39+ [97]) expresando LAP (TGF- $\beta$ ) y otros marcadores de regulación inducidos por IFN- $\gamma$ , como PD-L1 y moléculas MHC de clase II (**Figura 36**). Además, evaluamos nuevamente poblaciones de linfocitos Tregs, enfocados en células, expresando LAP (TGF- $\beta$ ) (**Figura 37**). Para ello, células infiltrantes del SNC, nódulos linfáticos cervicales y bazo fueron extraídas de animales con EAE después de 5 días de tratamiento con IFN- $\gamma$ , durante la fase crónica de la EAE y analizadas por citometría de flujo.

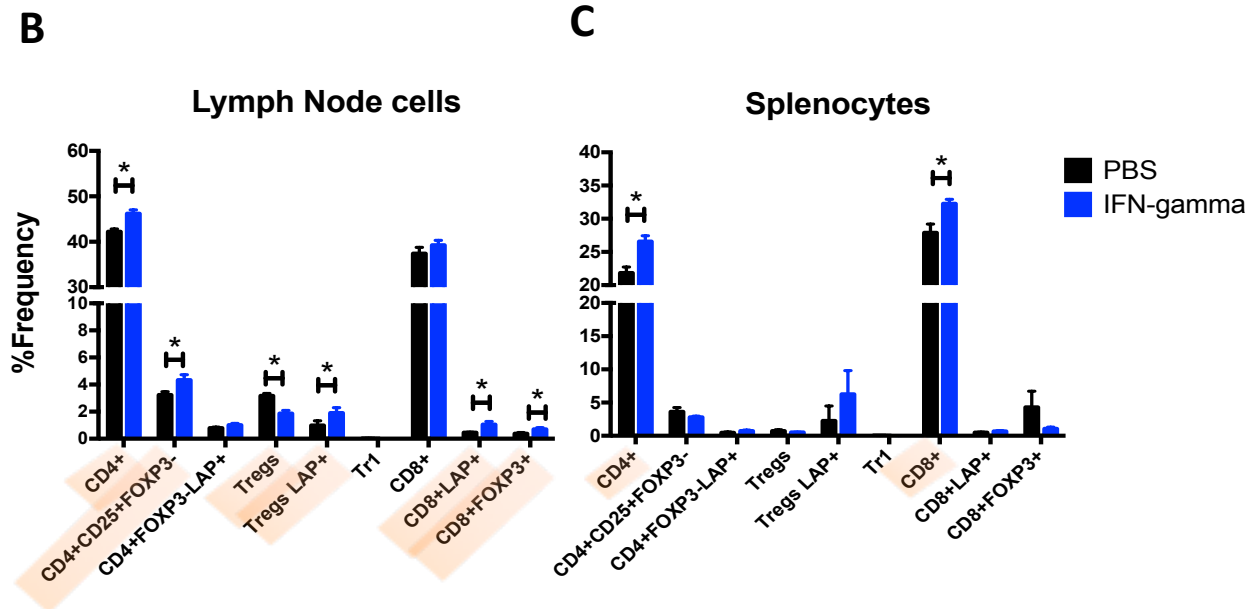




**Figura 36. El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$  induce un aumento en la frecuencia de LAP+ y PD-L1+ en diferentes subtipos de células CD11b+.** Ratones EAE iniciando la fase crónica de la enfermedad (día 14 post inmunización) fueron tratados con IFN- $\gamma$  o el vehículo (PBS) durante 5 días. Células mononucleares infiltrantes del SNC, nódulos linfáticos cervicales y del bazo fueron aisladas y cultivadas *ex vivo* por 24 horas, sin ningún estímulo. Promedio de las frecuencia diferentes subpoblaciones de células CD11b+ (CD11b+, CD11b+CD11c+, CD45+CD11b+CD39+) en el **A)** Sistema nervioso central, **B)** Nódulos linfáticos y **C)** Bazo (SP) de ratones tratados con PBS (barras negras) o IFN- $\gamma$  (barras azules). Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes (n por grupo en cada experimento IFN- $\gamma$ =4; n PBS=4). \* $p$ <0.05.

**A**





**Figura 37.** El tratamiento de animales en la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$  induce un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs convencionales y CD8+LAP+ en el sistema nervioso central. Ratones EAE iniciando la fase crónica de la enfermedad (día 14 post inmunización) fueron tratados con IFN- $\gamma$  o el vehículo (PBS) durante 5 días. Células mononucleares infiltrantes del SNC, nódulos linfáticos cervicales y del bazo fueron aisladas y cultivadas *ex vivo* por 24 horas, sin ningún estímulo. Promedio de las frecuencias diferentes subpoblaciones de Linfocitos Tregs expresando LAP (TGF- $\beta$ ) **A**) Sistema nervioso central **B**) Nódulos linfáticos y **C**) Bazo (SP) de ratones tratados con PBS (barras negras) o IFN- $\gamma$  (barras azules). Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes (n por grupo en cada experimento IFN- $\gamma$  =4; n PBS=4). \* $p$ <0.05.

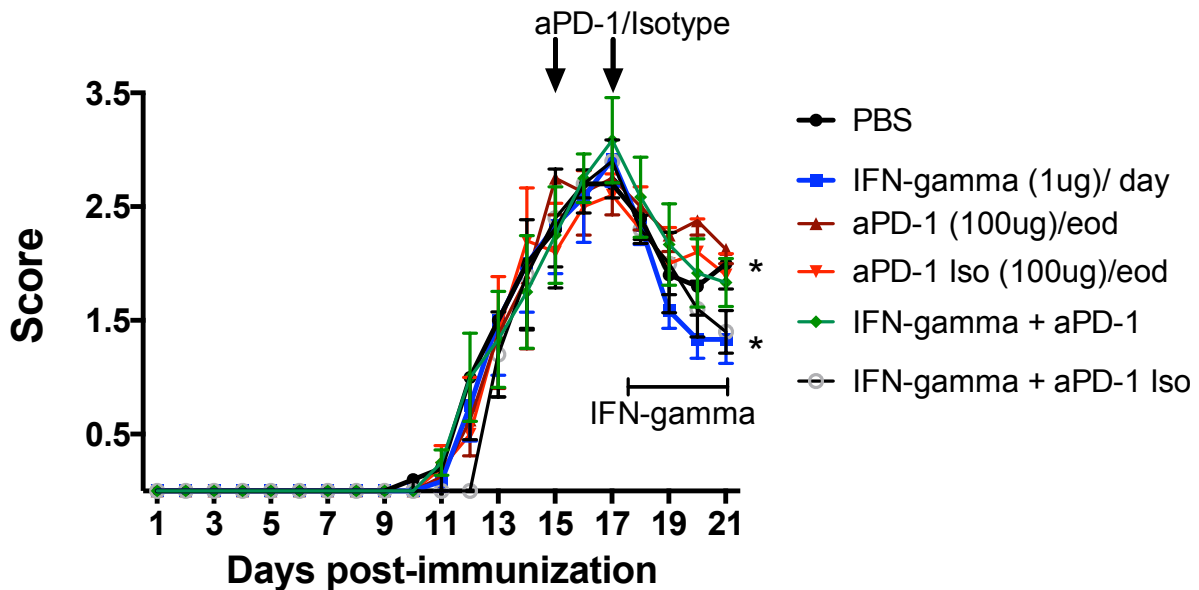
Nuestros resultados muestran que el tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$  induce un aumento significativo en la frecuencia de subgrupos de células CD11b+ expresando PD-L1, principalmente microglía (CD11b+CD45+CD39+), células CD11b+CD11c+ de nódulos linfáticos y bazo, y células CD11b+ (CD11b+CD11c-) de bazo. Además, IFN- $\gamma$  también induce una significativa mayor frecuencia de LAP (TGF- $\beta$ ) en células CD11b+ (CD11b+CD11c-) y de células CD11b+CD11c+ de nódulos linfáticos y bazo (**Figura 36**). Por otro lado, al analizar los subtipos de linfocitos Tregs, los resultados confirman las observaciones anteriores, con una mayor frecuencia significativa de linfocitos Tregs convencionales en el SNC de animales tratados con IFN- $\gamma$ , comparados con los controles

tratados con PBS, no así, en nódulos linfáticos ni bazo. De manera interesante, IFN- $\gamma$  induce un aumento significativo, tanto en el SNC como en los nódulos linfáticos, de la frecuencia de linfocitos CD8+LAP+, y también una mayor frecuencia de linfocitos CD8+FOXP3+, aunque esto último sólo fue significativo en células de los nódulos linfáticos (**Figura 37**).

En conclusión, los análisis de citometría de flujo revelan que el tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$  induce un aumento significativo en la expresión de FOXP3 y LAP en linfocitos CD8+ y de LAP y PD-L1 en células CD11b+ y en CD11b+CD11c+, que pueden actuar como presentadoras de antígeno y potenciales activadoras de linfocitos Tregs en la periferia y en el SNC (microglía).

Con el fin de demostrar la importancia de la vía PD-1/PD-Ls durante el tratamiento con IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE, se determinó el impacto del bloqueo de dicha vía sobre los efectos protectores de IFN- $\gamma$  (**Figura 38**). Los resultados muestran que el tratamiento individual con anticuerpos bloqueantes anti-PD-1 exacerba los síntomas de la EAE. Además, en comparación a los ratones tratados con el control de isotipo, la administración de anticuerpos bloqueantes de PD-1, previo al inicio de tratamiento con IFN- $\gamma$ , suprimió los efectos benéficos de IFN- $\gamma$ . Estos resultados demuestran que los efectos terapéuticos de IFN- $\gamma$  también dependen de la interacción PD-1/ PD-L1.

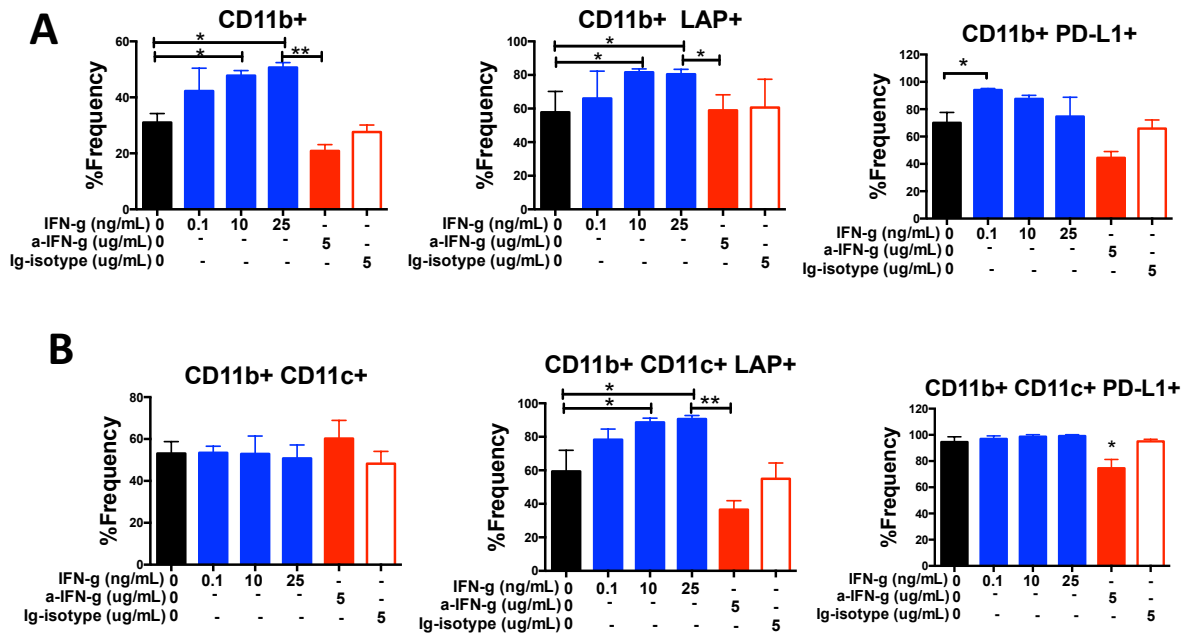
## EAE progression



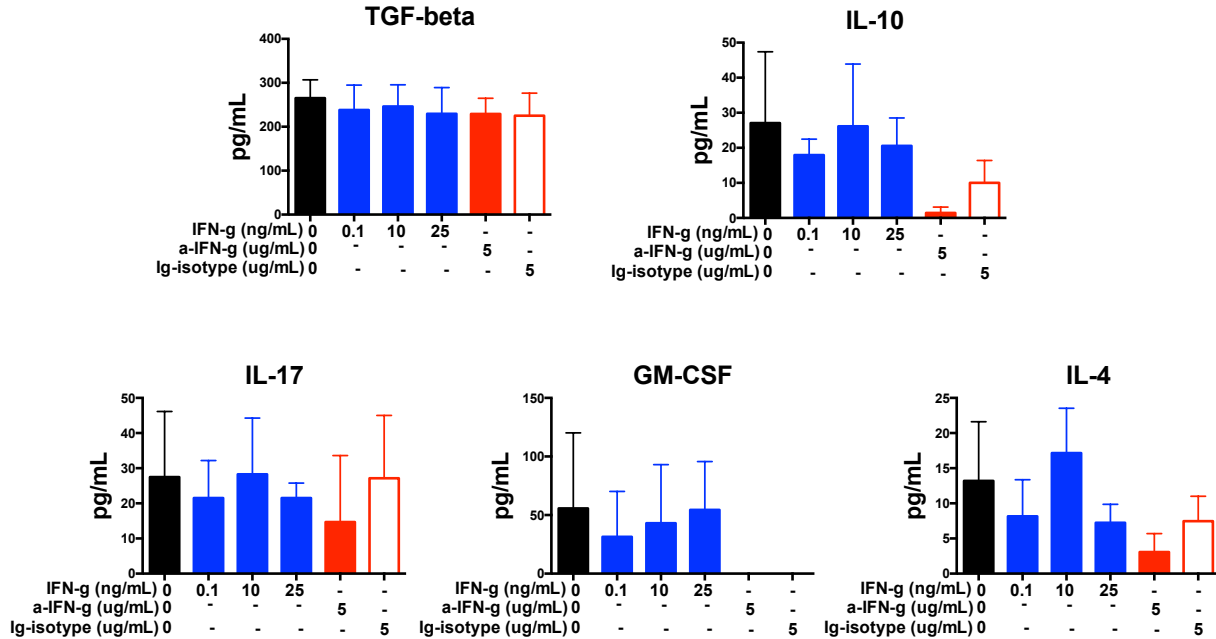
**Figura 38. Efecto de la administración *in vivo* de IFN- $\gamma$  y anticuerpos anti-PD-1 durante la fase crónica de la EAE.** Seis grupos de ratones C57BL/6J fueron inmunizados con el péptido MOG (150  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub>; 500  $\mu$ g MT; 200 ng PT) para inducir EAE crónica y se inició tratamiento (iP) en el peak de la fase crónica de la EAE (día 17), se inició tratamiento con 1  $\mu$ g diario (durante 5 días) de IFN- $\gamma$  (círculos azules para el grupo C57BL/6J) y PBS (cuadrado negro para el grupo C57BL/6J), 500  $\mu$ g de anti-PD-1 dos días pre-tratamiento con IFN- $\gamma$ , y una segunda dosis dos días después de la primera al inicio del tratamiento con IFN- $\gamma$  (triángulo marrón), 500  $\mu$ g de anti-PD-1 isotipo en la misma dosis mencionada anteriormente (triángulo rojo), IFN- $\gamma$  + anti-PD-1 (igual dosis y administración) (rombo verde) e IFN- $\gamma$  + anti-PD-1 isotipo (igual dosis y administración) (círculo gris), durante 5 días. Barras de error representan  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ . Promedio de 1 experimento independiente,  $n = 6-10$  ratones/grupo. \* $p < 0.05$ .

*Evaluar el efecto ex vivo e in vitro de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de TGF- $\beta$  y PD-L1 en células CD11b+.*

Con el interés de determinar si es posible inducir *ex vivo* la expresión de estas moléculas reguladoras (TGF- $\beta$  y PDL-1) en células CD11b+ periféricas, esplenocitos fueron aislados de ratones con EAE en fase crónica y estimuladas *ex vivo* en presencia del péptido MOG durante 72 horas, en presencia de concentraciones crecientes de IFN- $\gamma$ , de un anticuerpo neutralizante anti-IFN- $\gamma$  o de su control de isotipo (**Figura 39**). Los análisis de citometría de flujo revelaron que el tratamiento *ex vivo* con IFN- $\gamma$  indujo un aumento significativo en la frecuencia de células CD11b+ y en la frecuencia de células CD11b+ y CD11b+CD11c+ expresando LAP (TGF- $\beta$ ) (**Figura 39 A y B**), mientras que al bloquear el IFN- $\gamma$  liberado en forma endógena con anticuerpos, los niveles de inducción de LAP (TGF- $\beta$ ) fueron similares al control sin estimulación. Además, IFN- $\gamma$  indujo un aumento significativo en la frecuencia de PD-L1 en células CD11b+ (**Figura 39 A**), mientras que en células CD11b+CD11c+, este aumento no fue significativo. Sin embargo, al bloquear con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , la expresión de PD-L1 en células CD11b+CD11c+, fue significativamente menor en comparación con todos los grupos analizados (**Figura 39 B**). Finalmente, no se detectó cambios en la secreción de TGF- $\beta$ , ni otras citoquinas inflamatorias o reguladoras en el sobrenadante de estos cultivos celulares (**Figura 40**).



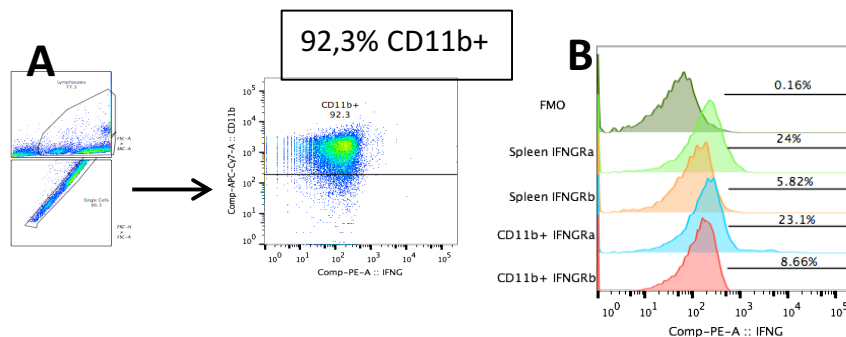
**Figura 39. Efecto ex vivo de IFN- $\gamma$  sobre células del bazo de ratones en fase crónica de la EAE en la frecuencia de LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1 en células CD11b+ y CD11b+CD11c+.** Células provenientes del bazo de ratones con EAE en fase crónica fueron aisladas y cultivadas durante 72 horas en presencia de 10  $\mu$ g/mL pMOG. **A)** Frecuencia promedio de células CD11b+, CD11b+LAP+ y CD11b+PD-L1+ **B)** Frecuencia promedio de células CD11b+CD11c+, CD11b+CD11c+LAP+ y CD11b+CD11c+PD-L1 en respuesta a IFN- $\gamma$ , un anticuerpo neutralizante anti-IFN- $\gamma$  (a-IFN- $\gamma$ ) o un control de isotipo (ig anti-IFN- $\gamma$  iso). Barras representan promedio $\pm$ SD (n por grupo en cada experimento = 4). \* $p$ <0.05.



**Figura 40. Efecto *ex vivo* IFN- $\gamma$  sobre células del bazo de ratones en fase crónica de la EAE en la secreción de citoquinas reguladoras e inflamatorias.** Células provenientes del bazo de ratones con EAE en fase crónica fueron aisladas y cultivadas durante 72 horas en presencia de 10  $\mu$ g/mL pMOG. Se analizaron los sobrenadantes de estas células mediante ensayo de multiplex para determinar citoquinas TGF- $\beta$ , IL-10, IL-17, GM-CSF e IL-4, en respuesta a IFN- $\gamma$ , un anticuerpo neutralizante anti-IFN- $\gamma$  (a-IFN- $\gamma$ ) o un control de isotipo (ig anti-IFN- $\gamma$  iso). Barras representan promedio $\pm$ SD (n por grupo en cada experimento = 4).

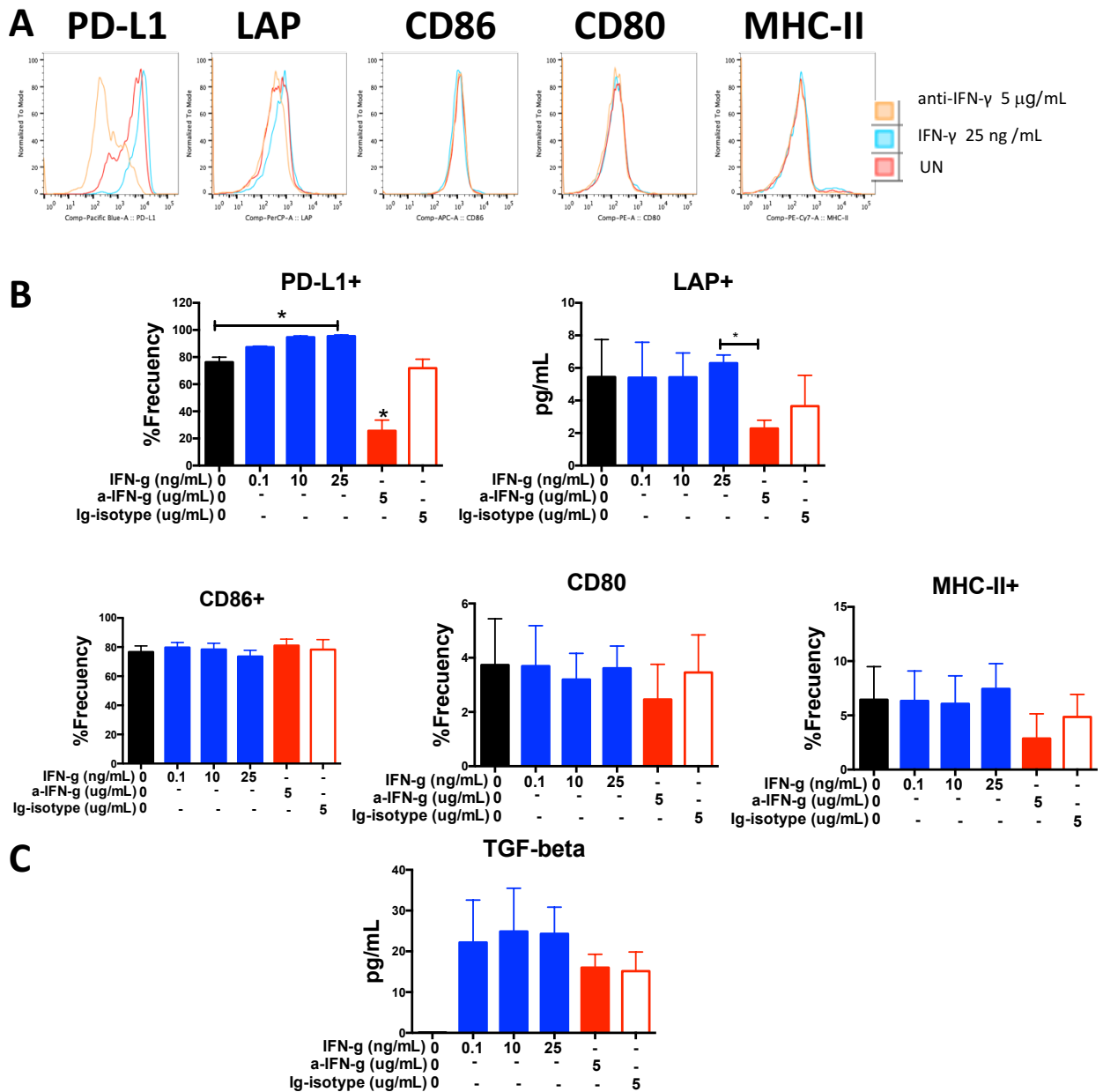
Luego, determinamos la capacidad de IFN- $\gamma$  para inducir *in vitro* un aumento en la expresión de LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1 en células CD11b $^{+}$ . Para ello, células CD11b $^{+}$  fueron aisladas (pureza >90%) del bazo de animales en fase crónica de la EAE (**Figura 41**). Primero, se verificó la expresión de las sub-unidades del receptor de IFN- $\gamma$  (IFNGRa e IFNGRb) en estas células (**Figura 41 B**) y luego se incubaron en presencia del péptido MOG y diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$ , del anticuerpo bloqueante de IFN- $\gamma$ , o de su control de isotipo durante 24 (**Figura 42**) o 72 (**Figura 43**) horas. Además, incluimos a modo de control, células CD11b $^{+}$  de animales sin EAE (naïve) (**Figura 44**). Los análisis

muestran que IFN- $\gamma$  induce un aumento significativo en la frecuencia de LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1 en células CD11b+ provenientes de la fase crónica de la EAE a las 72 horas, y solo significativo de PD-L1 a las 24 horas de estimulación con IFN- $\gamma$ . De manera interesante, IFN- $\gamma$  no induce un aumento significativo de PD-L1, ni de LAP (TGF- $\beta$ ) en células CD11b+ provenientes de animales naïve, e incluso disminuye significativamente la frecuencia de células CD11b+, expresando PD-L2 (**Figura 44**). El análisis de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y también de moléculas MHC-II, no mostró cambios significativos en respuesta a IFN- $\gamma$ , en ninguno de las condiciones evaluadas (EAE 24 y 72 horas, naïve 72 horas). Finalmente, aunque no se detectó diferencias significativas en la secreción de TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de los cultivos celulares, se observó una tendencia al incremento de secreción de TGF- $\beta$  en respuesta a IFN- $\gamma$  y una leve disminución al bloquear esta citoquina (**Figura 42 C**), mientras que en el control sin estímulo los niveles de TGF- $\beta$  fueron indetectables.

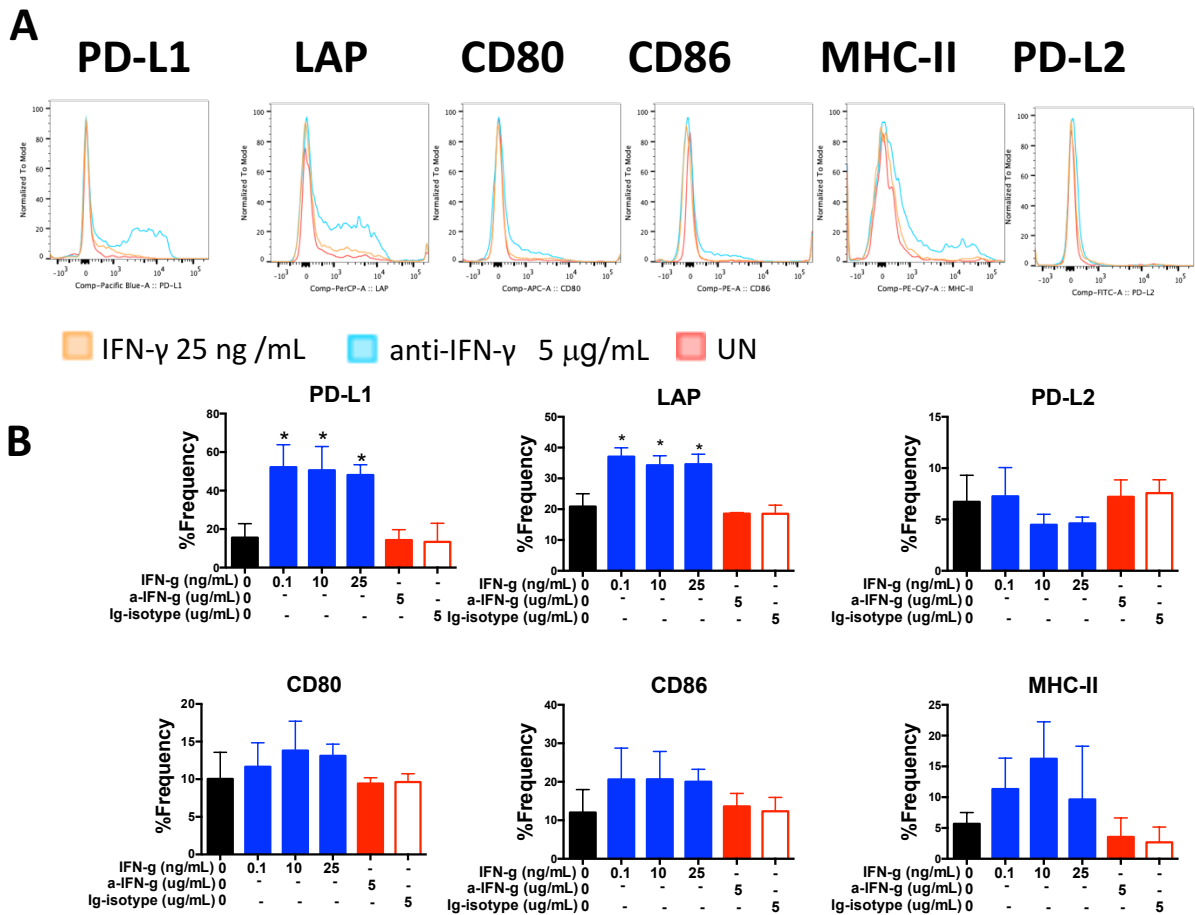


**Figura 41. Purificación de células CD11b+ y expresión de sub-unidades del receptor de IFN- $\gamma$ .** **A)** Análisis de citometría de flujo de la purificación de células CD11b+ purificados del bazo de ratones con EAE o naïve, con una pureza >90%. **B)** Ejemplo de la expresión de las sub-unidades del IFNGR en esplenocitos totales y células CD11b+ purificadas.



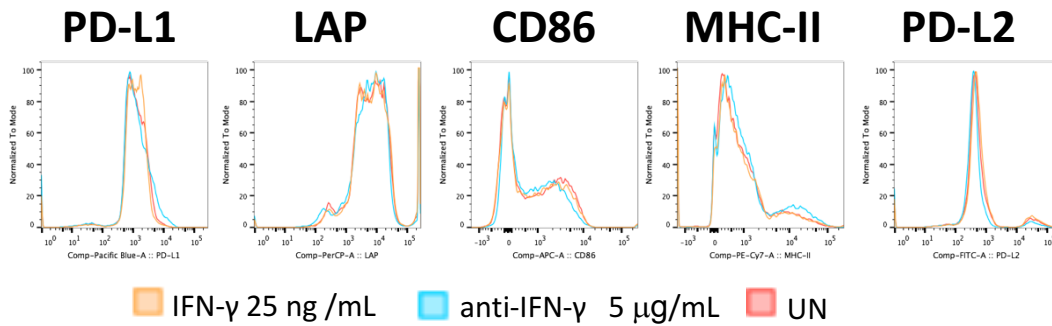


**Figura 42. Efecto a 24 horas de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1 en células purificadas CD11b<sup>+</sup> proveniente del bazo de ratones en fase crónica de la EAE.** Células CD11b<sup>+</sup> purificadas, fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de 10  $\mu$ g/mL pMOG y diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (0.1, 10, 25 ng/mL) o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  o anti-IFN- $\gamma$  isotipo. **A)** Análisis de citometría de flujo. Histogramas representativos de la expresión de PD-L1, LAP, CD86, CD80, MHC-II. **B)** efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción PD-L1, LAP, CD86, CD80, MHC-II. **C)** Niveles TGF- $\beta$  en el sobrenadante (pg/mL). Barras representan promedio $\pm$ SD de 4 experimentos independientes. \* $p$ <0.05.

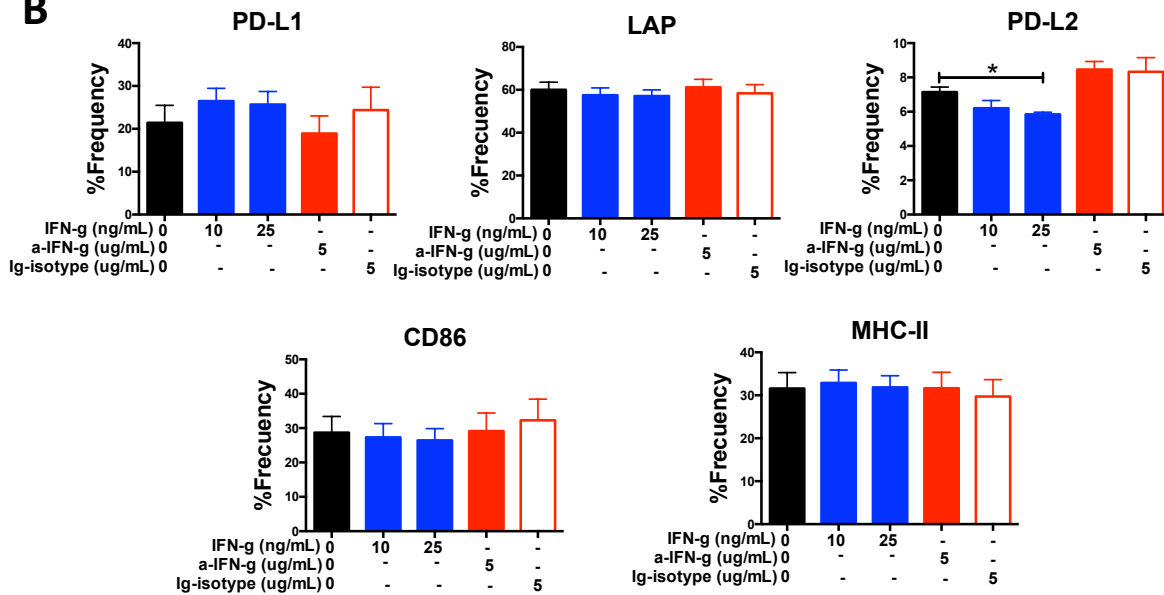


**Figura 43. Efecto a 72 horas de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1 en células purificadas CD11b<sup>+</sup> proveniente del bazo de ratones en fase crónica de la EAE.** Células CD11b<sup>+</sup> purificadas, fueron cultivadas durante 72 horas en presencia de 10  $\mu$ g/mL pMOG y diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (0.1, 10, 25 ng/mL) o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  o anti-IFN- $\gamma$  isotipo. **A)** Análisis de citometría de flujo. Histogramas representativos de la expresión de PD-L1, LAP, PD-L2, CD86, CD80, MHC-II. **B)** Efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción PD-L1, LAP, PD-L2, CD86, CD80, MHC-II. Barras representan promedio $\pm$ SD de 4 experimentos independientes. \* $p$ <0.05.

**A**



**B**

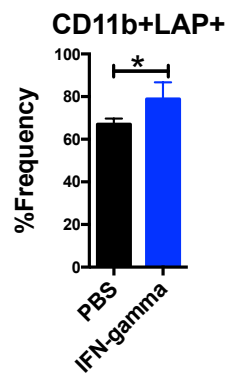


**Figura 44. Efecto a 72 horas de IFN- $\gamma$  sobre la inducción de LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1 en células purificadas CD11b<sup>+</sup> proveniente del bazo de ratones naïve (sin EAE).** Células CD11b<sup>+</sup> purificadas, fueron cultivadas durante 72 horas en presencia de 10  $\mu$ g/mL pMOG y diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (0.1, 10, 25 ng/mL) o 5  $\mu$ g/mL de anti-IFN- $\gamma$  o anti-IFN- $\gamma$  isotipo. **A)** Análisis de citometría de flujo. Histogramas representativos de la expresión de PD-L1, LAP, PD-L2, CD86, MHC-II. **B)** efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inducción PD-L1, LAP, PD-L2, CD86, MHC-II. Barras representan promedio $\pm$ SD de 4 experimentos independientes. \* $p$ <0.05.

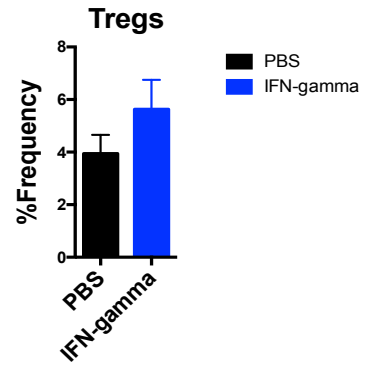
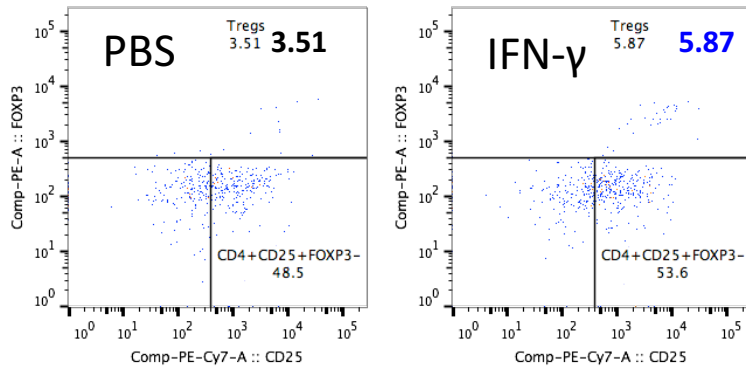
*Evaluar la capacidad de células CD11b+ estimuladas con IFN- $\gamma$  sobre la inducción de linfocitos Tregs.*

Por último, evaluamos la capacidad de las células CD11b+ provenientes de animales tratados *in vivo* con IFN- $\gamma$  o PBS para inducir linfocitos Tregs, a partir de linfocitos CD4+ naïve de animales sanos (**Figura 45**). Para esto, células CD11b+ aisladas del bazo de ratones tratados *in vivo* con IFN- $\gamma$  o PBS, fueron co-cultivadas en razón de 1:1 con linfocitos T CD4+ naïve obtenidos del bazo de ratones sanos, en presencia de 2  $\mu$ g/mL de anti-CD3. Después de 4 días de incubación, se encontró una frecuencia significativamente mayor de células expresando LAP (TGF- $\beta$ ) en células CD11b+ provenientes de ratones con EAE tratados *in vivo* con IFN- $\gamma$  comparado con aquellas células CD11b+ de ratones tratados con PBS (**Figura 45 A**). Además, los análisis muestran un aumento no significativo en la inducción de linfocitos Tregs por células CD11b+ provenientes de animales con EAE tratados con IFN- $\gamma$  en comparación a la inducción por células CD11b+ de ratones tratados con PBS (**Figura 45 B**). De manera interesante, este aumento de inducción se pierde al agregar en el co-cultivo, anticuerpos anti-TGF- $\beta$ , lo cual indica que la capacidad de inducción de linfocitos Tregs por células CD11b+ tratadas con IFN- $\gamma$ , depende de los niveles secretados de TGF- $\beta$  (**Figura 45 B**). No se detectó diferencia en la secreción de citoquinas reguladoras como inflamatorias analizadas en el sobrenadante de estos cultivos celulares. Sin embargo, en la condición con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  se observó que existe una mayor secreción de IL-17, lo que sugiere que la inducción de TGF- $\beta$  (LAP) por IFN- $\gamma$  sería necesaria para favorecer la generación de linfocitos Tregs versus linfocitos Th17 (**Figura 45 C**).

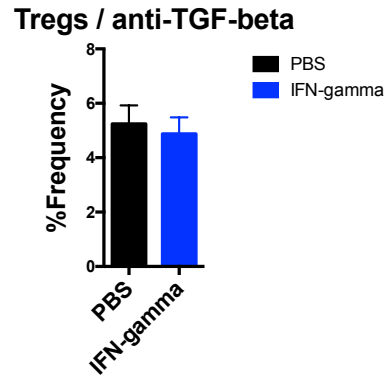
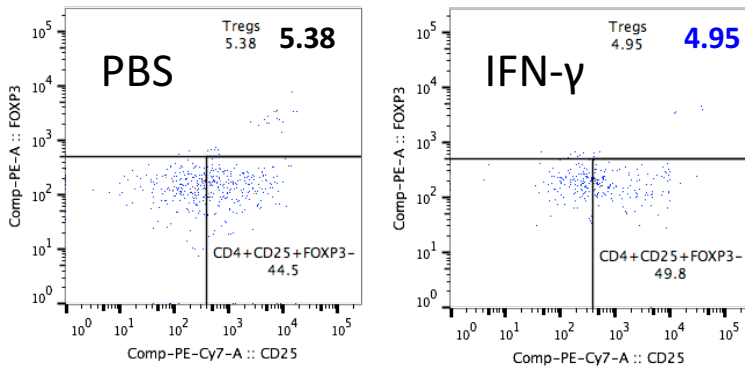
**A**



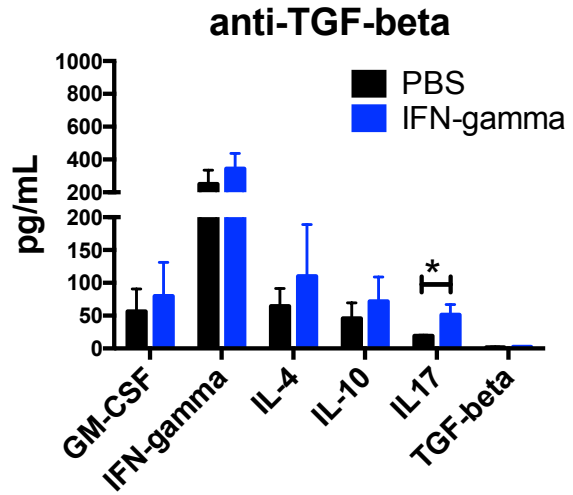
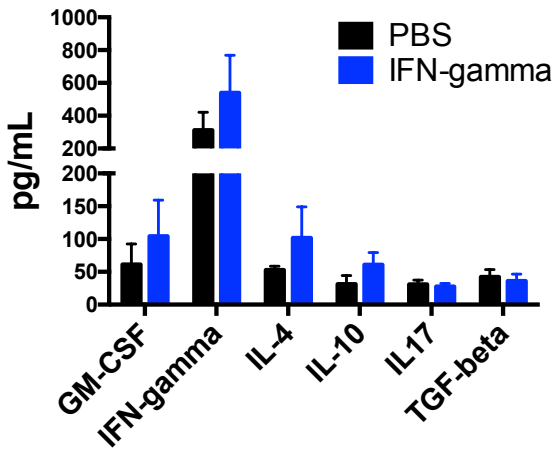
## B CD11b+/T CD4 naïve



## CD11b+/T CD4 naïve + anti-TGF- $\beta$



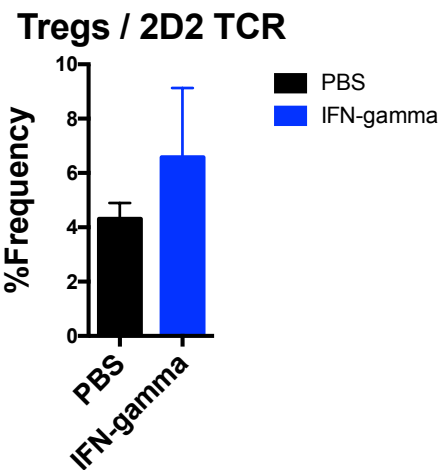
## C



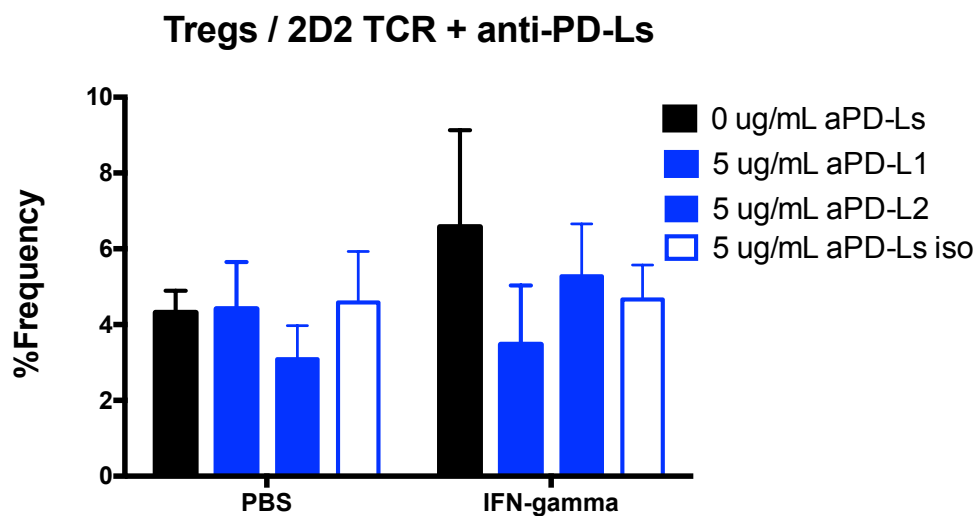
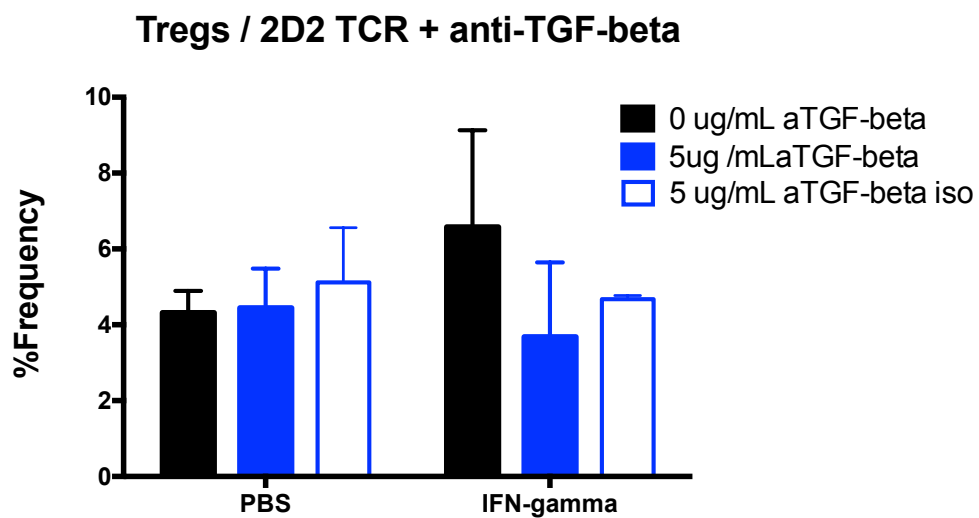
**Figura 45. Inducción de linfocitos Tregs por células CD11b+ provenientes de animales con EAE tratados con IFN- $\gamma$ .** Células CD11b+ purificadas del bazo de animales con EAE tratados durante 5 días con 1  $\mu\text{g}$  de IFN- $\gamma$  o PBS, fueron cultivadas durante 4 días en una razón 1:1 con linfocitos T CD4+naïve de animales sanos, en presencia de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD3. **A)** Frecuencia de células CD11b+ expresando LAP+ (TGF- $\beta$ ) después de 4 días de cultivo. **B)** Frecuencia de inducción de linfocitos Tregs a partir de linfocitos T CD4+naïve de animales sanos, sin o con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpos bloqueantes de TGF- $\beta$ . **C)** Niveles de citoquinas secretadas (GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17, TGF- $\beta$ ) en los cultivos de células CD11b+ con linfocitos T CD4+naïve, sin o con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpos bloqueantes de TGF- $\beta$ . Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes. \* $p$ <0.05.

Con la intención de evaluar la inducción de linfocitos Tregs por células CD11b+ en función de una respuesta antígeno-específica, evaluamos la inducción de linfocitos Tregs por parte de células CD11b+ a partir de linfocitos CD4+ naïve de animales 2D2 (animales con linfocitos T expresando un TCR específico para MOG) en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido MOG (**Figura 46 A**). Similar a lo observado en la **Figura 45**, las células CD11b+ provenientes de ratones con EAE tratados *in vivo* con IFN- $\gamma$  indujeron un aumento no significativo de la frecuencia de linfocitos Tregs versus las células CD11b+ provenientes de ratones con EAE tratados con PBS. Además, la adición de anticuerpos bloqueantes de PD-L1 y TGF- $\beta$  disminuyó la inducción de linfocitos Tregs observada con células CD11b+ provenientes de animales tratados con IFN- $\gamma$  comparado con los cultivos controles con células CD11b+ provenientes de ratones con EAE tratados con PBS, aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística (**Figura 46 B**)

**A**



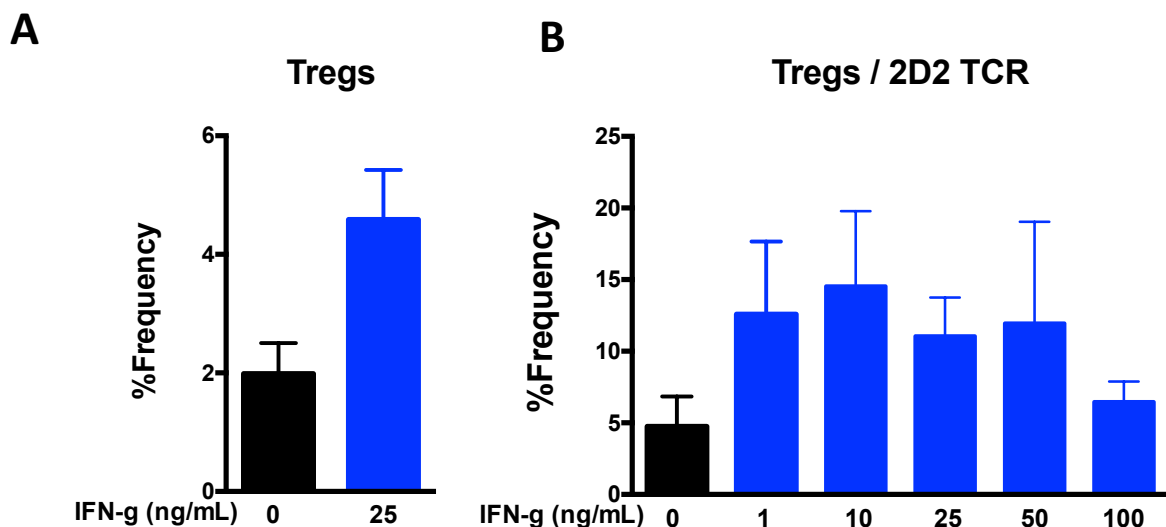
**B**



**Figura 46. Inducción de linfocitos Tregs a partir de linfocitos T CD4+ naïve (“2D2 TCR”) por células CD11b+ provenientes de animales con EAE tratados con IFN- $\gamma$ .** Células CD11b+ purificadas de animales con EAE tratados durante 5 días con 1  $\mu\text{g}$  de IFN- $\gamma$  o PBS, fueron cultivadas durante 4 días en una razón 1:1 con linfocitos T CD4+naïve de animales “2D2 TCR” en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido MOG. **A)** Frecuencia de inducción de linfocitos Tregs a partir de linfocitos T CD4+naïve “2D2 TCR”. **B)** Frecuencia de inducción de linfocitos Tregs a partir de linfocitos T CD4+naïve “2D2 TCR”, en presencia de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpos bloqueantes de PD-L1, PD-L2, TGF- $\beta$  y sus respectivos controles de isotipo. Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.

Luego, para evaluar si células CD11b+ estimuladas *ex vivo* con IFN- $\gamma$  son capaces de inducir linfocitos Tregs, células CD11b+ purificadas de ratones en fase crónica de la EAE (sin tratamiento) fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido MOG durante 24 horas. Posteriormente, las células CD11b+ fueron lavadas exhaustivamente para eliminar el IFN- $\gamma$  agregado exógenamente, y se cultivaron durante 4 días en conjunto con linfocitos T CD4+ naïve provenientes de ratones sanos o 2D2, y estimulados con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD3 o 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido MOG, respectivamente. Los resultados mostraron un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs, a partir de linfocitos T CD4+ de ratones naïve (**Figura 47 A**) y 2D2 (**Figura 47 B**) inducido por células CD11b+ pre-acondicionadas con IFN- $\gamma$ . El efecto inductor de IFN- $\gamma$  fue observado a bajas concentraciones de esta citoquina mientras que concentraciones elevadas de IFN- $\gamma$  inhibieron dicha inducción.





**Figura 47.** La estimulación de células CD11b+ *ex vivo* con IFN- $\gamma$ , es suficiente para inducir un aumento de linfocitos Tregs provenientes de animales con EAE tratados con IFN- $\gamma$ . Células CD11b+ purificadas de animales en fase crónica de la EAE, fueron cultivadas durante 1 día con diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  (1, 10, 25, 50 y 100 ng/mL) en presencia de 10  $\mu$ g/mL del péptido MOG. Luego, las células fueron lavadas, y co-cultivadas con linfocitos T CD4+ naïve provenientes de **A**) animales sanos (naïve) o **B**) “2D2 TCR”, con 2  $\mu$ g/mL anti-CD3 o 10  $\mu$ g/mL del péptido MOG. Se determinó la frecuencia de linfocitos Tregs mediante citometría de flujo. Barras representan promedio $\pm$ SD de 3 experimentos independientes.

En resumen, el conjunto de éstos últimos resultados indican que los efectos terapéuticos de IFN- $\gamma$  en EAE dependen de la vía PD-1/PD-Ls y que IFN- $\gamma$  es capaz de inducir principalmente un aumento de la frecuencia de células CD11b+ expresando LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1. Además, el tratamiento con IFN- $\gamma$  de células CD11b+ tanto *in vivo* como *ex vivo*, es suficiente para inducir linfocitos Tregs a partir de linfocitos T CD4+ naïve, en respuesta a estimulación inespecífica (anti-CD3) o antígeno-específico, y dicha inducción depende de la expresión de TGF- $\beta$  y PD-L1.

## VI. DISCUSIÓN

Históricamente, IFN- $\gamma$  ha sido descrito como una citoquina pro-inflamatoria, no obstante, durante los últimos años múltiples reportes han mostrado que, dependiendo tanto del estado inflamatorio en el que se encuentre y de su concentración, esta citoquina también posee efectos protectores/reguladores [63]. Ésta función dual de IFN- $\gamma$ , ha sido ampliamente descrita en la EM y EAE, donde la evidencia hasta ahora indica que IFN- $\gamma$  ejercería una actividad patogénica en humanos, pero protector en el modelo animal [56], [57]. Más aún, el efecto terapéutico de IFN- $\gamma$  sobre la EAE, se encuentra específicamente limitada a la fase efectora de la EAE, mientras que durante la fase inductiva de la enfermedad, IFN- $\gamma$  tiene un efecto patogénico [67]. Particularmente, dentro de esta capacidad reguladora del IFN- $\gamma$ , no está claramente definido su efecto sobre la inducción/expansión de linfocitos Tregs. De este modo, así como existe evidencia de que IFN- $\gamma$  es capaz de inhibir la inducción de linfocitos Tregs [98], [99], también hay evidencia a favor de su inducción [68], [71], [100].

Debido a que una de las principales funciones de los linfocitos Tregs es la restricción de linfocitos autoreactivos, los cuales pueden desencadenar enfermedades autoinmunes como la EM y EAE [101], se ha propuesto que puede existir una desregulación de la población de linfocitos Tregs en esta enfermedad [58]. De manera interesante, estudios han demostrado que los linfocitos Tregs estarían desregulados en la EM y EAE, ya sea por poseer una reducción en la frecuencia [102], [103], o por una disminución en la funcionalidad supresora de esta población [37], [46], [104], [105]. Dentro de este contexto, el principal objetivo de este proyecto, fue determinar el efecto de una terapia con IFN- $\gamma$  sobre la población de linfocitos Tregs en la fase crónica de la EAE. Nuestros primeros resultados indican que IFN- $\gamma$  es capaz de reducir los síntomas de fase crónica de la EAE, asociado con un incremento de linfocitos Tregs en el SNC. Este incremento de linfocitos Tregs en el SNC de los animales tratados con IFN- $\gamma$ , concuerda con lo descrito en la literatura que durante periodos de remisión de la EAE, existe una acumulación de linfocitos Tregs en el SNC [37], [44].

Sin embargo, sólo la acumulación de linfocitos Tregs en el SNC, no necesariamente está relacionada en forma directa con el efecto terapéutico de IFN- $\gamma$ . Es más, Korn *et al* (Nat Med, 2007) demostraron que durante el *peak* de la EAE, también existe una acumulación de linfocitos Tregs en el SNC, los cuales, debido al gran microambiente inflamatorio existente, son incapaces de suprimir linfocitos T efectores del SNC [37].

Para responder la interrogante de si el efecto terapéutico de IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE depende de la población de linfocitos Tregs, nuestra primera estrategia fue utilizar anticuerpos neutralizantes de CD25, para depletar esta población reguladora, en conjunto con IFN- $\gamma$ . Si bien, actualmente se ha demostrado que un tratamiento con anticuerpos anti-CD25, es beneficioso en pacientes con EM, se ha observado que en conjunto con una reducción de linfocitos T efectores, la frecuencia y funcionalidad de linfocitos Tregs también se ve disminuida [106]–[110]. Aún más, hasta la fecha, el tratamiento con anticuerpos anti-CD25 en la EAE, ha demostrado ampliamente que inactiva/depleta la población de linfocitos Tregs, aumentando la incidencia y exacerbando los síntomas de la enfermedad [39]–[41], [44], [90], [111], [112]. Para sorpresa nuestra, a diferencia de lo esperado, el tratamiento con anti-CD25 mejoró significativamente los síntomas de la EAE en comparación con el control de isotipo. Por lo tanto, no pudimos de esta forma evaluar si el efecto protector de IFN- $\gamma$  en la EAE depende de linfocitos Tregs. Una posible explicación para esta paradoja, podría estar relacionada con la etapa de la EAE en la cual administramos el tratamiento. Ninguno de los trabajos previos ha ensayado el tratamiento con anticuerpos anti-CD25 durante la fase crónica de la EAE, sino más bien profilácticamente antes de la inducción de la enfermedad, durante la fase inductiva o en periodos de remisión de los síntomas. En la fase crónica de la EAE, existe una mayor proporción de linfocitos T efectores que T reguladores, por lo que el tratamiento con anti-CD25 podría estar inactivando diferencialmente a linfocitos T efectores, induciendo una reducción en los síntomas de la enfermedad. Esta hipótesis, concuerda con lo observado por Hayosh *et al* (J. Immunol. 1987) quien reportó que la inducción de la EAE pasiva con células efectoras provenientes de animales con EAE fue dramáticamente suprimida al pre-tratar las células efectoras con anti-CD25 [113]. Por lo tanto, nuestros resultados con el anticuerpo anti-CD25 podrían tener importantes

implicancias en los actuales estudios clínicos de pacientes con dicho anticuerpo y requieren una mayor profundización.

Nuestra segunda aproximación, fue utilizar el modelo de animales FOXP3<sup>GFP-DTR</sup>, para depletar específicamente las células que expresan FOXP3, es decir, la población de linfocitos Tregs. A diferencia del uso de los anticuerpos anti-CD25, se ha descrito que la depleción de la población de linfocitos Tregs específicamente en la fase crónica de la EAE induce una exacerbación de los síntomas de la enfermedad [42], similar a lo observado en esta tesis. Notablemente, el tratamiento con IFN- $\gamma$  fue incapaz de ejercer su efecto terapéutico en la fase crónica de la EAE en estos animales depletados de linfocitos Tregs. De manera interesante, animales deficientes del gen de IFN- $\gamma$ , a los cuales se les induce la EAE, presentan una elevada proporción de linfocitos T CD4+ efectores en el SNC, en comparación con animales *wild type* inducidos con EAE [114]. Esto es similar a lo observado en animales FOXP3<sup>GFP-DTR</sup>, en los cuales luego de depletar los linfocitos Tregs durante la fase crónica de la EAE se produce un aumento significativo de la población de linfocitos T efectores, tanto en la periferia como en el SNC [42]. Entonces, evidencia de la literatura junto con nuestras observaciones indican que IFN- $\gamma$  es capaz de redistribuir el balance entre linfocitos T CD4+ efectores y reguladores en el SNC de la EAE, a favor de los linfocitos Tregs.

Por otro lado, animales *scurfy* (*sf*) con una mutación disfuncional en el gen de FOXP3 que los lleva a desarrollar un severo desorden autoinmune multiorgánico [115], presentan una mejora en los síntomas de su enfermedad y un aumento en la esperanza de vida cuando carecen de la vía de señalización de IFN- $\gamma$  (*sf* x IFNGR<sup>-/-</sup>), lo cual sugiere que la señalización de IFN- $\gamma$  es patogénica en ausencia de linfocitos Tregs y que unos de los principales mecanismos reguladores de IFN- $\gamma$  estaría mediado por esta población celular [116].

En conjunto, todos estos antecedentes nos indican que el efecto protector de IFN- $\gamma$  durante la fase crónica de la EAE está mediado en parte por un incremento de la población de linfocitos Tregs, necesario para controlar la inflamación e infiltración

principalmente de linfocitos T efectores en el SNC, y asociado con un menor grado de desmielinización.

Con el fin de clarificar el mecanismo molecular por el cual IFN- $\gamma$  estaría induciendo este incremento de linfocitos Tregs en la EAE, evaluamos el efecto directo que posee esta citoquina sobre la inducción y expansión de los linfocitos Tregs. Hasta la fecha, existen diversos trabajos en diferentes modelos de enfermedad y diferentes condiciones de estimulación, que muestran que es posible inducir linfocitos Tregs con IFN- $\gamma$  [68]–[73]. En el modelo de la EAE, Wang *et al* (JCI, 2006) publicó un estudio describiendo que IFN- $\gamma$  induce en forma directa linfocitos Tregs a partir de linfocitos CD4+CD25<sup>-</sup>, los cuales eran capaz de reducir la severidad de la enfermedad [68]. Sin embargo, y a diferencia de las conclusiones de Wang, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que IFN- $\gamma$  es incapaz de inducir, al menos en forma directa, linfocitos Treg convencionales (CD4+CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>). Por último, estas células estimuladas con IFN- $\gamma$  son incapaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectores. Similar a nuestros resultados, se ha visto que IFN- $\gamma$  además de no ser capaz de inducir linfocitos Tregs a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive o de memoria, inhibe la demetilación del promotor de FOXP3 [117], necesaria para la expresión de este factor de transcripción y del fenotipo supresor de los linfocitos Tregs [118].

Al revisar otros mecanismos por los cuales IFN- $\gamma$  podría ser capaz de inducir linfocitos Tregs, Ouaked *et al* (JCI, 2009) encontró, al igual que nosotros, que en condiciones neutrales (en presencia de anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL4 y anti-IL12) IFN- $\gamma$  es incapaz de inducir linfocitos Tregs. Sin embargo, estos autores reportaron que en presencia de TGF- $\beta$ , la expresión de FOXP3 aumentaba de manera significativa en respuesta a IFN- $\gamma$  [71]. Por el contrario, nuestros resultados muestran que la adición de IFN- $\gamma$  exógeno o la neutralización de IFN- $\gamma$  endógeno tiene un efecto inhibitorio sobre la conversión de linfocitos T CD4+CD25<sup>-</sup> a linfocitos Tregs, en presencia de TGF- $\beta$  + IL-2 (sin anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL4 y anti-IL12), y que es independiente del estado inflamatorio del que provengan las células (fase inductiva, fase crónica o de animales naive). De manera interesante, el mismo grupo de investigadores mostró que el promotor de FOXP3 posee

sitios de unión para STAT-1, el cual al ser activado por IL-27, (y posiblemente por IFN- $\gamma$  e IL-12) induciría un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs. Si bien estos resultados apoyaban la idea de que IFN- $\gamma$  podría inducir la expresión de FOXP3, otros estudios han mostrado que, en condiciones similares a las utilizadas por nosotros, IFN- $\gamma$  inhibe de manera dependiente de STAT-1 la inducción de linfocitos Tregs [98], [119] y que el factor de transcripción IRF-1 (*interferon regulatory factor – 1*), activado principalmente por IFN- $\gamma$ , inhibe en forma directa la transcripción de FOXP3 [120]. En resumen, podemos concluir que IFN- $\gamma$  no induce un incremento en la frecuencia de linfocitos Tregs a partir de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> provenientes de la EAE y que más bien inhibe la inducción de esta población en condición de diferenciación de linfocitos iTreg (TGF- $\beta$  + IL-2).

A pesar de lo anterior, resultados de nuestro grupo de laboratorio, muestran que el tratamiento con IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE es dependiente de STAT-1 [67]. Esto, sumado a que en animales deficientes para STAT-1, muestran un aumento en la susceptibilidad a la EAE asociado con una disminución de linfocitos Tregs en el timo [121], nos preguntamos si IFN- $\gamma$  estaría ejerciendo un efecto sobre la población de linfocitos Tregs ya diferenciados. Observamos que IFN- $\gamma$  no induce cambios en la expresión de moléculas reguladoras sobre linfocitos Tregs ya diferenciados. Por otro lado, ha sido demostrado que IFN- $\gamma$  es capaz de inducir la expresión de T-bet en linfocitos Tregs, transformándolos de linfocitos Tregs a Treg-Th1-like[79], [82], [83], y si bien, T-bet no fue incorporado en nuestra medición, no observamos cambios en la funcionalidad de esta población reguladora.

Resumiendo esta parte de los resultados, el tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$  induce un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs en el SNC de la EAE, lo cual es dependiente de la expresión de FOXP3. Por su parte, los resultados *in vitro* indican que IFN- $\gamma$  no tiene un efecto directo sobre la conversión de linfocitos Tregs. Por lo tanto, estos resultados sugieren en su conjunto, que IFN- $\gamma$  ejerce un efecto indirecto sobre la inducción de linfocitos Tregs en la fase crónica de la EAE. Esto nos llevó a determinar la contribución de otras poblaciones celulares y moléculas reguladoras implicados en la actividad protectora de IFN- $\gamma$  y la regulación de linfocitos Tregs.

Debido a que las citoquinas TGF- $\beta$  [95] e IL-10 [94] están involucrados en tanto la diferenciación como función supresora de los linfocitos Tregs, así como en la supresión de la EAE [122]–[126], se estudió la relación entre ellas y el efecto protector de IFN- $\gamma$  en el desarrollo de la EAE. Consistente con lo observado en la literatura, encontramos que el tratamiento con anticuerpos anti-IL-10 empeoró los síntomas de la EAE [127]. Además, se determinó que la terapia en la fase crónica de la EAE con IFN- $\gamma$  no depende de la expresión de IL-10 *in vivo*. Más aún, nuestros resultados muestran que el tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$  tendió a disminuir la frecuencia de linfocitos T CD4+IL10+ en el SNC y que esplenocitos de ratones tratados *in vivo* con IFN- $\gamma$  exhiben una disminución significativa en la secreción de IL-10, todo lo cual es apoyado por evidencia que muestra que esta citoquina es capaz de inhibir la expresión de IL-10 [128].

Así mismo, la neutralización de TGF- $\beta$  con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  resultó en una exacerbación significativa de los síntomas de la EAE, concordando con lo reportado previamente en la literatura [124]. Lo novedoso es que encontramos, por primera vez, que el tratamiento con IFN- $\gamma$  en la EAE depende de los niveles de TGF- $\beta$ . Al contrario de lo esperado, no detectamos diferencias significativas, ni *in vivo* ni *in vitro*, en la expresión de LAP+ (TGF- $\beta$ ) en diferentes poblaciones de linfocitos Tregs (Th3). En cambio, sí observamos un incremento en la frecuencia de linfocitos CD8+LAP+ en respuesta al tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$  en EAE. Lo interesante es que esta población de células ha sido descrita como una nueva población de linfocitos reguladores con capacidad supresora importantes para proteger de la EAE [129]. Debido a la expresión de TGF- $\beta$ , éstas células son capaces de inducir o expandir linfocitos Tregs convencionales, mecanismo que podría estar actuando en nuestro modelo de estudio.

Ya que se ha observado que bajo condiciones tolerogénicas, las células presentadoras de antígeno (APC) son capaces de expresar TGF- $\beta$  e IL-10 e inducir linfocitos Tregs capaces de inhibir la EAE [43], [130], evaluamos la frecuencia de APC expresando LAP (TGF- $\beta$ ) en la periferia y en el SNC. Se observó un incremento en la expresión de LAP+ (TGF- $\beta$ ) en células CD11b+ y CD11b+CD11c+, y también en la microglía residente del

SNC. Hasta la fecha, en EAE, sólo se ha descrito que la presencia de IFN- $\gamma$  es necesaria para la inducción de TGF- $\beta$  en neuronas, las cuales son capaces de inducir linfocitos Tregs [43].

Incluimos en el análisis la molécula co-inhibitoria de linfocitos T efectores PD-L1. PD-L1 es altamente regulado por IFN- $\gamma$ , citoquina que es capaz de inducir su expresión en diversos tipos celulares [131]–[134], incluyendo APC [135]. La vía co-inhibitoria PD-1/PD-L1 es importante en la regulación y control de la EAE [136]. La importancia de PD-L1 en EAE, se demostró *in vivo* cuando animales con EAE tratados con anticuerpos anti-PD-1 exacerbaron sus síntomas [137]. Además, se ha descrito que esta vía, al igual que TGF- $\beta$ , es necesaria para la generación y mantención de linfocitos Tregs [138]–[140]. Más aún, este mecanismo es fundamental en la regulación de la EAE mediada por IL-12, el cual depende de la expresión de IFN- $\gamma$  [88]. En esta tesis, se demostró que el tratamiento con IFN- $\gamma$  induce la expresión de PD-L1 en diversos subgrupos de células CD11b<sup>+</sup>, tanto en el SNC como en la periferia, y que además IFN- $\gamma$  es capaz de inducir de manera significativa la frecuencia de células CD11b<sup>+</sup> expresando PD-L1. De manera interesante, también mostramos que el tratamiento *in vivo* con IFN- $\gamma$  también depende de la vía PD-1. También, se ha mostrado que la expresión de PD-L1 por células CD11b<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> inhibe la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> encefalitogénicos [135], lo que podría ser un mecanismo adicional por el cual IFN- $\gamma$  genera una alteración del balance entre linfocitos T efectores y linfocitos Tregs, a favor de éstos últimos en el SNC de la fase crónica de la EAE.

La inducción de LAP (TGF- $\beta$ ) y PD-L1 en APC, sin alterar la frecuencia de moléculas co-estimuladoras, nos indica que IFN- $\gamma$  es capaz de inducir un fenotipo regulador en células CD11b<sup>+</sup> provenientes de ratones con EAE. Ha sido demostrado que la estimulación *in vitro* de APC con IFN- $\gamma$  induce un fenotipo regulador capaz de reducir la proliferación de linfocitos T efectores y aumentar la frecuencia de linfocitos Tregs [141], [142] por lo que han sido propuestas como potencial terapia celular para la EAE [143]. De manera interesante, nuestros resultados están en concordancia con lo publicado recientemente por Lukas *et al* (PNAS, 2017), quienes demostraron que la inducción de linfocitos Tregs

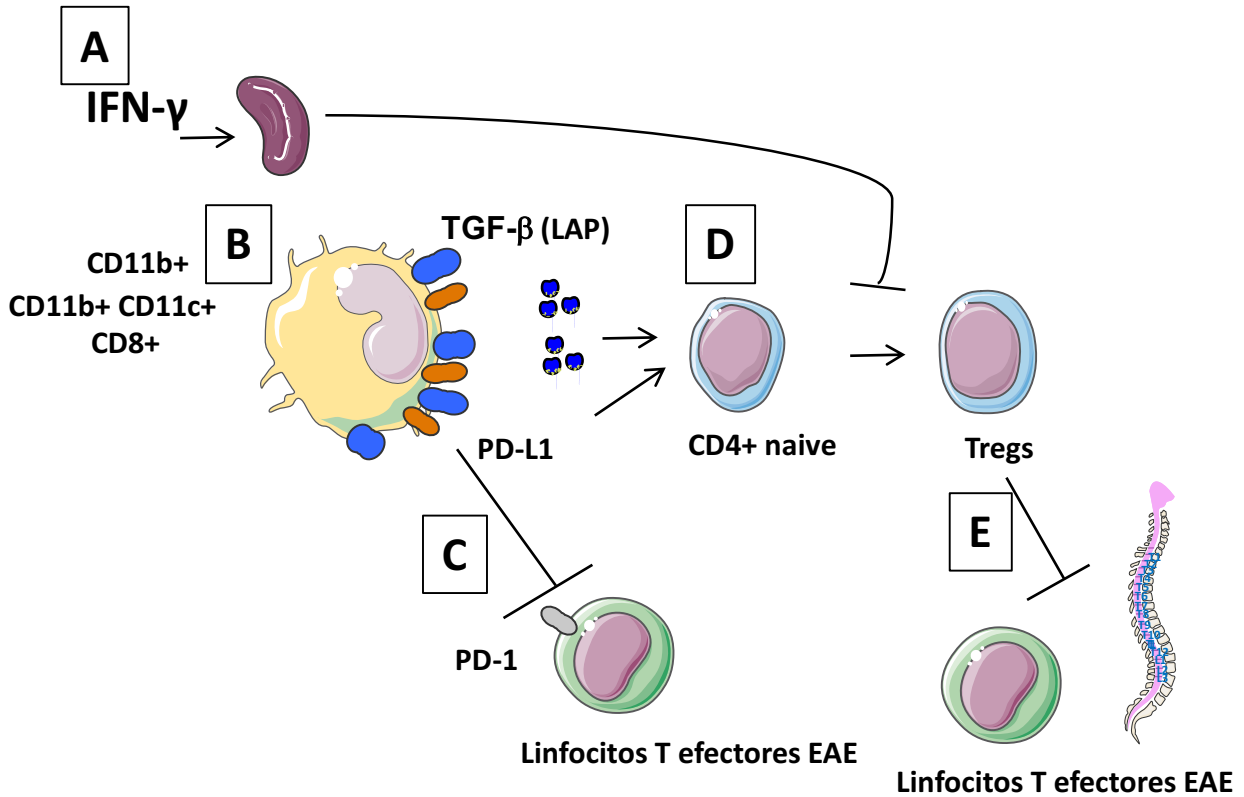


por células dendríticas CD11c+CD8+CD103+ es necesaria para reducir los síntomas de la EAE, en forma dependiente de la expresión de IDO y de la señalización de IFN- $\gamma$  [144].

Finalmente, nuestros resultados muestran que células CD11b+ pre-acondicionadas con IFN- $\gamma$  aumentan la inducción de linfocitos Tregs en respuesta a estimulación de linfocitos T antígeno específica (MOGp) o inespecífica (en presencia de anti-CD23); proceso que fue dependiente de TGF- $\beta$  y PD-L1.

## VII. CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados de esta tesis muestran que la mejoría de los síntomas de la EAE inducida por IFN- $\gamma$  depende de la expresión de FOXP3, los niveles de TGF- $\beta$  y de la interacción PD-1/PD-L1. IFN- $\gamma$  no induce en forma directa la conversión a linfocitos Tregs e inhibe la expresión de FOXP3 en condiciones de diferenciación de linfocitos iTregs. Sin embargo, IFN- $\gamma$  es capaz de condicionar principalmente diferentes subtipos de células CD11b+ (también linfocitos T CD8 [129]) en la EAE, las cuales son capaces a través de un incremento en la expresión de LAP (TGF- $\beta$ ) [43] y PD-L1 [135], de inducir un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs *in vivo* y *ex vivo*. Además, la expresión de PD-L1 podría ser un mecanismo sumatorio del potencial regulador de estas células, ejerciendo inhibición sobre la proliferación de linfocitos T efectores, desviando el balance en el SNC de animales con EAE, hacia un perfil regulador, lo cual se asocia con una menor infiltración de células mononucleares periféricas y un menor grado de desmielinización (**Figura 48**). Un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares por los cuales IFN- $\gamma$  ejerce sus efectos terapéuticos sobre la EAE, podría servir de base para desarrollar futuras terapias celulares enfocadas en subgrupos de pacientes con un estadio crónico de la EM.



**Figura 48: Mecanismo de inducción de linfocitos Tregs por un tratamiento con IFN- $\gamma$  en la fase crónica de la EAE. A)** IFN- $\gamma$  no induce linfocitos Tregs de manera directa, e inhibe la diferenciación de linfocitos Tregs (TGF- $\beta$  +IL-2). **B)** IFN- $\gamma$  actúa principalmente en células CD11b+, CD11b+CD11c+ y CD8 de la periferia, induciendo un incremento en la expresión de LAP (TGF- $\beta$ ), y en CD11b+, CD11b+CD11c+, también un incremento en la expresión de PD-L1. **C)** PD-L1 estaría inhibiendo la proliferación de linfocitos T efectoros. **D)** TGF- $\beta$  y PD-L1 en conjunto están induciendo un incremento en la frecuencia de linfocitos Tregs en la EAE. **E)** Linfocitos Tregs inducidos por células CD11b+ son capaces de suprimir linfocitos T efectoros encefalitogénicos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Goverman, "Autoimmune T cell responses in the central nervous system.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 6, pp. 393–407, 2009.
- [2] A. Compston and A. Coles, "Multiple sclerosis," *Lancet*, vol. 372, no. 9648, pp. 1502–1517, 2008.
- [3] P. Browne, D. Chandraratna, C. Angood, H. Tremlett, C. Baker, B. V. Taylor, and A. J. Thompson, "Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity," *Neurology*, vol. 83, no. 11, pp. 1022–1024, Sep. 2014.
- [4] T. Corona and G. C. Román, "Multiple sclerosis in Latin America.," *Neuroepidemiology*, vol. 26, no. 1, pp. 1–3, 2006.
- [5] E. Ojeda, D. Díaz-Cortes, D. Rosales, C. Duarte-Rey, J.-M. Anaya, and A. Rojas-Villarraga, "Prevalence and clinical features of multiple sclerosis in Latin America," *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 115, no. 4, pp. 381–387, Apr. 2013.
- [6] V. Díaz, J. Barahona, J. Antinao, R. Quezada, I. Delgado, C. Silva, and R. J. Guilloff, "Incidence of multiple sclerosis in Chile. A hospital registry study," *Acta Neurol. Scand.*, vol. 125, no. 1, pp. 71–75, 2012.
- [7] G. D. C. M. De Salud., "Guía Clínica 2010. Esclerosis Múltiple," *Vasa*, p. 60, 2008.
- [8] J. Nogales-gaete, R. Aracena, S. Cepeda-zumaeta, C. Eloiza, P. Agurto, V. Díaz, and S. Labbé, "Esclerosis múltiple recurrente remitente en el sector público de salud de Chile. Descripción clínica de 314 pacientes," pp. 559–566, 2014.
- [9] H. L. Weiner, "The challenge of multiple sclerosis: How do we cure a chronic heterogeneous disease?," *Ann. Neurol.*, vol. 65, no. 3, pp. 239–248, 2009.
- [10] B. Hemmer, S. Nessler, D. Zhou, B. Kieseier, and H.-P. Hartung, "Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis.," *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, vol. 2, no. 4, pp. 201–211, 2006.
- [11] C. Confavreux and S. Vukusic, "The clinical course of multiple sclerosis," in *Handbook of clinical neurology*, vol. 122, 2014, pp. 343–369.
- [12] A. Minagar, *Multiple sclerosis : a mechanistic view.* .
- [13] B. a. &apos;t Hart, B. Gran, and R. Weissert, "EAE: Imperfect but useful models of multiple sclerosis," *Trends Mol. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 119–125, 2011.
- [14] R. Gold, C. Linington, and H. Lassmann, "Understanding pathogenesis and therapy

- of multiple sclerosis via animal models: 70 Years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research," *Brain*, vol. 129, no. 8, pp. 1953–1971, 2006.
- [15] A. G. Baxter, "The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 11, pp. 904–912, 2007.
- [16] G. Krishnamoorthy and H. Wekerle, "EAE: An immunologist's magic eye," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 8, pp. 2031–2035, 2009.
- [17] H. Batoulis, K. Addicks, and S. Kuerten, "Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/TH1 paradigm," *Ann. Anat.*, vol. 192, no. 4, pp. 179–193, 2010.
- [18] R. E. Gonsette, "Self-tolerance in multiple sclerosis," *Acta Neurol. Belg.*, vol. 112, no. 2, pp. 133–140, 2012.
- [19] J. Zhu, H. Yamane, and W. E. Paul, "Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*).," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 28, pp. 445–489, 2010.
- [20] D. Luger, P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E. P. Bowman, N. M. Sgambellone, C.-C. Chan, and R. R. Caspi, "Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 4, pp. 799–810, 2008.
- [21] E. M. L. Chastain, D. S. Duncan, J. M. Rodgers, and S. D. Miller, "The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1812, no. 2, pp. 265–274, Feb. 2011.
- [22] M. Mohammad, M. Hassanpour, V. Tsai, H. Li, M. Ruitenber, D. Booth, J. Serrats, P. Hart, G. Symonds, P. Sawchenko, S. Breit, and D. Brown, "Dendritic Cells and Multiple Sclerosis: Disease, Tolerance and Therapy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 547–562, Dec. 2012.
- [23] K. S. Rawji and V. W. Yong, "The Benefits and Detriments of Macrophages/Microglia in Models of Multiple Sclerosis," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2013, pp. 1–13, 2013.
- [24] M. S. Weber, T. Prod'homme, J. C. Patarroyo, N. Molnarfi, T. Karnezis, K. Lehmann-Horn, D. M. Danilenko, J. Eastham-Anderson, A. J. Slavin, C. Linington, C. C. A. Bernard, F. Martin, and S. S. Zamvil, "B-cell activation influences T-cell

- polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity,” *Ann. Neurol.*, vol. 68, no. 3, pp. 369–383, Sep. 2010.
- [25] B. Ajami, J. L. Bennett, C. Krieger, K. M. McNagny, and F. M. V Rossi, “Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 9, pp. 1142–1149, 2011.
- [26] C. Lucchinetti, W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, and H. Lassmann, “Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.,” *Ann. Neurol.*, vol. 47, no. 6, pp. 707–17, Jun. 2000.
- [27] Z. Jiang, J. X. Jiang, and G.-X. Zhang, “Macrophages: A double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis,” *Immunol. Lett.*, vol. 160, no. 1, pp. 17–22, Jul. 2014.
- [28] M. B. Lutz, “Induction of CD4(+) Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells.,” *Immune Netw.*, vol. 16, no. 1, pp. 13–25, Feb. 2016.
- [29] S. D. MILLER, E. J. MCMAHON, B. SCHREINER, and S. L. BAILEY, “Antigen Presentation in the CNS by Myeloid Dendritic Cells Drives Progression of Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1103, no. 1, pp. 179–191, Mar. 2007.
- [30] H. Li, G.-X. Zhang, Y. Chen, H. Xu, D. C. Fitzgerald, Z. Zhao, and A. Rostami, “CD11c+CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis.,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 4, pp. 2483–93, Aug. 2008.
- [31] F. O. Martinez and S. Gordon, “The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.,” *F1000Prime Rep.*, vol. 6, p. 13, 2014.
- [32] F. Jadidi-Niaragh and A. Mirshafiey, “Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis.,” *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 33, no. 3, pp. 545–567, 2011.
- [33] E. M. Shevach, “Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression,” *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 636–645, 2009.
- [34] M. a. Curotto de Lafaille and J. J. Lafaille, “Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?,” *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 626–635, 2009.

- [35] A. Schmidt, N. Oberle, and P. H. Krammer, "Molecular mechanisms of Treg-mediated cell suppression," *Front. Immunol.*, vol. 3, no. MAR, pp. 1–20, 2012.
- [36] M. Da Silva Martins and C. a. Piccirillo, "Functional stability of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells," *Trends Mol. Med.*, vol. 18, no. 8, pp. 454–462, 2012.
- [37] T. Korn, J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T. R. Petersen, B. T. Bäckström, R. a Sobel, K. W. Wucherpfennig, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, "Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation.," *Nat. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 423–431, 2007.
- [38] A. Ma, Z. Xiong, Y. Hu, S. Qi, L. Song, H. Dun, L. Zhang, D. Lou, P. Yang, Z. Zhao, X. Wang, D. Zhang, P. Daloz, and H. Chen, "Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in Cynomolgus monkeys," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 9, no. 5, pp. 599–608, 2009.
- [39] U. Oh, G. Blevins, C. Griffith, N. Richert, D. Maric, C. R. Lee, H. McFarland, and S. Jacobson, "Regulatory T Cells Are Reduced During Anti-CD25 Antibody Treatment of Multiple Sclerosis," *Arch. Neurol.*, vol. 66, no. 4, pp. 471–9, Apr. 2009.
- [40] a. P. Kohm, P. a. Carpentier, H. a. Anger, and S. D. Miller, "Cutting Edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 9, pp. 4712–4716, 2002.
- [41] E. Montero, G. Nussbaum, J. F. Kaye, R. Perez, A. Lage, A. Ben-Nun, and I. R. Cohen, "Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells: Analysis using depleting antibodies," *J. Autoimmun.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2004.
- [42] M. Koutouros, K. Berer, N. Kawakami, H. Wekerle, and G. Krishnamoorthy, "Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS.," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 2, p. 163, Dec. 2014.
- [43] Y. Liu, I. Teige, B. Birnir, and S. Issazadeh-Navikas, "Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE," *Nat. Med.*, vol. 12, no. 5, pp. 518–525, May 2006.

- [44] M. J. McGeachy, L. a Stephens, and S. M. Anderton, "Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system.," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 5, pp. 3025–3032, 2005.
- [45] K. Venken, N. Hellings, T. Broekmans, K. Hensen, J.-L. Rummens, and P. Stinissen, "Natural naive CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression.," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 9, pp. 6411–6420, 2008.
- [46] V. Viglietta, C. Baecher-Allan, H. L. Weiner, and D. a Hafler, "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.," *J. Exp. Med.*, vol. 199, no. 7, pp. 971–979, 2004.
- [47] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard, "Cellular responses to interferon-gamma.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 749–795, 1997.
- [48] M. Fountoulakis, M. Zulauf, A. Lustig, and G. Garotta, "Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 208, no. 3, pp. 781–7, Sep. 1992.
- [49] G. Valente, L. Ozmen, F. Novelli, M. Geuna, G. Palestro, G. Forni, and G. Garotta, "Distribution of interferon- $\gamma$  receptor in human tissues," *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, no. 9, pp. 2403–2412, Sep. 1992.
- [50] P. Bernabei, E. M. E. Coccia, L. Rigamonti, M. Bosticardo, G. Forni, S. Pestka, C. D. Krause, A. Battistini, and F. Novelli, "Interferon- $\gamma$  receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 70, pp. 950–960, 2001.
- [51] J. M. Reed, P. J. Branigan, and A. Bamezai, "Interferon gamma enhances clonal expansion and survival of CD4+ T cells.," *J. Interferon Cytokine Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 611–622, 2008.
- [52] G. Regis, L. Conti, D. Boselli, and F. Novelli, "IFN $\gamma$ R2 trafficking tunes IFN $\gamma$ -STAT1 signaling in T lymphocytes," *Trends Immunol.*, vol. 27, no. 2, pp. 96–101, 2006.
- [53] G. R. Stark and J. E. Darnell, "The JAK-STAT Pathway at Twenty," *Immunity*, vol.

- 36, no. 4, pp. 503–514, 2012.
- [54] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, “Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 75, no. 2, pp. 163–189, Dec. 2003.
- [55] L. Sanvito, “The Multifaceted Role of Interferon- $\gamma$  in Central Nervous System Autoimmune Demyelination~!2009-09-01~!2009-11-02~!2010-07-14~!,” *Open Autoimmun. J.*, vol. 2, no. 4, pp. 151–159, 2010.
- [56] G. Arellano, P. A. Ottum, L. I. Reyes, P. I. Burgos, and R. Naves, “Stage-Specific Role of Interferon-Gamma in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis.,” *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 492, 2015.
- [57] P. A. Ottum, G. Arellano, L. I. Reyes, M. Iruretagoyena, and R. Naves, “Opposing Roles of Interferon-Gamma on Cells of the Central Nervous System in Autoimmune Neuroinflammation.,” *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 539, 2015.
- [58] J. M. Fletcher, S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tubridy, and K. H. G. Mills, “T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 162, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [59] G. Arellano, E. Acuña, L. I. Reyes, P. A. Ottum, P. De Sarno, L. Villarroel, E. Ciampi, R. Uribe-San Martín, C. Cárcamo, and R. Naves, “Th1 and Th17 Cells and Associated Cytokines Discriminate among Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis Phenotypes,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 753, Jun. 2017.
- [60] H. S. Panitch, R. L. Hirsch, A. S. Haley, and K. P. Johnson, “Exacerbations of Multiple Sclerosis in Patients Treated With Gamma Interferon,” *Lancet*, no. April 1, pp. 893–894, 1987.
- [61] S. Skurkovich, a Boiko, I. Beliaeva, a Buglak, T. Alekseeva, N. Smirnova, O. Kulakova, V. Tchechonin, O. Gurova, T. Deomina, O. O. Favorova, B. Skurkovic, and E. Gusev, “Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis.,” *Mult. Scler.*, vol. 7, no. 5, pp. 277–284, 2001.
- [62] a Billiau, H. Heremans, F. Vandekerckhove, R. Dijkmans, H. Sobis, E. Meulepas, and H. Carton, “Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma.,” *J. Immunol.*, vol. 140, no. 5, pp. 1506–1510,



1988.

- [63] H. Kelchtermans, A. Billiau, and P. Matthys, “How interferon- $\gamma$  keeps autoimmune diseases in check,” *Trends Immunol.*, vol. 29, no. 10, pp. 479–486, 2008.
- [64] R. Furlan, E. Brambilla, F. Ruffini, P. L. Poliani, a Bergami, P. C. Marconi, D. M. Franciotta, G. Penna, G. Comi, L. Adorini, and G. Martino, “Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 3, pp. 1821–1829, 2001.
- [65] J. J. Sabatino, J. Shires, J. D. Altman, M. L. Ford, and B. D. Evavold, “Loss of IFN-gamma enables the expansion of autoreactive CD4+ T cells to induce experimental autoimmune encephalomyelitis by a nonencephalitogenic myelin variant antigen,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 7, pp. 4451–4457, 2008.
- [66] R. C. Axtell, B. a De Jong, K. Boniface, L. F. Van Der Voort, P. De Sarno, R. Naves, M. Han, F. Zhong, J. G, R. Mair, A. Christakos, I. Kolkowitz, L. Katz, C. H. Polman, R. D. W. Malefyt, L. Steinman, B. a de Jong, K. Boniface, L. F. van der Voort, R. Bhat, P. De Sarno, R. Naves, M. Han, F. Zhong, J. G. Castellanos, R. Mair, A. Christakos, I. Kolkowitz, L. Katz, J. Killestein, C. H. Polman, R. de Waal Malefyt, L. Steinman, and C. Raman, “T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis,” *Nat. Med.*, vol. 16, no. 4, pp. 406–412, 2010.
- [67] R. Naves, S. P. Singh, K. S. Cashman, A. L. Rowse, R. C. Axtell, L. Steinman, J. D. Mountz, C. Steele, P. De Sarno, and C. Raman, “The interdependent, overlapping, and differential roles of type I and II IFNs in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis,” *J. Immunol.*, vol. 191, no. 6, pp. 2967–77, 2013.
- [68] Z. Wang, J. Hong, W. Sun, G. Xu, N. Li, X. Chen, A. Liu, L. Xu, B. Sun, and J. Z. Zhang, “Role of IFN-g in induction of Foxp3 and conversion of CD4+CD25- T cells to CD4+ Tregs,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 9, pp. 2434–2441, 2006.
- [69] V. Daniel, M. Sadeghi, H. Wang, and G. Opelz, “CD4+CD25+Foxp3+IFN- $\gamma$ + human induced T regulatory cells are induced by interferon- $\gamma$  and suppress alloresponses nonspecifically,” *Hum. Immunol.*, vol. 72, no. 9, pp. 699–707, Sep. 2011.

- [70] G. Warnecke, G. Feng, R. Goto, S. N. Nadig, R. Francis, K. J. Wood, and A. Bushell, "CD4+ regulatory T cells generated in vitro with IFN- $\gamma$  and allogeneic APC inhibit transplant arteriosclerosis.," *Am. J. Pathol.*, vol. 177, no. 1, pp. 464–472, 2010.
- [71] N. Ouaked, P.-Y. Mantel, C. Bassin, S. Burgler, K. Siegmund, C. a Akdis, and C. B. Schmidt-Weber, "Regulation of the foxp3 gene by the Th1 cytokines: the role of IL-27-induced STAT1.," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 2, pp. 1041–1049, 2009.
- [72] "Conversion of peripheral CD4+CD25<sup>-</sup> T cells to CD4+CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by IFN- $\gamma$  in patients with Guillain-Barré syndrome," *J. Neuroimmunol.*, vol. 217, no. 1–2, pp. 80–84, Dec. 2009.
- [73] S. Huang, W. Wang, and L. Chi, "Feasibility of up-regulating CD4+CD25<sup>+</sup> Tregs by IFN- $\gamma$  in myasthenia gravis patients," *BMC Neurol.*, vol. 15, no. 1, p. 163, Dec. 2015.
- [74] H. Kelchtermans, B. De Klerck, T. Mitera, M. Van Balen, D. Bullens, A. Billiau, G. Leclercq, and P. Matthys, "Defective CD4+CD25<sup>+</sup> regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN- $\gamma$ ," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 7, no. 2, pp. R402-15, 2005.
- [75] H. Kelchtermans, E. Schurgers, L. Geboes, T. Mitera, J. Van Damme, J. Van Snick, C. Uyttenhove, and P. Matthys, "Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon- $\gamma$  and counteraction by interferon- $\gamma$ ," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, no. 4, p. R122, 2009.
- [76] C. Koenecke, C.-W. Lee, K. Thamm, L. Fohse, M. Schafferus, H.-W. Mittrucker, S. Floess, J. Huehn, A. Ganser, R. Forster, and I. Prinz, "IFN- $\gamma$  Production by Allogeneic Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Is Essential for Preventing Experimental Graft-versus-Host Disease," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 6, pp. 2890–2896, Sep. 2012.
- [77] K. Sun, H.-H. Hsiao, M. Li, E. Ames, M. Bouchlaka, L. a. Welniak, T. Hagino, J. Jagdeo, C.-C. Pai, M. Chen, B. R. Blazar, M. Abedi, and W. J. Murphy, "IFN- $\gamma$  Receptor-Deficient Donor T Cells Mediate Protection from Graft-versus-Host Disease and Preserve Graft-versus-Tumor Responses after Allogeneic Bone Marrow Transplantation," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 4, pp. 2033–2042, 2012.
- [78] R. K. Chowdary Venigalla, P. J. Guttikonda, V. Eckstein, A. D. Ho, S. Sertel, H.-M.

- Lorenz, and T. Tretter, "Identification of a human Th1-like IFN $\gamma$ -secreting Treg subtype deriving from effector T cells," *J. Autoimmun.*, vol. 39, no. 4, pp. 377–387, Dec. 2012.
- [79] A. Kitz and M. Dominguez-Villar, "Molecular mechanisms underlying Th1-like Treg generation and function," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 22, pp. 4059–4075, Nov. 2017.
- [80] M. a Koch, G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell, "The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation.," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 6, pp. 595–602, 2009.
- [81] A. O. H. Hall, D. P. Beiting, C. M. Tato, B. John, C. G. Lombana, G. H. Pritchard, J. S. Silver, N. Bouladoux, J. S. Stumhofer, T. H. Harris, J. Grainger, E. D. Tait, S. Wagage, D. S. Roos, P. Scott, L. a Turka, S. Cherry, S. L. Reiner, D. Cua, Y. Belkaid, M. M. Elloso, a Christopher, G. Oldenhove, C. G. Lombana, G. H. Pritchard, J. S. Silver, N. Bouladoux, J. S. Stumhofer, T. H. Harris, J. Grainger, E. D. T. Wojno, S. Wagage, D. S. Roos, P. Scott, L. a Turka, S. Cherry, S. L. Reiner, D. Cua, Y. Belkaid, M. M. Elloso, and C. a Hunter, "The cytokines Interleukin 27 and Interferon- $\gamma$  promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology," *Immunity*, vol. 37, no. 3, pp. 511–23, 2012.
- [82] M. a. Koch, K. R. Thomas, N. R. Perdue, K. S. Smigiel, S. Srivastava, and D. J. Campbell, "T-bet<sup>+</sup> Treg Cells Undergo Abortive Th1 Cell Differentiation due to Impaired Expression of IL-12 Receptor  $\beta$ 2," *Immunity*, vol. 37, no. 3, pp. 501–510, 2012.
- [83] M. Dominguez-Villar, C. M. Baecher-Allan, and D. A. Hafler, "Identification of T helper type 1–like, Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in human autoimmune disease," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 6, pp. 673–675, Jun. 2011.
- [84] A. Kitz, M. de Marcken, A. Gautron, M. Mitrovic, D. A. Hafler, and M. Dominguez-Villar, "AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease," *EMBO Rep.*, vol. 17, no. 8, pp. 1169–1183, Aug. 2016.
- [85] S. A. McClymont, A. L. Putnam, M. R. Lee, J. H. Esensten, W. Liu, M. A. Hulme, U. Hoffmüller, U. Baron, S. Olek, J. A. Bluestone, and T. M. Brusko, "Plasticity of

- Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes,” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 3918–3926, Apr. 2011.
- [86] V. Daniel, C. Naujokat, M. Sadeghi, R. Weimer, F. Renner, S. Yildiz, and G. Opelz, “Observational support for an immunoregulatory role of CD3+CD4+CD25+IFN-gamma+ blood lymphocytes in kidney transplant recipients with good long-term graft outcome.,” *Transpl. Int.*, vol. 21, no. 7, pp. 646–60, Jul. 2008.
- [87] H. Li and B. Shi, “Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 12, no. 1, pp. 24–30, Jan. 2015.
- [88] X. CHENG, Z. ZHAO, E. VENTURA, B. GRAN, K. SHINDLER, and A. ROSTAMI, “The PD-1/PD-L pathway is up-regulated during IL-12-induced suppression of EAE mediated by IFN-gamma,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 185, no. 1–2, pp. 75–86, Apr. 2007.
- [89] C. N. Nagineni, K. S. Cherukuri, V. Kutty, B. Detrick, and J. J. Hooks, “Interferon- $\gamma$  differentially regulates TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 expression in human retinal pigment epithelial cells through JAK-STAT pathway,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 210, no. 1, pp. 192–200, Jan. 2007.
- [90] E. M. Akirav, C. M. Bergman, M. Hill, and N. H. Ruddle, “Depletion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by mouse, but not rat, antigens,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 87, no. 15, pp. 3511–3519, Nov. 2009.
- [91] L. A. Stephens and S. M. Anderton, “Comment on ‘Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells’,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 4, p. 2036; author reply 2037-8, Aug. 2006.
- [92] M. Dominguez-Villar, C. M. Baecher-Allan, and D. A. Hafler, “Identification of T helper type 1-like, Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in human autoimmune disease.,” *Nat. Med.*, vol. 17, no. 6, pp. 673–675, 2011.
- [93] M. Kleinewietfeld and D. A. Hafler, “The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity.,” *Semin. Immunol.*, vol. 25, no. 4, pp. 305–12, Nov. 2013.
- [94] P. Hsu, B. Santner-Nanan, M. Hu, K. Skarratt, C. H. Lee, M. Stormon, M. Wong, S.

- J. Fuller, and R. Nanan, "IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1," *J. Immunol.*, vol. 195, no. 8, pp. 3665–3674, Oct. 2015.
- [95] D. A. Horwitz, S. G. Zheng, J. Wang, and J. D. Gray, "Critical role of IL-2 and TGF- $\beta$  in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 4, pp. 912–5, Apr. 2008.
- [96] N. Gagliani, C. F. Magnani, S. Huber, M. E. Gianolini, M. Pala, P. Licona-Limon, B. Guo, D. R. Herbert, A. Bulfone, F. Trentini, C. Di Serio, R. Bacchetta, M. Andreani, L. Brockmann, S. Gregori, R. A. Flavell, and M.-G. Roncarolo, "Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 6, pp. 739–746, Apr. 2013.
- [97] N. Braun, J. Sévigny, S. C. Robson, K. Enjoji, O. Guckelberger, K. Hammer, F. Di Virgilio, and H. Zimmermann, "Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain.," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 12, no. 12, pp. 4357–66, Dec. 2000.
- [98] D. Caretto, S. D. Katzman, A. V Villarino, E. Gallo, and A. K. Abbas, "Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells.," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 1, pp. 30–34, 2010.
- [99] X. Tao, J. Ma, Y. Zhang, J. Yu, L. Cai, J. Wang, and S. G. Zheng, "Neutralization of IL-4 and IFN- $\gamma$  Facilitates inducing TGF- $\beta$ -induced CD4(+)Foxp3(+) Regulatory Cells.," *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 52–7, Mar. 2008.
- [100] K. J. Wood and B. Sawitzki, "Interferon  $\gamma$ : a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo," *Trends Immunol.*, vol. 27, no. 4, pp. 183–187, 2006.
- [101] N. Goebels, H. Hofstetter, S. Schmidt, C. Brunner, H. Wekerle, and R. Hohlfeld, "Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence.," *Brain*, vol. 123 Pt 3, pp. 508–518, 2000.
- [102] K. Venken, N. Hellings, M. Thewissen, V. Somers, K. Hensen, J. L. Rummens, R. Medaer, R. Hupperts, and P. Stinissen, "Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression

- at the single-cell level,” *Immunology*, vol. 123, no. 1, pp. 79–89, 2008.
- [103] J. Huan, N. Culbertson, L. Spencer, R. Bartholomew, G. G. Burrows, Y. K. Chou, D. Bourdette, S. F. Ziegler, H. Offner, and A. A. Vandenbark, “Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 81, no. 1, pp. 45–52, Jul. 2005.
- [104] G. Frisullo, V. Nociti, R. Iorio, A. K. Patanella, M. Caggiula, A. Marti, C. Sancricca, F. Angelucci, M. Mirabella, P. A. Tonali, and A. P. Batocchi, “Regulatory T cells fail to suppress CD4T<sup>+</sup>-bet<sup>+</sup> T cells in relapsing multiple sclerosis patients.” *Immunology*, vol. 127, no. 3, pp. 418–28, Jul. 2009.
- [105] M. Kumar, N. Putzki, V. Limmroth, R. Remus, M. Lindemann, D. Knop, N. Mueller, C. Hardt, E. Kreuzfelder, and H. Grosse-Wilde, “CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis.” *J. Neuroimmunol.*, vol. 180, no. 1–2, pp. 178–84, Nov. 2006.
- [106] R. Martin, “Anti-CD25 (daclizumab) monoclonal antibody therapy in relapsing–remitting multiple sclerosis,” *Clin. Immunol.*, vol. 142, no. 1, pp. 9–14, Jan. 2012.
- [107] A. Papadopoulou, T. Derfuss, and T. Sprenger, “Daclizumab for the treatment of multiple sclerosis,” *Neurodegener. Dis. Manag.*, p. nmt-2017-0023, Aug. 2017.
- [108] L. E. Baldassari and J. W. Rose, “Daclizumab: Development, Clinical Trials, and Practical Aspects of Use in Multiple Sclerosis,” *Neurotherapeutics*, Jul. 2017.
- [109] P. Lips, “Vitamin D physiology,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 92, no. 1, pp. 4–8, 2006.
- [110] U. Oh, G. Blevins, C. Griffith, N. Richert, D. Maric, C. R. Lee, H. McFarland, and S. Jacobson, “Regulatory T cells are reduced during anti-CD25 antibody treatment of multiple sclerosis.” *Arch. Neurol.*, vol. 66, no. 4, pp. 471–479, 2009.
- [111] L. A. Stephens, D. Gray, and S. M. Anderton, “CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 48, pp. 17418–17423, Nov. 2005.
- [112] J. R. Podojil, L. N. Liu, S. A. Marshall, M.-Y. Chiang, G. E. Goings, L. Chen, S. Langermann, and S. D. Miller, “B7-H4Ig inhibits mouse and human T-cell function and treats EAE via IL-10/Treg-dependent mechanisms,” *J. Autoimmun.*, vol. 44, pp.

- 71–81, Aug. 2013.
- [113] N. S. Hayash and R. H. Swanborg, “Autoimmune effector cells. IX. Inhibition of adoptive transfer of autoimmune encephalomyelitis with a monoclonal antibody specific for interleukin 2 receptors.,” *J. Immunol.*, vol. 138, no. 11, pp. 3771–5, Jun. 1987.
- [114] C. Q. Chu, S. Wittmer, and D. K. Dalton, “Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis.,” *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 1, pp. 123–128, 2000.
- [115] E. N. Hadaschik, X. Wei, H. Leiss, B. Heckmann, B. Niederreiter, G. Steiner, W. Ulrich, A. H. Enk, J. S. Smolen, and G. H. Stummvoll, “Regulatory T cell-deficient scurfy mice develop systemic autoimmune features resembling lupus-like disease.,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 17, no. 1, p. 35, Feb. 2015.
- [116] T. J. Suscovich, N. R. Perdue, and D. J. Campbell, “Type-1 immunity drives early lethality in scurfy mice,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, no. 9, pp. 2305–2310, Sep. 2012.
- [117] G. A. E. S. Abdulrasool and G. A. E. Salman, “In vitro generation of human FOXP3+ regulatory T cells,” Jan. 2014.
- [118] P. C. J. Janson, M. E. Winerdal, P. Marits, M. Thörn, R. Ohlsson, and O. Winqvist, “FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans,” *PLoS One*, vol. 3, no. 2, 2008.
- [119] J.-H. Chang, Y.-J. Kim, S.-H. Han, and C.-Y. Kang, “IFN- $\gamma$ -STAT1 signal regulates the differentiation of inducible Treg: Potential role for ROS-mediated apoptosis,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 5, pp. 1241–1251, May 2009.
- [120] A. Fragale, L. Gabriele, E. Stellacci, P. Borghi, E. Perrotti, R. Ilari, A. Lanciotti, A. L. Remoli, M. Venditti, F. Belardelli, and A. Battistini, “IFN regulatory factor-1 negatively regulates CD4+ CD25+ regulatory T cell differentiation by repressing Foxp3 expression.,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 3, pp. 1673–82, Aug. 2008.
- [121] T. Nishibori, Y. Tanabe, L. Su, and M. David, “Impaired development of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the absence of STAT1: increased susceptibility to autoimmune disease.,” *J. Exp. Med.*, vol. 199, no. 1, pp. 25–34, 2004.
- [122] H. Zhang, J. R. Podojil, J. Chang, X. Luo, and S. D. Miller, “TGF- $\beta$ -Induced Myelin

- Peptide-Specific Regulatory T Cells Mediate Antigen-Specific Suppression of Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 12, pp. 6629–6636, Jun. 2010.
- [123] X. Zhang, D. N. Koldzic, L. Izikson, J. Reddy, R. F. Nazareno, S. Sakaguchi, V. K. Kuchroo, and H. L. Weiner, "IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells," *Int. Immunol.*, vol. 16, no. 2, pp. 249–256, 2004.
- [124] L. D. Johns and S. Sriram, "Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing antibody to TGF beta 1 enhances the clinical severity of the disease.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–7, Aug. 1993.
- [125] D. J. Cua, H. Groux, D. R. Hinton, S. A. Stohlman, and R. L. Coffman, "Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis.," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 6, pp. 1005–10, Mar. 1999.
- [126] X. Zhang, J. Reddy, H. Ochi, D. Frenkel, V. K. Kuchroo, and H. L. Weiner, "Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF- $\beta$  dependent and associated with increases in CD4+LAP+ and CD4+CD25+ T cells," *Int. Immunol.*, vol. 18, no. 4, pp. 495–503, Apr. 2006.
- [127] B. Cannella, Y. L. Gao, C. Brosnan, and C. S. Raine, "IL-10 fails to abrogate experimental autoimmune encephalomyelitis," *J. Neurosci. Res.*, vol. 45, no. 6, pp. 735–746, Sep. 1996.
- [128] C. Herrero, X. Hu, W. P. Li, S. Samuels, M. N. Sharif, S. Kotenko, and L. B. Ivashkiv, "Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma.," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 10, pp. 5034–5041, 2003.
- [129] M. L. Chen, B. S. Yan, D. Kozoriz, and H. L. Weiner, "Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF- $\beta$ - and IFN- $\gamma$ -dependent mechanisms," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 12, pp. 3423–3435, 2009.
- [130] A. Nazmi, I. Mohamed Arif, K. Dutta, K. Kundu, and A. Basu, "Neural Stem/Progenitor Cells Induce Conversion of Encephalitogenic T Cells into CD4 + - CD25 + - FOXP3 + Regulatory T cells," *Viral Immunol.*, vol. 27, no. 2, pp. 48–59, Mar. 2014.
- [131] J. Kim, A. C. Myers, L. Chen, D. M. Pardoll, Q.-A. Truong-Tran, A. P. Lane, J. F.



- McDyer, L. Fortunato, and R. P. Schleimer, "Constitutive and Inducible Expression of B7 Family of Ligands by Human Airway Epithelial Cells," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 33, no. 3, pp. 280–289, Sep. 2005.
- [132] A. Garcia-Diaz, D. S. Shin, B. Homet, R. Damoiseaux, R. S. Lo, and A. Ribas, "Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression," *CellReports*, vol. 19, pp. 1189–1201, 2017.
- [133] M. Mandai, J. Hamanishi, K. Abiko, N. Matsumura, T. Baba, and I. Konishi, "Dual Faces of IFN $\gamma$  in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 10, pp. 2329–34, May 2016.
- [134] K. Abiko, N. Matsumura, J. Hamanishi, N. Horikawa, R. Murakami, K. Yamaguchi, Y. Yoshioka, T. Baba, I. Konishi, and M. Mandai, "IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 9, pp. 1501–1509, Apr. 2015.
- [135] B. Schreiner, S. L. Bailey, T. Shin, L. Chen, and S. D. Miller, "PD-1 ligands expressed on myeloid-derived APC in the CNS regulate T-cell responses in EAE.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 10, pp. 2706–17, Oct. 2008.
- [136] B. Zhu, I. Guleria, A. Khosroshahi, T. Chitnis, J. Imitola, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury, "Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis.," *J. Immunol.*, vol. 176, no. 6, pp. 3480–9, Mar. 2006.
- [137] A. D. Salama, T. Chitnis, J. Imitola, M. J. I. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury, "Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis.," *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 1, pp. 71–8, Jul. 2003.
- [138] L. M. Francisco, V. H. Salinas, K. E. Brown, V. K. Vanguri, G. J. Freeman, V. K. Kuchroo, and A. H. Sharpe, "PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 13, pp. 3015–3029, Dec. 2009.
- [139] L. Wang, K. Pino-Lagos, V. C. de Vries, I. Guleria, M. H. Sayegh, and R. J. Noelle,

- “Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 27, pp. 9331–9336, Jul. 2008.
- [140] C. European Respiratory Society., G. Zhang, J. Huang, and B. Qi, *European respiratory journal.*, vol. 44, no. Suppl 58. ERS Journals, 2014.
- [141] D. Rojas-Canales, R. Krishnan, C. F. Jessup, and P. T. Coates, “Early exposure of interferon- $\gamma$  inhibits signal transducer and activator of transcription-6 signalling and nuclear factor  $\kappa$ B activation in a short-term monocyte-derived dendritic cell culture promoting ‘FAST’ regulatory dendritic cells,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 167, no. 3, pp. 447–458, Mar. 2012.
- [142] D. Rojas and R. Krishnan, “IFN- $\gamma$  generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3+ T-regulatory cell generation,” *Immunol. Lett.*, vol. 132, no. 1–2, pp. 31–37, Aug. 2010.
- [143] B.-G. Xiao, X.-C. Wu, J.-S. Yang, L.-Y. Xu, X. Liu, Y.-M. Huang, B. Bjelke, and H. Link, “Therapeutic potential of IFN-gamma-modified dendritic cells in acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis,” *Int. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 13–22, 2004.
- [144] D. Lukas, N. Yogev, J. M. Kel, T. Regen, I. A. Mufazalov, Y. Tang, F. Wanke, B. Reizis, W. Müller, F. C. Kurschus, M. Prinz, I. Kleiter, B. E. Clausen, and A. Waisman, “TGF- $\beta$  inhibitor Smad7 regulates dendritic cell-induced autoimmunity,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 8, pp. E1480–E1489, Feb. 2017.

## IX. ANEXO



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

### CERTIFICACIÓN

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en la tesis de Investigación titulada **“Regulación de la respuesta de Linfocitos T reguladores por Interferón-gamma en encefalomiелitis autoinmune experimental”**, del Sr. Gabriel Arellano Lorca, Tesista y su Patrocinante-Responsable es el **Dr. Rodrigo Naves Pichuante, PhD** del Laboratorio de Neuroinmunología, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (CBA 0815 FMUCH).

Ambos investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por **36** meses, tiempo estimado de ejecución correspondiente al Proyecto de Tesis del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Escuela de Postgrado.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*

**Dr. Emilio Herrera Videla**  
Presidente

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 29 de octubre de 2015.

---

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales  
Facultad de Medicina - Universidad de Chile  
Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile  
Fono: 2 978 6923, Email: [cba@med.uchile.cl](mailto:cba@med.uchile.cl)