

214-Fc
Biotecnología
1837

.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias



ROL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS EN LA GENERACIÓN EX VIVO DE LINFOCITOS T REGULADORES

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

FABIOLA BEATRIZ OSORIO OLIVARES

Agosto, 2006
Santiago - Chile

Directores de Memoria de Título: Dr. Mario Rosemblatt Silver.
Dra. María Rosa Bono Merino.



**“ROL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS EN LA GENERACIÓN
EX VIVO DE LINFOCITOS T REGULADORES ”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

FABIOLA BEATRIZ OSORIO OLIVARES

Dr. Mario Roseblatt Silber
Director Seminario de Título

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora

Dr. Miguel Allende Connelly
Presidente

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.



Dr. Arturo Ferreira Vigoroux
Corrector

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dra. María Rosa Bono
Patrocinante

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Santiago, _____ de 2006

*Nací en el equinoccio, bajo las hortensias y los aeroplanos del calor.
Una tarde, cogí mi paracaídas y dije: " Entre una estrella y dos golondrinas".
Y ahora mi paracaídas cae de sueño en sueño por los espacios de la muerte.
El primer día encontré un pájaro desconocido que me dijo:
"Si yo fuese dromedario no tendría sed ¿ Qué hora es?"
Me lanzó tres miradas y media y se alejó diciendo "adios" con su pañuelo soberbio.
Mi paracaídas se enredó en una estrella apagada que seguía su órbita
concienzudamente como si ignorara la inutilidad de sus esfuerzos.
Y aprovechando este reposo bien ganado, comencé a llenar con profundos
pensamientos las casillas de mi tablero:
"Se debe escribir en una lengua que no sea la materna"
"Los cuatro puntos cardinales son tres: el Sur y el Norte"
"Un poema es una cosa que será"
"Un poema es una cosa que nunca es pero que debiera ser"
"Si yo no hiciera al menos una locura al año, me volvería loco"
Tomo mi paracaídas, y del borde de mi estrella en marcha, me lanzo a la atmósfera
del último suspiro.
Ah, ah, soy altazor, el gran poeta, sin caballo que coma alpiste, ni caliente su
garganta con claro de luna sino con mi pequeño paracaídas como un quitasol sobre
los planetas.
Hombre, he ahí tu paracaídas maravilloso como el vertigo.
Poeta, he ahí tu paracaídas, maravilloso como el imán del abismo.
Mago, he ahí tu paracaídas que una palabra tuya puede convertir en un parasubidas
maravilloso como el relámpago que quisiera cegar al creador.
¿Qué esperas?
La vida es un viaje en paracaídas y no lo que tú quieres creer.*

Vicente Huidobro.

Agradecimientos

Después de bastante tiempo y sacrificio ha terminado una hermosa etapa de mi vida. Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, los cuales han sido mis mas fieles compañeros, apoyándome en todos los momentos, y siempre luchando por mi felicidad. Los quiero mucho, mucho.

También agradezco a mi hermano, Consuelo y a mi linda sobrinita javierita, la cual se ha convertido en mis ojos y me ha enseñado a percibir la vida de una mejor manera. A mi tia Toya, quien ha sido para mí un pilar fundamental y me ha orientado y aconsejado siempre. Gracias a mis abuelitos, que están en el cielo cuidándome, por darme todo su amor durante mi infancia. Gracias a Rossana por quererme y cuidame tanto y a toda mi familia, a todos, gracias.

Gracias a María Rosa y a Mario por darme la libertad de pensar, por siempre escuchar mis ideas y por no imponerme las suyas. Gracias por el inmenso universo que me han enseñado y por darme la oportunidad de dejarme trabajar en un laboratorio tan maravilloso. Por supuesto quiero agradecer a toda mi familia inmunológica, partiendo por el Leíto, gracias por ser un excelente amigo y por ser un guía no sólo en lo laboral sino también en lo humano. Gracias a todos mis compañeros, Jenny, Ale, Raúl, Gonzalo, Paulita, Saumín, Jocelyn, Jaime, Pablo, Felipe, Pablo V, Paz y a la Karina con Fernandito. Gracias a todos por su buena onda siempre y porque tienen la capacidad de convertir el trabajo en algo mucho mas entretenido. Gracias también por las enriquecedoras conversaciones que hemos tenido y que me han ayudado a generar nuevas ideas. También a Eva y a Pamela por ser tan buenas personas y sobre todo por ser tan chistosas.

A mis amigos de la U, Pilar, Nacho, Tuti, Jose, Negro a planteam y a todos los lolos con los cuales he pasado muy buenos momentos piantes. Gracias por todo, todo, todo.

A mis amigas del colegio, Pancha, Loreto, Sol e Irene. Ustedes saben que no son necesarias las palabras a veces. Besos.

Finalmente quiero agradecer al soporte de todo esto. Al Pepe, mil gracias por darme las fuerzas para seguir adelante, por no dejarme nunca sola, y por enfrentar conmigo todos mis problemas. Gracias por hacerme feliz, te amo.

ÍNDICE GENERAL:

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1.INTRODUCCIÓN	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Animales	15
2.2 Anticuerpos y reactivos	15
2.3 Preparación de LT vírgenes	17
2.4 Generación de células dendríticas de médula ósea:	17
2.5 Co-cultivo de células dendríticas inmaduras y linfocitos T vírgenes para la obtención de linfocitos T reguladores:	19

2.6 Ensayo de supresión in vitro:	19
2.7 Determinación del porcentaje de división celular mediante tinción con CFSE.	21
2.8 Preparación del ARN total y RT-PCR para la detección del factor de transcripción Foxp3.	22
2.9 ELISA para la detección de citoquinas inmunosupresoras (IL-10).	23
2.10 Análisis estadístico	24
3.RESULTADOS	25
3.1 En el co-cultivo de linfocitos T vírgenes con células dendríticas inmaduras se genera una población de linfocitos T reguladores (LTregs):	25
3.2 Los LTregs inducidos con iDCs poseen actividad supresora:	31
3.3 La supresión de los LTregs dependería del contacto celular y no de factores solubles:	34
3.4 Los LTregs generados ex vivo de ratones F1 requieren activación antígeno-específica para suprimir pero una vez activados, pueden suprimir de modo antígeno no-específico.	36
4. DISCUSIÓN	39
5. CONCLUSIONES	44
6. REFERENCIAS	45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Modelo de mecanismos de supresión de Linfocitos T reguladores.	12
FIGURA 2	Modelo de inducción de Inmunidad y Tolerancia dependiendo del estado de maduración de la célula dendrítica.	13
FIGURA 3	Las células dendríticas generadas presentan un fenotipo inmaduro.	28
FIGURA 4	Linfocitos T cocultivados con células dendríticas inmaduras adquieren los marcadores de linfocitos T reguladores CD25 y CD62L y permanecen en un estado de activación intermedio.	29
FIGURA 5	El cocultivo de linfocitos T vírgenes con células dendríticas inmaduras genera una población de linfocitos T reguladores Foxp3 ⁺ .	30
FIGURA 6	Los linfocitos T reguladores generados con células dendríticas inmaduras poseen actividad supresora.	32
FIGURA 7	La supresión de la proliferación de linfocitos T efectores dependería de la presencia de LT reguladores y no de factores solubles producidos por estas células.	35

FIGURA 8 La activación del linfocito T regulador es un proceso dependiente de antígeno, sin embargo su actividad supresora no lo es. 37

FIGURA 9 Producción de IL-10 durante el ensayo de supresión con linfocitos T OT-II. 38

ABREVIATURAS

2-ME:	2-mercaptoetanol..
APC:	célula presentadora de antígeno.
CFSE:	<u>C</u> arboxi- <u>F</u> luoresceína diacetato <u>S</u> uccinimidil <u>E</u> ster.
CTLA-4:	antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico.
DC-Bazo:	células dendríticas de bazo.
DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMPC:	dimetilpirocarbonato.
DNA:	ácido desoxirribonucleico.
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario.
EDTA:	ácido etilen diamino tetra acético.
ELISA:	<i>enzyme linked immuno sorbent assay.</i>
FCS:	suero fetal bovino.
FITC:	isotiocianato de fluoresceína.
GITR:	receptor relacionado con la familia de los receptores de factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides.
GM-CSF:	factor estimulador de colonia granulocito-macrófago.
HEPES:	ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N´-[2-etanosulfónico]).
IBD:	enfermedad inflamatoria del intestino.
iDC:	células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea.
IgG:	inmunoglobulina G.
IgM:	inmunoglobulina M.
IL-2:	interleuquina 2.
IL-10:	interleuquina 10.
IMDM:	Medio Dulbecco modificado por Iscove.

LT:	linfocito T.
LTef:	linfocito T efector.
LTreg:	linfocito T regulador.
LTv:	linfocito T vírgen.
LT/DC-Bazo:	linfocito T cocultivado con células dendríticas de bazo.
LT/iDC	linfocito T cocultivado con células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea.
MHC-I/II:	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II.
OVA:	ovalbúmina.
PBS:	tampón fosfato salino.
PCC:	citocromo c de paloma.
PE:	ficoeritrina.
PerCP:	proteína peridina clorofila-a.
RNA:	ácido ribonucleico.
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero.
Rpm:	revoluciones por minuto.
RPML:	instituto memorial roswell park.
TCR:	receptor de la célula T.
TGF- β :	factor de crecimiento transformante beta .
Th1:	Linfocito T helper 1.
Th2:	Linfocito T helper 2.
Tr1:	Linfocito T regulador del tipo Tr1.
Th3:	Linfocito T regulador del tipo Th3.

RESUMEN

Los linfocitos T reguladores son importantes mediadores de la respuesta inmune debido a que mantienen la tolerancia a antígenos (propios y externos) y evitan el desarrollo de autoinmunidad al suprimir a los LT autoreactivos. Los mecanismos moleculares que llevan a la diferenciación a LT reguladores y su función son hoy un tema de extensa investigación. Fenotípicamente, esta población se caracteriza por la expresión constitutiva de CD25 (cadena α del receptor de IL-2), CD62L (L-selectina) y constituyen la única población descrita que expresa constitutivamente el factor de transcripción Foxp3, un gen clave en el desarrollo y función de estas células. Otros marcadores como CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico) y GITR (receptor relacionado con la familia- de los receptores de factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides) también son expresados en esta población celular. Actualmente, numerosos estudios sugieren que los linfocitos T reguladores podrían ser utilizados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en la inducción de tolerancia a transplantes así como en alergias, en el tratamiento de inmunopatologías e inmunidad microbiana, lo que ha generado un fuerte interés por desarrollar metodologías que permitan aislar y expandir linfocitos T reguladores.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales, encargadas de capturar y procesar antígenos e iniciar la respuesta inmune primaria. Este proceso es dependiente del estado de maduración de la célula dendrítica de manera tal que si el antígeno es capturado en un contexto inflamatorio (como por ejemplo, una infección microbiana), esta célula entra en la fase terminal de maduración activando linfocitos T vírgenes para convertirlos en linfocitos T efectores. Por otra

parte, si el antígeno es captado en ausencia de señales inflamatorias, la célula dendrítica permanece en un estado inmaduro y genera una respuesta tolerogénica favoreciendo la expansión de linfocitos T reguladores en lugar de linfocitos T efectores.

Esta memoria de título tiene por objetivo desarrollar, en un modelo murino, una metodología para la preparación de linfocitos T reguladores *ex vivo* mediante el cocultivo de linfocitos T vírgenes con células dendríticas inmaduras y evaluar el fenotipo de estas células y funcionalidad de estas células en ensayos de supresión.

Nuestros resultados indican que al día 4 del cocultivo de células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea de ratón con linfocitos T vírgenes se obtiene una población de linfocitos T CD4⁺ (80%), de los cuales el 91% es doble positivo para los marcadores de linfocitos T reguladores CD25⁺CD62L⁺. Además, éstas células expresan el RNA mensajero para el factor de transcripción Foxp3 determinado por RT-PCR. Este fenotipo es adquirido exclusivamente en el cocultivo con células dendríticas del tipo inmaduro.

La funcionalidad de esta población de linfocitos T reguladores se evaluó mediante un ensayo de supresión *in vitro*. Los resultados indican que estas células suprimen la proliferación de linfocitos T efectores de una manera dependiente de la dosis de linfocitos T reguladores presentes en el ensayo.

Además detectamos en el sobrenadante de los ensayos de supresión, altas cantidades de IL-10, una citoquina con propiedades anti-inflamatorias,. Sin embargo, los sobrenadantes de estos ensayos no detienen la proliferación de linfocitos T efectores, sugiriendo que los linfocitos T reguladores suprimen por un mecanismo dependiente de contacto celular.

Finalmente, demostramos que los linfocitos T reguladores generados *ex vivo* específicos para un antígeno dado, son capaces de suprimir la proliferación de

linfocitos T efectores en respuesta a otro antígeno sí y sólo si los linfocitos T reguladores son previamente activados con su antígeno específico. Esto indica que la activación del linfocito T regulador es un proceso dependiente del antígeno, pero que su capacidad supresora no lo es.

En síntesis, nuestros resultados muestran que linfocitos T vírgenes cocultivados con células dendríticas inmaduras en presencia de un antígeno específico, se convierten en una población homogénea de linfocitos T reguladores que poseen actividad supresora. El sistema desarrollado en esta memoria de título, trasladado al sistema humano, podría ser usado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en la inducción de tolerancia a trasplantes.

ABSTRACT

Regulatory T cells are important mediators of the immune system because they maintain tolerance to self and foreign antigens and prevent the risk of autoimmunity through the suppression of autoreactive T lymphocytes. The molecular mechanisms leading to the differentiation of regulatory T cells and their function are nowadays unknown. These cells show constitutive expression of CD25 (α chain of IL-2 receptor), CD62L (L-selectin), and they constitute the only cell population expressing the transcription factor Foxp3, a master gene involved in the development and function of these cells. In addition, this population expresses CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4) and GITR (Glucocorticoid-Induced Tumour-necrosis factor Receptor family-related gene). Nowadays, several studies suggest that regulatory T cells could be used in the treatment of autoimmune diseases, in the induction of tolerance to transplants and allergies, and in the treatment of immunopathologies and microbial immunity. Thus, there is a great interest in the development of new techniques to isolate and expand regulatory T cells.

Dendritic cells are professional antigen presenting cells that, depending on their maturation state, can induce tolerance or immunity. In this context, if the antigen is captured in an inflammatory context, dendritic cell will enter into a state as terminal maturation activating naïve T cells and converting them into effector T cells. On the other hand, if the antigen is captured in a non-inflammatory context, dendritic cells will remain in an immature state generating regulatory T cells.

In this thesis we have developed a method for the preparation of murine regulatory T cells *ex vivo* through the coculture of naïve T cells with immature dendritic cells and

specific antigen. The phenotype of these cells was evaluated together with their functionality in suppression assays *in vitro*.

Our results show that we obtained a population of CD4 T cells (80%) of which a 91% is double positive for the regulatory T cells markers CD25⁺CD62L⁺ at day 4 of coculture. In addition, these cells express the mRNA for the transcription factor Foxp3, determined by RT-PCR. The functionality of the regulatory T cells was evaluated through a suppression assay *in vitro*. The results indicate that these cells suppress effector T cells proliferation in a dose dependent manner.

Also, we detected in the supernatants of the suppression assays, high amounts of IL-10, a cytokine with anti-inflammatory properties. However, supernatants obtained from suppression assays were unable to suppress the proliferation of effector T cells, suggesting that intercellular contact is a requirement for the suppressive mechanism.

Finally, we demonstrated that regulatory T cells generated *ex vivo* specific for one antigen suppress the proliferation of effector T cells in response to another antigen. This bystander suppression occurs only when these regulatory T cells are activated with their own antigen. This suggests that the activation of regulatory T cell is an antigen-dependent process while their suppressive activity is not. This mechanism has enormous potential for clinical application.

In synthesis, these results demonstrate that through cocultures with immature dendritic cells, naïve T cells can be converted in a population of regulatory T cells with suppressive activity.

This system if applicable to the human model, could be used in induction to tolerance to transplants and in the treatment of autoimmune diseases.

1. INTRODUCCIÓN

Un tema clave en inmunología es entender cómo el sistema inmune es capaz de reconocer los antígenos propios, evitando de este modo la autoinmunidad así como los antígenos no propios (exógenos) ejerciendo una efectiva respuesta inmune contra ellos. En este contexto, durante las primeras etapas del desarrollo, el sistema inmune genera diversos mecanismos para evitar la autoinmunidad. El primero de ellos ocurre en el timo, se denomina tolerancia central y consiste en la eliminación de linfocitos T (LT) que poseen alta afinidad contra antígenos propios (autoreactivos) en un proceso denominado selección clonal (Sakaguchi 2005). Sin embargo, este proceso es incompleto debido a que es posible encontrar en la periferia (tejidos terciarios) LT autoreactivos que han escapado a la selección clonal o LT específicos para antígenos (propios y exógenos) no presentados en el timo (von Herrath & Harrison 2003). La presencia de LT autoreactivos en individuos sanos sugiere la existencia de mecanismos reguladores en la periferia denominados mecanismos de tolerancia periférica (von Herrath & Harrison 2003). En este ámbito, el sistema inmune endógenamente produce una subpoblación de LT CD4⁺ altamente especializada en la supresión de LT autoreactivos en la periferia. Estos linfocitos se conocen como T reguladores (LTregs) y constituyen el principal mecanismo de tolerancia periférica (Sakaguchi 2005). Los trabajos publicados por el grupo de Sakaguchi y colaboradores presentaron evidencia importante acerca del papel de esta subpoblación en la mantención de la tolerancia. Así, ratones linfopénicos reconstituidos con LT efectores, en ausencia de LTregs, desarrollan autoinmunidad severa caracterizada por linfoproliferación e infiltración autoinmune en múltiples órganos mientras que la

cotransferencia de LT efectores en presencia de LTregs previene el desarrollo de autoinmunidad (Sakaguchi y col, 1995), sugiriendo que los LTregs son responsables de mantener la tolerancia *in vivo*.

La mayoría de los LTregs (denominados LTregs naturales) son generados en el timo durante el proceso normal de maduración de los LT y persisten en la periferia con una función estable. Esta población se caracteriza por la expresión constitutiva de CD25 (cadena α del receptor de IL-2), y constituyen la única población descrita que expresa constitutivamente el factor de transcripción Foxp3, un gen clave en el desarrollo y función de estas células (Sakaguchi 2005). En humanos, la mutación en Foxp3 genera un severo desorden autoinmune conocido como síndrome de inmunodesregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al cromosoma X (IPEX). En ratones, los mutantes para Foxp3 (llamados scurfy) poseen LTregs afuncionales y desarrollan un síndrome similar a IPEX en humanos (Masteller y col, 2006).

Además, otros marcadores como CD62L (L-selectina), CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico), GITR (receptor relacionado con la familia de los receptores de factor de necrosis tumoral inducidos por glucocorticoides) y CD103 (integrina $\alpha_E\beta_7$) se han asociado a esta población, sin embargo, Foxp3 es el único marcador molecular específico de LTregs (Wood & Sakaguchi 2003).

Además de los LTregs naturales, se han descrito otras subpoblaciones de LTregs que, a diferencia de los LTregs naturales, son generados en la periferia. Los LTregs del tipo Tr1, son células que pueden suprimir la respuesta de linfocitos T helper 1 (Th1) o T helper 2 (Th2) mediante la secreción de IL-10. Aunque esta población posee características similares a los LTregs naturales, estos linfocitos no expresan foxp3 y suprimen a través de factores solubles, indicando que son funcionalmente distintos y corresponden a una población celular diferente (Thompson & Powrie 2004).

Otra subpoblación de LTregs la constituyen los LTregs del tipo Th3 que se caracterizan por secretar TGF- β (Horwitz y col, 2004). En este trabajo, nos centraremos en estudiar los LTregs naturales y su generación *ex vivo*.

Diversos trabajos de inmunosupresión *in vitro* e *in vivo* han postulado diversos mecanismos por los cuales los LTregs naturales suprimen la inmunidad (Figura1) Después de la interacción del receptor del linfocito T (TCR) con su antígeno, los LTregs inhiben la respuesta inmune *in vitro* e *in vivo* de una manera antígeno no específica y no restringido a las moléculas de histocompatibilidad (MHC) (Vlad y col, 2005). *In vivo*, los LTregs pueden localizarse y expandirse junto con LT efectores (LTef) en los linfonodos que drenan al antígeno así como en tejidos inflamados, facilitando de este modo la supresión específica (von Boehmer 2005). De este modo, la supresión puede ser mediada por citoquinas, por contacto directo entre el LTreg y el LTef o por mecanismos que “instruyen” a las células presentadoras de antígeno (APC) a incrementar el metabolismo de triptofano y/o a secretar citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- β , interfiriendo de este modo con la activación del LTef (von Boehmer 2005) (Figura1).

El papel de las citoquinas en el mecanismo de supresión de los LTregs se ha evaluado en modelos *in vitro* e *in vivo*. Análisis *in vitro* han mostrado que los LTregs suprimen la proliferación de LTCD4⁺ y LTCD8⁺ por una reacción que es independiente de IL-10 y TGF- β . Esta supresión requiere contacto directo entre la célula supresora y la célula suprimida, dado que la supresión no ocurre cuando las células están separadas por una membrana permeable. Además, estudios *in vitro* indican que no se requiere la presencia de una APC debido a que la supresión ocurre en cultivos libres de estas células. En todos los casos, la supresión requiere de la activación del LTreg por

ligandos del TCR o anticuerpos anti-CD3 (von Boehmer 2005). Sin embargo, los requerimientos para la supresión *in vivo* requieren un mayor estudio dado que aún cuando IL-10 no es esencial para la supresión *in vitro*, esta citoquina es considerada una de las moléculas claves involucradas en inmunosupresión *in vivo* (von Boehmer 2005). Evidencia de esto la otorgan trabajos de trasplantes en ratones. El bloqueo de IL-10 por anticuerpos bloqueadores inhibe la supresión en modelos de trasplante de piel murino en los cuales los LTregs están presentes durante la inducción y mantención de la tolerancia (Wood & Sakaguchi 2003). Además, LTregs aislados de ratones deficientes en IL-10 son incapaces de proteger el desarrollo de la enfermedad inflamatoria del Intestino (Inflammatory Bowel Disease, IBD) iniciada por LTef CD4⁺CD45RB^{HI} (Wood & Sakaguchi 2003).

Otra citoquina importante en el mecanismo de supresión de los LTregs es TGF- β citoquina que está principalmente involucrada en la supresión sobre LTef CD8⁺ (von Boehmer 2005).

Por otra parte, moléculas accesorias y co-estimuladoras también han sido evaluadas con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la supresión de los LTregs. Estudios recientes han demostrado la función de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en LTCD4⁺ activados (Paust y col, 2004). Estas moléculas son esenciales en la supresión mediada por contacto celular *in vitro*, debido a que su ausencia en LTef reduce la susceptibilidad a la supresión por LTregs comparados con LTef normales (Paust y col, 2004). CD80 y CD86 en el LTef son ligandos de la molécula CTLA-4 presente en los LTregs. Este modelo podría proveer una explicación para el contacto directo entre LTregs y LTefs requerido para la supresión *in vitro* (von Boehmer 2005) (Figura1).

La función propuesta para el receptor-ligando CTLA-4-CD80 o CTLA-4-CD86 en la interacción LTreg-LTef es distinta a la propuesta para el mismo receptor-ligando entre LTreg y DC. Esta interacción induce la síntesis de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en las células dendríticas (DCs). IDO es responsable del metabolismo del aminoácido esencial triptofano. La reducción del triptofano libre luego de la inducción de IDO se ha asociado a una disminución en la activación del LT y podría constituir el mecanismo de supresión dependiente de APC *in vivo*. Este mecanismo de supresión al parecer no es esencial *in vitro*, dado que la supresión puede ser observada en cultivos libres de APCs (von Boehmer 2005) (Figura1).

Las células dendríticas son APCs profesionales que interpretan una amplia gama de señales y las transmiten a los LT dirigiendo una apropiada respuesta inmune (Vlad y col, 2005). Dependiendo de su estado de maduración, promueven o suprimen la respuesta inmune de los LT (Vlad y col, 2005) (Figura2). En este contexto, si la DC capta antígenos en un contexto inflamatorio, como por ejemplo una infección microbiana, esta célula entra en la fase terminal de maduración activando a los LT vírgenes para convertirlos posteriormente en LT efectores, iniciando de este modo la respuesta inmune (Levings y col, 2005) (Figura2). Por otra parte, numerosos trabajos se han centrado en el estudio de la influencia de la DC sobre la diferenciación de LT en ausencia de inflamación. Estos trabajos han conducido a la idea de que las DCs inmaduras (iDCs) o semimaduras tienen un papel distinto en la regulación del sistema inmune debido a que al momento de presentar antígenos, promueven tolerancia en lugar de inmunidad. La hipótesis propuesta es que cuando la DC está en un estado inmaduro o “tolerogénico”, es capaz de expandir preferencialmente LTregs en lugar de LTef (Figura2). De hecho, la captación de antígeno en un contexto no inflamatorio, como por ejemplo mediante la conjugación del antígeno a un anticuerpo anti-DEC205

(receptor de DCs inmaduras) resulta en la generación *de novo* de LTregs antígeno-específicos *in vivo* (Kretschmer y col, 2005). Además, la administración endovenosa de DCs tolerogénicas ha sido eficiente en la supresión de tiroiditis autoinmune experimental en modelos murinos mediante la activación de LTregs específicos para la proteína tiroglobulina (Verginis y col, 2005).

Por esta razón, la generación de LTregs y las terapias basadas este tipo celular tienen el potencial de ser beneficiosas en numerosos tratamientos clínicos, sobre todo en el estudio de enfermedades autoinmunes e inducción de tolerancia a trasplantes. Un problema actual en el diseño de terapias usando LTregs es obtener cantidades suficientes para una terapia mediante transferencia adoptiva. Los LTregs constituyen sólo un 5-10% de la población LT CD4⁺ en ratón y un 1-2% en humanos. Por esta razón, hoy en día un gran número de investigadores se encuentran desarrollando técnicas de generación y expansión *ex vivo* de LTregs con el objetivo de utilizarlos en la supresión de la respuesta inmune.

En este trabajo generamos un protocolo que nos permitió producir LT reguladores *ex vivo*. Para ello utilizamos ratones transgénicos para el TCR y DCs presentadoras de antígeno inmaduras generadas a partir de precursores presentes en la médula ósea. Hemos demostrado además que estos LTreg son capaces de suprimir la respuesta inmune.

Mecanismos de supresión de LTregs

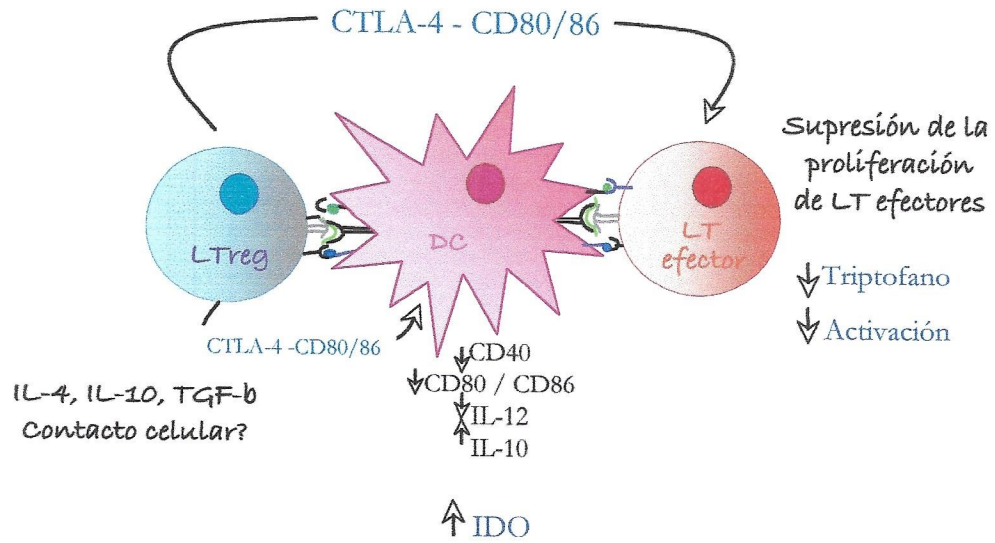


Figura 1: Modelo de mecanismos de supresión de Linfocitos T reguladores.

Condición inflamatoria:



Condición homeostática:



Figura 2: Modelo de inducción de Inmunidad y Tolerancia dependiendo del estado de maduración de la célula dendrítica.



HIPOTESIS

“Células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea generan linfocitos T reguladores *ex vivo* con actividad supresora”.

OBJETIVO GENERAL

Generar linfocitos T reguladores *in vitro* y caracterizarlos fenotípica y funcionalmente.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Generar LTregs *ex vivo* mediante el cocultivo de linfocitos T vírgenes con células dendríticas inmaduras en presencia de su antígeno específico.
- Determinar la expresión de los marcadores específicos de LTregs: CD4, CD25, CD62L y el factor de transcripción Foxp3.
- Analizar la actividad supresora de los LTregs en un ensayo de supresión *in vitro*.
- Estudiar el mecanismo de supresión (contacto celular versus factores solubles).
- Analizar la especificidad antigénica de los linfocitos T reguladores generados *ex vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Los ratones ocupados en este trabajo son el producto de la cruce entre ratones AND transgénicos para el TCR ($V\alpha 11^+V\beta 3^+$) con un background genético $H2^b$ (Kaye y col, 1989) y ratones B10.BR ($H2^k$). Los linfocitos T de estos ratones F1 (AND x B10.BR) (100% $CD4/V\alpha 11^+$ con una pureza del 95%) reconocen el péptido C-terminal del Citocromo C de paloma (PCC^{87-104}) presentado en un contexto MHC-II I-E^k. Ambas cepas fueron adquiridas de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.) y mantenidas en un vivero convencional. Además, se ocuparon ratones OT-II para los ensayos de especificidad antigénica (proporcionado por Dr. Alexis Kalergis, Pontificia Universidad Católica de Chile). Estos ratones poseen un background genético $H-2^b$ y los linfocitos T de estos ratones reconocen el péptido 323-339 de la ovalbúmina de pollo ($OVA^{323-339}$) presentado en un contexto MHC-II I-E^b (Barnden y col, 1998).

2.2 Anticuerpos y reactivos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales: Conjugados a FITC: anti-I-A/I-E clon 2G9, anti- $V\alpha 11$ clon RR8-1, anti-CD25 clon 7D4, anti-CD69 clon H1.2F3, anti-CD80 clon 16-10A1, anti-CD86 clon GL1. Conjugados a PE: anti-CD11c clon N418, anti-CD62L (L-selectina) clon MEL-14. Conjugados a PerCP: anti-CD4 clon

RM4-5. Conjugados a CyChrome: anti-CD44 clon IM7. Anticuerpos purificados: anti-IE^K clon 17-3-3.

Los péptidos PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴ (H2N-KKAERADLIAYLKQATAK-OH) y OVA³²³⁻³³⁹ (H2N-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH) fueron sintetizados en New England Peptide, Inc.

Además, se utilizaron los siguientes reactivos: Colagenasa D (Roche, Mannheim, Alemania), DNAsa-I (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.), penicilina, estreptomicina, 2-mercaptoetanol, tampón de reacción TRIS-HCl, MgCl₂, dNTPs y ADN polimerasa (todos de Invitrogen, Brasil); MACS anti-CD11c (clon N418), MACS anti-rata IgG y MACS anti-mouse IgG (todos de Miltenyi Biotec, Alemania); Trizol Reagent (GIBCO BRL, Amenania); cloroformo, isopropanol y etanol 75% (todos de Merck, Darmstadt, Alemania); DMPC (Sigma Chemical, CO, EE.UU.); Agarosa 0,8%, Agarosa 2% y bromuro de etidio (todos de W&Z Winkler, Stgo., Chile); DNAsa libre de RNAsa (Boehringer, Mannheim, Alemania); tampon de reacción, RNasin®, M-MLV RT (todos de Promega, Madison, WI, EE.UU.); Tween 20 (Sigma, St. Louis, EE.UU.); TMB Reagent (BD Pharmingen, EE.UU.)

2.3 Preparación de LT vírgenes

Los linfocitos T vírgenes se obtuvieron de timo de ratones F1 (AND x B10.BR) de 4 a 6 semanas de edad, depletados de células presentadoras. Para esto, los timos se disgregaron y pasaron por una malla metálica de 90 μm . Para eliminar las células presentadoras del timo, las células se resuspendieron a 10^8 por ml en DMEM + 2% FCS y se incubaron con el anticuerpo anti-I-E^K (clon 17-3-3) (5 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Posteriormente, se lavaron 2 veces con 5 ml de tampón MACS, se incubaron con 40 μl de micro esferas anti-mouse IgG de cabra por cada 10^8 células en 1ml de tampón MACS por 10 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Luego, se lavaron las células con 10 ml de tampón MACS y se resuspendieron en tampón MACS para eliminar las células presentadoras con un magneto (VarioMACS®) y columnas de selección negativa CS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania). Las células así purificadas, corresponden a una fracción de linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo virgen de los cuales más del 90% expresa la cadena transgénica V α 11 medido por citometría de flujo (Kaye y col, 1989).

2.4 Generación de células dendríticas de médula ósea:

Las células dendríticas inmaduras se generaron a partir de precursores de médula ósea de ratones F1 (AND x B10.BR) entre 2-3 meses de edad. Los ratones se sacrificaron por sobredosis de éter y se disectaron tibias y fémures. Los precursores se obtuvieron al perfundir los huesos con RPMI suplementado con L-glutamina 2mM,

penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. La médula ósea se disgregó por agitación fuerte hasta obtener una suspensión homogénea y la suspensión celular se centrifugó a 300 x g por 5 min a temperatura ambiente. Se lisaron los glóbulos rojos en 1 ml de NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 10 mM, Na₂EDTA 0.1 mM , pH 7.2-7.4 y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Las células obtenidas se cultivaron en placas de Petri microbiológicas (140mm x 20mm, Sterilin) a 10x10⁶ células en 20 ml de medio RPMI m conteniendo 10% FCS, 50µM 2-ME, 50 µg/mL gentamicina y 3%vol/vol de sobrenadante de la línea celular J558L, transfectada con el gen de GM-CSF murino (proporcionado por A.M. Lennon-Duménil, U520, Institut Curie, Paris, Francia). Las células se mantuvieron a 37°C y 5%CO₂ y en los días 4 y 8, se recuperaron las células adherentes y en suspensión, luego de tratar la placa con 4 ml de tripsina, durante 6 min a 37°C. Los cultivos se replaquearon, bajo las mismas condiciones iniciales, con medio fresco en presencia del sobrenadante de las J558L al 3% Vol./vol . Después de 12 días de cultivo, se eliminó la fracción de células no-adherentes y se colectó exclusivamente la fracción adherente, enriquecida en células dendríticas inmaduras, la que fue utilizada en los análisis de citometría de flujo y en la inducción de linfocitos T reguladores.

2.5 Co-cultivo de células dendríticas inmaduras y linfocitos T vírgenes para la obtención de linfocitos T reguladores:

Las células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea y los linfocitos T vírgenes se cultivaron a una razón de 1:5 y a una concentración de $0,2 \times 10^6$ y 1×10^6 células/ml respectivamente, en medio IMDM conteniendo 10% FCS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicina, 50 μM 2-ME y 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina-B. Para la activación de los linfocitos T se usó 2,5 μM del péptido PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴. Al tercer día de co-cultivo, se reemplazó la mitad del medio por medio fresco. Las células se co-cultivaron por 4 días, luego de los cuales se colectaron para el análisis por citometría de flujo, extracción de mRNA y ensayo de supresión *in vitro*.

2.6 Ensayo de supresión *in vitro*:

Como fuente de linfocitos T efectores se usaron timocitos totales de ratones F1 y como células presentadoras se utilizaron células dendríticas aisladas de bazo de estos mismos ratones siguiendo un protocolo descrito previamente (Iwasaki & Kelsall 1999). Para expandir la población de células dendríticas, los ratones se trataron con la citoquina Flt3-L, la que expande homogéneamente todas las subpoblaciones de células dendríticas. Brevemente, ratones F1 de entre 8 a 12 semanas se inyectaron vía subcutánea en el dorso con 1×10^7 células de melanoma murino B16 transfectadas con el gen de la citoquina Flt3-L (facilitadas por el Dr. Hidde Ploegh, Harvard Medical School, Boston, EE.UU). Luego de dos semanas, los ratones se sacrificaron y se colectó el bazo, el cual se disgregó y digirió por 45 minutos a 37°C con agitación

suave en presencia 1.200 U/ml de colagenasa-D (Roche, Mannheim, Alemania) en 5ml de volumen final de IMDM+10%FCS suplementado con 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomina y 50 μ M de 2-ME. Posteriormente, el tejido se pasó a través de una malla metálica de 90 μ m y se lavó en un volumen final de 10 ml de IMDM+ 10%FCS. Luego, las células se lavaron con 10 ml de tampón MACS a 4°C y se incubaron con 40 μ l de microesferas anti-CD11c (clon N418) (Miltenyi Biotec, Alemania) por cada 10⁸ células en 500 μ l de tampón MACS por 10 minutos a 4°C con rotación. Posteriormente, las células se lavaron con 10 ml de tampón MACS, se resuspendieron a 10⁸ células por ml de tampón MACS y se aislaron usando un magneto (VarioMACS®) y columnas de selección positiva LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania). Se colectó la fracción positiva, obteniendo una pureza de \geq 95% medido por citometría de flujo como el porcentaje de células CD11c⁺.

Timocitos de ratones F1 se lavaron 2 veces con 10 ml de PBS y se marcaron con CFSE 5 μ M por 10 min. Posteriormente se lavaron 2 veces con 10 ml de medio. Estas células (0,4 x 10⁶ por pozo) se co-cultivaron con DCs de bazo (0,1 x 10⁶ por pozo) en medio IMDM+ 10% FCS + 50 μ g/mL gentamicina + 50 μ M 2-ME + 0,5 μ g de anfotericina-B en presencia de 2,5 μ M del péptido específico PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴. Los co-cultivos se realizaron en placas de 24-pozos por 4 días en ausencia o presencia de tres cantidades diferentes de LTregs (0,08 x 10⁶, 0,4 x 10⁶, 2 x 10⁶ por pozo) en un volumen final de 2 ml. La proliferación de los timocitos marcados con CFSE se evaluó por citometría de flujo, determinando la dilución del colorante CFSE a través de los diferentes ciclos de división celular.

En otro grupo de experimentos, orientados a determinar la especificidad antigénica de los LTregs generados, se realizó la misma metodología descrita previamente pero

usando timocitos de ratones OT-II, extraídos de la misma manera que los timocitos de ratones F1. Estos timocitos de ratones OT-II ($0,4 \times 10^6$ /pozo) se marcaron con CFSE y posteriormente se cocultivaron con DCs de bazo de ratones F1 ($0,1 \times 10^6$ /pozo) en presencia o ausencia de LTregs F1 en tres cantidades diferentes ($0,08 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$, 2×10^6 por pozo) en presencia de $1\mu\text{M}$ del péptido OVA³²³⁻³³⁹ o en presencia de $1\mu\text{M}$ del péptido OVA³²³⁻³³⁹ más $2,5 \mu\text{M}$ del péptido PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴, en un volumen final de 2 ml.

2.7 Determinación del porcentaje de división celular mediante tinción con CFSE.

La medición del porcentaje de división celular se realizó por dilución del colorante CFSE. Esta tinción se diluye equitativamente entre las células hijas a través de cada ciclo de división celular y esto puede ser cuantificado por citometría de flujo. De este modo, las células que no han entrado en división celular presentan un pico con una intensidad media de fluorescencia alta para esta tinción. Por otra parte, las células en división celular presentan sucesivos picos con intensidades medias de fluorescencia intermedias y en los cuales cada pico representa un ciclo de división celular. Los porcentajes de células divididas, medidos en diferentes condiciones (en ausencia o presencia de linfocitos T reguladores y en presencia de linfocitos T efectores de diferente especificidad antigénica), se graficaron en el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., EE.UU.).

2.8 Preparación del RNA total y RT-PCR para la detección del factor de transcripción Foxp3.

Se extrajo RNA total a partir de 4×10^6 linfocitos T por extracción con TRIzol reagent (Gibco-BRL, EE.UU.), seguido de una extracción con cloroformo. El RNA se precipitó con isopropanol por 12 horas a -20°C , luego se lavó con 1 ml de etanol 75% (Merck, Alemania) se secó al aire y se resuspendió en H_2O -DMPC (Sigma Chemical CO, EE.UU.). La integridad del RNA se determinó en un gel de agarosa al 0,8% (W&Z, Winkler, Santiago, Chile) y se cuantificó determinando la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/vis (Jenway Limited, Inglaterra). Previo al RT-PCR, se digirieron 5 μg de RNA con 0,5 μl de DNasa-I/RNasa free (1U/ μl) (Boheringen, Mannheim, Alemania) en un volumen final de 22 μl con 1 μL de buffer de reacción (200 mM Tris-HCL (pH 8,4), 500 mM KCl) (Invitrogen, Brasil) y 1 μL de MgCl_2 50 mM por 30 minutos a 37°C . De esta mezcla se utilizaron 11 μl para la transcripción inversa y 11 μl para el control sin reacción. Luego se agregaron 500 pmoles de oligonucleótido poli-dT (Gibco-BRL, EE.UU.), y se incubó 10 minutos a 70°C . El cDNA se sintetizó a partir de 2-2.5 μg de RNA total, utilizando 2 U buffer MMLV-RT (Promega, Madison, WI), 15 U RNAsin (Promega, Madison, WI), 0.5 mM dNTP, y buffer MMLV-RT (Promega, Madison, WI) por 1 h a 42°C , luego se incubó por 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Estas reacciones se efectuaron en un termociclador (PTC-150 Minicycler, MJ Research INC, EE.UU.) La reacción de PCR se realizó con 2 μL de cDNA, y 23 μL de una mezcla de MgCl_2 1,5 mM, dNTP 200 μM de cada uno, tampón de reacción (200 mM Tris-HCL (pH 8,4), 500 mM KCl), primers sentido y antisentido (8 ng/ μL de cada uno) y ADN polimerasa (1,25 U). La amplificación del gen de Foxp3 se realizó

mediante el siguiente protocolo: 2,5 min a 94°C, seguido de 31 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 57°C y 30 s a 72. Los primers usados para la detección de Foxp3 fueron:

Sentido: 5'-CAG CTG CCT ACA GTG CCC CTA G-3'

Antisentido: 5'-CAT TTG CCA GCA GTG GGT AG-3'

Estos primers fueron publicados en el trabajo de Hori y cols (Hori y col, 2003). Como control se utilizó el gen de β -actina, utilizando el siguiente protocolo: 5 min a 94°C seguido de 14 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 58°C y 90 s a 72°C. Los primers utilizados para la detección de β -actina fueron los siguientes:

Sentido: 5'-AAATCGTGCGTGACATTAAGG-3'

Antisentido: 5'-CCGATCCACACGGAGTACTT-3'

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1.2% con un transiluminador de luz ultravioleta. Los geles se fotografiaron usando una camara digital Kodak (DC 120 Digital Camera, Gibco BRL, EE.UU).

2.9 ELISA para la detección de IL-10.

La detección de IL-10 en los sobrenadantes de los ensayos de supresión se realizó mediante ELISA de captura usando el kit BD OptEIA mouse ELISA set (BD Biosciences, EE.UU) según instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas de 96 pocillos Immuno-plate Maxisorp (Nunc, EE.UU) a las que se le agregaron 100 μ l de una

dilución del anticuerpo de captura en NaHCO_3 0,33M, Na_2CO_3 0,66 M pH 9,5. Luego de incubar a 4°C toda la noche se lavó la placa 3 veces con PBS + 0,1% Tween 20 (Sigma, EE.UU.) y se incubó una hora con PBS + 10% FCS para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente la placa se lavó tres veces con PBS + 0,1% Tween 20 y se agregaron 100 μl de estándar de citoquina recombinante o sobrenadante de ensayos de supresión. Las muestras se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y se lavaron 5 veces con PBS + 0,1% Tween 20. Luego, las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con 100 μl de una mezcla de anticuerpo de captura biotinilado y avidina-peroxidasa en PBS + 10% FCS. Después de lavar 7 veces con PBS + 0,1% Tween 20 se agregaron 100 μl de TMB Substrate Reagent (BD Pharmingen, EE.UU.) y se incubó por 20 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 50 μl de H_3PO_4 1M. La densidad óptica a 450 nm se determinó en un espectrofotómetro Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, EE.UU.).

2.10 Análisis estadístico

A menos que se indique de otro modo, los datos son presentados como la media \pm desviación estándar. Para el análisis estadístico y el diseño de los gráficos se utilizó el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., EE.UU.).

3.RESULTADOS

3.1 Linfocitos T vírgenes cocultivados con células dendríticas inmaduras generan linfocitos T reguladores (LTregs):

Para determinar si las células dendríticas derivadas de médula ósea son capaces de generar linfocitos T reguladores (LTregs) se realizaron co-cultivos entre estas células dendríticas inmaduras (iDCs) y linfocitos T vírgenes transgénicos para el TCR en presencia del péptido específico PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴. Los cultivos de DCs producidas en las condiciones experimentales (Ver materiales y métodos, sección 2.4), producen una fracción de DCs adherentes a la placa y otra fracción que se mantiene en suspensión. Resultados de nuestro laboratorio han mostrado que estas subpoblaciones presentan diferencias en cuanto a las citoquinas que producen y al fenotipo obtenido luego de la activación por diversos estímulos (Pino 2005). En este estudio utilizamos la fracción más inmadura que corresponde a la fracción adherente de los cultivos al día 12. Estas células constituyen una población homogénea que expresa altos niveles del marcador de DCs CD11c, bajos niveles de MHC-II y de la molécula coestimuladora CD86 (B7.2) y altos niveles de la molécula coestimuladora CD80 (B7.1) (Figura 3). Por otra parte, estas células no secretan cantidades detectables de citoquinas como IL-10 o IL-12 en las condiciones de cultivo, determinado por ELISA de captura (Pino 2005). Estos resultados indican que estas células constituyen una población de DCs inmaduras en cuanto a fenotipo y secreción de citoquinas.

Para evaluar la capacidad de estas iDCs de generar LTregs, realizamos cocultivos entre iDCs y LT vírgenes transgénicos para el TCR, por 4 días en presencia del péptido

específico PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴ y evaluamos por citometría de flujo la expresión de los marcadores de LTregs CD25 y CD62L. Además se determinó la expresión del marcador de activación temprana CD69 y del marcador de activación tardío CD44. El análisis se realizó en la fracción de LT CD4⁺. Como se observa en la Figura 4A panel izquierdo, LT CD4⁺ cocultivados con iDCs derivadas de medula ósea presentan un mayor porcentaje de una población de células positivas para los marcadores de LTregs CD25 y CD62L (90% doble positivo, panel izquierdo) con respecto a los LT vírgenes originalmente utilizados en este cocultivo (Figura 4B, panel izquierdo), en los cuales no hay células dobles positivas para estos marcadores. Al comparar los LTregs originados con iDCs con LT efectores (LTef), generados en el cocultivo de LT vírgenes con DCs maduras derivadas de bazo, estos últimos tampoco expresan CD25 ni CD62L (Figura 4C, panel izquierdo). Al analizar la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD44 (Figura 4, paneles derechos), observamos que LT CD4⁺ cocultivados con iDCs derivadas de medula ósea constituyen una población heterogénea para el marcador CD44 expresando mayores niveles en comparación a LT vírgenes, pero niveles menores que LT efectores generados con DCs de bazo. En cuanto al marcador de activación temprana CD69, LT CD4⁺ cocultivados con iDCs presentan dos poblaciones para este marcador: una positiva (71%) y otra negativa (Figura 4A panel derecho). En contraste, ni LT vírgenes ni LT efectores, expresan CD69 (Figura 4B y 4C paneles derechos).

Estos resultados sugieren que las iDCs imprimen en LT vírgenes un fenotipo similar al descrito para LTregs en cuanto a los marcadores CD25 y CD62L, además de un estado intermedio de activación con una expresión heterogénea para CD44 y dos poblaciones para CD69. Este fenotipo no está presente en LT vírgenes ni en LT cocultivados con DCs maduras.

Los linfocitos T reguladores se caracterizan por expresar constitutivamente el factor de transcripción Foxp3, marcador de linaje y diferenciación de este tipo celular. Para confirmar que los LT generados en los cocultivos con iDCs corresponden efectivamente a LTregs, se realizó RT-PCR para detectar el RNAm de Foxp3 en estas células. Como se observa en la Figura 5, los LT vírgenes cocultivados con iDCs constituyen una población con alta expresión de Foxp3 a diferencia de LT vírgenes o LT efectores. Estos resultados indican que las iDCs tienen la capacidad de inducir una población de LTregs CD25⁺CD62L⁺CD4⁺Foxp3⁺ a partir de LT vírgenes.



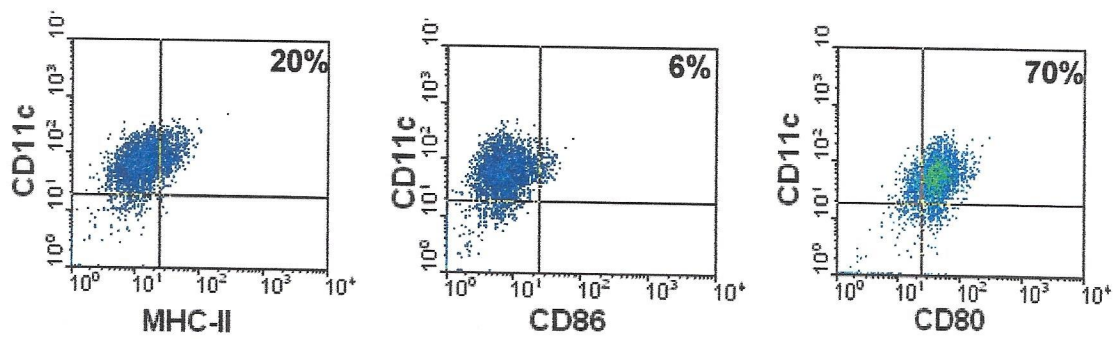


Figura 3. Las células dendríticas adherentes generadas a partir de médula ósea presentan un fenotipo inmaduro. Se determinó el fenotipo de la fracción adherente del cultivo de DCs al día 12 mediante citometría de flujo. Se estudió la expresión en la superficie de CD11c, MHC-II, CD86 y CD80. Experimento representativo de 5 experimentos independientes.

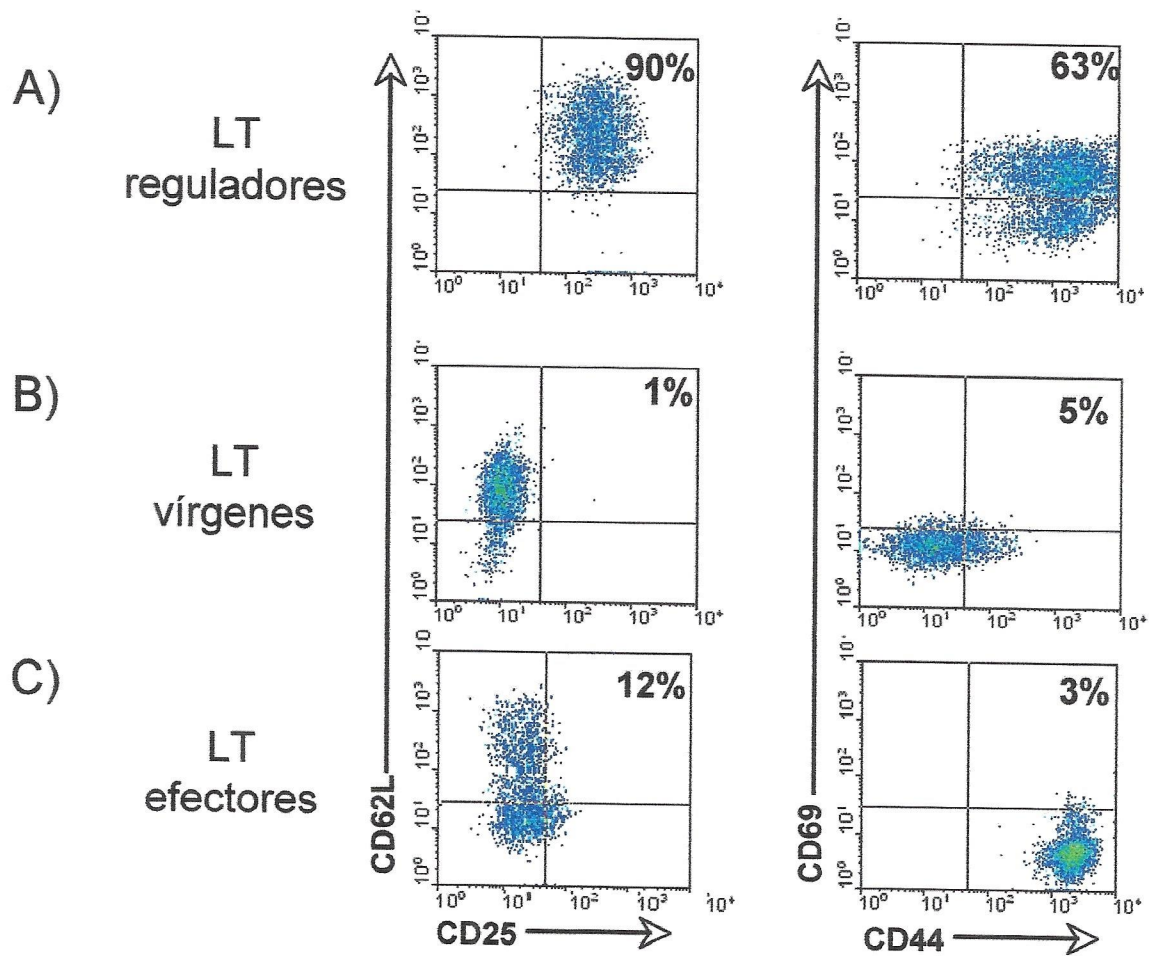


Figura 4. Linfocitos T cocultivos con células dendríticas inmaduras adquieren los marcadores de linfocitos T reguladores CD25 y CD62L y permanecen en un estado de activación intermedio. LT vírgenes purificados de ratones F1 (AND X B10.BR) se cocultivaron con células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea de ratones F1 en presencia de su antígeno específico PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴. Luego de 4 días se analizó por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD25 y CD62L y los marcadores de activación CD69 y CD44 en: (A) Linfocitos T cocultivos con células dendríticas inmaduras. (B) Linfocitos T vírgenes y C) Linfocitos T efectores (linfocitos T vírgenes cocultivos con células dendríticas maduras derivadas de bazo de ratón F1 en presencia del péptido específico PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴). Los números representan el porcentaje de células dobles positivas. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.



Figura 5: El cocultivo de linfocitos T vírgenes con células dendríticas inmaduras genera una población de linfocitos T Foxp3⁺. Expresión del RNA mensajero de Foxp3 (panel superior) y RNA mensajero de β-actina (panel inferior) en linfocitos T vírgenes cocultivados con células dendríticas inmaduras (LTregs), linfocitos T vírgenes cocultivados con células dendríticas maduras de bazo (LTefectores) y linfocitos T vírgenes. Los productos de PCR se corrieron en un gel al 1.2% agarosa y se visualizaron en un transiluminador de luz UV. Experimento representativo de 2 experimentos independientes.

3.2 Los LTregs inducidos con iDCs poseen actividad supresora:

Para demostrar que los LTregs generados al término del cocultivo entre LT vírgenes y iDCs derivadas de médula ósea, en presencia del péptido específico poseen actividad reguladora, se ensayó la capacidad de éstas células de suprimir una respuesta inmune específica inhibiendo la proliferación de LT efectores en un ensayo de presentación antigénica. Timocitos de ratones F1 se estimularon por 4 días con DCs de bazo (maduras) en presencia del péptido PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴, en condiciones en las cuales se induce la proliferación de LT efectores. A estos cocultivos les agregamos cantidades variables de LTregs isogénicos generados *ex vivo* (1:5, 1:1, 5:1, LTreg:LTef) y evaluamos la proliferación de los LT efectores mediante dilución del marcaje con CFSE. Los resultados indican (Figura 6A) que los LTregs inhiben la proliferación de los LT efectores de una manera dependiente del número de LTregs agregados al cocultivo. Así, la cantidad de LT efectores en proliferación cae de un 99% en ausencia de LTregs a un 23% cuando existe una razón 5 LTreg por 1 LT vírgen. Para descartar que la disminución en la proliferación sea un efecto del número de células y no un efecto supresor intrínseco de los LTregs generados, se realizó el experimento control en el cual se agregaron LT vírgenes en lugar de LTregs en las mismas dosis y se determinó el efecto en la proliferación de LT efectores. Como se aprecia en la figura 6B, el efecto supresor no se observa cuando se colocan LT vírgenes en lugar de LTregs en el ensayo de supresión, indicando que los LTregs generados *ex vivo* con iDCs poseen actividad supresora *in vitro*.

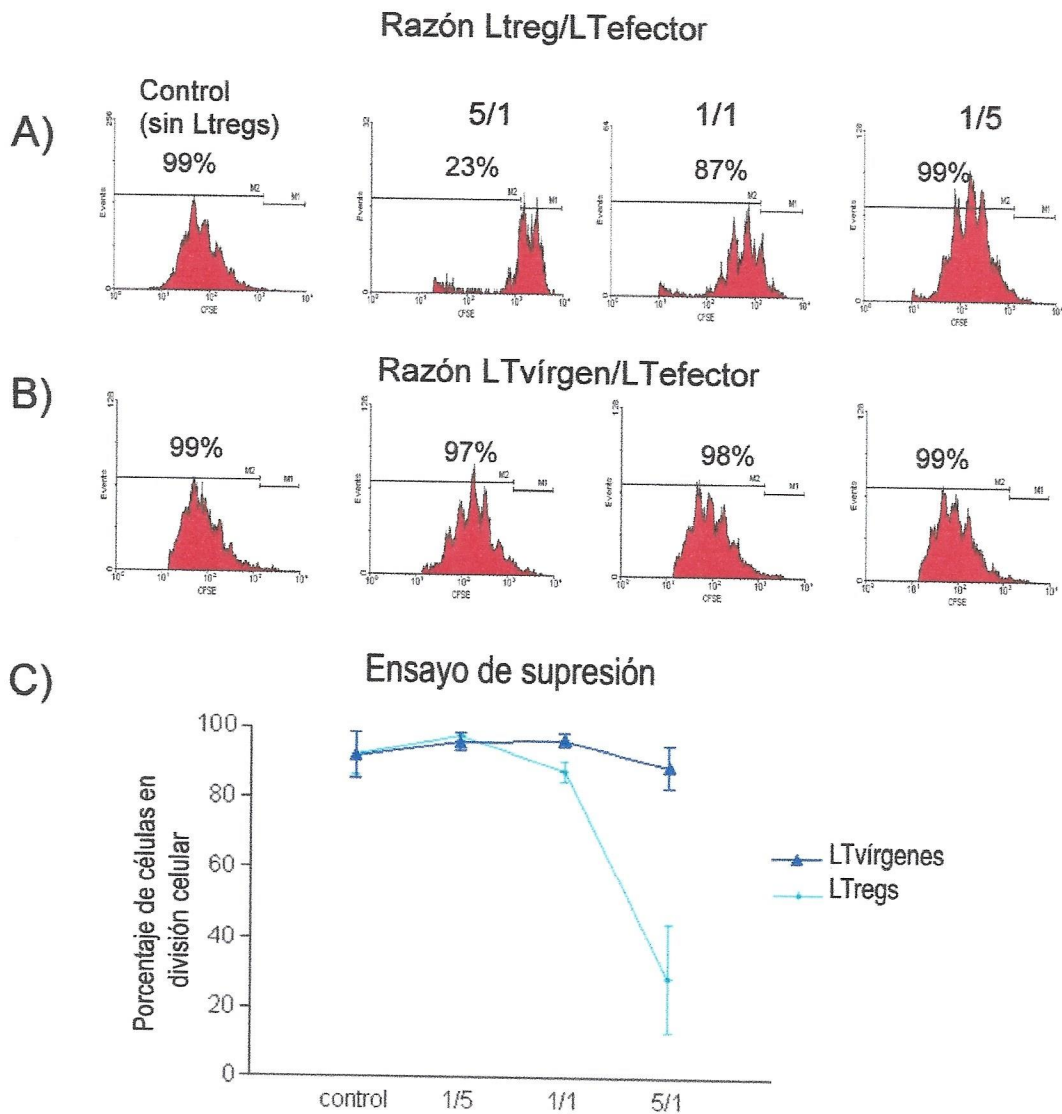


Figura 6: Los linfocitos T reguladores generados con células dendríticas inmaduras poseen actividad supresora. Timocitos de ratones F1 (AND x B10.BR) se marcaron con CFSE 5 μ M y se cocultivaron con DCs maduras derivadas de bazo de ratones F1 más el péptido PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴ 2,5 μ M en ausencia o presencia de distintas dosis de LTregs o de LT vírgenes, ambos de ratones F1. A) Ensayo de supresión en ausencia (control sin LTregs) o presencia de LTregs generados con células dendríticas inmaduras. La proliferación de LT efectoras se determinó al cuarto día de cocultivo por citometría de flujo en presencia de cantidades decrecientes de LTregs (LTregs/LT: 5/1; 1/1; 1/5). B) Ensayo de supresión en ausencia o presencia de LT vírgenes en lugar de linfocitos T reguladores en las mismas cantidades anteriormente indicadas. La dilución del colorante (menores intensidades de fluorescencia) equivale a los sucesivos ciclos

de proliferación celular. C) Los datos mostrados en A y B se graficaron en función del porcentaje de células en división celular y se realizó el análisis estadístico de 3 experimentos independientes. Las barras muestran la desviación estándar de los tres experimentos

3.3 La supresión de los LTregs dependería del contacto celular y no de factores solubles:

Con el objetivo de identificar factores solubles involucrados en el mecanismo de supresión, se evaluó la presencia de IL-10, citoquina de conocida actividad inmunoreguladora asociada a LTregs (von Boehmer 2005). Para esto se cuantificó IL-10 mediante ELISA de captura en los sobrenadantes de los ensayos de supresión. Como se observa en la figura 7, se detectaron altas concentraciones de IL-10 en los ensayos de supresión que contenían LTregs, sugiriendo que esta citoquina puede desempeñar un papel importante en el mecanismo de supresión de LTregs. En contraste, esta citoquina no fue detectada en los ensayos que contenían LT vírgenes en lugar de LTregs (Figura 7A). Estos resultados, nos llevaron a diseñar experimentos con el objetivo de determinar si la supresión inducida por los LTregs dependía de contactos célula-célula o estaba mediada por factores solubles. Para esto evaluamos si el medio condicionado proveniente del ensayo en el cual hubo un mayor grado de supresión (ensayo que contiene 5 LTregs por 1 LTefector) (Figura 6A) poseía actividad supresora en un ensayo de presentación antigénica (Figura 7B). Los resultados indican que el medio condicionado, proveniente de un ensayo de supresión el cual se encuentra enriquecido en IL-10, no detiene la proliferación de LT efectores sugiriendo que el mecanismo por el cual los LTregs ejercen su acción depende del contacto celular entre el LTreg , LTef y las DCs.

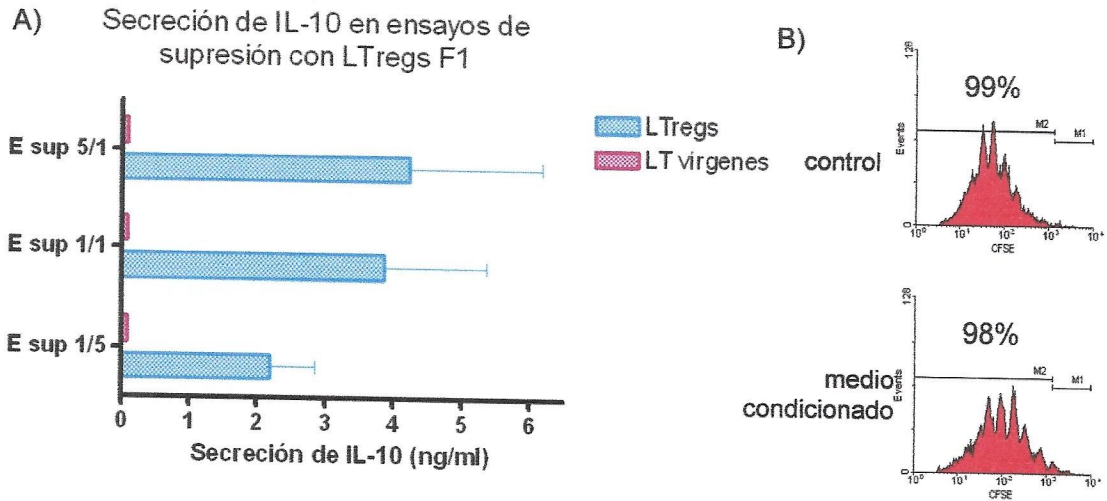


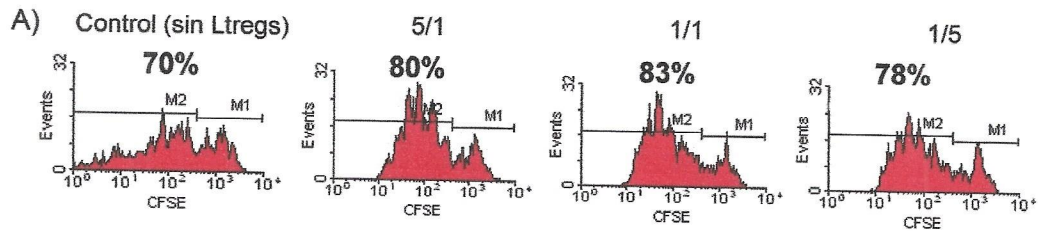
Figura 7: La supresión de la proliferación de linfocitos T efectores dependería de la presencia de LT reguladores y no de factores solubles producidos por estas células. A) Secreción de IL-10 en los sobrenadantes de los ensayos de supresión medidos por ELISA de captura. Análisis estadístico de tres experimentos independientes. B) Medición de la proliferación de LT efectores de ratones F1 (AND x B10.BR) en presencia del medio condicionado del ensayo de supresión realizado a una razón 5/1 (LTregs/LT). Timocitos de ratones F1 se marcaron con CFSE 5 μ M y se cocultivaron por 4 días con DCs maduras derivadas de bazo de ratones F1 en presencia de péptido PCC 2,5 μ M más 300 μ l del medio condicionado (proveniente del sobrenadante con la mayor concentración de IL-10) del ensayo de supresión. El experimento control no contiene el medio condicionado de los ensayos de supresión.

3.4 Los LTregs generados *ex vivo* de ratones F1 requieren activación antígeno-específica para suprimir pero una vez activados, pueden suprimir de modo antígeno no-específico.

Para determinar la especificidad antigénica de los LTregs generados, se evaluó la capacidad de los LTregs F1 (específicos para el péptido PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴) de suprimir la proliferación de LTef de ratones OT-II (específicos para el péptido OVA³²³⁻³³⁹) en presencia de APCs (DCs maduras derivadas de bazo) más el péptido OVA³²³⁻³³⁹. Adicionalmente, se realizó el mismo experimento pero agregando ambos péptidos a los pozos de co-cultivo. Este experimento se realizó con el objetivo de determinar si la activación del LTreg o su actividad supresora es un proceso dependiente de antígeno. Como se ilustra en la figura 8A, los LTregs provenientes de la cepa F1 no son capaces de suprimir la proliferación de LTef provenientes de la cepa OT-II en presencia del péptido OVA³²³⁻³³⁹ en ninguna dosis. Sin embargo, los LTregs F1 pueden suprimir la proliferación antígeno específica de LTef OT-II exclusivamente cuando los LTregs se encuentran en presencia de su péptido específico PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴ (Figura 8B). Este efecto es dependiente de la cantidad de LTregs en el ensayo. Estos resultados sugieren que la activación del LTreg es dependiente de antígeno mientras que la actividad supresora no lo es.

Adicionalmente, se detectó altas cantidades de IL-10 en los sobrenadantes de todos los ensayos de supresión sugiriendo que, esta citoquina, por sí sola, no es capaz de suprimir la proliferación de LTefs, sin embargo esto no descarta la posibilidad que esta citoquina pudiera actuar sobre los linfocitos inocentes (bystander) (Figura 9).

Razón LTreg F1/ LT efector OVA + OVA³²³⁻³³⁹



Razón LTreg F1/ LT efector OVA + OVA³²³⁻³³⁹ + PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴

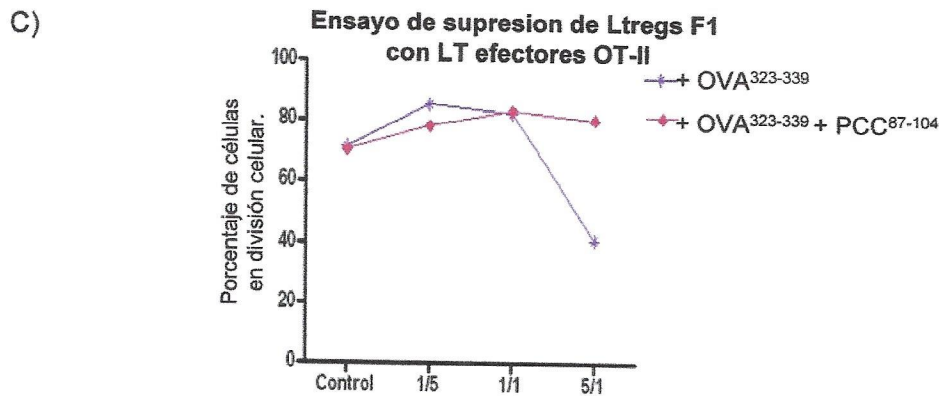
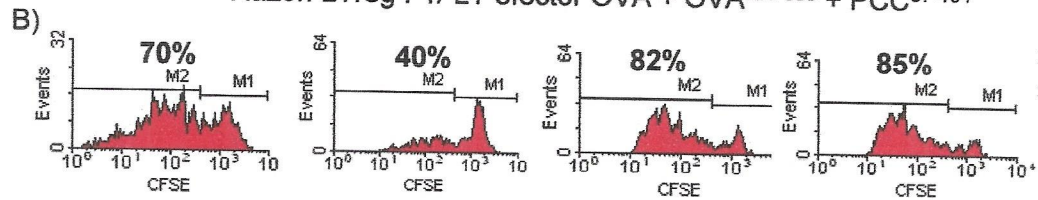


Figura 8: La activación del linfocito T regulador es un proceso dependiente de antígeno, sin embargo su actividad supresora no lo es. Timocitos de ratones OT-II se marcaron con CFSE 5 μ M y cocultivaron con DCs maduras de bazo de ratones F1 (AND x B10.BR) en ausencia o presencia de LTregs F1 en 3 cantidades decrecientes (LTregs/LT: 5/1; 1/1; 1/5). La proliferación de LT efectores se determinó al cuarto día de cocultivo por citometría de flujo (A) Ensayo de supresión en ausencia (control sin LTregs) o presencia de LTregs F1 en presencia del péptido OVA³²³⁻³³⁹ 1 μ M. (B) Ensayo de supresión en ausencia (control sin LTregs) o presencia de LTregs F1 en presencia del péptido OVA³²³⁻³³⁹ 1 μ M más el péptido PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴ 2,5 μ M. C) Los datos mostrados en A y B se graficaron en función del porcentaje de células en división celular. Los datos graficados son representativos de 2 experimentos independientes.

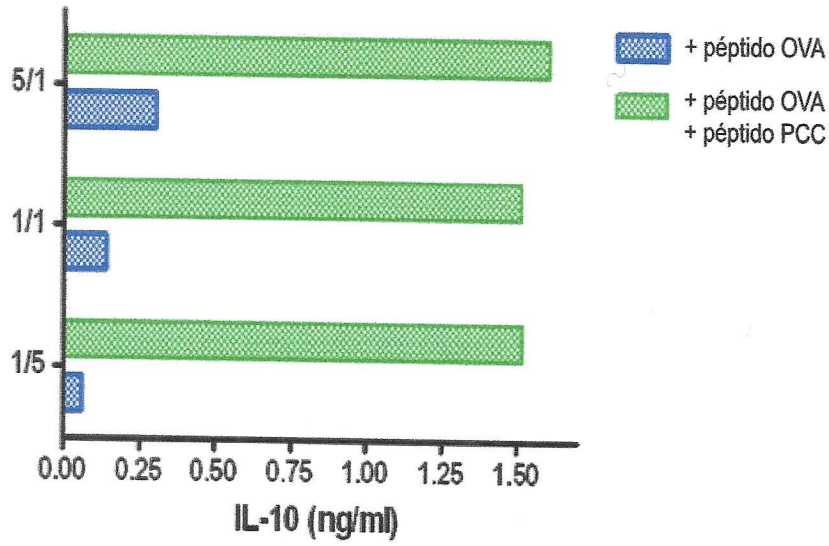


Figura 9: Producción de IL-10 durante el ensayo de supresión con linfocitos T OT-II. Se determinó la secreción de IL-10 en los sobrenadantes de los ensayos de supresión descritos en la figura 6 por ELISA de captura.

4. DISCUSIÓN

Muchas preguntas acerca de cómo y dónde se generan los linfocitos T reguladores permanecen hoy en día sin responder. En esta memoria de título presentamos evidencia que avala que los linfocitos T reguladores pueden ser inducidos y/o convertidos a partir de linfocitos T vírgenes mediante el cocultivo con células dendríticas inmaduras. Aunque los factores que determinan el potencial de una célula dendrítica de inducir linfocitos T reguladores aún no han sido determinados, la ausencia de secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células dendríticas inmaduras generadas con el protocolo de nuestro laboratorio, ha sido relacionada en la generación de linfocitos T reguladores (Jonuleit y col, 2001). Estas células dendríticas expresan bajos niveles de las moléculas de histocompatibilidad y de la molécula coestimuladora CD86, aunque expresan altos niveles de la molécula coestimuladora CD80. CD86 y CD80 en la célula dendrítica son ligandos de CD28 y CTLA-4 en el linfocito T. Experimentos en células dendríticas humanas han mostrado que la expresión diferencial de CD86 y CD80 podría determinar el balance entre activación o inhibición de la respuesta inmune modificando la potencia de los LTregs (Zheng y col, 2004). El bloqueo de CD86 inhibe la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4(+) en presencia de LTregs mientras que el bloqueo de CD80 aumenta esta respuesta sugiriendo que CD86 interfiere con la capacidad supresora del LTreg mientras que CD80 la activa. Por otra parte, análisis de modelamiento molecular y experimentos funcionales han mostrado que CD80 es un ligando más afín a CTLA-4 que CD86 (Zheng y col, 2004). De este modo la interacción CD86-CD28 representa una fuerte señal que interfiere con la función inhibitoria del LTreg mientras que CD80

promueve la función reguladora a través de la interacción con CTLA-4 en el LTreg (Zheng y col, 2004). Estos antecedentes están en concordancia con el fenotipo de las células dendríticas inmaduras generadas en esta memoria de título y con la producción de linfocitos T con actividad reguladora mostrada en este trabajo.

Los ensayos fenotípicos y funcionales de los LTregs generados en esta memoria de título con células dendríticas inmaduras *ex vivo* son consistentes con los descritos para los linfocitos T reguladores naturales tanto en la expresión de CD25 como de Foxp3 (Figura 4 y Figura 5). Trabajos relacionados con la generación de linfocitos T reguladores *ex vivo* a través del cocultivo con células dendríticas inmaduras en humanos han mostrado que es posible generar LTregs del tipo Tr1 similares a los generados en la periferia, los cuales no expresan Foxp3 y suprimen a través de la secreción de IL-10 (Levings y col, 2005). En ratones, se ha observado un comportamiento similar y estas células supresoras han mostrado inhibir la colitis mediada por linfocitos T *in vitro* en *in vivo* (Gad y col, 2004). Las diferencias con el trabajo aquí presentado radica en que en esta memoria de título se muestra que las DCs inmaduras tienen la capacidad de generar LTregs Foxp3⁺ que suprimen por contacto directo y que se asemejan mas a LTregs naturales que a LTregs del tipo Tr1. Este hecho puede tener tres explicaciones posibles: en primer lugar, los LTregs generados en este trabajo provienen de LT vírgenes de timo y se sabe que los LTregs naturales son generados en el timo durante el desarrollo embrionario (von Boehmer 2005). Por otra parte, las DCs utilizadas en la generación de LTregs *ex vivo* en los trabajos anteriormente mencionados, incluyen la adición de IL-10 en la generación de las DCs. La presencia de esta citoquina en los cultivos de DCs podría modular el fenotipo de los LTregs generados, a diferencia de las DCs ocupadas en este trabajo, las cuales secretan bajas cantidades de esta citoquina en las condiciones del cultivo

establecidas por nosotros. Finalmente, en este trabajo utilizamos un modelo transgénico para la generación de LTregs. En este sistema, todos los linfocitos T poseen el mismo TCR y todos reconocen el mismo antígeno por lo tanto, esta condición podría favorecer la generación de una población homogénea de LTregs.

En este trabajo también mostramos que los LTregs generados poseen actividad supresora y suprimen la proliferación de linfocitos T efectores de la misma cepa de modo dosis dependiente (Figura 5A). Este efecto supresor no se manifiesta cuando se utilizan LT vírgenes en lugar de LTregs, confirmando que la supresión observada *in vitro* es una capacidad intrínseca de los LTregs (Figura 5B). Sin embargo, es necesario una alta cantidad de LTregs generados *ex vivo* para suprimir la proliferación de LT efectores *in vitro* en forma eficiente ($\geq 5/1$ LTreg/ LTefector). Esto diferencia a los LTregs generados *ex vivo* en este trabajo con los LTregs naturales que pueden purificarse directamente del bazo de un ratón, ya que se requiere un número muy bajo de estos LTregs naturales para suprimir la proliferación de LT efectores *in vitro* (la supresión puede ser observada en razones $\leq 1/1$ Ltreg/LTefector (Tang y col, 2004)). Aunque esto puede parecer una desventaja, el protocolo aquí presentado permite obtener un número mayor de LTregs a partir del timo de un ratón de los que originalmente se pueden recuperar del bazo y evita los costosos experimentos de purificación de esta población.

Por otra parte, mostramos que IL-10 está presente en los ensayos en los que los LTregs suprimieron la proliferación de LT efectores (Figura 7A) sugiriendo que esta citoquina pudiera estar relacionada con el mecanismo de supresión. Sin embargo, esta citoquina (así como otros factores solubles) por sí sola no es capaz de detener la proliferación de LT efectores (Figura 7B) indicando que los LTregs generados *ex vivo*

suprimen por mecanismos dependientes de contacto, del mismo modo que los LTregs naturales. Aunque esta citoquina pareciera no tener una función importante en la supresión *in vitro*, no obstante tiene una función esencial en la supresión *in vivo* (von Boehmer 2005).

Con el objetivo de determinar la especificidad antigénica de los LTregs generados *ex vivo*, analizamos si los LTregs de la cepa F1 que reconocen exclusivamente el péptido 83-104 del citocromo C de paloma, podían suprimir la proliferación de LT efectores de ratones OT-II, los cuales reconocen el péptido 323-339 de ovalbúmina (Figura 8). Observamos que los LTregs F1 suprimen la proliferación de LT efectores de la cepa OT-II en respuesta a OVA sólo si están en presencia de su antígeno específico PCC. Esto indica que la activación del LTreg es un proceso dependiente de antígeno, pero una vez activado, puede suprimir la proliferación de LT efectores de cualquier especificidad. Este fenómeno, conocido como “supresión de los inocentes” (bystander suppression), posee gran potencial terapéutico, sobre todo en la inducción de tolerancia mediante antígenos orales. Un trabajo publicado por el grupo de Roncarolo y cols (Groux y col, 1997), muestra que LTregs del tipo Tr1 específicos para OVA suprimen la colitis en ratones, exclusivamente cuando se administra la proteína OVA en el agua, mostrando que los LTregs deben ser activados con su antígeno específico para ser funcionales *in vivo* y sugiriendo que esta población puede suprimir la respuesta inmune a antígenos desconocidos presentes en el microambiente intestinal por un mecanismo de “supresión de los inocentes” a través de otros antígenos dirigidos a LTregs.

Finalmente, encontramos altas cantidades de IL-10 en los sobrenadantes de los ensayos de supresión de inocentes (Figura 9) lo cual confirma la hipótesis de

que esta citoquina, si bien no posee una función *in vitro*, estaría estrechamente relacionada en el mecanismo de supresión *in vivo*.

En resumen, en este trabajo entregamos evidencia de que las células dendríticas inmaduras pueden generar linfocitos T reguladores a partir de linfocitos T vírgenes. Estos linfocitos adquieren un fenotipo de linfocito T regulador natural debido a la expresión de Foxp3 y actúan mediante un mecanismo de supresión dependiente de contacto. Además, una vez activados, estos linfocitos T reguladores suprimen la respuesta inmune a otros antígenos desconocidos.

Este conocimiento acerca de la generación, activación y supresión de los linfocitos T reguladores es importante en el futuro diseño de inmunoterapias que puedan ser usadas en la inducción de tolerancia a trasplantes, enfermedades autoinmunes, tratamiento de alergias e inducción de tolerancia en la enfermedad de injerto contra huésped, entre otros.

5. CONCLUSIONES

- Linfocitos T vírgenes de ratón F1 transgénico cocultivados en presencia de células dendríticas inmaduras y el péptido específico, se diferencian a una población homogénea de linfocitos T reguladores al día 4 de cocultivo.
- Las células dendríticas inmaduras imprimen un fenotipo de linfocito T regulador caracterizado por la expresión de los marcadores de linfocitos T reguladores CD25 y CD62L y por la expresión de CD25 y Foxp3. Este fenotipo es exclusivamente adquirido en el cocultivo con células dendríticas del tipo inmaduro.
- Funcionalmente, los LTregs, en presencia de su antígeno específico, suprimen la proliferación de linfocitos T efectores isogénicos de un modo dosis dependiente.
- IL-10 está presente en el sobrenadante de los ensayos de supresión, sin embargo, esta citoquina, y otros probables factores solubles por sí solos no son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectores, sugiriendo que es necesario el contacto directo entre el linfocito T regulador y el linfocito T efector en el mecanismo de supresión *in vitro*.
- Los linfocitos T reguladores generados *ex vivo* específicos para un antígeno son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectores en respuesta a otro antígeno siempre y cuando el linfocito T regulador sea activado con su propio antígeno. Esto indica que la activación del linfocito T regulador es un proceso dependiente de antígeno, pero que su actividad supresora no lo es.

6. REFERENCIAS

- Barnden, M. J., J. Allison, et al. (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements." Immunol Cell Biol **76**(1): 34-40.
- Gad, M., N. N. Kristensen, et al. (2004). "Characterization of T-regulatory cells, induced by immature dendritic cells, which inhibit enteroantigen-reactive colitis-inducing T-cell responses *in vitro* and *in vivo*." Immunology **113**(4): 499-508.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Horwitz, D. A., S. G. Zheng, et al. (2004). "Regulatory T cells generated *ex vivo* as an approach for the therapy of autoimmune disease." Semin Immunol **16**(2): 135-43.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (1999). "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells." J Exp Med **190**(2): 229-39.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2001). "Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells." Trends Immunol **22**(7): 394-400.
- Kaye, J., M. L. Hsu, et al. (1989). "Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor." Nature **341**(6244): 746-9.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, et al. (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." Nat Immunol **6**(12): 1219-27.
- Levings, M. K., S. Gregori, et al. (2005). "Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells." Blood **105**(3): 1162-9.
- Masteller, E. L., Q. Tang, et al. (2006). "Antigen-specific regulatory T cells-*Ex vivo* expansion and therapeutic potential." Semin Immunol **18**(2): 103-10.
- Paust, S., L. Lu, et al. (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10398-403.

- Pino, K. (2005). "Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas de médula ósea." Memoria de título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." Nat Immunol **6**(4): 345-52.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, et al. (2004). "*In vitro*-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." J Exp Med **199**(11): 1455-65.
- Verginis, P., H. S. Li, et al. (2005). "Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells." J Immunol **174**(11): 7433-9.
- Vlad, G., R. Cortesini, et al. (2005). "License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC." J Immunol **174**(10): 5907-14.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol **6**(4): 338-44.
- von Herrath, M. G. and L. C. Harrison (2003). "Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity." Nat Rev Immunol **3**(3): 223-32.
- Wood, K. J. and S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." Nat Rev Immunol **3**(3): 199-210.
- Zheng, Y., C. N. Manzotti, et al. (2004). "CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells." J Immunol **172**(5): 2778-84.

