

UCH-FC
MAG-B
M285
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Efecto de macrófagos derivados de la médula ósea en la reprogramación de linfocitos Th17 murinos

Tesis entregada a la Universidad De Chile en Cumplimiento Parcial
de los requisitos para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Valeria Manriquez Rojas

Diciembre, 2014

Directores de Tesis:
Dra. María Rosa Bono
Dr. Mario Rosemblatt

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

Valeria Victoria Manriquez Rojas

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de Diciembre, 2014.

Directora de Tesis:

Dra. María Rosa Bono

Co-Director de Tesis:

Dr. Mario Rosemblatt

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Álvaro Glavic

Dra. Verónica Palma



María Rosa Bono
.....
Mario Rosemblatt
.....
Álvaro Glavic
.....
Verónica Palma
.....

Si buscas resultados distintos,
No hagas siempre lo mismo.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Finalizando esta larga etapa por el laboratorio de Inmunología, me gustaría agradecer a todas las personas que día a día me enseñaron y me contuvieron para que, a pesar de las dificultades, pudiera sacar este trabajo adelante.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. María Rosa Bono, quien como directora de esta tesis, me ha orientado y apoyado durante todo este proceso, haciendo hasta lo imposible para que este trabajo haya finalizado de la mejor manera posible. Gracias por permitirme trabajar a su lado y darme todas las oportunidades para seguir creciendo como científica. También me gustaría agradecer al Dr. Mario Roseblatt, quien siempre depositó su confianza en mí y me hizo sentir que era capaz. Se agradece su buen humor y su mirada crítica. A ambos, muchas gracias por todo!

En especial me gustaría agradecer a los miembros de mi comisión, Alvaro Glavic y Verónica Palma, por su disposición y permitir que lo imposible se hiciera posible. Gracias por su valiosa discusión de esta tesis y por el tiempo designado a hacer de este, un mejor trabajo.

Me gustaría agradecer en particular a dos grandes científicas. A Gabriela Tejón por ser mi compañera, por brindarme además de su mirada crítica, una linda amistad. Espero que todo lo que te depare el futuro sea espectacular!. A Daniela, por escucharme y aconsejarme de manera muy acertada. Ambas son muy inteligentes y no me cabe duda que llegaran muy lejos!

Como no agradecer a la familia del inmunolab, quienes día a día me ayudaron, me subieron el ánimo y con los cuales compartimos hermosos momentos. En general agradecer a Natalia, Camila, Domi, Felipe, Coté, Jaime, Daniel, Yessia, Sarah, Pablo y Paula. Al Leito, por ser un amigo, con el cual fue posible conversar, reírse y llorar.. eres el alma del laboratorio y espero que nada ni nadie te haga cambiar.

Agradecer a Pame, Zoilis y Oscar, por ser personas súper sinceras, transparentes y por entregarme tanto cariño. Los llevo en mi corazón y siempre los recordaré.

Agradecer a todos mis grupos de amigos, "las amiguitas", "las vivís", "los bachi" y "los biotek", por subirme el ánimo en los momentos de frustración y disfrutar conmigo en los momentos de alegría.

Agradecer a Enrique, mi compañero de vida, por cuidarme, por amarme y aceptarme. Gracias por incentivar me a seguir aprendiendo de todas las ciencias, por enseñarme otra visión de la vida y por caminar conmigo hacia adelante.

Finalmente y no menos importante, agradecer a mi familia, quienes son el motor de mi vida, mi apoyo incondicional y lo mas preciado que tengo. Los amo papá, mamá, Daniel e Ignacio. Gracias infinitas por todo!

A todos, muchas gracias y au revoir!

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 Introducción al sistema inmune.....	1
1.1.2 Linfocitos T reguladores	3
1.1.3 Linfocitos Th17	6
1.1.4 Plasticidad en linfocitos T CD4 ⁺	9
1.1.5 Células de la médula ósea y linfocitos T CD4+	11
1.2 HIPÓTESIS	15
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	15
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 MATERIALES	16
2.1.1 Animales.....	16
2.1.2 Anticuerpos	16
2.1.3 Reactivos.....	17
2.2 MÉTODOS	18
2.2.1 Cultivo de células de la médula ósea	18
2.2.2 Purificación de células dendríticas (DCs).....	19
2.2.3 Purificación de linfocitos T vírgenes (CD4+ CD25-).....	20
2.2.4 Generación de linfocitos T reguladores y linfocitos Th17.....	21
2.2.5 Marcaje celular y citometría de flujo.....	22
2.2.6 Separación de linfocitos Th17 generados in vitro mediante <i>cell sorting</i>	23
2.2.7 Reprogramación de linfocitos Th17 <i>in vitro</i>	24
2.2.8 Efecto de macrófagos derivados de la médula ósea <i>in vivo</i>	25

2.2.9 Detección de citoquinas mediante CBA (Cytometric Bead Array)	25
2.2.10 Aislamiento de las células de lámina propia de intestino	26
2.2.11 Análisis Estadístico	27
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Caracterización de células estromales de médula ósea	28
3.2 Efecto de los macrófagos derivados de la médula ósea en la generación linfocitos Treg	33
3.3 Efecto de los macrófagos derivados de médula ósea en la generación de linfocitos Th17	35
3.4 Efecto de los macrófagos derivados de médula ósea sobre la proliferación de los linfocitos Treg y Th17	38
3.5 Reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg en presencia de macrófagos derivados de la médula ósea	40
3.6 Mecanismos involucrados en la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg	43
3.7 Efecto de los macrófagos derivados de la médula ósea <i>in vivo</i>	45
4-. DISCUSIÓN	51
4.1. Caracterización de células estromales de médula ósea	51
4.2 Reprogramación de linfocitos Th17 en Treg	58
4.6 Efecto de los macrófagos derivados de médula ósea <i>in vivo</i>	62
5-. RESUMEN DE RESULTADOS	66
6. CONCLUSION	67
7. REFERENCIAS.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación y reprogramación de linfocitos T CD4+	2
Figura 2. Efecto de las citoquinas inflamatorias en la generación de linfocitos Th17	8
Figura 3. El cultivo de células estromales de médula ósea favorece el enriquecimiento de macrófagos.....	30
Figura 4. Los macrófagos en P2 presentan un fenotipo regulador.	32
Figura 5. Macrófagos cultivados a partir del estroma de médula ósea favorecen la diferenciación a linfocitos Treg	34
Figura 6. Macrófagos cultivados a partir del estroma de médula ósea inhiben la diferenciación a Th17	37
Figura 7. Los macrófagos retardan la proliferación de los linfocitos Th17 pero no de los linfocitos Treg.....	39
Figura 8. Linfocitos Th17 murinos pueden reprogramarse a linfocitos Treg en presencia de macrófagos cultivados a partir del estroma de médula ósea.....	42
Figura 9. La reprogramación de linfocitos Th17 a Treg depende de un mecanismo que depende del contacto celular	44
Figura 10. Protocolos experimentales para determinar el efecto de los macrófagos <i>in vivo</i>	46
Figura 11. Los macrófagos obtenidos del estroma de médula ósea disminuyen la inflamación mediada por α -CD3 <i>in vivo</i>	47
Figura 12. El tratamiento de la inflamación intestinal con macrófagos <i>in vivo</i> induce un aumento linfocitos Treg pero no afectan el porcentaje de Th17.	49

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Porcentaje de diferentes tipos celulares presentes en los distintos pasajes del cultivo de células estromales de médula ósea de ratón. . . .	29
--	----

ABREVIATURAS

α MEM: Medio mínimo esencial alfa (*Alfa Minimum Essential Medium*)

APC: Células Presentadoras de Antígeno (*Antigen Presenting Cell*)

β -ME: Beta-mercaptoetanol

CD11b: Integrina alfa M (*Cluster of differentiation 11b*)

CD39: Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa 1 (*Cluster of differentiation 39*)

CD73: Ecto-5'-nucleotidasa (*Cluster of differentiation 73*)

CD80: Cúmulo de diferenciación (*Cluster of differentiation 80*)

CD86: Cúmulo de diferenciación (*Cluster of differentiation 86*)

DC: Células Dendríticas (*Dendritic Cell*)

Foxp3: *Forkhead box 3*

GFP: Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

IFN γ : Interferón gama

IL: Interleuquina

IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

i.p: Intrapritonial

LP: Lamina Propia

LTv: Linfocitos T vírgenes

MDSC: Células mieloides supresoras (*Myeloid-derived Supresor Cells*)

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

MLN: Linfonodo mesentérico (*Mesenteric Lymph Nodes*)

MSC: Células mesenquimáticas (*Mesenchymal Stem Cells*)

MØ: Macrófagos

PDL-1: *Programmed death-ligand 1*

PLN: Linfonodos periféricos (*Peripheral Lymph Nodes*)

PMA: *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*

RA: Ácido retinoico (*Retinoic Acid*)

SEM: Error estandar de la media (*Standard Error of the Mean*)

SFB: Suero fetal bovino

TCR: Receptor de linfocitos T (*T Cell Receptor*)

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factors*)

Treg: Linfocitos T reguladores

RESUMEN

Los linfocitos T vírgenes CD4+ pueden diferenciarse, dependiendo de las condiciones presentes en el microambiente, tanto en linfocitos T efectores (Th1, Th2, Th17) como en linfocitos T reguladores (Treg), adquiriendo funciones, patrones de citoquinas y genes reguladores maestros característicos. En la actualidad, se ha acumulado evidencia que indica que los linfocitos T CD4+ diferenciados pueden reprogramarse y adquirir el fenotipo de otro subgrupo de linfocitos T CD4+. Bajo este contexto, se ha observado que a los linfocitos Treg y los linfocitos Th17, son los linfocitos que presentan mayor plasticidad. Así, se ha demostrado que linfocitos Treg pueden reprogramarse a linfocitos Th17 en un ambiente inflamatorio, perdiendo la expresión de FoxP3 (el gen regulador maestro característico de este linaje) y adquiriendo el fenotipo y la función característica de linfocitos Th17. Sin embargo, no hay evidencia de que los linfocitos Th17 murinos se reprogramen a linfocitos Treg. Estudios recientes en humanos han planteado que los linfocitos Th17 pueden reprogramarse *in vitro* a linfocitos Treg en presencia de células troncales mesenquimáticas (MSC) o células mieloides supresoras (MDSC).

En este trabajo, se estudió el efecto de células estromales de médula ósea en la reprogramación de linfocitos Th17 murinos *in vitro*. Nuestros resultados demuestran que los linfocitos Th17 pueden reprogramarse a linfocitos T reguladores (Treg) en presencia de macrófagos provenientes de la médula ósea. La reprogramación de los linfocitos Th17 requiere de un mecanismo que depende del contacto celular mientras que la estabilidad de los linfocitos Th17 se ve afectada por factores solubles secretados por los macrófagos. Estos resultados contribuyen al conocimiento de los

mecanismos utilizados por el sistema inmune para mediar inmunidad y tolerancia, por lo que deberían ser considerados en el diseño de futuras terapias celulares.

ABSTRACT

Depending on the conditions present in the microenvironment, naive CD4⁺ T cells can differentiate into distinct T helper subsets (Th1, Th2, Th17 cells) and regulatory T cells (Tregs), which present different functions, cytokine secretion patterns and characteristic master regulatory genes. Accumulating evidence suggests that Tregs and helper T cells can be reprogrammed and acquire the phenotype of other CD4⁺ T cell subsets. In this context, it has been observed that among T helper subsets, Tregs and Th17 cells exhibit the highest level of plasticity. Moreover, it has been shown that Tregs can be reprogrammed to Th17 cells in an inflammatory environment, losing FoxP3 expression (a master regulator gene characteristic of this lineage) and acquiring the phenotype and functions associated to Th17 cells. However, there is no evidence of Th17 cell reprogramming to a Treg phenotype in a murine model. Recent studies in humans have raised this possibility by demonstrating that Th17 cells can be reprogrammed to Tregs *in vitro* in the presence of mesenchymal stem cells (MSC) or myeloid-derived suppressor cells (MDSC).

In this work, we studied the effect of bone marrow stromal cells in reprogramming murine Th17 cells *in vitro*. Our results demonstrate that Th17 cells can be reprogrammed to Tregs in the presence of bone marrow-derived macrophages. Furthermore, our data show that Th17 cell reprogramming depends on cell contact, while the stability of Th17 cells is affected by soluble factors secreted by macrophages. Our results contribute to the understanding of the mechanisms used by the immune system to mediate immunity and tolerance, and therefore should be considered in the future design of cellular therapies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 Introducción al sistema inmune

El sistema inmune es el encargado de proteger al organismo de los múltiples patógenos que existen en el medio ambiente. Además, es el responsable de mantener la tolerancia a moléculas propias y a moléculas extrañas que no representen un peligro para la integridad del individuo. Para llevar a cabo estas funciones, diferentes tipos de células participan eliminando organismos dañinos e iniciando una respuesta inmune adaptativa. En las mucosas encontramos células especializadas en la presentación de antígenos (APC), las cuales frente a la presencia de un organismo extraño, lo fagocitan, lo procesan y viajan al linfonodo más cercano para presentar péptidos en moléculas de histocompatibilidad (MHC) que son reconocidas por linfocitos T a través de un receptor específico llamado TCR (*T Cell Receptor*) (Abbas y cols., 2008).

El linfocito T CD4+ vírgen, una vez activado, es capaz de diferenciarse en al menos cuatro subgrupos de linfocitos T caracterizados por su patrón de secreción de citoquinas, función y un gen regulador maestro (Figura 1). Tres de estos subgrupos se generan y funcionan bajo condiciones inflamatorias y son conocidos como linfocitos Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos Th1 forman parte de la inmunidad celular combatiendo microorganismos intracelulares, mientras que los linfocitos Th2 forman parte de la inmunidad humoral encargándose del control de helmintos y microorganismos extracelulares. Los linfocitos Th17 por su parte, cumplen un importante papel en la eliminación de bacterias extracelulares y hongos (Zhou y cols., 2009). Un cuarto subgrupo, denominados linfocitos T reguladores (Treg), se produce en ausencia de

citoquinas inflamatorias y participan suprimiendo la proliferación de linfocitos T efectores. De esta manera, los linfocitos T reguladores son los principales protagonistas en los procesos de Tolerancia Inmunogénica (Sakaguchi y cols., 2008).

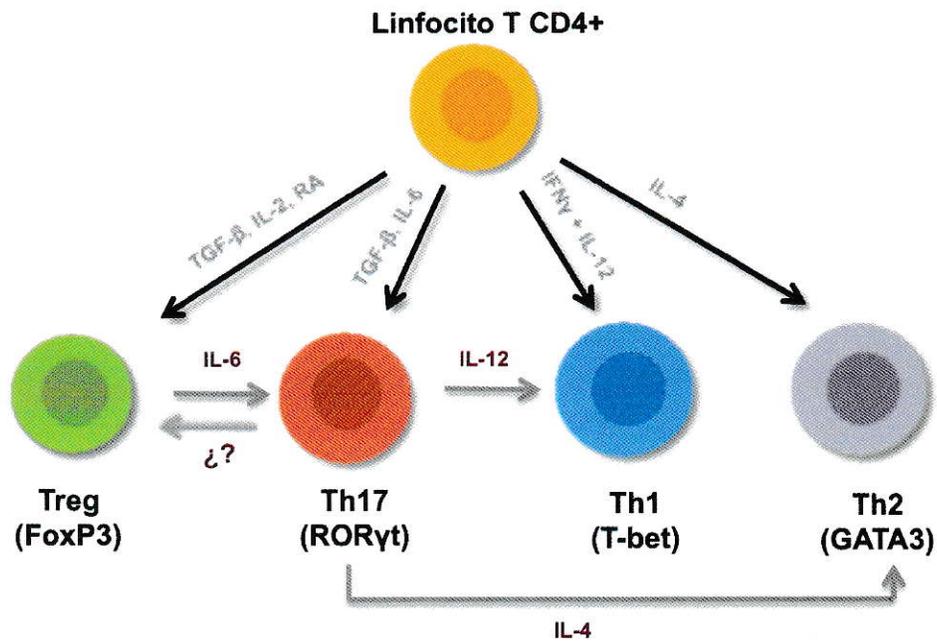


Figura 1. Diferenciación y reprogramación de linfocitos T CD4+. Los linfocitos T CD4+ vírgenes una vez que reconocen el antígeno presentado por células dendríticas pueden ser diferenciados a linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg. Estos programas de diferenciación están controlados por citoquinas producidas por las células del microambiente. En plomo, se observan las citoquinas mínimas para la diferenciación a cada linaje linfocitario y entre paréntesis, el factor de transcripción que los caracteriza. Se ha observado que estos linfocitos T CD4+ presentan gran plasticidad, debido a que en presencia de un patrón particular de citoquinas (en rojo), pueden reprogramarse a otros linajes linfocitarios.

1.1.2 Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores son los responsables de mantener la homeostasis celular al inducir tolerancia a antígenos (propios y extraños) y prevenir enfermedades autoinmunes al suprimir linfocitos T autoreactivos. Este linaje de linfocitos T CD4+ se caracterizan por la expresión de CD25 y el factor de transcripción FoxP3 (*Forkhead box P3*), el cual regula su desarrollo y función (Campbell y Koch., 2011; Sakaguchi y cols., 2005; Sakaguchi y cols., 2008; Wang y cols., 2008).

Estos linfocitos T CD4+ FoxP3+ pueden originarse tanto en el timo a partir de un fino proceso de selección denominándose linfocitos T reguladores naturales o tímicos (nTreg), o bien a partir de linfocitos T vírgenes CD4+ presentes en los órganos linfoides periféricos, y a estos se les llama linfocitos Treg inducibles (iTreg) (Curotto de Lafaille y Lafaille, 2009).

La diferenciación de linfocitos vírgenes T CD4+ a iTreg ocurre cuando la presentación de antígeno la realizan células presentadoras de antígenos tolerogénicas en presencia de citoquinas como TGF- β , IL-2 y ácido retinoico (RA) (Bi-man Fu y cols., 2009; Kim y Diamond., 2014).

Se ha demostrado que las células dendríticas del intestino pueden presentar un fenotipo tolerogénico y se caracterizan por expresar bajos niveles de moléculas MHC-II y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, producir en altas cantidades de IL-10 y bajas cantidades de las citoquinas inflamatorias IL-1, IL-6 o IL-12 (Bi-man Fu y cols., 2009; Kim y Diamond., 2014). Además existen otras moléculas en las células dendríticas que pueden participar en los procesos de activación de linfocitos

T, como PDL-1. Este receptor al unirse a su ligando PD-1 en linfocitos T, transmite una señal inhibitoria que reduce la proliferación (Freeman y cols., 2000).

Por otra parte, se ha determinado que tanto las células presentadoras de antígenos, como otras células del sistema inmune podrían generar un microambiente tolerogénico, secretando factores y citoquinas que favorecen la diferenciación de linfocitos T vírgenes a iTreg. Uno de los factores de polarización más importantes es TGF- β , un citoquina que posee funciones pleitrópicas en una amplia gama de linajes celulares y que en ausencia de citoquinas inflamatorias, es capaz de inducir la expresión del factor de transcripción FoxP3 en linfocitos T vírgenes, e inducir la señalización mediada por las proteínas Smad2, Smad3 y Smad4 (Feng y Derynck., 2005).

Se han descrito otras citoquinas y/o moléculas, además de TGF- β , que favorecen la generación de linfocitos T reguladores, siendo IL-2 y ácido retinoico (RA) los más estudiados. La interacción de IL-2 con su receptor, permite la transcripción del factor de transcripción Stat5, el cual favorece posteriormente la expresión de FoxP3, promoviendo, en conjunto con TGF- β , la diferenciación hacia linfocitos T reguladores (Burchill y cols, 2007). RA por su parte, es un metabolito de la vitamina A que se encuentra fundamentalmente en el intestino. RA induce la acetilación del promotor de FoxP3 y su posterior transcripción génica (Kim, 2008). La acción conjunta de TGF- β y RA, aumenta el número de linfocitos T reguladores y a su vez, le otorgan mayor estabilidad *in vivo* e *in vitro*, en comparación a los linfocitos que sólo se generan en presencia de TGF- β . (Mucida y cols., 2007).

La expresión del factor de transcripción FoxP3 en linfocitos T vírgenes, produce a su vez, un aumento de expresión de moléculas de superficie como CD39 y CD73, que forman parte de los mecanismos a través de los cuales los linfocitos T reguladores ejercen su función supresora (Sakaguchi y cols., 2008; Borsellino y cols., 2007; Wang y cols., 2008).

CD39 es una ectoenzima que hidroliza ATP/UTP y ADP/UDP a sus respectivos nucleósidos monofosfatos, AMP Y UMP. La expresión coordinada de CD39 con la ectoenzima CD73 en la superficie de linfocitos T reguladores, permite generar adenosina pericelular a partir de nucleósidos extracelulares, la cual va a interactuar con el receptor de adenosina A2A presente en linfocitos T efectores activados, suprimiendo su proliferación (Deaglio y cols., 2007; Borsellino y cols., 2007). Además de cumplir un rol inmunosupresor, CD39 se ha descrito como un marcador de activación de células linfoides. La expresión de esta molécula aumenta cuando los linfocitos T reconocen un antígeno a través del TCR (Borsellino y cols., 2007; Maliszewki y cols., 1994). De esta manera, la expresión de CD39 permite determinar tanto el estado de activación de estas células, como la capacidad supresora que pueden llevar a cabo los Treg a través de la maquinaria enzimática y la producción de adenosina.

Los linfocitos Treg además son capaces de secretar citoquinas con propiedades antiinflamatorias como IL-10, que tienen la capacidad de contener la respuesta inmune al inhibir la síntesis de citoquinas inflamatorias (Ostmann y cols, 2013). Se ha descrito que esta citoquina juega un rol fundamental para apaciguar enfermedades inmunes relacionadas con los linfocitos Th17 y Th1, como la glomerulonefritis (Ostmann y cols, 2013) y la colitis (Huber y cols, 2011).

1.1.3 Linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 son un subgrupo de linfocitos T efectores encargados de la protección de los hospederos contra bacterias extracelulares y hongos, y participan en la homeostasis del intestino estimulando la expresión péptidos antimicrobianos y la secreción de mucina (Chen et al., 2003; Liang et al., 2006; Korn y cols., 2009). La activación inapropiada de estos linfocitos se ha asociado con enfermedades autoinmunes (artritis, psoriasis, esclerosis múltiple) y patologías inflamatorias crónicas (Symons et al., 2012), como las enfermedades inflamatorias intestinales (Waite and Skokos, 2012).

Los linfocitos Th17 se caracterizan por expresar el factor de transcripción ROR γ t y por producir las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Estos linfocitos se diferencian a partir de linfocitos T vírgenes activados, en presencia de al menos dos citoquinas: TGF- β e IL-6. Como ya describimos anteriormente, TGF- β tiene el potencial dual para inducir tanto la transcripción FoxP3 como de ROR γ t. De esta manera, el linaje linfocitario al cual se van a diferenciar los linfocitos T vírgenes en presencia de esta citoquina depende de los factores microambientales que acompañan este proceso. Bajo este contexto, la IL-6 es fundamental para bloquear la diferenciación a linfocitos T reguladores, favoreciendo la generación de linfocitos Th17. Específicamente, IL-6 induce la expresión de la proteína STAT3, la cual a su vez es capaz de actuar como un activador de la transcripción de ROR γ t y un represor de FoxP3 (Harris y cols., 2007; Zhou y cols., 2008).

Se han estudiado otras citoquinas que favorecen la diferenciación, el número y la estabilidad de los linfocitos Th17, entre las que destacan la IL-1 β , IL-23 e IL-21 (Figura 2).

IL-1 β es una citoquina que participa aumentando la expresión de ROR γ t y a su vez, de IL-17 (Chung y cols., 2009; Brustle y cols., 2007). La ausencia de IL-1 β o la función deficiente de su receptor, resulta en una disminución de linfocitos Th17 efectores, produciendo respuestas inflamatorias poco eficientes (Sutton y cols., 2006). Al igual que la IL-1 β , se ha descrito que IL-23 también regula positivamente la expresión de ROR γ t, pero a diferencia de IL-1 β , IL-23 tiene la capacidad de estabilizar y expandir los linfocitos Th17 (Zhou y cols., 2007). Esta función se lleva a cabo mediante la generación de señales que aumentan la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-17, IL-1, TNF e IL-6 y suprimen la producción de, citoquinas antiinflamatorias como IL-10 (Korn y cols., 2009). IL-21 por su parte, es una citoquina producida por los mismos linfocitos Th17 que puede actuar de manera autocrina favoreciendo la diferenciación a este linaje linfocitario. Al igual que IL-6, esta citoquina induce la expresión de STAT3 (Chen y cols., 2007) y la consecuente expresión de los factores de transcripción ROR γ t y ROR α (Yang y cols., 2008). Estudios *in vivo* han demostrado que linfocitos T CD4+ vírgenes activados en presencia de TGF- β e IL-21, son capaces de inducir una respuesta inflamatoria caracterizada por altos niveles de IL-17 y ROR γ t (Fantini y cols., 2007).

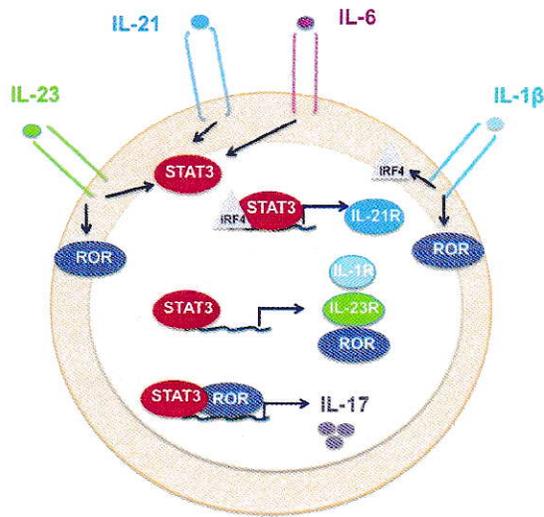


Figura 2. Efecto de las citoquinas inflamatorias en la generación de linfocitos Th17. La unión de IL-6 con su receptor induce la expresión de STAT3, el cual a su vez induce la expresión de los receptores de las citoquinas IL-21, IL-1 y IL-23, además de ROR γ t. Este último factor, en conjunto con STAT-3, induce la expresión de IL-17.

Recientemente, se han descrito dos subgrupos de linfocitos Th17 que se diferencian en las citoquinas involucradas en su diferenciación y la capacidad de inducir inflamación. El primer subgrupo se denomina linfocitos Th17 reguladores y se caracteriza por diferenciarse a partir de un linfocito T vírgen en presencia de TGF- β e IL-6, pero en ausencia de IL-23 (Peters y cols., 2011). Se ha descrito que estos linfocitos Th17 no participan en la generación de respuestas inflamatorias, si no por el contrario, son capaces de suprimir linfocitos T efectores a través de un mecanismo que involucra las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Al igual que los linfocitos Treg, los linfocitos Th17 reguladores tienen la capacidad de disminuir las respuestas inflamatorias a través de la producción de adenosina (Chalmin y cols., 2012).

El otro subgrupo de linfocitos Th17 corresponde a los linfocitos Th17 inflamatorios o patogénicos y se diferencian en un ambiente que contiene IL-6, IL-1 β e

IL-23, pero sin TGF- β (Peters y cols., 2011). Estos linfocitos inflamatorios no expresan en su superficie las ectonucleotidasas CD39 y CD73, por lo que no son capaces de suprimir linfocitos T efectores. Sin embargo, dada su capacidad de producir respuestas inflamatorias, son los principales actores en enfermedades autoinmunes (Chalmin y cols., 2012).

1.1.4 Plasticidad en linfocitos T CD4⁺

La diferenciación de linfocitos T vírgenes CD4⁺ a linajes con distintas funciones en la respuesta inmune, ha sido considerado un proceso reversible (Figura 1). Bajo este contexto, se ha determinado que particularmente, los linfocitos Treg y los linfocitos Th17, son los linajes que presentan mayor plasticidad (Zhou y cols., 2009).

En un proceso inflamatorio, como lo es la respuesta inmune frente a un patógeno, se producen diversas citoquinas inflamatorias que pueden actuar directamente sobre los linfocitos Treg, influyendo en su fenotipo y función supresora. Se ha reportado que IFN- γ e IL-12, citoquinas involucradas en la diferenciación de linfocitos Th1, son capaces de activar, en Treg, la expresión del factor de transcripción T-bet, característico de linfocitos Th1. La expresión conjunta de T-bet y FoxP3, permite que los linfocitos Treg supriman específicamente a los linfocitos Th1. Sin embargo, una mayor activación de T-bet en comparación a FoxP3, tiene un efecto deletéreo en la función de Treg, aumentando a su vez la actividad tipo Th1 (Lu y cols., 2010). De esta manera, se ha determinado que en presencia de IFN- γ e IL-12, los linfocitos Treg son capaces de reprogramar sus parámetros genéticos y convertirse en linfocitos que presentan características de linfocito Th1 (Campbell y Koch., 2011).

La IL-6 por su parte, puede actuar en la estabilidad y función de linfocitos nTreg y iTreg, induciendo la pérdida en la expresión de FoxP3 y la adquisición del fenotipo y función característica de linfocitos Th17 (Xu y cols.,2007; Yang y cols.,2008b). Esto se produce debido a que STAT3, inducido por IL-6, disminuye la expresión de FoxP3 a través de un mecanismo aún no dilucidado. (Xu y cols.,2007; Yang y cols.,2008b).

Los linfocitos Th17 por su parte, presentan gran plasticidad pudiendo reprogramar su patrón genético para expresar las características fenotípica y funcionales de los linfocitos Th1 y Th2. Se ha observado que al cocultivar linfocitos Th17 *ex vivo* en presencia de IFN- γ e IL-12, estos linfocitos co-expresan el factor de transcripción T-bet en conjunto con ROR γ t. Estos linfocitos Th1/Th17 por lo tanto, son capaces de combinar las funciones pro-inflamatorias de ambos subgrupos de linfocitos efectores, expresando tanto IL-17 como IFN- γ (Lexberg y cols., 2010). Por otro lado, se ha observado que linfocitos Th17 generados *in vitro*, pueden ser reprogramados a linfocitos Th2 en presencia de IL-4 (Lexberg y cols., 2008).

A diferencia de los otros procesos de reprogramación en linfocitos T CD4+, la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg no se produce en presencia de factores de polarización de linfocitos Treg como TGF- β , IL-2 y RA. Sin embargo, estudios en humanos, han demostrado *in vitro*, que los linfocitos Th17 pueden reprogramarse a linfocitos Treg en presencia de células estromales de médula ósea, como lo son las células troncales mesenquimáticas (MSC) o células mieloides supresoras CD14+ HLA-DR^{low} (MDSC). (Hoechst y cols., 2011; Ghannam y col., 2010). Si bien el mecanismo por el cual estas células podrían ejercer este efecto aún no se encuentra

completamente dilucidado, estos estudios plantean que estas células son capaces de crear un microambiente tolerogénico caracterizado por la presencia de IL-10 y TGF- β , que favorecería este proceso (Hoechst y cols., 2011; Ghannam y col., 2010).

1.1.5 Células de la médula ósea y linfocitos T CD4+

La médula ósea es un tejido que alberga una gran diversidad de células capaces de modular la respuesta inmune mediada por linfocitos T. En este trabajo, estudiamos en las células mesenquimáticas (MSC) y los macrófagos (M \emptyset) debido a que estas células tienen la capacidad de dirigir específicamente los procesos de diferenciación de Treg y Th17 en modelos murinos.

Las MSC son células multipotentes que tienen la capacidad de inhibir la diferenciación de linfocitos Th17 y la producción de citoquinas inflamatorias como IL-17, TNF- α e IFN- γ (Augello y cols., 2007; Ghannam y col., 2010; Le Blanc y Mougiakakos., 2012; Qu y cols., 2012). Por otra parte, se ha observado que las MSC favorecen la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos Treg y el aumento en la producción de factores inmunosupresores como IL-10,IDO y PGE2 (English y cols., 2009; Kavanagh y Mahon, 2011; Shi y cols., 2012).

Se ha observado que las MSC pueden además modular el fenotipo de otras células presentes en la médula ósea, como por ejemplo, los M \emptyset . El cultivo *in vitro* de MSC con M \emptyset , induce la expresión de un fenotipo regulador, los cuales secretan una gran cantidad de IL-10, expresan bajos niveles de MHC-II y producen una bajas cantidades de citoquinas inflamatorias como IL-12, TNF e IFN γ (Kim y Hematti., 2009; Le Blanc y Mougiakakos.,2012; Maggini y cols., 2010).

Los Mø son células fagocíticas que se originan a partir de monocitos circundantes en la sangre que tienen la capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T, iniciando y modulando la respuesta inmune adaptativa (Mazzini y cols., 2014; Mann y Li., 2014). Los Mø se caracterizan por co-expresar los marcadores CD11b y F4/80, y de acuerdo a las condiciones presentes en el microambiente durante el proceso de activación, ellos se pueden clasificar en Mø clásicamente activados o Mø alternativamente activados (Mooser D.M y Edwards J.P., 2008)

Los Mø clásicamente activados o macrófagos inflamatorios (M1) se activan en presencia de LPS y citoquinas inflamatorias como IFN γ y TNF, que pueden ser producidas tanto por células del sistema inmune innato, tales como *Natural killer*, o por células del sistema inmune adaptativo, como los linfocitos Th1. Cuando estos Mø son activados, secretan una gran cantidad de citoquinas inflamatorias como TNF e IL-12, bajas cantidades de IL-10, aniones superóxidos y radicales libres de oxígeno y nitrógeno que incrementan su habilidad para matar células u microorganismos (Heusinkveld, M. y cols., 2011; Martinez y Gordon., 2014; Mooser D.M y Edwards J.P., 2008). De esta manera, los Mø clásicamente activados participan en las respuestas inflamatorias y son componentes vitales de la defensa del hospedador. Sin embargo, dado que estas células producen grandes cantidades de citoquinas inflamatorias, se ha observado que los macrófagos M1 podrían favorecer la diferenciación a linfocitos Th17 y participar activamente en las inmunopatologías que ocurren durante algunas enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide e inflamación crónica del intestino (Li y cols., 2013; Mooser D.M y Edwards J.P., 2008; Shouval y cols., 2014).

Los Mø alternativamente activados (M2) se estimulan en ausencia de citoquinas inflamatorias y pueden clasificarse en Mø reparadores de tejidos o Mø reguladores. Los Mø reparadores de tejidos se activan en presencia de IL-4 y participan, como su nombre lo dice, en la reparación del tejido dañado. Estas células son capaces de producir grandes cantidades de IL-4 y dado que presentan la enzima arginasa, son capaces de degradar arginina, participando en la síntesis de colágeno. Se ha observado que estos macrófagos producen cantidades similares de IL-12 e IL-10, por lo que no son capaces de producir un desequilibrio que pueda favorecer una respuesta inflamatoria o una respuesta reguladora (Brancato y Albina, 2011; Mooser y Edwards, 2008).



Los Mø reguladores por su parte, activan a través de los receptores tipo Toll (TLR) en presencia de complejos inmunes, prostaglandinas, células apoptóticas, IL-10, adenosina, dopamina o histamina (Mooser D.M y Edwards J.P., 2008). Este subgrupo de Mø se caracterizan por secretar grandes cantidades de IL-10 y bajas cantidades de IL-12, produciendo un microambiente tolerogénico. Además, expresan en baja cantidad moléculas relacionadas con la activación de los linfocitos T como MHC-II, CD80 y CD86, favoreciendo la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos T reguladores (Elcombe y cols., 2013; Filardi, y cols., 2010; Mantovani y cols., 2004; Mooser y Edwards, 2008). Por otra parte, se ha observado que los Mø reguladores tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune generada por linfocitos Th1 o Th17 a través de un mecanismo que puede ser independiente de la inducción de Treg. Bajo este contexto, la IL-10 producida por estos Mø surge como el principal factor inmunoregulador ya que se ha demostrado, puede afectar negativamente la

diferenciación y estabilidad de estos linfocitos T efectores (Denning y cols, 2007; Hayashi y cols, 2013; Takada y cols., 2010).

Dada sus características inmunosupresoras, los Mø reguladores juegan un rol fundamental en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria y en la inducción de tolerancia, sobre todo en el intestino, donde se ha demostrado que la ausencia de Mø reguladores estaría relacionada con colitis severa y respuestas inmunes inflamatorias potentes (Hayashi y cols, 2013; Medina-Contreras y cols., 2011; Shouval y cols., 2014).

En este trabajo analizaremos la reprogramación celular de linfocitos Th17 murinos a linfocitos Treg *in vitro*, con el fin de comprender los mecanismos que permiten mantener el equilibrio entre inmunidad y tolerancia. Dado que esta reprogramación se ha observado solo en humanos y cuando están presentes células mesenquimáticas o células mieloides supresoras, se purificó células del estroma de médula ósea para inducir este proceso. Determinamos que la reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg es posible en presencia de Mø con características reguladoras, confirmando la capacidad de reprogramación de esta subpoblación linfocitaria. Estos resultados permitirán el estudio *in vivo* de la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg y los mecanismos que están involucrados en este proceso.

1.2 HIPÓTESIS

Macrófagos derivados del estroma de médula ósea inducen la reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos T reguladores .

1.3 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de macrófagos derivados del estroma de médula ósea en la reprogramación de linfocitos Th17 murinos a linfocitos T reguladores.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar y caracterizar fenotípicamente células estromales de médula ósea.
2. Estudiar el efecto de macrófagos derivados del estroma de médula ósea en la generación de linfocitos Treg y Th17.
3. Estudiar la reprogramación *in vitro* de linfocitos Th17 a linfocitos Treg en presencia de macrófagos derivados del estroma de médula ósea.
4. Evaluar *in vivo* el efecto de macrófagos derivados del estroma de médula ósea en un modelo de inflamación intestinal en ratones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Animales

Ratones C57BL/6 (B6) : cepa de ratones de haplotipo H-2^b. Estos ratones se utilizaron para la purificación de DCs de bazo y para el cultivo *in vitro* de células de la médula ósea. Estos ratones se adquirieron en Jackson Laboratory (USA).

Ratones OTII/Foxp3-GFP: cepa de ratones de haplotipo H-2^b. Se caracterizan por poseer LT CD4⁺ cuyo TCR reconoce exclusivamente un péptido de 17 aminoácidos derivados de la proteína ovoalbúmina de pollo (OVA₃₂₃₋₃₃₉). Además, presentan *knock-in* de la proteína GFP bajo el promotor FoxP3. Estos ratones se generaron en el bioterio de la Fundación Ciencias para la Vida, al cruzar ratones machos OTII con hembras GFP-FoxP3. Solo los machos de la descendencia presentaron las características de sus progenitores, por lo que solo se usó animales de este sexo para la generación de linfocitos Th17 *in vitro*.

Todos los experimentos con animales se realizaron bajo la normativa de CONICYT y fueron albergados en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la Fundación Ciencia para la Vida.

2.1.2 Anticuerpos

Para la caracterización fenotípica de las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de eBioscience: CD80 FITC (clon 16-10A1), CD90 FITC (clon 30-H12), CD11c PE (clon N418), IL-17 PE (clon 17B7), CD25 PE (clon PC61.5), CD39 PE (clon 24DMS1), CD86 PE (clon GL-1), CD115 PE (clon AF598), PDL-1 PE (clon MIH5), CD73 PE-Cy7 (clon

Ty/11.8), GR-1 PE-Cy7 (clon RB6-8C5), SCA-1 PE-Cy7 (clon D7), CD3 APC (clon 17A2), IL-17 APC (clon 17B7), CD4 APCH7 (clon GK1.5), CD19 APCH7 (clon 1D3), CD117 (clon ACK2) y CD73 PECy5 (clon Ty/11.8). Los siguientes anticuerpos se obtuvieron de BD Pharmingen; H2K^b FITC (clon AF6 88.5), I-A^b PE (clon AF6 120.1) y TER 119 PE (clon TER-119), mientras que los anticuerpos adquiridos de Biolegend fueron los siguientes: CD11c FITC (clon N418), I-A^b FITC (clon 25-9-17), NK1.1 (clon PK136), CD11b PE (clon M1/70), CD34 PE (clon HM34), CD49b (clon DX5), CD49d (clon 9C10), B220 PE-Cy7 (RA 36B2), CD45.1 PE-Cy7 (clon A20), CD4 APC (clon GK1.5), CD11b APC (clon M1/70), SCA-1 APC (clon EB-161.7), CD44 APC (clon IM7), CD45.2 APC (clon 104), F4/80 (clon BM8). Para la activación de los linfocitos T se utilizó el anticuerpo anti-CD3 de eBioscience (clon 145-2C11). Este anticuerpo permite activar todos los linfocitos T aún sin necesidad de presentar un antígeno.

2.1.3 Reactivos

Para el cultivo celular de linfocitos T con células dendríticas y macrófagos se usó medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 2-mercaptoetanol [0,05 µM] (Invitrogen), Fungizona [0,25 µg/ml] (Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Para la generación de linfocitos T reguladores y conversión de linfocitos Th17, se agregó además TGF-β [5 ng/ml] (eBioscience), IL-2 [10 ng/ml] (eBioscience) y RA [10 nM] (Sigma-Aldrich). Para la generación de linfocitos Th17 se agregó TGF-β [5 ng/mL], IL-6 [20 ng/mL], IL-1β [10 ng/mL] y anti-IFN-γ [10 µg/ml]. Todas las citoquinas utilizadas fueron de eBioscience.

Las células del estroma de médula ósea fueron cultivadas en medio αMEM (Minimum essential médium alpha, GIBCO) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultivo de células de la médula ósea

Se usaron ratones C57Bl/6, machos, que tenían entre 2 a 5 meses de edad. Las células de la médula ósea se extrajeron de las tibias y fémures de los ratones. Los huesos se esterilizaron con etanol 70% durante 1 minuto en campana y se perfundieron con IMDM. Posteriormente, las médulas fueron disgregadas por agitación vigorosa y centrifugadas a 450 x g durante 10 minutos. Luego, se lisaron los glóbulos rojos y se centrifugaron las muestras a 450 x g durante 10 minutos. Las células fueron resuspendidas en medio α MEM + 10% SFB a una concentración aproximada de 3×10^6 células/mL y se cultivaron en placas T25 a 37°C y 5% CO₂. Se cambió la mitad del medio cada 4 días y cuando se observó que las células alcanzaron un 80% de confluencia se cambió de pasaje (día 10-12 de cultivo). Para esto, se eliminó todo el medio de las placas y se adicionó 4 mL de PBS 1X durante 1 minuto. Luego, se descartó el PBS 1X y posteriormente agregó 2 mL de tripsina-EDTA (GIBCO BRL), incubándose durante 10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se lavó una vez la placa con la misma tripsina y se recuperaron las células en un tubo con 2mL de α MEM + 10% FSB. Se volvió a lavar la placa con 2 mL de α MEM + 10% FSB. Las células se centrifugaron a 450 x g durante 10 minutos, y posteriormente se resuspendieron con α MEM + 10%. Las células se resuspendieron a una concentración de $0,145 \times 10^6$ células/mL. Se cultivaron 7mL de esta suspensión celular en placas T25 a las cuales se les cambia la mitad del medio cada 4 días. Las células fueron utilizadas en pasaje 2.

El fenotipo de las células obtenidas en cada pasaje se analizó mediante citometría de flujo. Para determinar el patrón de citoquinas que secretan, se cultivaron 100.000 macrófagos en medio α MEM + 10% FBS sin ningún reactivo (control), con LPS (1 μ g/mL) o Zimozan (10 μ g/mL) durante 4 horas a 37°C. Se extrae el sobrenadante para analizar las citoquinas por CBA o ELISA.

2.2.2 Purificación de células dendríticas (DCs)

La obtención de DCs se hizo a partir del bazo de ratones machos, C57BL/6, que tenían entre 2 a 4 meses de edad. Para purificar las DCs, se disgregó mecánicamente el bazo y se resuspendió en 5 mL de PBS + 10% suero fetal bovino (SFB). Los tejidos se digirieron en agitación constante durante 45 minutos, a 37°C, en presencia de 1 mg/mL de colagenasa D (Roche) y 20 μ g/ml de DNAsa I (Sigma). La suspensión celular resultante se pasó a través de un *cell strainer* de 70 μ m, se lavó con RPMI + 10% SFB y el pellet obtenido se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos, a 4°C. Transcurrido el tiempo, se lavaron las células con 12 mL de PBS (Phosphate buffer saline, Invitrogen) y se resuspendieron en Verseno + 0,5% SFB, de manera que quedó a una concentración de 330×10^6 células/mL. Se agregó 30 μ L de MACS[®] CD11c de ratón (clon N418, Miltenyi Biotec) por cada 100×10^6 células y se incubó durante 20 minutos a 4°C con agitación constante. Luego de la incubación, las células se lavaron y se resuspendieron en Verseno + 0,5% SFB, dejando las células a una concentración de 100×10^6 células/mL. Se purificaron las células CD11c⁺ por selección positiva usando un magneto (VarioMACS[®], Miltenyi Biotec) y el porcentaje de células dendríticas se verificó por citometría de flujo mediante la expresión de CD11c.

2.2.3 Purificación de linfocitos T vírgenes (CD4+ CD25-)

Los linfocitos T vírgenes se obtuvieron a partir del bazo de ratones OTII /Foxp3-GFP machos, de 2 a 4 meses de edad. Para esto se perfundió el bazo con RPMI + 10% SFB luego de lo cual se centrifugaron las células a 600 x g por 7 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich) y las células se incubaron durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron las células con 12 mL de PBS y se resuspendieron a una concentración de 250×10^6 células/mL en Verseno + 0,5 % SFB. Luego se agregaron 5 μ L de Biotin-Antibody Cocktail (CD4+ T cell isolation kit II, Miltenyi Biotec) por cada 10×10^6 células y se incubaron durante 12 minutos a 4°C con agitación constante. Posteriormente, sin lavar las células, se adicionó 30 μ L de Verseno + 0,5% SFB y 10 μ L de partículas anti-Biotin (CD4+ T cell isolation kit II, Miltenyi Biotec) por cada 10×10^6 células, y se incubaron durante 20 minutos a 4°C con agitación. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con 10 mL de PBS + 0,5% SFB y se resuspendieron en el mismo medio dejando las células a una concentración de 100×10^6 células/mL. La suspensión celular fue sometida a separación inmunomagnética (VarioMACS[®], Miltenyi Biotec) y se recolectó la fracción negativa, la cual correspondió a la población celular CD4+. Para la posterior depleción de linfocitos CD25+, la fracción enriquecida en linfocitos CD4+ se incubó con 1 μ L del anticuerpo CD25 PE por cada 10 millones de células en 100 μ L de Buffer MACS. Luego de 12 minutos de incubación, se lavaron las células y se resuspendieron en 80 μ L de bufer MACS y 20 μ L de partículas magnéticas anti-PE por cada 10 millones de células. Se incubó a 4°C, en agitación constante y oscuridad, durante 20 minutos y luego de lavar las células se procedió a la separación inmunomagnética de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando columnas LS (Miltenyi Biotec). Se recolectó la

fracción negativa, la cual contiene los linfocitos CD4+CD25-. El porcentaje obtenido de estas células, se verificó por citometría de flujo.

2.2.4 Generación de linfocitos T reguladores y linfocitos Th17

Para generar Treg y linfocitos Th17 se realizaron co-cultivos de DCs y células estromales de médula ósea provenientes de ratones C57BL/6 con LT vírgenes (CD4⁺CD25⁻) de ratones OTII/Foxp3- GFP.

Se co-cultivaron $0,02 \times 10^6$ DCs con $0,1 \times 10^6$ linfocitos T vírgenes por pozo, en placas de 96 pozos de fondo plano (Orange Scientific) y en medio completo de co-cultivo (IMDM + 10% SFB + fungizona + 2ME). El volumen final por pozo fue de 200 μ l. Para la generación de linfocitos T reguladores inducibles, se adicionó anti-CD3 (1 μ g/ml), TGF- β [2 ng/mL], IL-2 [10 ng/mL] y RA [10nM]. Por otro lado, para la generación de linfocitos Th17 se agregó al medio anti-CD3 (1 μ g/ml), TGF- β [2 ng/mL], IL-6 [20 ng/mL], IL-1 β [10 ng/mL] y α -IFN γ [10 μ g/ml]. En algunos casos, estas células fueron cocultivadas con 8500 células de la médula ósea, las cuales fueron plaqueadas 48 horas antes que las demás célula en medio α MEM + 10% FBS.

Luego de 5 días de cultivo se analizó mediante citometría de flujo la generación de Treg (GFP+ CD4+CD25+). Del mismo modo, se analizó la producción de IL-17 por los linfocitos Th17, para lo cual, las células fueron previamente activadas con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina por 4hrs.

Cuando se indica, los linfocitos T vírgenes fueron marcados con Violet (Cell Trace™ Violet proliferation kit). Para ello, se lavaron 2 veces con PBS para eliminar los restos de suero y se resuspendieron en 1 ml de PBS por cada 10×10^6 células en presencia de Violet [5 μ M]. Las células se agitaron en vortex por 10 segundos y luego se incubaron durante 20 minutos con agitación suave, en oscuridad y a 37°C. Posteriormente, se llevó a un volumen total de 10 ml con medio IMDM + 10% SFB y se incubaron las células durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y se resuspendieron a una concentración de 5×10^6 células/ml en medio de cocultivo

2.2.5 Marcaje celular y citometría de flujo

Para la detección de moléculas de superficie, las células se incubaron en PBS + 2% SFB y Fc-block durante 10 minutos, en oscuridad y a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las células y resuspendieron en PBS + 2% SFB. A este medio, se le agregó distintas combinaciones de anticuerpos y se incubó a 4°C durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se lavaron con PBS + 2% SFB y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Para descartar las células muertas se utilizó yoduro de propidio (PI, Sigma- Aldrich)

Para el marcaje intracelular, luego del marcaje de superficie, las células se resuspendieron en buffer de permeabilización y fijación 1X (KIT Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization, BD Bioscience) a una concentración de 1×10^6 células/mL y se incubaron por 20 minutos, a 4°C en oscuridad. Luego, las células se lavaron con 700 μ L de buffer de permeabilización (KIT Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization,

BD Bioscience) y se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en buffer de permeabilización 1X y los correspondientes anticuerpos intracelulares. Se incubaron las células durante 30 minutos a 4°C en oscuridad y posteriormente se lavaron con 700 µL de buffer de permeabilización y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron a una concentración de 1-2 x10⁶ células/mL de PBS + 2% FSC para ser analizadas por citometría de flujo. Para la detección de células muertas en células fijadas, se usó 1µl/ml de Viability dye (Fixable Viability dye eFluor®, eBioscience) el cual se marcó en conjunto con los anticuerpos de superficie.

Los análisis de los resultados obtenidos a partir de la citometría se realizaron utilizando el programa BD FACS Diva de BD Bioscience y el programa Flow Jo (Tree Star inc.).

2.2.6 Separación de linfocitos Th17 generados in vitro mediante *cell sorting*

Luego de la generación de los linfocitos Th17, se aisló la subpoblación deseada mediante *cell sorting*. Para esto, las células se recuperaron de la placa y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en RPMI + 10% SFB a una concentración de 2 x 10⁶ células/mL. Se adicionó 25 µL/mL de PMA [1 mM], 2 µL/mL de ionomicina [0,5 mg/mL] y se incubó durante 4 horas a 37°C . Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS + 2% FSB, se resuspendieron en ese mismo medio a una concentración de 100 x 10⁶ células/mL y se incubaron durante 20 minutos, a 4°C, en presencia de anti-CD4 APC y anti-IL-17 PE. Luego, las células se lavaron con RPMI + 10% FSB filtrado y se resuspendieron en este mismo

medio a una concentración de 25×10^6 células/mL. Los linfocitos Th17 fueron seleccionados por *cell sorter* en base a la expresión de CD4+IL-17+FoxP3-.

2.2.7 Reprogramación de linfocitos Th17 *in vitro*

Linfocitos Th17 generados *in vitro* se purificaron mediante *cell sorter* y co-cultivaron con células dendríticas y factores de polarización a Treg, en presencia o ausencia de células de la médula ósea.

Específicamente, se recultivaron $0,1 \times 10^6$ linfocitos Th17 con $0,02 \times 10^6$ DC en presencia de los factores de diferenciación a Treg; TGF- β [5 ng/ml] (eBioscience), IL-2 [10 ng/ml] (eBioscience), RA [10 nM] (Sigma-Aldrich). En algunos casos, se agregó 8.500 ó 100.000 células de la médula ósea por pozo 48 horas antes que las demás células, en placas de 96 pozos de fondo plano (Orange Scientific). Las células se cultivaron en medio completo (IMDM + 10% SFB + fungizona + 2ME) y la activación de los linfocitos T se indujo con anti-CD3 [1ug/mL]. Al quinto día de cultivo, se analizó la expresión de IL-17 y GFP-FoxP3 en linfocitos T CD4+.

El mismo cultivo de reprogramación se realizó en un *Transwell* (Millicell® 96-Well Cell Culture Insert Plates) en presencia de TGF- β [5 ng/ml] (eBioscience), IL-2 [10 ng/ml] (eBioscience), RA [10 nM] (Sigma-Aldrich) En el pozo inferior se cultivaron diferentes concentraciones de células de la médula ósea, mientras que en el pozo superior, se co-cultivaron las células dendríticas con los linfocitos Th17.

2.2.8 Efecto de macrófagos derivados de la médula ósea *in vivo*

Se indujo inflamación intestinal mediante anti-CD3 (145-2C11)(Huber y cols., 2011). Para ello, ratones C57BL/6 se inyectaron por vía intraperitoneal con dos dosis de 20 µg de anti-CD3 a las 0 y 48 horas de tratamiento. En algunos casos, se inyectó $0,6 \times 10^6$ macrófagos reguladores 24 horas antes y 24 horas después de la primera dosis de anti-CD3. Para la condición control, en vez de inyectar anti-CD3, se inyectó dos dosis de PBS 1X.

Transcurridos 6 días desde la primera dosis de anti-CD3, se midió el largo del colon y mediante citometría de flujo, se analizó el porcentaje de células que expresaban IL-17 o GFP-FoxP3. Se pesaron los ratones todos los días para determinar como variaba este parámetro con la inflamación intestinal.

2.2.9 Detección de citoquinas mediante CBA (Cytometric Bead Array)

La detección de citoquinas en los sobrenadantes de los cocultivos de generación de linfocitos Treg o Th17 se realizó utilizando Cytometric Bead Array (CBA). Específicamente, se usó el kit Th1/Th2/Th17 de ratón (Cytokine Kit BD Bioscience), el cual permitió evaluar simultáneamente IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 por citometría de flujo. Para esto se mezclaron 11 µL de sobrenadante, con 11 µL de un mix por partes iguales de perlas específicas para cada citoquina y 11 µL de PE *Detection Reagent*. Esta mezcla se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las muestras con 200 µL de una solución de lavado provista en el kit y las muestras se centrifugaron a 250 x g durante 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 300 µL de la solución de lavado y se midió la

concentración de citoquinas mediante citometría de flujo. La cantidad de cada citoquina se determinó por interpolación a partir de una curva estándar. Los datos obtenidos fueron analizados por el programa BD CBA Software (BD TM).

2.2.10 Aislamiento de las células de lámina propia de intestino

Para aislar linfocitos de lámina propia, el intestino delgado se aisló de su unión con el estómago e intestino grueso y colocó sobre una placa con HBSS 1X. Luego de eliminar el tejido conectivo, se cortó el intestino longitudinalmente y se limpió el interior, asegurándose de que quedara libre de heces. Posteriormente, se cortó en trozos de 3 a 4 cm y se incubó a 37°C por 20 min en 20 ml de RPMI + Hepes 25 mM + β -merceptoetanol 50 μ M + 0,145 mg/mL de DDT + EDTA 5mM. Al término de la incubación, se agitó vigorosamente durante 10 segundos y los pedazos de intestino fueron transferidos a un nuevo tubo con 10 ml de RPMI + Hepes 25 mM + β -merceptoetanol 50 μ M + EDTA 2mM. Esta operación se repitió 2 veces con el objetivo de eliminar los linfocitos intraepiteliales. El tejido intestinal restante, se sometió a digestión enzimática durante 45 min a 37°C en 12 ml de medio de RPMI + Hepes 25 mM + β -ME 50 μ M con 0,1 mg /mL de liberasa (Roche) + 10 mg/mL DNAasa. Luego, se disgregó mecánicamente el tejido no digerido en filtros de 100 μ m (Cell Strainer, BD) y la suspensión celular se centrifugó a 600 x g por 7 min a 4°C. Posteriormente, el pellet obtenido se suspendió en 4 ml de Percoll 44% y se realizó una centrifugación en gradiente discontinua de Percoll 44/67 a 600 x g por 20 min a 20°C, con una aceleración de 1 y sin freno. La interfase celular se lavó con 8 mL de RPMI + 10%SFB a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 completo + 10% SFB y se contaron.

2.2.11 Análisis Estadístico

Todos los datos se analizaron usando el programa GraphPad Prism 5.0c y son presentados como el promedio \pm SEM. Para comparar dos grupos, se usó el t test pareado y para comparar 3 o más grupos, se usó el test de comparación múltiple de *Kruskal Wallis*. Los resultados se consideraron como estadísticamente significativos cuando el *P value* fue < 0.05 .



3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de células estromales de médula ósea.

Trabajos previos han demostrado que los linfocitos Treg pueden reprogramarse a linfocitos Th17 cuando son cultivados en condiciones de polarización a Th17 (Xu y cols., 2007; Yang y cols., 2008b). Sin embargo, el cultivo de linfocitos Th17 en condiciones de polarización a Treg no induce su reprogramación a Treg. En humanos se ha descrito que células troncales mesenquimáticas (MSC) o células mieloides supresoras (MDSC), tienen propiedades inmunosupresoras e inducen en un pequeño porcentaje de células la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg (Hoechst y cols., 2011; Ghannam y col., 2010). En este trabajo, estudiamos el efecto de células estromales de médula ósea sobre la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg en ratones.

Para obtener células estromales de medula ósea se perfundieron las tibias y los fémures de ratones C57BL6. La médula resultante fue cultivada en medio α MEM + 10% SFB y una vez alcanzada la confluencia, las células fueron tripsinizadas y recultivadas. Analizamos mediante citometría de flujo la presencia de diferentes linajes celulares en la médula ósea antes de ser cultivadas (P_0) y en los pasajes P_1 y P_2 , obtenidos luego de la tripsinización de las células adherentes (Tabla I).

La Tabla I muestra, en una ventana de células vivas, que las células en P_0 son una mezcla de diferentes poblaciones celulares, entre las cuales destacan por su mayor abundancia, las células tipo mieloides supresoras CD11b⁺ GR-1^{hi} CD49d⁺ (18,9 \pm 3,9 %) y los neutrófilos CD11b⁺ GR-1^{hi} F4/80⁻ (13,2 \pm 8,8 %). Esta tendencia cambia

cuando las células se encuentran en P₁, ya que desaparecen las células tipo mieloides supresoras CD11b+GR-1^{hi}CD49d+ (0,3 ± 0,1 %) y los neutrófilos CD11b+GR-1^{hi} F4/80- (1,0 ± 1,5 %), dando lugar a un enriquecimiento significativo de macrófagos CD11c- CD11b+F4/80+CD64+ (81,6 ± 6,5) que es aún mayor en P₂ (95,7 ± 0,4). De esta manera, determinamos que el cultivo de médula ósea que realizamos favorece el enriquecimiento principalmente de macrófagos.

Tabla I. Porcentaje de diferentes tipos celulares presentes en los distintos pasajes del cultivo de células estromales de médula ósea de ratón.

Población	Sub-población	Marcadores	Pasaje 0	Pasaje 1	Pasaje 2
Mieloides	Tipo mieloides supresoras	CD11b+ GR-1 hi CD49d+	18,9 ± 3,9	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	Macrófagos	CD11c- CD11b+ F4/80+ CD64+	1,5 ± 1,1	81,6 ± 6,5	95,7 ± 0,4
	Neutrófilos	CD11b+ F4/80- GR-1hi	13,3 ± 8,8	1,0 ± 1,5	0,4 ± 0,6
	Monocitos	CD11b+ CD115+	4,4 ± 0,1	0,6 ± 0,5	1,4 ± 2,0
	Dendríticas Convencionales	CD11c+ B220-	1,6 ± 0,6	9,8 ± 6,4	2,4 ± 0,9
	Dendríticas Plasmocitoides	CD11c+ B220+	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1
Linfocitos	Linfocitos B	B220+ CD19+	2,3 ± 0,6	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0
	Linfocitos T	CD3+	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,8	0,7 ± 0,4
NK	Asesinos Naturales	NK1.1+ CD3-	9,3 ± 0,9	3,8 ± 3,1	4,6 ± 4,0
Células troncales	Tipo MSC	SCA-1+ CD90+ CD44+ TER119-	2,0 ± 2,4	0,6 ± 6,2	0,1 ± 2,4

Los macrófagos resultantes en P₂ expresan CD11b y F4/80, marcadores específicos de este linaje celular en ratones, expresan en su totalidad CD64, el receptor de alta afinidad de las inmunoglobulinas del tipo IgG,,y no expresan CD11c, el marcador por excelencia de células dendríticas en ratones (Figura 3).

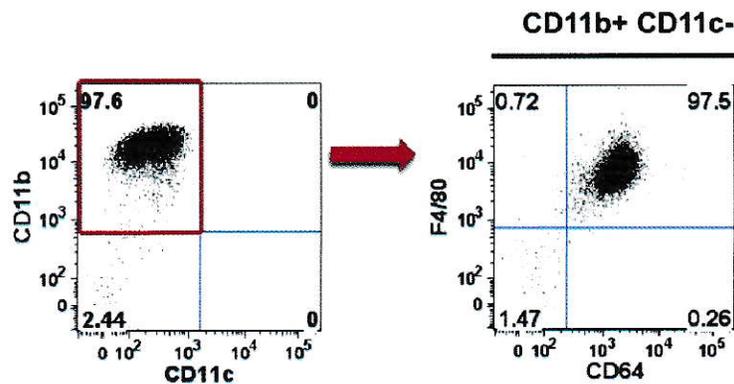


Figura 3. El cultivo de células estromales de médula ósea favorece el enriquecimiento de macrófagos. Células de la médula ósea de ratones C57Bl/6 fueron cultivadas en medio α MEM + 10% FBS y tripsinizadas una vez que alcanzaron la confluencia. Luego de dos procesos de tripsinización se analizó mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores CD11c, CD11b, F4/80, CD64 y GR-1 en las células obtenidas.

La capacidad de las células presentadoras de antígenos para inducir inmunidad o tolerancia depende de la expresión de moléculas relacionadas con la presentación de antígenos o moléculas de histocompatibilidad y moléculas de coestimulación. Los macrófagos CD11c-CD11b+F4/80+ obtenidos en P₂ exhiben una baja expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (IA-b) y de las moléculas de coestimulación PDL-1 y CD80, en comparación con la expresión observada en células dendríticas (DC) del bazo de un ratón de la misma cepa (Figura 4A). La expresión de CD86 en los macrófagos es similar a la de las DC. Estos resultados nos indican que los macrófagos obtenidos en el cultivo de células estromales de médula ósea podrían favorecer una respuesta tolerogénica tal como se ha sugerido en la literatura (Bi-man y cols., 2009; Sun y cols., 2014).

Con el fin de determinar si los macrófagos obtenidos en cultivo presentan un fenotipo regulador, medimos las citoquinas que producen cuando son activados con zimozan o LPS (Mooser y Edwards, 2008). En la figura 4B observamos que los macrófagos no activados o activados con zimozan o LPS, no producen IL-4, IFN γ e IL-12p70. Sin embargo, observamos que los macrófagos producidos en este trabajo producen grandes cantidades de IL-10 cuando son activados con LPS.

Estos resultados indican que los macrófagos derivados del estroma de médula ósea presentan características de macrófagos reguladores ya que exhiben baja expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase-II, baja expresión las moléculas co-estimuladoras CD80 y PDL-1, además producen una gran cantidad de IL-10, una citoquina con reconocida función inmunosupresora.

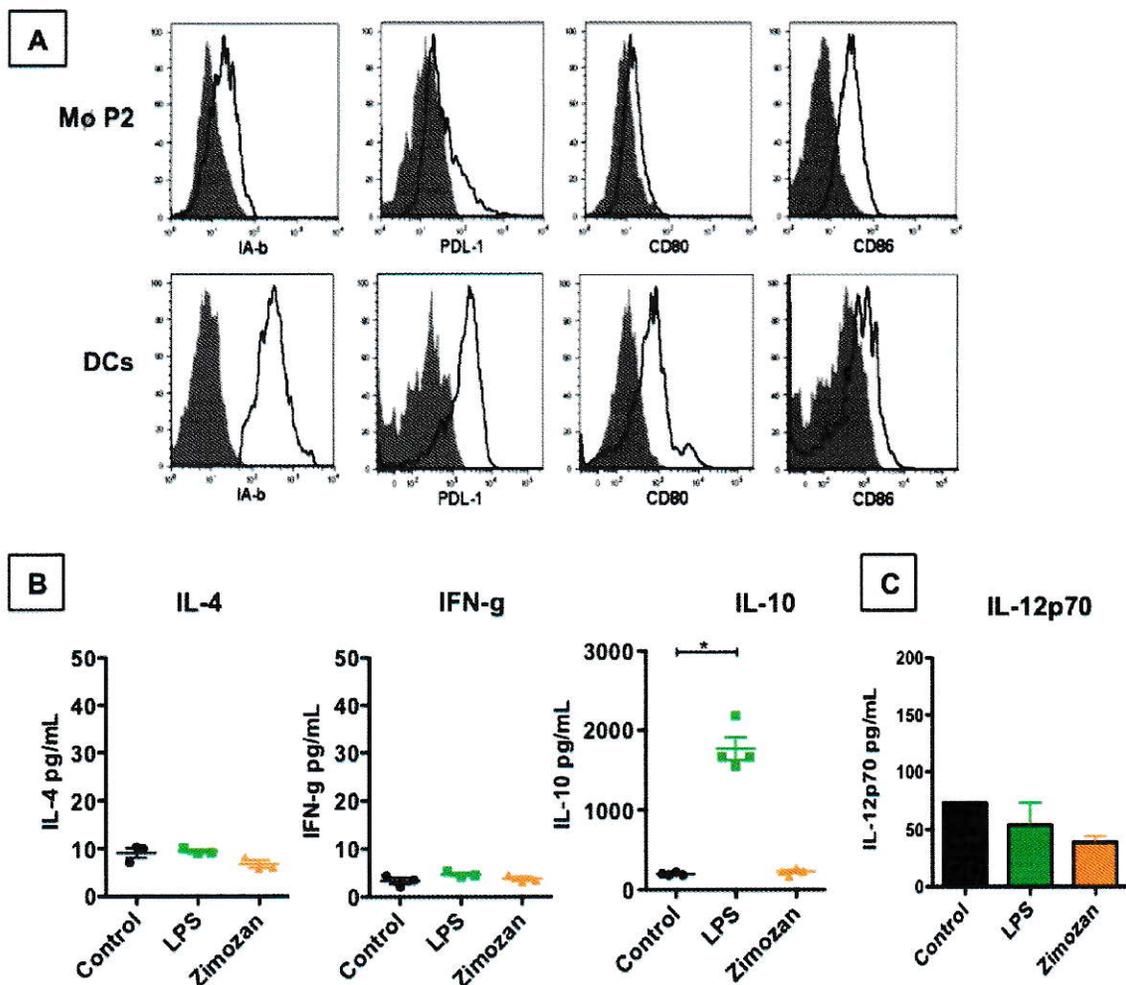


Figura 4. Los macrófagos en P2 presentan un fenotipo regulador. A- Histograma representativo de la expresión de IA-b, PDL-1, CD80 y CD86 y en macrófagos (Mø) CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺ obtenidos a partir de células de médula ósea y en células dendríticas (DC) obtenidas del bazo de ratones C57BL6. El histograma sombreado corresponde al control y las líneas negras al marcaje específico. B-C. Patrón de secreción de citoquinas de 100.000 Mø cultivados a 37°C en presencia o ausencia de LPS (1µg/mL) o Zimozan (10µg/mL) durante 4 horas. La concentración de IL-4, IFN-γ e IL-10 en el sobrenadante del cultivo se determinó mediante CBA (B) y de IL-12p70 mediante ELISA (C). Los datos representan el promedio ± SEM de al menos tres experimentos independientes (Prueba Kruskal-Wallis, * p < 0,05)

3.2 Efecto de los macrófagos derivados de la médula ósea en la generación de linfocitos Treg

Con el fin de analizar si los macrófagos con características reguladoras pueden ejercer un rol inmunosupresor e inducir un ambiente tolerogénico, analizamos el efecto que tienen estas células en la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Treg y Th17.

Linfocitos T vírgenes CD4⁺CD25⁻ provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP (CD45.1⁺/CD45.2⁺) fueron cocultivados durante 5 días con α -CD3 y células dendríticas (DCs), en presencia o ausencia de macrófagos derivados del estroma de médula ósea provenientes de un ratón C57BL6 (CD45.2⁺). Para inducir la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos T reguladores, se agregó al cultivo TGF- β , IL-2 y ácido retinoico (RA).

Al analizar la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Treg CD45.1⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ mediante citometría de flujo (Figura 5A), observamos que en presencia de células dendríticas, los macrófagos aumentan el porcentaje de células CD25⁺FoxP3⁺ de un 55% a un 70% y alcanza incluso un 80% cuando el cultivo se realiza en presencia de macrófagos, pero en ausencia de células dendríticas. Esto es relevante ya que se piensa que solo las células dendríticas son capaces de activar linfocitos T vírgenes. Por otra parte, el número absoluto de Treg en presencia de macrófagos es significativamente mayor en comparación a los cultivos sin macrófagos y la presencia de células dendríticas no produjo cambios significativos. Estos resultados indican que el efecto de los macrófagos es directo sobre los linfocitos T y no requiere de la mediación de otras células presentadoras.

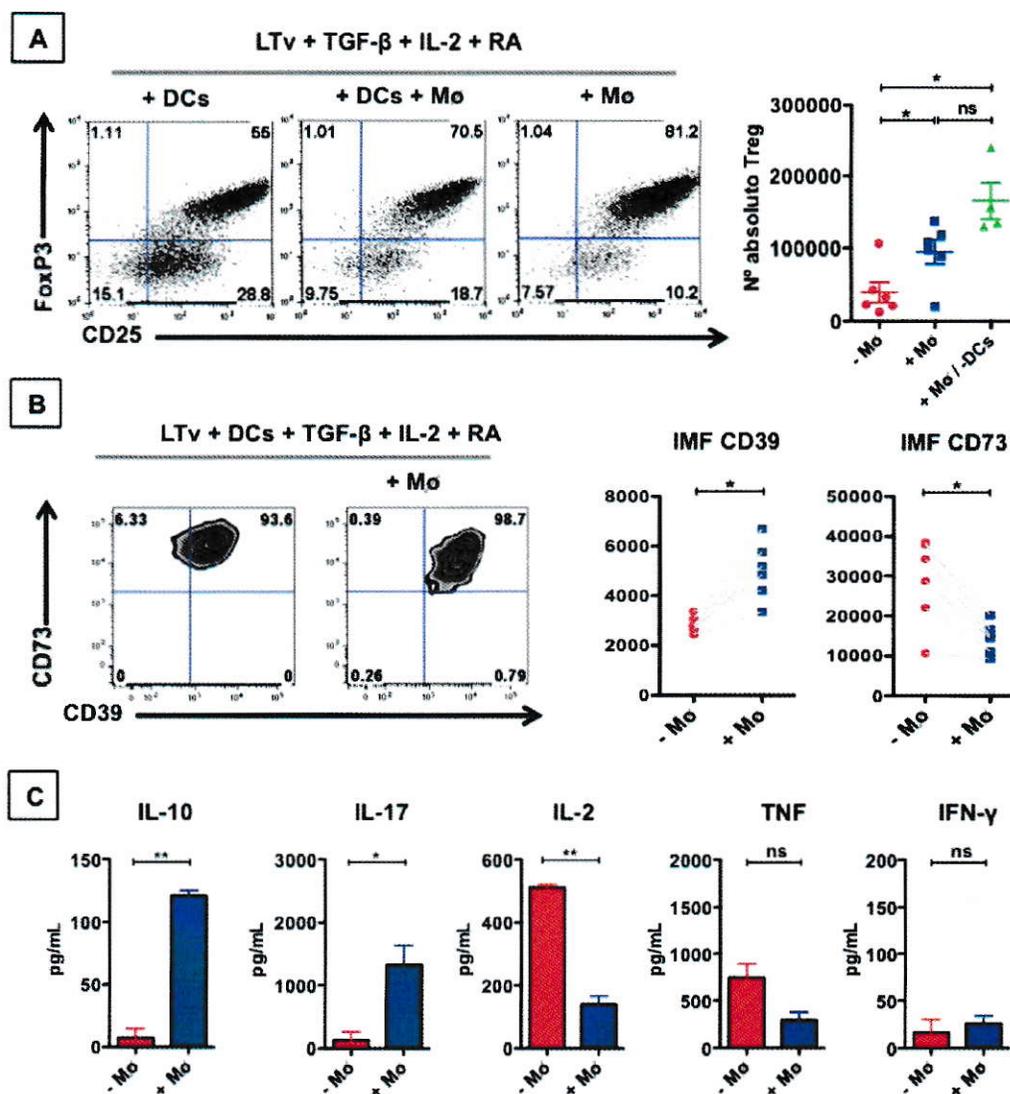


Figura 5. Macrófagos derivados de médula ósea favorecen la diferenciación de linfocitos T vírgenes a Treg. 100.000 linfocitos T vírgenes CD4⁺CD25⁻ provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP se cultivaron durante 5 días con α -CD3 y la condición de polarización a Treg (TGF- β , IL-2 y RA), en presencia o ausencia de 20.000 DCs. En algunos casos, se agregó al cultivo 8.500 macrófagos (Mø). **A-** Imagen representativa obtenida por citometría de flujo de la expresión de FoxP3-GFP y CD25 en una ventana CD45.1+CD4⁺ y gráfica del número absoluto de Treg en las condiciones analizadas. **B-** Imagen representativa de la expresión de CD39 y CD73 en linfocitos Treg CD45.1+CD4⁺FoxP3⁺ y gráfica de la intensidad media de fluorescencia. **C-** Evaluación de la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de generación de Treg en presencia o ausencia de Mø determinada mediante CBA. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (t test pareado * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

Con el propósito de estudiar si los macrófagos derivados de médula ósea pueden modificar los mecanismos a través de los cuales los Treg ejercen la supresión, estudiamos la expresión de CD39 y CD73, dos ectonucleotidasas que tienen la capacidad de degradar el ATP/ADP y producir adenosina, un nucleósido que detiene la proliferación de linfocitos T efectores. En la figura 5B observamos que aquellos linfocitos diferenciados en presencia de macrófagos expresan mayores niveles de CD39 y menores niveles de CD73, en comparación con los linfocitos diferenciados en ausencia de estas células. Por otra parte, al analizar el efecto de los macrófagos en la producción de citoquinas en los cultivos de generación de linfocitos Treg observamos que la presencia de estas células aumenta significativamente la concentración de IL-10 e IL-17 y disminuye significativamente la concentración de IL-2. No se observó variaciones en la concentración de las citoquinas TNF o IFN- γ (Figura 5C). Aunque la presencia de los macrófagos produce cambios significativos sobre los linfocitos Treg, la interpretación de los resultados no es evidente.

3.3 Efecto de los macrófagos derivados de médula ósea en la generación de linfocitos Th17

Linfocitos T vírgenes CD4⁺CD25⁻ provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP (CD45.1⁺/CD45.2⁺) fueron cocultivados con α -CD3, células dendríticas (DCs), en presencia o ausencia de macrófagos provenientes de un ratón C57BL6 (CD45.2⁺). Para inducir la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos Th17, se agregó al cocultivo TGF- β , IL-6, IL-1 β y el anticuerpo bloqueador α -IFN γ .

Al analizar la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Th17 CD45.1+CD4+IL-17+ mediante citometría de flujo (Figura 6A), observamos que la presencia de macrófagos reduce el porcentaje de linfocitos Th17 de un 60% a un 37%. Por otra parte, la presencia de macrófagos en el cultivo disminuyen significativamente el número absoluto de Th17 en comparación a los cultivos en ausencia de estas células. Además, no observamos diferencias significativas en los cultivos con macrófagos, en presencia o ausencia de células dendríticas. Estos resultados indican que el efecto negativo de los macrófagos en la diferenciación a linfocitos Th17 no requiere de otras células presentadoras.

Trabajos recientes han determinado que existen dos tipos de linfocitos Th17: linfocitos Th17 inflamatorios y linfocitos Th17 reguladores (Chalmin y cols., 2012). Estos dos subtipos se diferencian fenotípicamente y funcionalmente. Para determinar que tipo de linfocitos Th17 producen los macrófagos *in vitro*, analizamos mediante citometría de flujo la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, dos moléculas características de los linfocitos Th17 reguladores que no están presentes en los linfocitos Th17 inflamatorios.

La Figura 6B muestra que la presencia de macrófagos en los cultivos induce, en los linfocitos Th17, una disminución significativa de la expresión de CD39, mientras que la expresión de CD73 no se ve afectada por estas células. Al analizar el efecto de los macrófagos en la producción de citoquinas en los cultivos de diferenciación a linfocitos Th17 observamos que la presencia de los macrófagos disminuye significativamente la concentración de IL-17, pero no afecta la concentración de IL-10, IL-2, TNF e IFN- γ (Figura 6C). El conjunto de estos resultados muestra que los macrófagos derivados de médula ósea tienen un efecto inhibitorio en la diferenciación de linfocitos Th17.

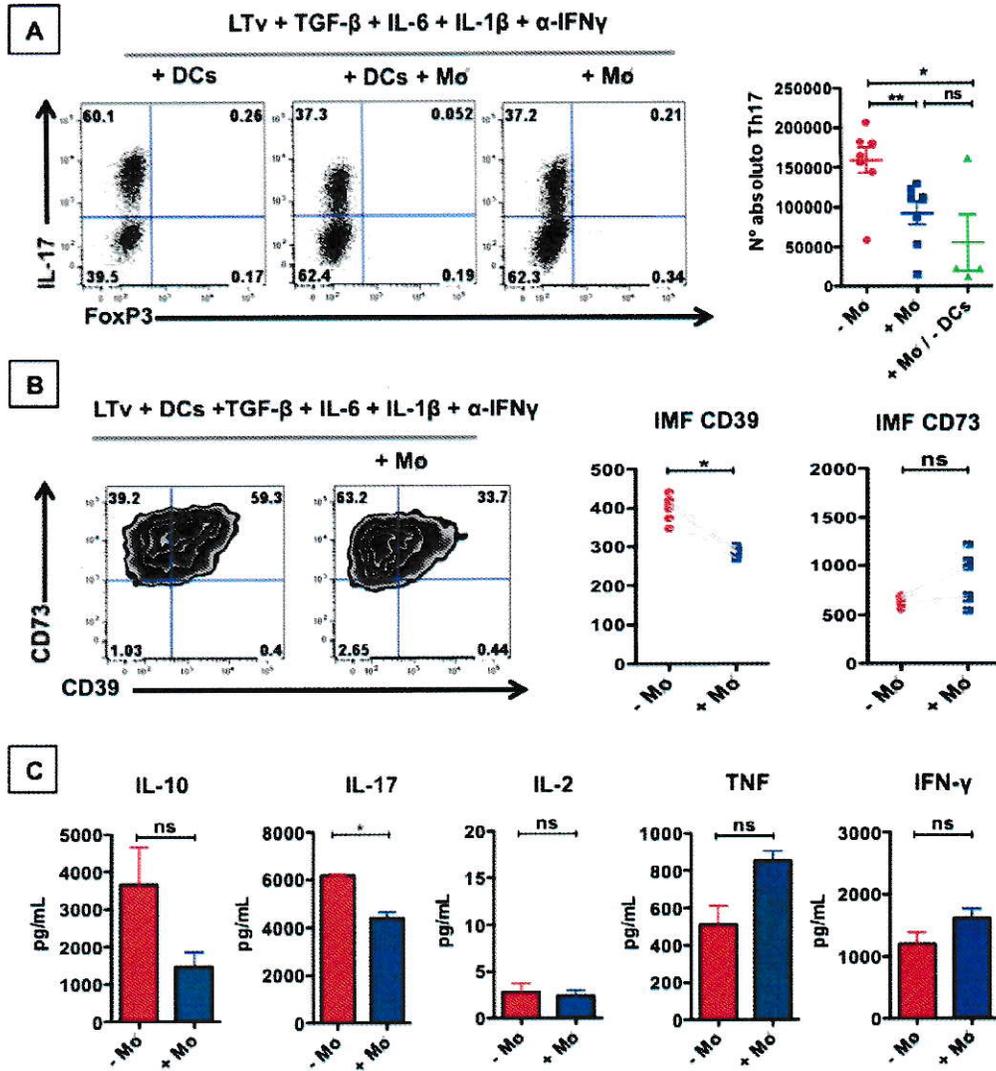


Figura 6. Macrófagos derivados de médula ósea inhiben la diferenciación de linfocitos T vírgenes a Th17. 100.000 linfocitos T vírgenes CD4⁺CD25⁻ provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP se cultivaron durante 5 días con α -CD3 y la condición de polarización a Th17 (TGF- β , IL-6, IL-1 β y α -IFN- γ), en presencia o ausencia de 20.000 DCs. En algunos casos, se agregó al cultivo 8.500 macrófagos (Mø) A- Imagen representativa obtenida por citometría de flujo de la expresión de IL-17 en una ventana CD45.1+CD4⁺ y gráfica del número absoluto de Th17 en las condiciones analizadas B- Imagen representativa de la expresión de CD39 y CD73 en linfocitos Th17 CD45.1+CD4⁺IL-17⁺ y gráfica de la intensidad media de fluorescencia C- Evaluación de la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de generación Th17 en presencia o ausencia de Mø determinada mediante CBA. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (t test pareado * p < 0,05, ** p < 0,005).

3.4 Efecto de los macrófagos derivados de médula ósea sobre la proliferación de los linfocitos Treg y Th17

Con el objetivo de determinar el efecto de los macrófagos en la proliferación de los linfocitos Treg y Th17, linfocitos T vírgenes CD4+CD25- provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP (CD45.1+/CD45.2+) fueron marcados con el colorante fluorescente *Violet* y cocultivados con α -CD3, células dendríticas (DCs), en presencia o ausencia de macrófagos provenientes de un ratón C57BL6 (CD45.2+). El colorante *Violet* tiene la propiedad de marcar las células de forma irreversible y de ir disminuyendo proporcionalmente en las células en división. Para inducir la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos T reguladores, se agregó al cultivo TGF- β , IL-2 y RA, y para inducir la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos Th17, se usaron la citoquinas TGF- β , IL-6, IL-1 β y el anticuerpo bloqueador α -IFN γ .

En la figura 7A comparamos la proliferación de linfocitos Treg generados en presencia o ausencia de macrófagos en un cultivo de 5 días. Los gráficos muestran los datos en una ventana de linfocitos Treg CD4+ FoxP3+. En el gráfico de barras, se muestran los porcentajes de linfocitos Treg en cada uno de los ciclos de proliferación. Observamos que la mayor parte de las células ha realizado 4 o 5 ciclos de proliferación, pero no existen diferencias significativas en presencia o ausencia de macrófagos.

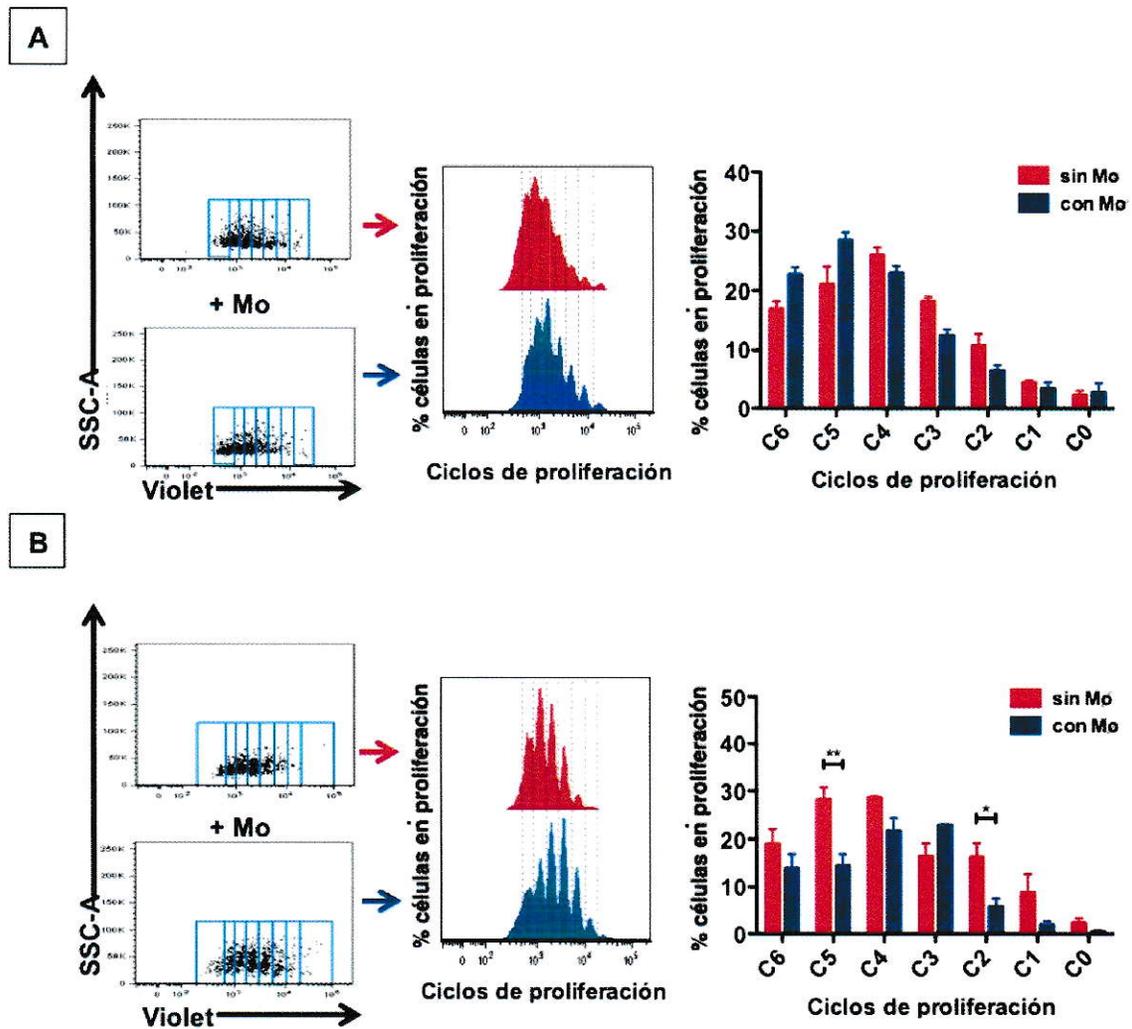


Figura 7. Los macrófagos derivados de médula ósea retardan la proliferación de los linfocitos Th17 pero no de los linfocitos Treg. 100.000 Linfocitos T vírgenes CD4+CD25- provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP fueron marcados con Violet y cultivados durante 5 días con α -CD3 y 20.000 DCs, en presencia o ausencia de 8.500 macrófagos ($M\phi$). Además, se agregó al cultivo TGF- β , IL-2 y RA para la generación de Treg y TGF- β , IL-6, IL-1 β , α -IFN γ para la generación de linfocitos Th17. **A-** Imagen representativa de la proliferación de linfocitos Treg CD45.1+CD4+FoxP3+ diferenciados a partir de linfocitos T vírgenes en presencia o ausencia de $M\phi$ y gráfica del porcentaje de células en cada ciclo de proliferación. **B-** Imagen representativa de la proliferación de linfocitos Th17 CD45.1+CD4+IL-17+ diferenciados a partir de linfocitos T vírgenes en presencia o ausencia de $M\phi$ y gráfica del porcentaje de células en cada ciclo de proliferación. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (t test pareado * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

En la figura 7B se muestra el análisis de la proliferación de los linfocitos Th17 en presencia o ausencia de macrófagos. Este análisis se realizó en una ventana de linfocitos CD4+IL-17+. El resultado de este análisis muestra que la presencia de macrófagos durante la generación de Th17 retarda la proliferación de estos linfocitos. El máximo de células en ausencia de macrófagos se encuentran en el ciclo 5 (C5) de proliferación, mientras que en presencia de macrófagos se encuentran en el ciclo 3 (C3). La diferencia en la proliferación con macrófagos es estadísticamente significativa en los ciclos C2 y C5.

De esta manera, hemos determinado que los macrófagos derivados de médula ósea ejercen un claro efecto en la diferenciación de linfocitos Treg y Th17, no afectan la proliferación de los linfocitos Treg, pero retardan la proliferación de los linfocitos Th17. El conjunto de estos resultados sugiere que los macrófagos generados en este trabajo son macrófagos tipo reguladores.

3.5 Reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg en presencia de macrófagos derivados de la médula ósea

Puesto que generamos macrófagos con características reguladoras, analizamos la capacidad de estas células para reprogramar linfocitos Th17 a linfocitos Treg. Para esto, aislamos por *cell sorting* linfocitos Th17 CD4+IL-17+ generados *in vitro* en ausencia de macrófagos a partir de LTV provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP (CD45.1+/CD45.2+) y los cocultivamos por 5 días con 20.000 células dendríticas (DCs), α -CD3 y los factores polarizantes a Treg TGF- β , IL-2 y RA. A los cocultivos se les agregó o no 8.500 ó 100.000 macrófagos (CD45.2+) derivados de médula ósea.

En la figura 8A se muestra que en los cultivos de linfocitos Th17 sin macrófagos o con 8.500 macrófagos, no hay reprogramación de los linfocitos Th17 a linfocitos Treg y cerca del 70% mantuvo su fenotipo. Sin embargo, cuando los linfocitos Th17 fueron cultivados con 100.000 macrófagos, se redujo significativamente el porcentaje de linfocitos Th17 en comparación a la condición sin macrófagos (de un 70% a un 50%) y observamos alrededor de un 6% de reprogramación a linfocitos Treg, determinados por la expresión de FoxP3.

Por otra parte, analizamos el patrón de citoquinas presentes en los cultivos en ausencia o presencia de 100.000 macrófagos. En la figura 8B observamos que la presencia de estas células provoca una disminución significativa de las citoquinas IL-17, TNF e IFN- γ , mientras que no hubo diferencias en la IL-2. En estas condiciones no se detectó IL-10 e IL-4. Estos resultados sugieren que los macrófagos derivados de médula ósea producen un ambiente más bien tolerogénico en las condiciones de reprogramación de Th17.

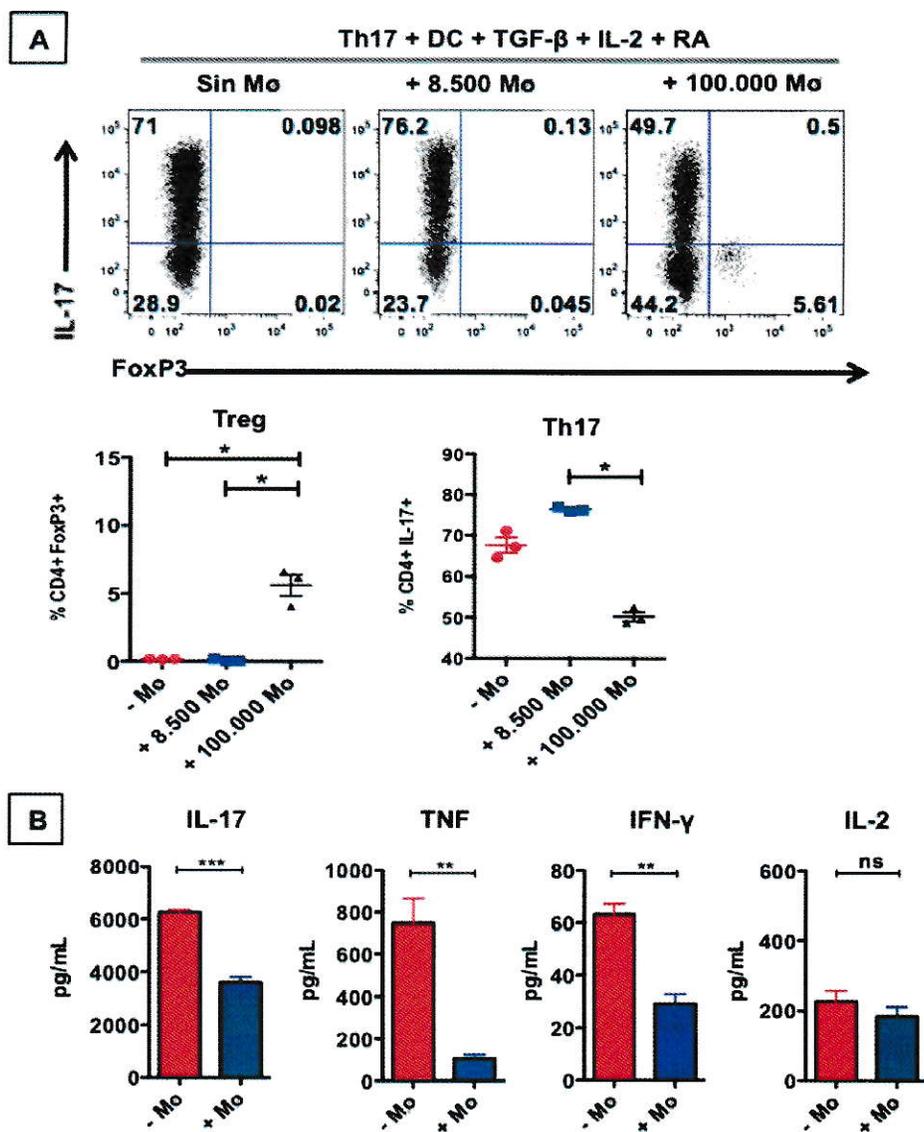


Figura 8. Linfocitos Th17 murinos pueden reprogramarse a linfocitos Treg en presencia de macrófagos derivados de la médula ósea. 100.000 linfocitos Th17 CD4+IL-17+ generados *in vitro* en ausencia de M ϕ , fueron aislados mediante cell sorter y cultivados con 20.000 DCs, α -CD3 y condiciones de polarización a Treg TGF- β , IL-2 y RA. En algunos casos, se agregó al cocultivo 8.500 ó 100.000 M ϕ . A- Imagen representativa de la expresión de IL-17 y FoxP3 en linfocitos T CD45.1+CD4+ y gráfica del porcentaje de Treg y Th17 en cada condición. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (Prueba Kruskal Wallis * p< 0.05). B- Evaluación por CBA de la cantidad de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de reprogramación de linfocitos Th17 con o sin 100.000 M ϕ . Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (t test pareado ** p< 0,005, *** p< 0,0005).

3.6 Mecanismos involucrados en la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg

Para dilucidar si la reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg depende del contacto celular o de factores solubles secretados por los macrófagos, se realizó el cultivo de reprogramación en un *transwell*.

100.000 linfocitos Th17 CD4+ IL-17+ generados a partir de LTV provenientes de un ratón OTII/Foxp3-GFP (CD45.1+/CD45.2+) fueron cocultivados con 20.000 células dendríticas (DCs) en el pozo superior de un *transwell*, mientras que en el pozo inferior, se sembraron 100.000 macrófagos derivados de médula ósea (CD45.2). Para inducir un ambiente propicio para la reprogramación, se agregó al medio α -CD3 y los factores polarizantes a Treg TGF- β , IL-2 y RA.

En la figura 9 observamos que cuando los linfocitos Th17 son cultivados separados de los macrófagos por el *transwell* no hay reprogramación a Treg, indicando que este proceso depende del contacto celular (Figura 9A). Además observamos que cuando el cultivo se lleva a cabo en un *transwell*, el porcentaje de linfocitos Th17 que mantiene la producción de IL-17 es similar al porcentaje obtenido en los cultivos de reprogramación sin *transwell* (47%). Por otro lado, la intensidad media de fluorescencia para IL-17 disminuye en el cultivo realizado en *transwell* indicando que estas células están expresando en menor cantidad esta citoquina (Figura 8C).

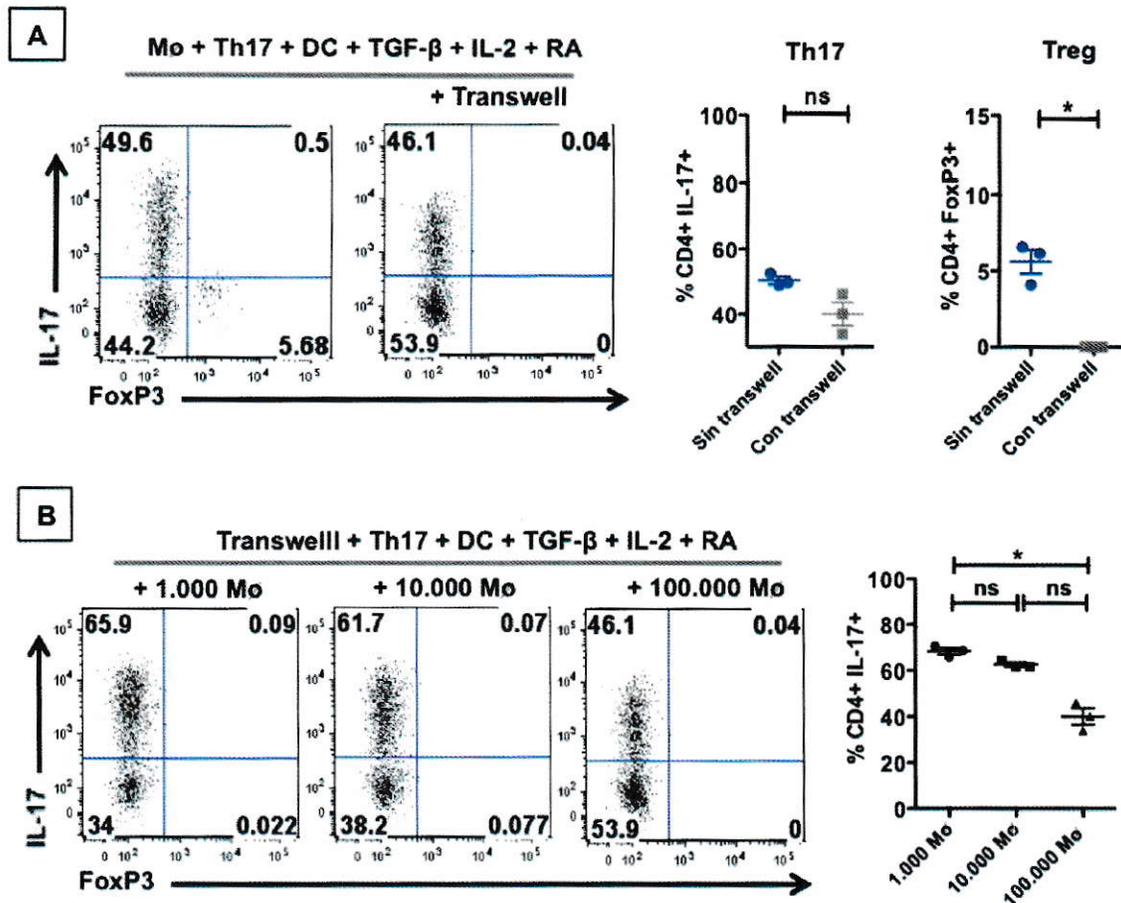


Figura 9. La reprogramación de linfocitos Th17 a Treg depende del contacto celular. 100.000 linfocitos Th17 CD4+IL-17+ generados *in vitro* en ausencia de M ϕ , fueron aislados mediante cell sorter y cultivados durante 5 días con 20.000 células dendríticas (DCs) en el pozo superior de un *transwell*. Se cultivaron además, 100.000 M ϕ en el pozo inferior. El cultivo se hizo en presencia de α -CD3 y los factores polarizantes a Treg TGF- β , IL-2 y RA **A-** Imagen representativa de la expresión de IL-17 y FoxP3 en células CD45.1+CD4+ cuando el cultivo se hace en un *transwell* o no. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (t test pareado * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$). **B-** Imagen representativa de la expresión de IL-17 y FoxP3 en células CD45.1+CD4+ y gráfica del porcentaje de Th17 en cultivos de reprogramación de Th17 en *transwell* con distintas concentraciones de M ϕ . Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (Prueba Kruskal-Wallis * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

Con el fin de determinar si la pérdida en la estabilidad de los Th17 observada en la condición de reprogramación con 100.000 macrófagos (con o sin *transwell*) se debe específicamente a la presencia de los macrófagos, realizamos un experimento en *transwell* con dosis decrecientes de macrófagos. En la Figura 9B observamos que a medida que la concentración de macrófagos aumenta, el porcentaje de linfocitos Th17 disminuye.

De esta manera, hemos determinado que los macrófagos pueden reprogramar linfocitos Th17 murinos a linfocitos Treg a través de un mecanismo que depende del contacto celular y a su vez, afectan la estabilidad de los linfocitos Th17 de manera dosis dependiente.

3.7 Efecto de los macrófagos derivados de la médula ósea *in vivo*

Para estudiar *in vivo* el efecto de los macrófagos derivados de médula ósea sobre las poblaciones endógenas de linfocitos Th17 y Treg, utilizamos un modelo de inflamación intestinal en ratones. Esta inflamación es producida por la inyección intravenosa de un anticuerpo que se une a CD3 (α -CD3) en los linfocitos T e induce la activación masiva de estas células, provocando daño en las paredes del intestino delgado y pérdida transitoria de peso en los ratones (Merger y cols. 2002).

Los ratones estudiados fueron expuestos a 3 tratamientos diferentes tal como se indica en la Figura 10. La inflamación fue evaluada diariamente a través del peso de los ratones y al cabo de 7 días los ratones fueron sacrificados y evaluados los porcentajes de linfocitos Treg y Th17 en bazo, linfonodos periféricos (PLN), órgano

mesentérico (MLN) y lámina propia (LP). Además se disectó el colon y se midió el largo de éste en todos los ratones de cada uno de los tratamientos.

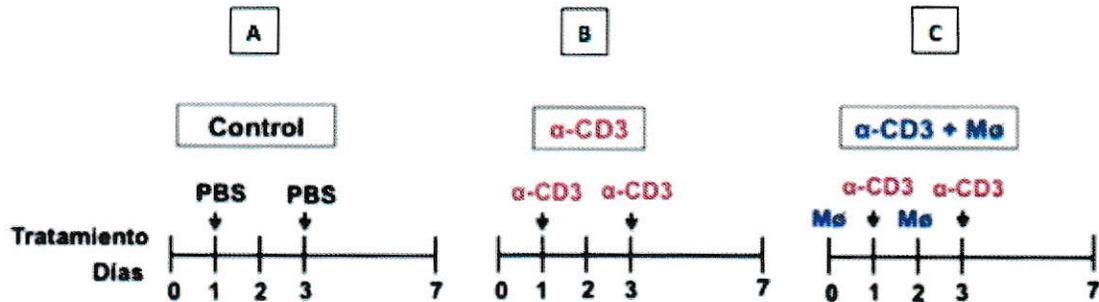


Figura 10. Protocolos experimentales para determinar el efecto de los macrófagos *in vivo*. A- Tratamiento control, en el cual los ratones fueron inyectados con dos dosis de PBS a los días 1 y 3. B- Tratamiento con dos dosis de α -CD3 a los días 1 y 3. C- Tratamiento con α -CD3 + Mø, dos dosis de α -CD3 a los días 1 y 3, y dos dosis de Mø a los día 0 y 2.

Al analizar la pérdida de peso, se observó que los ratones que recibieron dos dosis de α -CD3, en comparación a la condición control, pierden peso rápidamente desde el primer día del tratamiento hasta los días 4 y 5, donde alcanzan un máximo de pérdida en comparación con su peso inicial. Sin embargo, en la figura 11.A observamos que aquellos ratones que fueron tratados con macrófagos tienden a perder menos peso que aquellos tratados solamente con α -CD3. Tanto los ratones tratados con α -CD3, como con α -CD3 + Mø, son capaces de recuperar su peso luego de alcanzar un máximo de pérdida. Este resultado sugiere que los macrófagos podrían estar disminuyendo la inflamación intestinal.

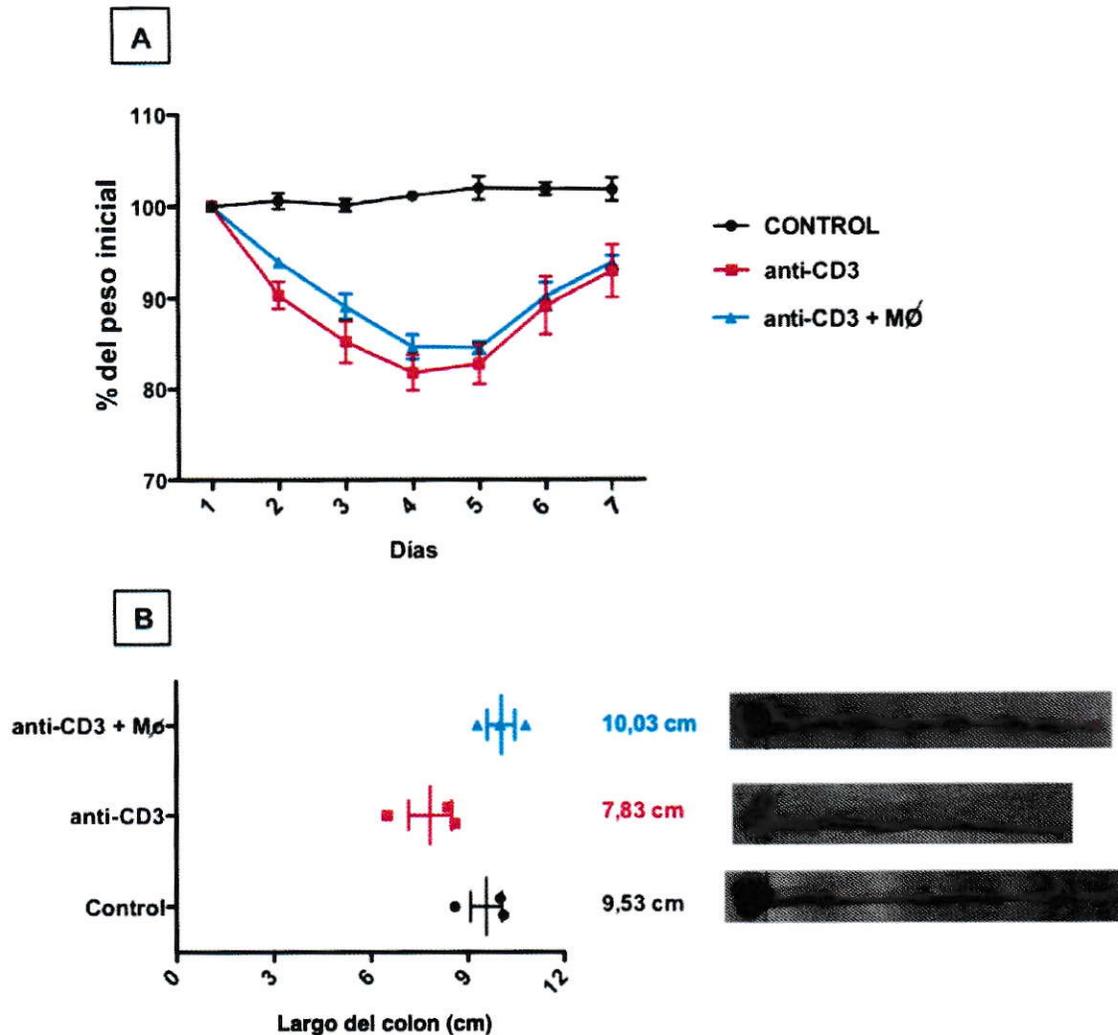


Figura 11. Los macrófagos derivados de médula ósea disminuyen la inflamación mediada por α -CD3 *in vivo*. Ratones C57BL6 fueron inyectados con dos dosis de PBS (Control), o dos dosis de α -CD3 (20ug/mL), o con dos dosis de α -CD3 (20ug/mL) mas dos dosis de $0,6 \times 10^6$ macrófagos (α -CD3 + MØ) **A-** Cinética de variación del porcentaje del peso de los ratones, considerando 100% el peso del primer día. **B-** A la izquierda, gráfica representativa del largo del colon de los ratones mantenidos en cada uno de los tratamientos experimentales luego de 7 días de iniciado el proceso. A la derecha, fotografía representativa del colon de un ratón por tratamiento. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes.

En la literatura se ha demostrado que los ratones que desarrollan colitis e inflamación intestinal presentan un colon de menor tamaño que los ratones sanos, lo que les impide la reabsorción de agua y favorece la formación de heces líquidas (Hayashi y cols., 2013; Zigmond y cols., 2014). Para determinar si los macrófagos derivados de médula ósea que fueron inyectados en el curso del protocolo tienen un efecto en la inflamación intestinal, sacrificamos los ratones al día 7 después del inicio del tratamiento y medimos el largo del colon de los ratones tratados o no con los macrófagos (Figura 11B). Observamos que el tratamiento con α -CD3 provoca la disminución del largo del colon de 10 a 7,8 cm, indicando que se está produciendo una inflamación importante en este órgano. Sin embargo, cuando se inyectan macrófagos junto con α -CD3, el tamaño del colon es similar al de un ratón no tratado con el anticuerpo, midiendo en promedio 10 cm.

De esta manera, nuestros resultados sugieren que la presencia de macrófagos derivados del estroma de medula ósea durante la inducción de inflamación intestinal mediada por α -CD3 tiende a disminuir los síntomas físicos de la inflamación *in vivo*, como son la pérdida de peso y la disminución del largo del colon.

Para determinar si el efecto tolerogénico de los macrófagos derivados de médula ósea *in vivo* está relacionado con una variación en los porcentajes de linfocitos Treg y Th17, analizamos los porcentajes de estas poblaciones linfocitarias en bazo, linfonodos periféricos (PLN), órganos mesentérico (MLN) y lamina propia (LP).

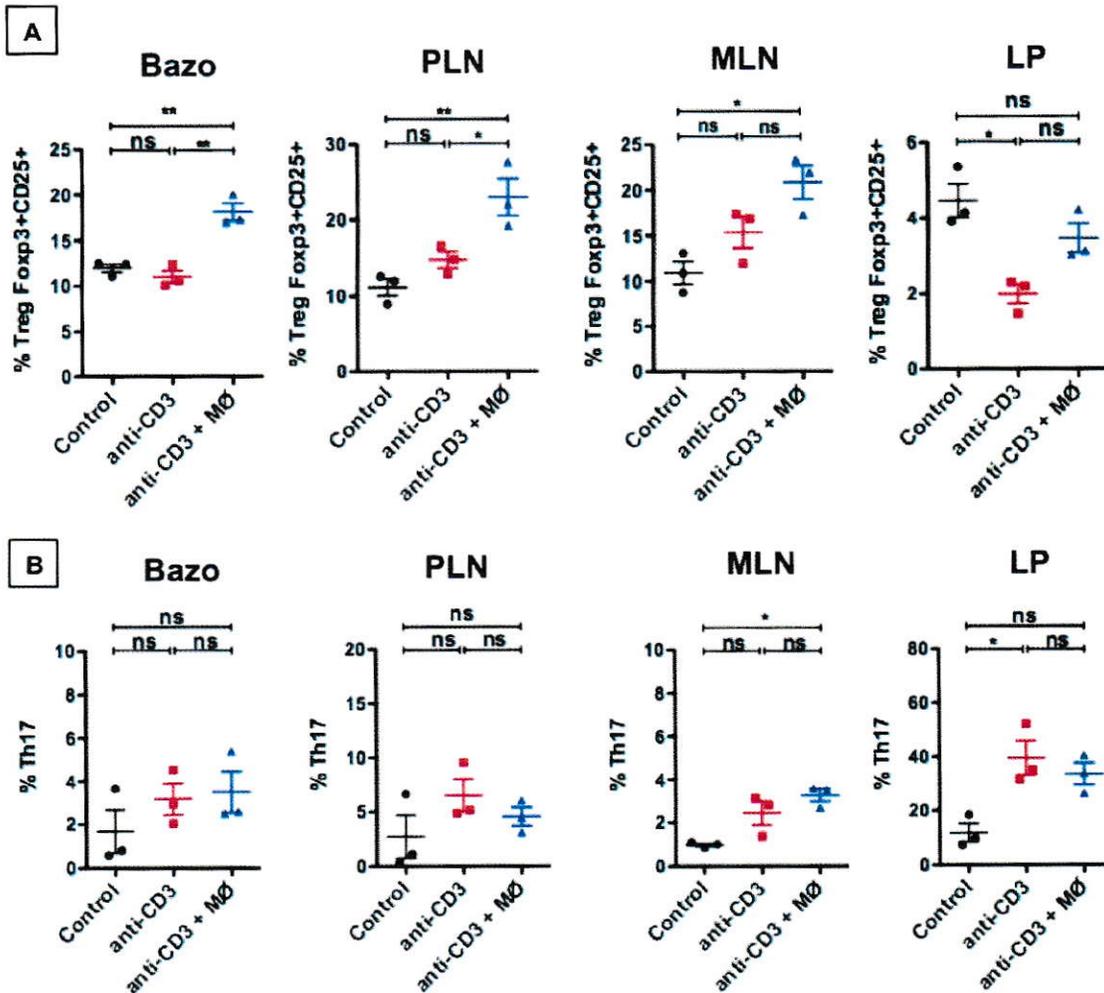


Figura 12. El tratamiento de la inflamación intestinal con macrófagos *in vivo* induce un aumento linfocitos Treg y no afecta a los linfocitos Th17. Se extrajo el Bazo, PLN, MLN y LP de ratones C57BL/6 controles, tratados con α -CD3 o con α -CD3 + M ϕ . Luego de 7 días, analizamos el porcentaje de linfocitos T en cada uno de los órganos mediante citometría de flujo. **A-** Porcentaje de linfocitos Treg CD4+CD25+Fxp3+. **B-** Porcentaje de linfocitos Th17 CD4+IL-17+. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (ANOVA medidas repetidas * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

En la figura 12A observamos que la inflamación mediada por α -CD3 provoca una disminución significativa de linfocitos Treg solo en lámina propia (LP). No hubo variación en el porcentaje de esta población linfocitaria en bazo, PLN y MLN. Por otro lado, la transferencia adoptiva de macrófagos en los ratones tratados con α -CD3 produce un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos Treg en bazo y PLN, mientras que en MLN y LP se observa una tendencia al aumento de Treg, pero la diferencia no es significativa.

Respecto a los linfocitos Th17, la inflamación mediada por α -CD3 produce un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos Th17 solo en lámina propia mientras que en todos los otros órganos estudiados no se observaron cambios significativos (Figura 12B). El porcentaje de Th17 no se vio afectado por la transferencia de macrófagos en ninguno de los órganos analizados.

De esta manera, el análisis de los Treg y Th17 endógenos en los animales a los cuales se les indujo una inflamación intestinal *in vivo*, muestra en la lámina propia un aumento de Th17 y una disminución de Treg que no es revertida por el tratamiento con macrófagos. Sin embargo, la transferencia adoptiva de macrófagos muestra efectos beneficiosos sobre los ratones cuando se evalúa el tamaño del colon de estos animales.

4-. DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de células estromales de médula ósea.

La reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg es un proceso que se ha observado en humanos solamente en condiciones en las cuales los linfocitos Th17 son cocultivados con células mesenquimáticas o células mieloides supresoras *in vitro* (Ghannam y col., 2010; Hoechst y cols., 2011). Si bien el mecanismo por el cual células mesenquimáticas o las células mieloides ayudan a la reprogramación de linfocitos Th17 no se encuentra completamente dilucidado, estos estudios plantean que estas células inducirían un microambiente tolerogénico caracterizado por la presencia de IL-10 y TGF- β , que favorecería este proceso (Hoechst y cols., 2011; Ghannam y col., 2010).

En esta tesis, y con el fin de establecer un modelo murino que nos permitiera estudiar la reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg, cultivamos y caracterizamos células del estroma de médula ósea, un órgano donde se ha descrito, conviven una diversidad de poblaciones celulares que tienen la capacidad de modular el balance entre linfocitos Treg y Th17, entre ellas, las células mesenquimáticas troncales, células mieloides supresoras y los macrófagos.

Con este fin, cultivamos células del estroma de médula ósea obtenidas a partir de los huesos largos de ratones C57BL/6 en medio α MEM + 10% FBS sin utilizar ningún tipo de factor de crecimiento adicional. El medio fue renovado cada 4 días con el fin de remover las células no adherentes y añadir nuevos nutrientes al cultivo. En estas condiciones se obtuvo un estroma que contenía varios tipos celulares que fueron caracterizados mediante una batería de anticuerpos específicos.

El resultado de este análisis (Tabla I) muestra los porcentajes de diez poblaciones estudiadas,. Los datos muestran que en P_0 , los porcentajes de las poblaciones analizadas no alcanzan el 100%, sugiriendo que hay poblaciones celulares, presentes en la médula ósea, que no fueron identificadas con la batería de anticuerpos usada. Estas poblaciones podrían corresponder a eosinoflos, basófilos o mastocitos. En P_1 y P_2 , observamos un enriquecimiento principalmente de macrófagos. Este resultado fue inesperado pues se ha descrito que el cultivo de células de la médula ósea en medio α MEM + 10% FBS favorece el crecimiento de células mesenquimáticas de ratón y no de macrófagos (Ren y cols., 2008). Esto pudo deberse a que en nuestros cultivos no fueron descartadas las células no adherentes luego de 24 horas de la incubación como es usual en este tipo de cultivos, sino que luego de 3 días (Ren y cols., 2008). En estas condiciones, estas células podrían haber influido en los cultivos produciendo factores que favorecen el crecimiento de macrófagos por sobre otras poblaciones celulares.

Los macrófagos puede clasificarse de acuerdo a la función que desempeñan en macrófagos clásicamente activados, aquellos que desempeñan una función inflamatoria, en macrófagos reparadores de tejidos, que participan en la reparación de los tejidos dañados y macrófagos reguladores que participan en la regulación de la respuesta inmune (Mooser y Edwards, 2008). Cada una de estas sub-poblaciones se caracteriza por secretar un patrón típico de citoquinas. Para determinar a cual de estos prototipo pertenecen los macrófagos obtenidos en nuestros cultivos de estroma de médula ósea, analizamos las citoquinas secretadas por los macrófagos así como la expresión de moléculas involucradas en la activación de linfocitos T luego de ser activados con ligandos de TLR2 o TLR4.



Los resultados muestran la ausencia de IL-4, descartando que los macrófagos en cultivo sean del tipo reparadores de tejidos. Por otro lado, al estudiar la concentración de IL-12 e IL-10, observamos que estos macrófagos producen grandes cantidades de IL-10 en todas las condiciones estudiadas, en comparación a la producción de IL-12, especialmente al activar a través del TLR4. Estos datos sugieren que los macrófagos obtenidos en estos cultivos serían del tipo regulador (Mooser y Edwards, 2008).

Células presentadoras tolerogénicas, como macrófagos reguladores o células dendríticas tolerogénicas, presentan una baja expresión de MHC-II (IA-b) y de moléculas de coestimulación como CD80 y CD86. Esta característica favorece la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Treg (Bi-man y cols., 2009; Sun y cols., 2014). Analizamos la expresión de estas moléculas en los macrófagos derivados de la médula ósea obtenidos en P₂ y las comparamos con la expresión en células dendríticas convencionales aisladas de bazo de ratones C57BL6. Observamos que los macrófagos derivados de médula ósea tienen baja expresión de MHC-II y de CD80, y similar expresión de CD86. Además, observamos que los macrófagos presentan una baja expresión de PDL-1, una molécula relacionada con la inhibición de la proliferación de linfocitos T. Estos resultados refuerzan la idea que el cultivo de células del estroma de médula ósea está enriquecido en macrófagos con características reguladoras.

Se ha descrito en la literatura que los macrófagos reguladores tienen la capacidad de favorecer la generación de linfocitos Treg e inhibir la diferenciación a linfocitos Th17 a través de IL-10 (Bi-man y cols., 2009; Sun y cols., 2014; Mooser y Edwards, 2008; Mantovani y cols., 2004; Elcombe y cols., 2013). Estudiamos el efecto de los macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea con el fin de observar si estas

células son capaces de modular la diferenciación de linfocitos T vírgenes a algunas de estas poblaciones linfocitarias.

Tal como se ha publicado en la literatura (Elcombe y cols., 2013; Filardi, y cols., 2010; Mantovani y cols., 2004; Mooser y Edwards, 2008), nuestros resultados demostraron que la inclusión de macrófagos en los cultivos de linfocitos T vírgenes y células dendríticas en condiciones de polarización a Treg, produjo un aumento en el porcentaje de linfocitos Treg (de 55% a un 70%). Este porcentaje es igual de alto (80%) cuando el cultivo se realiza en presencia de macrófagos, pero en ausencia de células dendríticas, sugiriendo que el efecto de los macrófagos es directo sobre los linfocitos T y no mediado a través de las células dendríticas. Estos resultados apoyan también la idea que el aumento en el número de linfocitos Treg en estos cultivos no se debería a una posible contaminación de los macrófagos con células dendríticas. Esta conclusión se ve reforzada por los resultados que muestran que los macrófagos son mejores productores de linfocitos Treg que las células dendríticas (Figura 5A).

CD39 es una ectonucleotidasa que degrada las moléculas de ATP y ADP a AMP mientras que CD73 por su parte, es una ectonucleotidasa que convierte el AMP a adenosina, una molécula que al unirse al receptor A2A presente en linfocitos T inhibe su proliferación (Deaglio y cols., 2007; Borsellino y cols., 2007). Ambas ectonucleotidasas forman parte de un mecanismo de supresión presente en los linfocitos Treg. Nuestros resultados muestran que la presencia de macrófagos en los cultivos de diferenciación a linfocitos Treg genera un aumento en la expresión de CD39 y una disminución de CD73 en estas células. Este fenotipo indica que los Treg generados en presencia de macrófagos derivados de la médula ósea tendrían una

mayor capacidad para disminuir respuestas inflamatorias mediadas por ATP, una señal de alerta celular que induciría la producción de citoquinas inflamatorias. Sin embargo, los Treg generados en presencia de los macrófagos podrían tener una capacidad disminuida de supresión de la proliferación de los linfocitos T ya que, al expresar menos CD73, producirían menos adenosina (Figura 5B) (Regateiro y cols., 2013; Deaglio y cols., 2007; Borsellino y cols., 2007).

Con el fin de analizar si la presencia de macrófagos podrían modificar el patrón de citoquinas producidas durante la diferenciación de los Treg favoreciendo un ambiente tolerogénico, determinamos la concentración de citoquinas presentes en el sobrenadante de estos cultivos. Los resultados muestran (Figura 5C) que existe un aumento significativo en la producción de IL-10 en los cultivos con macrófagos. El aumento de esta citoquina se debería principalmente al aporte de los macrófagos derivados de médula ósea, las cuales se sabe producen grandes cantidades de IL-10 aún en estado basal (Figura 4B). Sin embargo, no podemos descartar que tanto los Treg, como las células dendríticas puedan también estar aportando en la producción de esta citoquina (Bi-man Fu y cols., 2009; Kim y Diamond., 2014; Ostmann y cols, 2013). Concordante con el aumento de Treg en presencia de macrófagos, la IL-2, una citoquina que participa en la proliferación de los linfocitos T, disminuye debido probablemente al consumo de esta citoquina por los linfocitos Treg (Burchill y cols, 2007).

Un resultado sorprendente en los experimentos de generación de linfocitos Treg es el aumento significativo de IL-17 en los cultivos de diferenciación en presencia de macrófagos. Se ha demostrado que en presencia de TGF- β los linfocitos T vírgenes

pueden diferenciarse tanto a linfocitos Treg como a linfocitos Th17 produciéndose un momento de transición en el cual estas células son capaces de expresar tanto FoxP3, como ROR γ t y secretar así, citoquinas relacionadas con ambos fenotipos (Zhou y cols., 2008). Por otro lado, los linfocitos Treg además de expresar FoxP3, coexpresan el factor de transcripción de la población linfocitaria blanco sobre la que va a actuar (Campbell y Koch., 2011), como por ejemplo el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th17, ROR γ t, el cual a su vez está involucrado en la producción de IL-17 (Figura 2). Algunos trabajos han determinado que las poblaciones de linfocitos FoxP3+IL-17+ ó FoxP3+ROR γ t+ inducen respuestas tolerogénicas potentes, participando activamente en el inicio y desarrollo del cáncer de colon (Li, y Boussiotis, 2013). La presencia de macrófagos podría estar favoreciendo cualquiera de estos estados en los momentos iniciales del cultivo aumentando así, la cantidad de IL-17 acumulada luego de 5 días de cultivo.

Al analizar la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Th17 en presencia de macrófagos de la médula ósea observamos que los macrófagos producen una disminución en el porcentaje de células que secretan IL-17 (Denning y cols, 2007; Hayashi y cols, 2013; Takada y cols., 2010). Esto ocurre en presencia o ausencia de células dendríticas, demostrando que este efecto de los macrófagos es directo sobre los linfocitos T y no mediado por las células dendríticas. Nuestros resultados demuestran que los macrófagos obtenidos de los cultivos de médula ósea producen grandes cantidades de IL-10 aún en condiciones basales y esta citoquina está directamente relacionada con la pérdida de la estabilidad de linfocitos Th17 (Gu y cols., 2008; Denning y cols., 2007; Huber y cols., 2011), por lo que la disminución en el porcentaje de linfocitos Th17 podría explicarse por la presencia de esta citoquina.

Se ha determinado que existen dos tipos de linfocitos Th17 con funciones opuestas, los linfocitos Th17 reguladores y los linfocitos Th17 inflamatorios o patogénicos (Chalmin y cols., 2012). Los linfocitos Th17 reguladores tienen la capacidad de suprimir la proliferación de los linfocitos T CD4+ mediante un mecanismo que involucra las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Por otra parte, los Th17 inflamatorios, tienen características patogénicas, no expresan estas ectonucleotidasas y están relacionados con la generación de respuestas inflamatorias. (Chalmin y cols., 2012; Peters y cols., 2011).

En este estudio, analizamos la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en linfocitos Th17 con el fin de determinar si la presencia de macrófagos durante la diferenciación de linfocitos T vírgenes a Th17, puede influir en el fenotipo de estos linfocitos. Observamos que los macrófagos inducen una disminución de CD39, pero no observamos cambios significativos en CD73. Este resultado indicaría que los macrófagos podrían estar generando linfocitos Th17 con un fenotipo menos regulador que los Th17 generados en ausencia de macrófagos, pues tienen menos capacidad de hidrolizar el ATP presentes en el medio, permitiendo el aumento de citoquinas inflamatorias y produciendo una menor cantidad de adenosina.

Al analizar las citoquinas presentes en los cultivos de generación de linfocitos Th17, se observó una disminución significativa de IL-17 en presencia de macrófagos probablemente debido a la presencia de macrófagos.

Denning y sus colaboradores (2007) plantearon que macrófagos con características reguladoras, como los macrófagos de la lámina propia, pueden ejercer

efectos inmunosupresores sobre los linfocitos T CD4+ y disminuir su proliferación. Con el fin de determinar si los macrófagos producidos en este trabajo pueden ejercer una inmunosupresión sobre los linfocitos T, analizamos la proliferación de Treg y de Th17 generados en presencia de macrófagos. Nuestros resultados (Figura 7) demuestran que no existe diferencia en la proliferación de linfocitos Treg en presencia o ausencia de macrófagos, sin embargo, los macrófagos producen un retardo significativo en la proliferación de los linfocitos Th17. Esto sugiere que los macrófagos derivados de la médula ósea ejercerían su función inmunosupresora sobre los linfocitos Th17 favoreciendo la generación de linfocitos Treg.

En resumen, los macrófagos derivados de la médula ósea exhiben características de macrófagos reguladores y participarían en la inmunosupresión de la respuesta inmune, al favorecer la generación de linfocitos Treg e inhibir la generación y proliferación de linfocitos Th17.

4.2 Reprogramación de linfocitos Th17 en Treg

Luego de comprobar que los macrófagos cultivados a partir del estroma de médula ósea presentan un fenotipo tipo regulador que favorece la diferenciación de linfocitos Treg e inhibe la diferenciación a linfocitos Th17 *in vitro*, analizamos si los macrófagos son capaces de inducir la reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg en una ambiente tolerogénico.

Para analizar este punto, aislamos por *cell sorting* linfocitos Th17 generados en ausencia de macrófagos *in vitro*, los cuales se cocultivaron con células dendríticas y α -CD3, en condiciones de polarización a Treg (TGF- β , IL-2, RA).

Estos cultivos se realizaron en presencia de dos cantidades de macrófagos (8.500 y 100.000). Los resultados demostraron que la menor cantidad de macrófagos es insuficiente para reprogramar Th17 a Treg. Sin embargo, al agregar 100.000 macrófagos en los cultivos observamos que aproximadamente un 5% de Th17 se reprograman a linfocitos Treg.

Los macrófagos, al igual que los linfocitos T, son células que pueden reprogramarse de acuerdo al ambiente que los rodea. Así, en un ambiente inflamatorio, los macrófagos reguladores pueden reprogramar su fenotipo y ejercer una función inflamatoria (Mooser D.M y Edwards J.P., 2008). Se ha descrito que IL-17 afecta el fenotipo de los macrófagos induciendo la producción de citoquinas inflamatorias como TNF, IL-1 e IL-6, las cuales favorecen la diferenciación de los linfocitos Th17 (Chen y cols., 2013; Zhang y cols., 2013). De esta manera, es posible que en los cultivos con 8.500 macrófagos, donde la razón de Th17/M ϕ es aproximadamente 11:1, los macrófagos no fueron capaces de ejercer un efecto regulador ya que los linfocitos Th17 pueden haber influido sobre los macrófagos, volviéndolos inflamatorios, y en consecuencia evitando la reprogramación. Sin embargo, en la condición de reprogramación con 100.000 macrófagos, donde la razón Th17/M ϕ fue 1:1, si observamos una disminución en el porcentaje de linfocitos Th17 y un aumento de linfocitos Treg, indicando que bajo estas condiciones fue posible reprogramar linfocitos Th17 a linfocitos Treg (Figura 8A).

El análisis de la concentración de citoquinas presentes en los cultivos de reprogramación de linfocitos Th17 en la condición sin macrófagos y en la condición en

la cual se observó reprogramación (con 100.000 macrófagos) mostró que la presencia de macrófagos causó una reducción significativa de las citoquinas inflamatorias IL-17, TNF e IFN γ . Sin embargo, no se detectó la presencia IL-10 e IL-4 en ninguna de las condiciones estudiadas. Dado que los linfocitos Th17 expresan el receptor de IL-10 y además son capaces de producir esta citoquinas para autorregularse (Hubber y cols, 2011) sugerimos que a medida que la IL-10 fue producida por los macrófagos en cultivo fue consumida por los linfocitos Th17, disminuyendo así la cantidad de citoquinas inflamatorias presentes en los cultivos.

De esta manera, hemos demostrado, por primera vez, que los linfocitos Th17 murinos pueden reprogramarse a linfocitos Treg en presencia de macrófagos con características reguladoras derivados de médula ósea. Además, observamos que la proporción Th17/M ϕ es importante para que estos macrófagos produzcan un ambiente propicio para la reprogramación, caracterizado por una menor concentración de citoquinas inflamatorias.

Como una forma de abordar los mecanismos involucrados en la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg, realizamos experimentos de reprogramación en una cámara de *transwell*, la cual permite separar los Th17 y los M ϕ (Figura 9A). Los resultados sugieren que la reprogramación de linfocitos Th17 a Treg requiere como mínimo, el contacto celular entre los linfocitos y los macrófagos. Este resultado es novedoso, pues es la primera vez que se podría plantear que los macrófagos son capaces de modular a los linfocitos T a través del contacto. En este mecanismo podrían participar el complejo antígeno de histocompatibilidad-péptido y otras moléculas inhibitorias expresadas en la superficie de estas células.

Al analizar la estabilidad de los linfocitos Th17 en los cultivos de reprogramación a linfocitos Treg, observamos que al cultivar los linfocitos en ausencia de macrófagos, pero en presencia de la condición de polarización a Treg TGF- β , IL-2 y RA, solo el 70% se mantiene como linfocitos Th17 luego de 5 días de cultivo. Esto podría explicarse por el hecho que el RA, un metabolito de la vitamina A, afectaría la expresión del factor de transcripción ROR γ t, influyendo negativamente en la estabilidad de los linfocitos Th17 (Mucida y cols, 2007). Además, se observó que la presencia de 100.000 macrófagos en los cultivos de reprogramación de linfocitos Th17 disminuye aún mas la estabilidad de estos linfocitos, permaneciendo sólo el 49% como linfocitos Th17 (Figura 8A). Cuando el mismo cultivo de reprogramación en presencia de 100.000 macrófagos se llevó a cabo en una cámara *transwell* (Figura 9A), observamos que el porcentaje de linfocitos Th17 continua bajo (46%), lo que sugiere que la estabilidad de los linfocitos Th17 está siendo afectada por factores solubles presentes en el medio de reprogramación.

Para confirmar que la pérdida de estabilidad de los linfocitos Th17 en presencia de macrófagos depende de una mecanismo mediado por factores solubles, realizamos un cultivo de linfocitos Th17 con distintas concentraciones de macrófagos en un *transwell*. Observamos que a medida que la cantidad de macrófagos aumenta en los cultivos, se produce una disminución en el porcentaje de linfocitos Th17, sugiriendo que los macrófagos producirían una mayor cantidad de factores solubles que afectan la estabilidad de los linfocitos inflamatorios (Figura 9B).

De esta manera, hemos observado que los macrófagos pueden reprogramar linfocitos Th17 murinos a Treg *in vitro* a través de un mecanismo que requiere, como

mínimo el contacto célula-célula. Además, factores solubles producidos por la presencia de macrófagos en los cultivos de reprogramación afectarían la estabilidad de los linfocitos Th17.

4.6 Efecto de los macrófagos derivados de médula ósea *in vivo*

Con el fin de estudiar *in vivo* el efecto de los macrófagos derivados de médula ósea sobre los linfocitos Th17, realizamos una transferencia adoptiva de macrófagos en ratones a los cuales se les indujo inflamación mediada por α -CD3.

El tratamiento de los ratones con dos dosis de α -CD3 (20 μ g), provoca un daño en el intestino delgado, caracterizado por un aumento sistémico de IL-6 y TGF- β producidos como consecuencia del daño epitelial, la muerte celular y la fagocitosis de células apoptóticas (Merger y cols., 2002; Esplugues y cols., 2011). Por otra parte, se conoce que IL-6 y TGF- β juegan un rol fundamental en la generación de linfocitos Th17 (Harris y cols., 2007), por lo que este modelo genera inflamación y colitis mediada principalmente por linfocitos Th17 inflamatorios.

Para evaluar la inflamación intestinal producida por el tratamiento con α -CD3, determinamos el peso de los ratones diariamente y el largo del colon al término del experimento. Además, para observar el efecto de los macrófagos en los linfocitos Treg y Th17 residentes en el intestino, analizamos el porcentaje de ambas poblaciones linfocitarias en los ratones tratados o no con los macrófagos.

Observamos que el tratamiento con α -CD3 induce una pérdida de peso en los ratones producto de la inducción de colitis que alcanza su máximo los días 4 y 5 del tratamiento. Luego de este tiempo, los ratones comienzan a recuperar su peso.

Cuando se transfieren 2 dosis de macrófagos, se observa el mismo comportamiento que con el tratamiento con α -CD3. Sin embargo, existe una tendencia que sugiere que los macrófagos podrían estar atenuando la pérdida de peso.

Se ha determinado que los ratones con inflamación intestinal que han desarrollado colitis, tienen a disminuir el largo del colon, lo que disminuiría el área de reabsorción de agua y favorecería la liberación de heces líquidas (Hayashi y cols., 2013; Zigmond y cols., 2014). Al analizar al día 7 el largo del colon, se observó que el tratamiento con α -CD3 indujo una disminución en el largo del intestino grueso, indicando que este tratamiento indujo satisfactoriamente una inflamación intestinal y como consecuencia, una colitis. Al analizar el largo del colon de ratones que recibieron macrófagos observamos que después de 7 días, los ratones tratados con los macrófagos presentan un colon del mismo tamaño que los ratones controles y no presentan heces líquidas (Figura 11.B). Estos resultados muestran que los macrófagos derivados de médula ósea tienen un efecto sobre la inflamación intestinal, sin afectar el fenómeno de colitis. Las razones para esta divergencia se desconocen.

El intestino es un órgano que se caracteriza por presentar un ambiente propicio para llevar a cabo procesos de tolerancia. Un desbalance en este equilibrio puede resultar en enfermedades inflamatorias o cáncer (Zhu y cols., 2014). Bajo este contexto, se ha descrito que los macrófagos intestinales serían importantes actores en el proceso de tolerancia, siendo capaces de participar en el reconocimiento de antígenos y presentación a dendríticas tolerogénicas para favorecer en este órgano, la generación de linfocitos Treg (Medina-Contreras y cols., 2014). La capacidad de estos macrófagos intestinales de inducir tolerancia versus una respuesta inmune se

encuentra condicionada a la cascada de señalización que se desencadena cuando IL-10 se une a su receptor en estas células (Zigmond y cols., 2014; Shouval y cols., 2014). El tratamiento de los ratones con α -CD3 produce una tormenta de citoquinas inflamatorias que puede afectar el balance entre macrófagos inflamatorios y macrófagos reguladores, favoreciendo la inflamación y generando como consecuencia, colitis. Esta inflamación intestinal trae como consecuencia del daño epitelial y la muerte celular. Las células dendríticas y los macrófagos residentes luego de unos días fagocitan las células apoptóticas produciendo TGF- β , lo que favorecería un ambiente tolerogénico que se traduce en una recuperación del peso a partir del día 5 post tratamiento con α -CD3 (Perruche y cols, 2008). La transferencia adoptiva de macrófagos derivados de la médula ósea pudo haber amortiguado este proceso inflamatorio desde los primeros días del tratamiento, lo que se ve reflejado en la tendencia a perder menos peso y en el tamaño del colon a los 7 días de tratamiento.

Con el fin de determinar si los macrófagos generados en este trabajo tienen un efecto sobre los linfocitos Treg y Th17 residentes *in vivo*, analizamos estas poblaciones linfocitarias en el modelo de inflamación. Los resultados muestran que la inflamación mediada por α -CD3 afectó ambas poblaciones linfocitarias de manera significativa únicamente en la lámina propia, induciendo en ella, una disminución en los linfocitos Treg y un aumento de los linfocitos Th17. El tratamiento de estos ratones con macrófagos aumentó de manera significativa los linfocitos Treg en bazo y PLN con respecto a la condición de inflamación sin macrófagos. Por otra parte, no se observó un efecto de los macrófagos reguladores sobre la población de endógena de linfocitos Th17.

Estos resultados *in vivo* demuestran, que la transferencia adoptiva de macrófagos derivados de la médula ósea podrían favorecer una fagocitosis de células apoptóticas más rápida y con ello, una acumulación de TGF- β mayor que en la condición de inflamación mediada por α -CD3 sin macrófagos. Esta citoquina a su vez, favorecería el aumento de linfocitos Treg en bazo y MLN al día 7. Como observamos a través de este trabajo, la cantidad de macrófagos necesaria para afectar la estabilidad de linfocitos Th17 es central, lo que sugeriría la necesidad de transferir un mayor número de macrófagos regulatorios para poder observar algún cambio en los porcentajes de Th17 endógenos.

En resumen, el conjunto de los resultados muestra que el cultivo de células estromales de médula ósea, generados en ausencia de factores de crecimiento, favorece el enriquecimiento de macrófagos capaces de reprogramar linfocitos Th17 a linfocitos Treg *in vitro* a través de un mecanismo que depende, como mínimo, del contacto celular. Por otra parte, la transferencia de macrófagos a animales que cursan una inflamación intestinal favorece una más rápida recuperación. Estos resultados podrían tener relevancia en el desarrollo de terapias celulares con linfocitos Treg o Th17 donde la plasticidad de los linfocitos T CD4+ debe ser considerada.

5-. RESUMEN DE RESULTADOS

- El cultivo de estroma de médula ósea permite el enriquecimiento de macrófagos con un fenotipo tipo regulador, capaz de producir grandes cantidades de IL-10 y bajas cantidades de citoquinas inflamatorias como IFN- γ e IL-12.
- Los macrófagos favorecen la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Treg *in vitro*.
- Los macrófagos ejercen un efecto negativo en la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Th17 *in vitro*.
- Los linfocitos Th17 murinos pueden reprogramarse a linfocitos Treg *in vitro* en presencia de macrófagos reguladores cuando se encuentran en una proporción 1:1 en condiciones polarizantes a linfocitos Treg.
- La reprogramación de linfocitos Th17 a linfocitos Treg con macrófagos *in vitro* depende del contacto entre ambas células.
- La estabilidad de los Th17 se ve afectada por factores solubles producidos en los cultivos de reprogramación.
- La presencia de macrófagos derivados de médula ósea luego de la inducción de inflamación intestinal *in vivo* mediada por α -CD3, permite la disminuir los síntomas de la colitis.
- El tratamiento de la inflamación intestinal inducida por α -CD3 con las dosis de macrófagos estudiadas, permite el aumento de linfocitos Treg en algunos órganos, pero no induce cambios en el porcentaje de linfocitos Th17.

6. CONCLUSION

La reprogramación de linfocitos Th17 a Treg es un proceso complejo que requiere de células inmunosupresoras capaces de afectar la estabilidad de los linfocitos Th17. A través de este trabajo, hemos demostrado que macrófagos con un fenotipo regulador tienen la capacidad de inducir esta reprogramación de linfocitos Th17 a Treg por un mecanismo que involucra el contacto celular y factores solubles. Estos resultados demuestran por primera vez que los linfocitos Th17 pueden reprogramarse a linfocitos Treg en un modelo murino y da luces acerca de los requerimientos necesarios para que se produzca este proceso.

7. REFERENCIAS

Abbas, A.K, Lichtman A.H y Pillai S. 2008. Receptores del antígeno y moléculas accesorias de los linfocitos T. En Abbas, A.K, Lichtman A.H y Pillai S (eds), *Inmunología celular y molecular*. Pp 137-149. Elsevier Saunders, España.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. 2007. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, **56**: 1175–1186.

Bi-man, F., Xiao-Shu, H., Yu, S., Hu, A., Zhang, J., Ma, Y., Tam, N., Huang. J. 2010. A tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by activation of antigen-specific CD4+CD25+ T regulatory cells that promotes skin allograft survival in mice. *Cellular Immunology*, **261**. 69-76

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Mitri, D.D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Ho, S., Centonze, D., Bernardi, G., Luisa, M., Acqua, D., Rossini, P.M., Battistini, L., Ro, O., Falk, K. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells : hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**: 1225-1232.

Brancato, S.K., Albina, J.E. 2011. Wound macrophages as key regulators of repair. Origin, phenotype and function. *The american Journal of pathology*. **178**: 19-25

Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **178**: 280–290

Campbell, D.J., Koch, M.A. 2011. Phenotypical and functional specialization of FoxP3+ Regulatory T cells. *Nature Reviews*. **11**: 119-130

Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Végran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangère, V., Vicent, J., Masson, D., Robson, S.C., Eberl, G., Pallandre, J. R., Borg, C., Ryffel, B., Apetoh, L., Rébé, C., Ghiringbelli, F. 2012. Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity* **36**: 362–373

Chen, Y., P. Thai, Y.H. Zhao, Y.S. Ho, M.M. DeSouza, and R. Wu. 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem.* **278**:17036-43.

Chen, Z., Laurence A., O'Shea J.J. 2007. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol.***19**(6): 400- 408.

Chung, Y., S.H. Chang, G.J. Martinez, X.O. Yang, R. Nurieva, H.S. Kang, L. Ma, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* **30**:576–587.

Curotto De Lafaille, M., Lafaille, J. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**:626–635

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B., Robson, S.C. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* **204**:1257-65

English K., Ryan J.M., Tobin L., Murphy M.J., Barry F.P., Mahon B.P. 2009. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non- redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* . **156**:149-160.

Esplugues, E., S. Huber, N. Gagliani, A.E. Hauser, T. Town, Y.Y. Wan, W. O'Connor, Jr., A. Rongvaux, N. Van Rooijen, A.M. Haberman, Y. Iwakura, V.K. Kuchroo, J.K. Kolls, J.A. Bluestone, K.C. Herold, and R.A. Flavell. 2011. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. **475**: 514-518

Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM. 2007. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* **204**:1463–74

Denning, T.L., Y.-C. Wang, S.R. Patel, I.R. Williams, B. Pulendran. 2007. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* **8**:1086–1094

Elcombe, S. E., Naqvi, S., Van Den Bosch, M. W., Mackenzie, K. F., Cianfanelli, F., Brown, G. D. and Arthur, J. S. 2013. Dectin-1 Regulates IL-10 Production via a MSK1/2 and CREB Dependent Pathway and Promotes the Induction of Regulatory Macrophage Markers. *PloS one.* **8**: e60086

Fantini, M.C., Rizzo, A., Fina, D., Caruso, R., Becker, C., Neurath, M.F. 2007. IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. *Eur J Immunol.* **37**:3155-63.

Feng, X.H and Derynck, R. 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 659–693.

Filardy, A., Pires, D., Nunes, M., Takiya, C., Freire-de-lima, C., Ribeiro-Gomes, F. DosReis, G. 2010. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12^{low} IL-10^{high} Regulatory phenotype in macrophages. *J immunol.* **185**: 2044-2050

Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., et al. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp med.* **192(7)**: 1027-34

Ghannam, S., Pène, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C and Yssel, H. 2010. Mesenchymal Stem Cells inhibit Human Th17 Cell Differentiation and function and induce a T Regulatory Cell Phenotype. *The journal of immunology*. **185**: 302-312.

Guo Z, Wen Z, Qin A, Zhou Y, Liao Z, Liu Z, Liang Y, Ren T, Xu L. 2013. Antisense oligonucleotide treatment enhances the recovery of acute lung injury through IL-10-secreting M2-like macrophage-induced expansion of CD4+ regulatory T cells. *J immunol*. **190(8)**: 4337-4348.

Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., et al. 2007. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J. Immunol*. **179**: 4313–4317.

Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. 2013. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe*. 13 (6): 711-722.

Heusinkveld, M., De vos van Steenwijk, P.J., Goedemans, R., Ramwadhoebe, T. H., Gorter, A., Welters, M.J., Van Hall, T., Van der Burg, S.H. 2011. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol*. **187 (3)**: 1157-1165.

Hoechst, B., Gamrekelashvili, J., Manns, M.P., Greten, T.F., Korangy, F. 2011. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood*. **117**: 6532-6541

Huber, S., Gagliani N., Esplugues, E., O'Connor, W. Jr., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., Roncarolo, M.G., Battaglia, M., Flavell, R.A. 2011. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*, **34**: 554-565.

Kavanagh H, Mahon BP. 2011. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy*; **66**: 523–531.

Kelly, E. K., Wang, L. and Ivashkiv, L. B. 2010. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J. Immunol.* **184**: 5545 –5552.

Kim, C.H. 2008. Regulation of FoxP3 regulatory T cells and Th17 cells by retinoids. *Clinical & developmental immunology* **28**:1-12

Kim, J., Hematti, P. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* **37(12)**: 1445-53

Kim S.J., Diamond, B. 2014. Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity. *Semin Cell Dev Biol.* DOI: 10.1016/j.semcd.2014.04.020

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology* .**27**. 485– 517

Le Blanc, K., Mougiakakos, D. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews.* **12**: 383- 396.

Lexberg, M.H., Taubner, A., Forster, A., Albrecht, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., and Chang, H.D. 2008. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur. J. Immunol.* **38**: 2654–2664.

Lexberg, M.H., Taubner, A., Albrecht, I., Lepenies, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., Chang, H.D. 2010. IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17. *Eur. J. Immunol.* **40**: 3017-3027

Li J., Hsu H.C., Mountz, J.D. 2013. The Dynamic Duo- Inflammatory M1 macrophages and Th17 cells in Rheumatic Diseases. *J Orthop Rheumatol.* **1(1)**:4.

Li, L., Boussiotis, V.A. 2013. The role of IL-17-producing Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Immunol.* **148(2)**:246-53

Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L.A. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp. Med.* **203**: 2271-9

Lu, L.F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.L., Taganoy, K.D., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D., Rudensky, A.Y. 2010. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell.* **142**: 914-929.

Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzon IM, Nepomnaschy I *et al.* 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*, **5**: e9252

Maliszewski C.R., Delespesse G.J., Schoenborn M.A., Armitage R.J., Fanslow W.C., Nakajima T., Baker E., Sutherland G.R., Poindexter K., Birks C. Alpert A., Friend, D., Gimpel, Steven. Gayle, R. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. 1994. *The journal of immunology.* **153**: 3574- 3584.

Mann, E.R., Li, Xuhang. 2014. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World J Gastroenterol.* **20 (29)**: 9653-9664.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, **25**. 677–686.

Martinez F.O., Gordon, S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *J Leukoc Biol.* **80(6)**: 1298-1307

Mazzini E, Massimiliano L, Penna G, Rescigno M. 2014. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1⁺ macrophages to CD103⁺ dendritic cells. *Immunity.* **20**:248-261.

Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, Parkos CA, Denning TL. 2011. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest.* **12**: 4787-4795.

Merger, M., J.L. Viney, R. Borojevic, D. Steele-Norwood, P. Zhou, D.A. Clark, R. Riddell, R. Maric, E.R. Podack, and K. Croitoru. 2002. Defining the roles of perforin, Fas/FasL, and tumour necrosis factor alpha in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. *Gut.* **51**:155-63.

Mosser D.M., Edwards J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* **8**: 958–969..

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* **317**:256-260

Ostmann, Annett., Paust, Hans-Joachim., Panzer, Ulf., Wegscheid, Claudia., Kapffer, Sonja., Huber, Samuel., Flavell, Richard., Erhardt, Annette., Tiegs, Gisa. 2013. Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN. *JASN* **24**, 930-942.

Park J.M., Greten F.R., Wong A., Westrick R.J., Arthur J.S., Otsu K., Hoffmann A., Montminy M., Karin M. 2005. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis—CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity*. **23**: 319–329.

Parsa R, Andresen P, Gillett A, Mia S, Zhang XM, Mayans S, Holmberg D, Harris RA. 2012. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes*. **61**: 2881-2892

Perruche, S., Zhang, P., Lui, Y., Saas, P., Bluestone, J., Chen, W. 2008. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat. Med.* **14**: 528.

Peters, A., Lee, Y., Kurchroo, V.K. 2011. The many faces of Th17 cells. *Current opinion in immunology*. **23**: 702-706.

Qu X, Liu X, Cheng K, Yang R, Zhao RC. 2012. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol* , **40**: 761–770.

Regateiro F, Cobbold S, Waldmann H. 2013. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol*. **171**: 1-7.

Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI. 2008. Mesenchymal Stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. **2**: 141–150.

Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**: 345–352.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell. Rev.* **133**: 775-787.

Savage, N., Boer, T., Walburg, K., Joosten, S., Van Meijgaarden, K., Geluk, A., Ottenhoff, T. 2008. Human Anti-Inflammatory Macrophages Induce Foxp3⁺GITR⁺CD25⁺ Regulatory T Cells, Which Suppress via Membrane-Bound TGFβ-1. *The journal of immunology.* 181 (3): 2220-2226.

Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A. B., Ren, G. 2012. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 33(3): 136-143.

Shouval D, Biswas A, Goettel J, McCann K, Conaway E, Redhu NS, Mascanfroni ID, Al Adham Z, Lavoie S, Ibourk M, Nguyen D, Samsom J, Escher J, Somech R, Weiss B, Beier R, Conklin L, Ebens C, Santos F, Ferreira A, Sherlock M, Bhan A, Müller W, Mora J, Quintana F, Klein C, Muise A, Horwitz B, Snapper S. 2014. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity.* **4085**: 706-719.

Suh, Y.G., Kim, J.K., Byun, J.S., Yi H.S., Lee, Y.S., Eun, H.S., Kim, S.Y., Han, K.H., Lee, K.S., Duester, G., Friedman, S.L., Jeong, W.L. 2012. CD11b⁺ GR-1⁺ bone marrow cells ameliorate liver fibrosis by producing interleukin-10 in mice. *Hepatology.* **56**: 1902-1912.

Sun, C., Hall, J., Blank, R., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J., Belkaid, Y. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1757-1764

Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H., Lavelle, E.C. 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* **203**:1685– 1691

Symons, A., Budelsky, A.L., Towne, J.E. 2012. Are Th17 cells in the gut pathogenic or protective? *Mucosal Immunol.* **5**:4-6.

Takada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Kitazume, M., Honda, H., Oshima, Y., Saito, R., Takayama, T., Kobayashi, T., Chinen, H., Mikami, Y., Kanai, T., Okamoto, S., Hibi, T. 2010. Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10 producing regulatory macrophage subset. *J. Immunol.* **184**: 2671-2676.

Waite, J.C., and D. Skokos. 2012. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflamm.* **2012**: 819467.

Wang, R. Wan, Q. Kozhaya, L. Fujii, H. Unutmaz, D. 2008. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One.***3(7)**. e2705

Wang, C., Kang, S.G., HogenEsch, H., Love, P.E., and Kim, C.H. 2010. Retinoic acid determines the precise tissue tropism of inflammatory Th17 cells in the intestine. *J. Immunol.* **184**: 5519–5526

Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. 2007. Cutting edge: Regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β . *J. Immunol.* **178**: 6725–6729.

Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., et al. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR[α] and ROR. *Immunity* **28**: 29–39

Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., et al. 2008^o. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* **29**: 44–56

Zhang, R., Ito, S., Nishio, N., Cheng, N., Susuki, H., Isobe, KI. 2011. Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1(+)CD11b(+) cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. *Clin Exp Immunol.* 164 (3): **417-427**

Zhou, L., Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. 2007. IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* **8**: 967–974

Zhou, L., Chong, M.M.W and Littman, D.R. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity. Rev.* **30**: 646–655.

Zigmond E, Bernshtein B, Friedlander G, Walker CR, Yona S, Kim KW, Brenner O, Krauthgamer R, Varol C, Müller W, Jung S. 2014. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity.* **40**: 720-733.

Zhu W, Yu J, Nie Y, Shi X, Liu Y, Li F, Zhang XL. 2014. Disequilibrium of M1 and M2 Macrophages Correlates with the Development of Experimental Inflammatory Bowel Diseases. *Immunol Invest.* **12**: 1-15