

UCH-FC
MAG-B
O 838
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE POSGRADO

Papel del receptor de dopamina D5 en la patogenicidad de los linfocitos T CD4⁺

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de:

Magíster en Ciencias Biológicas

por

Francisco Javier Osorio Barrios

Director de Tesis:

Dra. María Rosa Bono

Co-director de Tesis:

Dr. Rodrigo Pacheco



Octubre 2016

Santiago - Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE POSGRADO

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

Francisco Javier Osorio Barrios

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 15 de septiembre del presente año.

Director de Tesis:
Dra. María Rosa Bono

Co-Director de Tesis
Dr. Rodrigo Pacheco

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Mario Roseblatt

Dr. Elías Utreras

Dedicatoria

Este trabajo aquí presente, junto a todos los pequeños logros de mi vida, se los dedico a las personas que me han permitido llegar a los 25 años sin haber conocido necesidades materiales ni falencias afectivas: mis padres.

Gracias por ser el ejemplo a seguir en mi camino y por hacerme sentir tan amado, todos los días.

-¿Y si te dijera que no quiero ser Pistolero, Roland, viejo camarada?-

-Diría que lo que tú quieras no tiene mucha importancia.

Stephen King, "Las Tierras Baldías" (1991).

"... Me fui perdiendo por los rieles de un tren que nunca llega"

La Transa, "Carnaval Callejero" (2014)

"No es lo mismo conocer el camino, que transitar por él"

-Morpheus. Hermanos Wachowski. The Matrix (1999)

Biografía



Nací un 25 de Diciembre de 1990, la primera ironía de mi vida. Crecí como un atípico niño inquieto que se interesaba por preguntas acerca de la naturaleza e historia. Cuestiones que mis padres y hermanas cariñosamente siempre supieron fomentar, de acuerdo a sus posibilidades económicas.

Sin problemas ni inconvenientes terminé mi educación básica en el Colegio Particular (subvencionado) N°172 José Abelardo Núñez para pasar a la Educación Pública Municipal del Liceo A-10 Manuel Barros Borgoño. Lugar que marcó mi vida, puesto que significó el paso a una burbuja (periférica) más grande y el primer enfrentamiento con el Chile real.

Toda mi educación superior la he cursado en la Universidad de Chile, por mi férreo compromiso con la Educación Pública, Laica e intelectualmente desafiante para las necesidades del país. En esta casa de estudios recibí el Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular en el año 2014 y, ahora, el Grado de Magíster en Ciencias Biológicas con el cual pretendo contribuir al desarrollo científico de la humanidad.

Agradecimientos

La realización de esta Tesis de Magíster no pudo haber sido posible sin el apoyo incondicional e irrestricto de mis padres y hermanas, así como tampoco sin la inmensa luz cálida que irradian mis preciosas y amadas sobrinas.

En cuanto al apoyo técnico y científico, los procedimientos experimentales que más tarde serán detallados fueron logrados gracias a la supervisión y dirección del Dr. Rodrigo Pacheco Rivera, quien dirige el Laboratorio de Neuroinmunología en la Fundación Ciencia & Vida. En el Laboratorio del Dr. Rodrigo Pacheco encontré todo el capital humano y técnico para la realización de todos los objetivos que nos planteamos durante este trabajo, que fue financiado por el Proyecto FONDECYT 1130271, el Proyecto Basal PFB-16 (a la Fundación Ciencia & Vida) y por la Beca CONICYT-PCHA/Magister Nacional-2014-22140120.

En la supervisión técnica también tuvo un papel importante la Profesora Dra. María Rosa Bono, a la cual le agradezco por aceptar amablemente dirigir y apoyar este trabajo. Sin ella y su laboratorio, en particular la Dra. Daniela Sauma, no se habría podido lograr la precisión técnica en un par de experimentos importantes en este trabajo.

A su vez, el apoyo del Bioterio y el Servicio de Citometría de Flujo de la Fundación Ciencia & Vida fueron esenciales para la realización de esta tesis, por lo que es necesario reconocer el trabajo del Dr. Sebastián Valenzuela y la Dra. Paz Reyes por liderar estas facilidades en el tiempo en el que se ejecutó este proyecto.

Agradecimientos II

Porque el dinero no es lo más importante

Nunca he estudiado otra cosa que no sea Ciencias, así que tengo escaso poder comparativo. Sin embargo, puedo aseverar que dedicarse a este lado del conocimiento es muy destructor en lo afectivo, social y emocional. Es por eso que quiero dedicarle unas palabras más sentidas a toda la gente que sirvió de *buffer* para impedir que cayera en la más profunda misantropía.

El primer párrafo siempre será dedicado a mi mayor virtud: mi familia. Muchas gracias a Luis Francisco (mi papi) por enseñarme que se necesita mucho más que un cáncer para acabar con la vida de un hombre y, que no hay persona más virtuosa que aquella que se dignifica en el trabajo. A Ana María (mi mami), por su incansable labor como dueña de casa trabajadora y por su agotador rol de madre para hacer congeniar 4 personas complicadas bajo el mismo techo. Quiero agradecer también a Claudia, por entregarme tanto cariño pese a que ahora tiene dos lindas hijas. Y además, necesito agradecer a Alejandra por ser un ejemplo inagotable de ideas creativas y talentos que no se aprenden en ninguna escuela. Muchas gracias a todos ellos por estar ahí desde siempre, los amo más que a nada ni nadie.

También es muy importante para mí dedicarle unas palabras a los dos pilares extra-familiares más importantes en estos últimos años:

i) Quiero agradecerle al Ingeniero en Biotecnología Ernesto López por su honesta amistad. Antes de conocerlo, yo pensaba que las épicas amistades sólo existían en los libros, como la de Frodo y Sam, la de Harry con Hermione o la de Jack y Roland, pero no. En él he encontrado un férreo, sincero, leal y recíproco compromiso sin importar el acotado tiempo por exceso de trabajo o relaciones amorosas. La amistad que hemos forjado es una de las cosas que más orgullo me dan. Gracias por no flaquear en mis momentos más nihilistas y depresivos. Gracias por leerme tan bien y hacerme notar mis fallas y virtudes. El valor de tu compañía es inconmensurable.

ii) En cuanto al valor de la compañía, también necesito agradecerle al Arquitecto Maximiliano Rojas por ser un notable apoyo, desde que comenzó el desafío de este Grado hasta marzo de este año. Gracias Maxi por tantas

enseñanzas en lo arquitectónico-inmediato, en los matices de la vida, en la cumbia, en la soltura social y en todo lo referido al simple goce. Gracias por la insistencia más allá de las ofensas y por estar tan dispuesto en el pasado, ante cualquier necesidad de compañía. Nunca olvidaré los excesivos kilómetros en Niteroi o esas horas a Chillán junto a tan buena compañía, que ni bien sirvieron como forjador de carácter. Y aunque no sea tan obvio, este logro también es por ti. Gracias por tanto, fuiste un buen amigo.

También preciso notar la tremenda contribución a mi vida de dos grandes científicos que me enseñaron todo lo técnico que leerán más adelante y, que no conforme con ello, también me han considerado su amigo, me han demostrado su cariño y me han hecho testigo de sus logros personales. Quiero darle las más sinceras gracias a la Dra. Carolina Prado y al Dr. Francisco Contreras. Sin ellos, nada de lo presentado en este trabajo sería posible. Han sido los mejores profesores que he tenido en la Educación Superior, puesto que también me han enseñado cómo ser un científico exitoso y no morir (de soledad) en el intento.

Como mencioné en la breve biografía, estudiar en la Casona Roja de San Diego ha sido uno de los grandes hitos de mi vida, no tan sólo por el lugar *per se*, sino que también por toda la gente que conocí ahí. Muchos de ellos, pese a los 11 años que han pasado desde que entré a primero medio, siguen siendo parte activa e importante de mi vida y necesito darles el reconocimiento adecuado. I) Quiero agradecerle al Asistente Social Ariel Campos por su hermanable amistad, por demostrarme que la gente puede superar sus defectos y madurar sin cambiar su esencia y las características que la definen como ser humano. Muchas gracias por esas largas y profundas conversaciones, por esos encuentros de tenis, esos partidos del Albo, la jarana y la asignación de tiempo. Haces la diferencia amigo. II) Quiero también agradecerle al Profesor de Estado Cristóbal Eluardo, porque sin planearlo mucho ha resultado ser una compañía infalible y un amigo notable. Gracias Cristo por las cumbias, por el Albo, por las salidas a los parques y por el tiempo dedicado. III) A su vez, quiero agradecer la compañía (desde 1999) y amistad del Ingeniero en Informática Carlos Muñoz por hacerme parte de su vida y pasatiempos al compartir en el tenis, al Albo y en las cumbias. Gracias gordo. IV) También preciso agradecerle al Administrador Público Sebastián Álvarez por esas borracheras intelectuales circunstanciales que tanto me gustaría que se dieran más frecuentemente, pero de lo bueno poco. Vale Seba por el desafío. V) Además, en este párrafo quiero agradecer la compañía virtual del particular Alan Rocco. Muchas gracias por nuestra amistad no convencional plagada de gestos de inmadurez y preocupación por el otro. VI) Y para terminar con la base Borgoñina, no puedo

finalizar este párrafo sin recalcar la trascendental importancia de mi H.G. el CB1° Juan Cuminao Muñoz, con el cual tengo una amistad que sirve de prueba para demostrar que dos seres tan pesados e insoportables como nosotros, pueden establecer una amistad que no se aminora por los miles de kilómetros de distancia.

Parte importante del trabajo científico es la capacidad de formar lazos interpersonales con la gente que compartes el mesón. En esa materia, fui un privilegiado al compartir con profesionales de excelencia con los cuales, incluso, compartí instancias de amistad. En este párrafo quiero agradecer al Ingeniero en Biotecnología Andro Montoya por compartir su filosofía conmigo, por las cervezas, la compañía del estar, el arte y tantos panoramas que surgieron en el camino. También, quiero agradecer a la Bióloga Daniela Elgueta por su compañía, por las tardes de comida y por tantos dulces gestos que tocaron fibras. Y a su vez, pese a que dejó este país hace un tiempo, en este párrafo quiero agradecer a la Ingeniera en Biotecnología Dafne Franz por ser una constante compañía, pese a que hay un gran Océano que nos separa.

Como mencioné en el primer párrafo de estos agradecimientos, nunca he estudiado algo que no sea Ciencias, así que desconozco si en otras carreras ocurre la misma obsesión que tenemos los científicos por nuestro trabajo. En esta obsesión patológica, es donde siempre encontré amigos con los que conversar de Ciencia (y otros temas, no somos tan *nerds*) y que incluso colaboraron intelectualmente en este trabajo. Quiero agradecer a los brillantes Ingenieros en Biotecnología Erick Armingol e Ignacio Avalos, por su amistad y apoyo y, por colaborar en el procesamiento de datos de transcripción de genes (Erick) y en el desarrollo de ensayos de migración *in vitro* (Ignacio). Muchas gracias cabros, son un ejemplo para mí. También quiero agradecer en este párrafo a la Ingeniera en Biotecnología Yessia Hidalgo por el constante y fructífero debate de ideas en Inmunología, por las diferentes conversaciones de variados temas y por compartir la periferia en este ambiente tan clasista. Considerando la periferia, aprovecharé para agradecerle también a los miembros permanentes de la "Junta Mensual" que no han sido nombrados aún; gracias Jorge Maturana por todo el aguante constante desde hace años, por ser tan buen oyente y compañero y, gracias al Licenciado Diego Nahuel por la aguda crítica de cine y los buenos momentos compartidos. Para finalizar estos agradecimientos, necesito agradecer el aporte de la Licenciada Constanza Torres en el momento de más flaqueza supo estar en el lugar adecuado y en el momento adecuado. Gracias por la amistad pony.

INDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xvii
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1- Relación Neuroinmune.....	1
2.2- La dopamina y sus receptores.....	2
2.3- Acción de la DA en la respuesta inmune.....	4
2.4- Esclerosis Múltiple	6
2.5- Enfermedades Intestinales Inflamatorias	14
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1- Animales y Anticuerpos.....	19
4.2- Obtención de quimeras.	21
4.3- Inducción de la EAE y obtención de linfocitos infiltrantes en el SNC de ratones enfermos.....	22
4.4- Inducción de colitis y obtención de linfocitos infiltrantes en la lámina propia del colon.....	23
4.5- Re-estimulación de linfocitos infiltrantes, citometría de flujo y purificación de LT CD4 ⁺	24
4.6- Cultivos de diferenciación y conversión de T _H 17.	25
4.7- Obtención de LT CD4 ⁺ con tropismo hacia el intestino y ensayos de migración.....	27
4.8- Determinación de los niveles de transcripción y análisis estadísticos.....	28
5. RESULTADOS.....	31

5.1.1- La expresión del D5R en el compartimento hematopoyético favorece el desarrollo de una respuesta más severa en EAE.....	31
5.1.2- El D5R expresado en LT CD4 ⁺ antígeno-específico no tiene efecto en la aparición, desarrollo y severidad de la enfermedad ni en la mortalidad en un modelo de agresivo de EAE.	34
5.2.1- El D5R regula diferencialmente el patrón transcripcional asociado a los fenotipos T _H 17.	40
5.2.2- El D5R no afecta la expresión de moléculas asociadas a funciones inmunosupresoras en los fenotipos de T _H 17.	42
5.2.3- El D5R no regula la plasticidad fenotípica de los T _H 17 <i>in vitro</i>	43
5.3.1- El D5R expresado en LT CD4 ⁺ favorece el desarrollo de colitis crónica.	45
5.3.2- La expresión del D5R en LT CD4 ⁺ no regula la adquisición de un fenotipo efector en el colon de ratones con colitis crónica.	47
5.3.3- El D5R expresado en los LT CD4 ⁺ favorece la migración hacia cLP en ratones RAG1KO con colitis crónica.	49
5.4.1- El D5R en LT CD4 ⁺ está asociado a la regulación de la expresión de moléculas de <i>homing</i> a intestino en bazo de ratones con colitis crónica.....	51
5.4.2- El D5R expresado en LT CD4 ⁺ colitogénicos es necesario para la migración hacia la lámina propia colónica.	57
5.4.3- El D5R regula negativamente la migración <i>in vitro</i> en LT CD4 ⁺ provenientes de ratones sanos.	61
6. DISCUSIÓN	63
6.1- Papel del receptor D5 de dopamina en los LT CD4 ⁺ en EAE.....	63
6.2- Papel de D5R en T _H 17	66
6.3- Papel del D5R en LT CD4 ⁺ en colitis	68
7. CONCLUSIONES	73
8. BIBLIOGRAFÍA	74

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Tipos y características de los DARs	3
Tabla II: Partidores utilizados en los ensayos de <i>real time</i> PCR.	29
Tabla III: El D5R expresado en el compartimento hematopoyético favorece el desarrollo de EAE.	33
Tabla IV: El D5R expresado en LT CD4 ⁺ encefalitogénico no afecta la incidencia, severidad ni mortalidad en un modelo agresivo de la EAE.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fuente de DA y sus efectos en LT CD4 ⁺	5
Figura 2: Cascada de eventos producidos en el desarrollo de la EAE..	8
Figura 3: El D5R expresado en los LT CD4 ⁺ totales y vírgenes favorece el desarrollo de EAE.	12
Figura 4: Perfil de transcripción de los distintos fenotipos de LT CD4 ⁺ involucrados en EAE.	13
Figura 5: El D5R expresado en el compartimento hematopoyético favorece el desarrollo de EAE en ratones quiméricos.	32
Figura 6: El D5R expresado en LT CD4 ⁺ no afecta la aparición, desarrollo y severidad de la enfermedad en un modelo agresivo de EAE..	35
Figura 7: El D5R expresado en LT CD4 ⁺ antígeno-específico no afecta la proporción ni el número de LT CD4 ⁺ infiltrados en el SNC de ratones RAG1KO con un modelo agresivo de la EAE.	37
Figura 8: El D5R regula la proporción entre los fenotipos de T _H 17.....	39
Figura 9: El D5R favorece el patrón transcripcional asociado al fenotipo T _H 17 Patogénico y algunos genes involucrados en el fenotipo No Patogénico.	40
Figura 10: El D5R no afecta la diferenciación a T _H 17 Patogénico o No Patogénico, ni tampoco la expresión de LAG3 y CTLA4 en estas poblaciones <i>in vitro</i>	42
Figura 11: El D5R no afecta la conversión de T _H 17 Patogénico a T _H 1 <i>in vitro</i>	44
Figura 12: El D5R expresado en Tn favorece la pérdida de peso en un modelo de Colitis Crónica..	46

Figura 13: El D5R no regula la adquisición de fenotipos patogénicos en LT CD4 ⁺ infiltrados en cLP.	48
Figura 14: La expresión de D5R en los LT CD4 ⁺ favorece la migración hacia cLP y regula negativamente la presencia de estas células en el bazo.....	50
Figura 15: El D5R expresado en LT CD4 ⁺ regula la expresión de moléculas de <i>homing</i> intestinal en el bazo de ratones con colitis crónica.....	53
Figura 16: El D5R expresado en LT CD4 ⁺ regula negativamente la expresión de CCR9 en el MLN de ratones con colitis crónica.....	55
Figura 17: El D5R no afecta la expresión de proteínas asociadas a la migración en LT CD4 ⁺ provenientes de ratones sanos.....	56
Figura 18: El D5R es requerido para la migración de LT CD4 ⁺ colitogénicos hacia la lámina propia colónica..	58
Figura 19: El D5R regula negativamente la expresión de CCR9 en LT CD4 ⁺ colitogénicos que lograron migrar a cLP <i>in vivo</i>	60
Figura 20: El D5R regula negativamente la migración <i>in vitro</i> en LT CD4 ⁺ provenientes de ratones sanos..	61

LISTA DE ABREVIATURAS

2D2: Ratones Transgénicos cuyo complejo receptor de los Linfocitos T reconoce de manera específica pMOG.

CD: Enfermedad de Crohn (*Crohn's Disease*)

cLP: Lámina propia del colon.

D5RKO: Ratones deficientes (*Knock Out*) en el receptor D5 de dopamina.

DA: Dopamina

DAR: Receptor de dopamina.

DC: Célula Dendrítica

EAE: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental.

EM: Esclerosis Múltiple.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

IL: Interleuquina.

LEAF: Libre de endotoxinas y bajo en azida.

LT: Linfocitos T.

MLN: Linfonodos Mesentéricos.

MNCs: Células Mononucleares.

PBMCs: Células Mononucleares presentes en la sangre.

pMOG: Glicoproteína de mielina de los Oligodendrocitos.

RAG1KO: Ratones deficientes en la Recombinasa 1.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TCR: Complejo Receptor de Linfocito T.

T_H: Linfocito T CD4⁺ colaboradores o *helper*.

T_n: Linfocito T CD4⁺ vírgen o *naïve*.

Treg: Linfocito T CD4⁺ regulador.

UC: Colitis Ulcerosa.

WT: Tipo silvestre o *wild type*.

1. RESUMEN

La dopamina es un neurotransmisor clásicamente asociado al aprendizaje, memoria, comportamiento y actividad locomotora. Sin embargo, durante la última década esta molécula ha sido asociada con la regulación de diferentes tipos de células inmunes.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se determinó que el Receptor D5 de Dopamina (D5R) expresado en linfocitos T (LT) CD4⁺ favorece el desarrollo de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), el modelo murino de Esclerosis Múltiple. Sin embargo, el papel del D5R en la fisiología de los LT CD4⁺ no ha sido dilucidado aún.

En esta tesis, se utilizaron ratones quiméricos para el D5R para demostrar que la expresión de éste receptor en el compartimento hematopoyético favorece la severidad de EAE. No obstante, al estudiar el papel del D5R en LT CD4⁺ mediante experimentos de transferencia adoptiva, se observó que el D5R no afecta la aparición, desarrollo ni severidad en un modelo agresivo de EAE.

El análisis posterior de los LT CD4⁺ infiltrados en el sistema nervioso central de ratones con EAE, indicó que el D5R está implicado en el balance entre los T_H17 que son capaces de producir IFN γ (Patogénicos) y los que no (No Patogénicos). De manera complementaria, experimentos de diferenciación *in vitro* hacia T_H17 seguidos de análisis de diversos reguladores moleculares mediante qPCR, indicaron que el D5R favorece la adquisición de un patrón transcripcional asociado a características patogénicas semejantes al fenotipo T_H1. Sin embargo, experimentos posteriores indicaron que el D5R no afecta la conversión de un fenotipo T_H17 hacia T_H1 *in vitro*.

Para evaluar si el D5R está involucrado en el desarrollo de otro modelo de autoinmunidad mediado por LT CD4⁺ y asociado a una variación en los niveles de concentración de dopamina, esta tesis se extendió al estudio de este receptor en el modelo de colitis crónica. Los resultados indicaron que el D5R expresado en LT CD4⁺ favorece el desarrollo de colitis, al propiciar la pérdida de masa corporal en ratones RAG1KO transferidos con LT CD4⁺ *naïve*. Sin embargo, este receptor no regula la adquisición de fenotipos T_H1 o T_H17 en la lámina propia del colon, uno de los principales sitios de inflamación en la enfermedad.

Posteriormente, experimentos de transferencia congénica de LT CD4⁺ indicaron que el D5R es requerido para la infiltración de estas células en la lámina propia colónica, presumiblemente porque regula la actividad de CCR9 y favorece la expresión de α 4 β 7 y LFA-1, todos marcadores asociados al *homing* a intestino.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren colectivamente que D5R tiene un papel importante en la patogenicidad de los LT CD4⁺. En el caso de EAE, el D5R está implicado en el balance de los T_H17 en el sistema nervioso central. En colitis, en cambio, D5R no afecta la diferenciación de las poblaciones efectoras de LT CD4⁺ en el sitio de inflamación evaluado, sino que favorece la migración a éste potenciando la expresión de las integrinas LFA-1 y α4β7.

ABSTRACT

Dopamine (DA) is a neurotransmitter classically involved in learning, memory, behaviour and locomotor activity. However, in the last decade, this molecule has been associated to the regulation of the physiology of several kinds of immune cells.

Previous studies performed by our group have determined that DA Receptor D5 (D5R) expressed on CD4⁺ T-Lymphocytes, favours the development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), a mouse model for Multiple Sclerosis. However, how D5R is involved in the regulation of CD4⁺ T-cell physiology remains pending to be explored.

In this thesis, using chimeric mice for D5R it was demonstrated that D5R expressed in the hematopoietic compartment favours the development of a more severe EAE. Nevertheless, experiments carried out by the adoptive transference of encephalytogenic CD4⁺ T-cells into lymphopenic recipient mice

showed no differences in the onset, development, severity and mortality of the disease in an aggressive model of EAE.

The analysis of CD4⁺ T-cells infiltrating the central nervous system indicated that D5R-deficiency modifies the ratio of T_H17 subtypes, which correspond to functional phenotypes of CD4⁺ T-cells strongly associated to autoimmunity. Complementary, experiments of *in vitro* T_H17 differentiation followed by the transcriptional analysis of several molecular markers by quantitative real time PCR indicated that D5R favours the acquisition of a molecular-pattern related to a pathogenic signature similar to T_H1. Nonetheless, subsequent experiments indicated that D5R-signaling has not effects in the phenotypic plasticity associated to the conversion of T_H17 into T_H1.

To evaluate the role of D5R expressed in CD4⁺ T-cells in another inflammatory model driven by CD4⁺ T-cells and associated to alterations in concentration of DA levels, this thesis was extended to the study of this receptor in the model of chronic inflammatory colitis. The results indicated that D5R expressed in CD4⁺ T-cells favours the development of colitis to promote the weight loss of lymphopenic mice transferred with naïve CD4⁺ T-cell. However, this receptor did not affect the acquisition of the phenotypes T_H1 or T_H17 in the colonic *lamina propria*, one of the main sites of inflammation in this disease.

Subsequent experiments involving the congenic transference of WT and D5RKO CD4⁺ T-cells indicated that D5R is required for the infiltration of those cells into

the colonic *lamina propria*, presumably by the regulation the activity of CCR9 and favouring the expression of key molecules involved in gut homing, including $\alpha 4\beta 7$ and LFA-1.

Taken together, the all data discussed above suggests that D5R have an importante role in the pathogenicity of the CD4⁺ T-cells. In EAE, D5R is involved in the balance of T_H17 in the central nervous system. In Chronic colitis, in other hand, D5R did not affect the differentiation of CD4+ T-cells in the site of inflammation, but favours the migration to this site enhancing the expression of LFA-1 and $\alpha 4\beta 7$.

2. INTRODUCCIÓN

2.1- Relación Neuroinmune

El sistema inmune es regulado recíprocamente por otros sistemas en el organismo. Una de las interacciones bidireccionales, físicas y funcionales, ocurriría con el sistema nervioso estableciendo la relación neuroinmune (Louveau y col., 2015), la cual estaría involucrada tanto en procesos fisiológicos como patológicos. El sistema nervioso puede modular la función del sistema inmune mediante neurotransmisores, los cuales pueden liberarse, por ejemplo, en los órganos linfoides primarios como el Timo y la médula ósea ya que estos órganos se encuentran inervados por fibras del sistema nervioso periférico (Mignini y col., 2003; Roggero y col., 2011; Huang y col., 2013). La regulación por neurotransmisores, ocurriría debido a que Linfocitos T (LT), células dendríticas (DCs) y otras células inmunes expresan algunos receptores para estas moléculas (Pacheco y col., 2010), como glutamato (Ganor & Levite, 2014), acetilcolina (Rosas-Ballina y col., 2011), serotonina (Franco y col., 2007), Norepinefrina (Xiu y col., 2013), Dopamina (DA) (Nakano y col., 2009) y otras.

2.1.1- Células del sistema inmune como fuente de neurotransmisores

No sólo las inervaciones del sistema nervioso pueden secretar neurotransmisores. Se ha observado que los LT pueden liberar Norepinefrina, Serotonina, DA y Acetilcolina, mientras que las DCs pueden liberar Glutamato, DA y Serotonina (Franco y col., 2007). Notablemente, LT CD4⁺ en los linfonodos pueden reconocer acetilcolina (de origen inmune o no inmune) y favorecer la diferenciación linfocitaria hacia T_H1, un fenotipo funcional particular dentro de ésta población (Pacheco y col., 2009). Además, se han encontrado receptores noradrenérgicos en los LT CD4⁺, como el receptor de norepinefrina. La norepinefrina inhibiría la producción de TGF- β , afectando con ello la generación y capacidad inmunosupresora de los LT reguladores (Treg) (Bhowmick y col., 2009). La DA en tanto, puede afectar la activación, proliferación y función efectora de los LT y la alteración en la señalización dopaminérgica está asociada a múltiples patologías inmunes (Pacheco y col., 2009; Pacheco y col., 2014). Lo anterior, hace relevante el estudio del efecto de este neurotransmisor en el funcionamiento de las células del sistema inmune.

2.2- La dopamina y sus receptores

La DA es un conocido neurotransmisor que clásicamente ejerce su acción en circuitos neuronales. Las neuronas que son capaces de sintetizar esta molécula son denominadas dopaminérgicas y han sido involucradas en variadas funciones vitales desarrolladas por el sistema nervioso central (SNC) como el movimiento voluntario, alimentación, sueño, aprendizaje y memoria (Jean-Martin Beaulieu & Raul R. Gainetdinov, 2011). La deficiencia o descompensación de algunas vías dopaminérgicas han sido asociadas a distintos desórdenes conductuales y cognitivos.

Recientemente nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión del receptor D3 de DA en los LT CD4⁺ favorece el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson (Gonzalez y col., 2013), la cual se asocia con grandes alteraciones en los niveles de concentración y distribución de DA en el cerebro (Hornykiewicz, 1966).

La DA actúa como ligando de un grupo de receptores específicos que pertenecen a la familia de Receptores Acoplados a Proteínas G. Estos comparten una estructura funcional de 7 dominios transmembrana y mediante acoplamiento a diferentes tipos de proteínas G, los receptores de DA (DARs) modulan la producción de AMPc y la actividad de la Proteína Kinasa A. Los DARs se clasifican en dos tipos de receptores y sus características se muestran en la Tabla I.

Tabla I: Tipos y características de los DARs

	DARs Tipo I	DARs Tipo II
Integrantes	D1R y D5R	D2R, D3R y D4R
Intrones en su secuencia	No	Sí; 6, 5 y 4, respectivamente.
Homología en sus dominios de transmembrana	~80%	Entre un 50 y 70%
Proteína G asociada	G α_s	G α_i
Efecto sobre los niveles de Adenosina Monofosfato cíclico	Aumenta	Disminuye
Efecto en la actividad de Proteína Kinasa A	Aumenta	Disminuye

Obtenido desde (Jean-Martin Beaulieu & Raul R. Gainetdinov, 2011).

2.3- Acción de la DA en la respuesta inmune

La DA ha adquirido relevancia dentro del campo de la inmunología, ya que se ha observado que este neurotransmisor puede ser sintetizado y/o almacenado en distintas células del sistema inmune. Por ejemplo, tanto los LT CD4⁺ efectoras como Treg son capaces de almacenar el neurotransmisor. En los Treg, se almacenan cantidades relevantes de DA que puede actuar de manera paracrina/autocrina afectando su capacidad inmunosupresora (Cosentino y col., 2000; Cosentino y col., 2007). Los Treg además pueden expresar constitutivamente la enzima Tirosina Hidroxilasa, que cataliza el paso limitante en la síntesis de DA. Esta enzima también se expresa en las DCs inmaduras, las cuales además poseen la maquinaria celular necesaria para almacenar, liberar y degradar DA (Prado y col., 2012). Junto con esto, se ha descrito que tanto Treg (Kipnis y col., 2004) como DCs (Prado y col., 2012) dependiendo de las condiciones particulares y del origen expresan diferentes DARs, por los cuales distintas funciones celulares podrían ser moduladas farmacológicamente (Nakano y col., 2008; Nakano y col., 2009).

Sumado a lo anterior, existen antecedentes indicando que tanto funciones reguladoras como efectoras podrían ser moduladas por la señalización de los DARs en los LT CD4⁺. Estos efectos son resumidos en la figura 1.

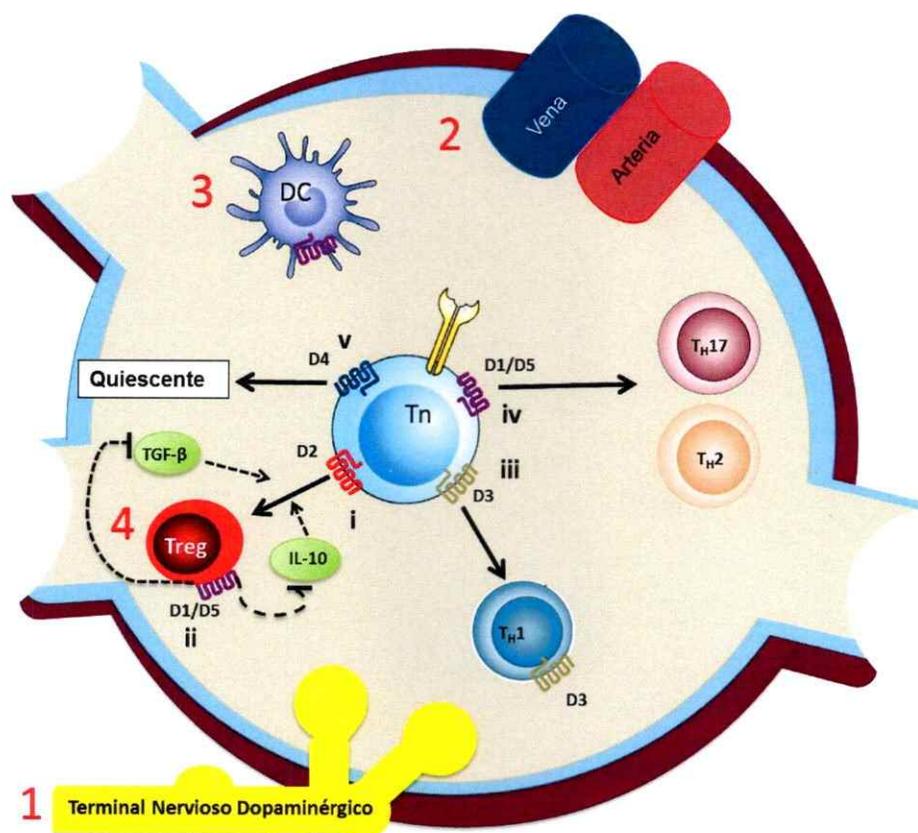


Figura 1: Fuente de DA y sus efectos en LT CD4⁺. Los LT pueden reconocer DA proveniente de distintas fuentes (números en rojo). 1. Terminales nerviosas que inervan los órganos linfoides. 2. Plasma sanguíneo donde en individuos sanos alcanza alrededor de 10 pg/mL. 3. De las DCs, las cuales podrían liberar DA en la presentación antigénica. 4. De los Tregs. Junto con esto, los LT CD4⁺ vírgenes (Tn) expresan los DARs Tipo I y II y, la señalización por DA tiene variados efectos en ellos (números romanos). i, La estimulación de D2R induce una secreción aumentada de IL-10, favoreciendo la polarización hacia Treg. ii, La activación de DARs Tipo I en los Treg, por el contrario, inhibe la síntesis de las moléculas características de este fenotipo. iii, La señalización de D3R favorece la polarización hacia el destino TH1. iv, La estimulación de DARs Tipo I favorece el destino TH2 y TH17. v, La estimulación del D4R produce un estado quiescente en las células T, que se caracteriza por un reducido metabolismo. Figura adaptada de (Pacheco y col., 2009).

2.4- Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente adultos jóvenes y de tercera edad, siendo la mayor causa de discapacidad en este grupo etario (Nylander & Hafler, 2012). Esta enfermedad se origina por una respuesta inflamatoria que se desarrollaría en la periferia contra antígenos derivados de la vaina de mielina. Bajo circunstancias aún desconocidas, poblaciones leucocitarias que reconocen dichos antígenos ingresarían al SNC traspasando la barrera hematoencefálica (BHE), provocando neuroinflamación y consecuentemente neurodegeneración (Ransohoff & Engelhardt, 2012). El escenario fisiopatológico de la EM se caracteriza por una desmielinización axonal a nivel perivascular y periventricular en el cerebro y médula espinal, generando en los pacientes variada sintomatología, según el territorio anatómico afectado. Dentro de los síntomas se encuentran fatigas, reducción en la movilidad, debilidad muscular, predisposición al desarrollo de contracturas, ataxia, temblores, dolor crónico, pérdida de capacidad cognitiva y trastornos del ánimo (depresión y ansiedad) entre otros (MINSAL, 2010).

Esta patología afecta mayormente a mujeres que a hombres en una relación aproximada de 3:1 (Voskuhl & Gold, 2012) y, se estima que su prevalencia mundial es alrededor de 2,3 millones de personas (MSIF, 2013). Con respecto a su origen se atribuyen factores genéticos, medioambientales y demográficos como desencadenantes de la enfermedad, dentro de los que incluso se considera el gradiente latitudinal (Koch-Henriksen & Sorensen, 2010). Sin embargo, su etiología es aún desconocida y debatida.

2.4.1- Encefalomiелitis Autoimmune Experimental, el Modelo animal de EM

El desarrollo de la EM, así como el mecanismo celular implicado en la patología ha sido extensamente estudiado gracias a la existencia de un modelo animal de la enfermedad que replica las principales características sintomatológicas y el curso temporal de la patología. La Encefalomiелitis Autoimmune Experimental (EAE) fue inducida por primera vez en 1947 gracias a los experimentos basados en repetidas inoculaciones con extractos de médula espinal en distintos modelos animales. Esto genera parálisis muscular en los animales inmunizados provocada por la desmielinización de las fibras nerviosas, generando lesiones distribuidas a lo largo del SNC (Baxter, 2009). El modelo animal EAE ha permitido evaluar las terapias paliativas que existen contra la EM y ha permitido identificar un vasto número de procesos fisiopatológicos que se ven involucrados en este desorden autoimmune. Los principales eventos de la EAE se resumen en la figura 2.

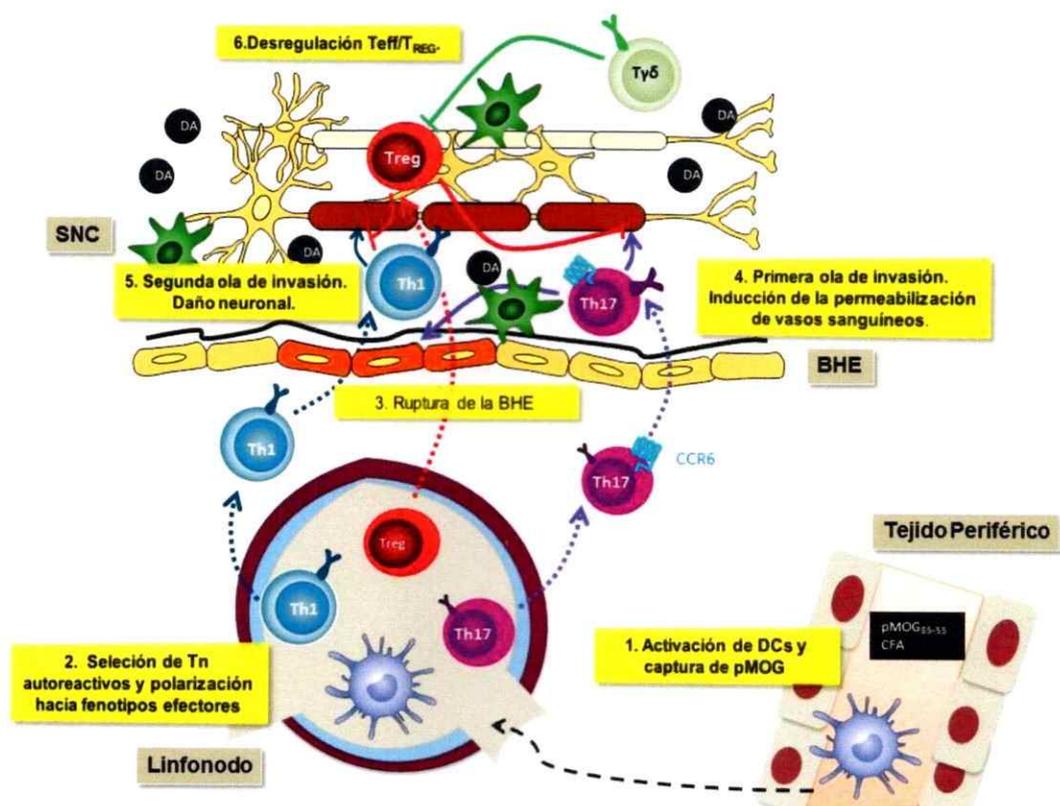


Figura 2: Cascada de eventos producidos en el desarrollo de la EAE. 1. Después de la administración subcutánea de un péptido derivado de la vaina de mielina, las DCs presentes en los tejidos maduran y se trasladan al linfonodo drenante. 2. Linfocitos T vírgenes (Tn) encefalitogénicos son activados por las DCs que presentan antígenos derivados de la mielina y adquieren un fenotipo efector. 3. Debido a la expresión de integrinas y receptores específicos, estos LT CD4⁺ T_H logran atravesar la BHE por el epitelio de los Plexos Coroideos, que mantiene aislado el espacio subaracnoide. 4. Se genera la primera ola de infiltración, la que está mediada principalmente por T_H17 (morado). Estos linfocitos son re-estimulados por células presentadoras de antígenos residentes asociadas a las meninges, favoreciendo la reactivación celular y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Éstas, inducen un cambio estructural en la BHE, haciéndola permeable para otros tipos de leucocitos. 5. Se genera la segunda ola de infiltración, debido a que los vasos sanguíneos que irrigan al SNC se vuelven más permisivos, producto de las señales proinflamatorias. Esta segunda ola de infiltración está constituida preponderantemente por T_H1 (azul). Los linfocitos T_H autoreactivos son re-estimulados por células presentadoras de antígenos perivasculares adquiriendo la capacidad de infiltrarse en el parénquima del cerebro y la médula espinal, generando daño neuronal. 6. El estado inflamatorio resulta complejo de controlar por los Treg (rojo) debido a que se encuentran inhibidos por la acción de LT $\gamma\delta$ (verde).

2.4.2- Regulación dopaminérgica en EM/EAE

En modelos murinos, la concentración de DA aumenta sistemática y significativamente en el estriado luego de la inducción de EAE, tanto en la fase de aparición de los primeros síntomas como en el pico de máxima severidad de la enfermedad (Balkowiec-Iskra y col., 2007a). En cuanto a los niveles de DA fuera del SNC durante la máxima severidad en la EAE, se ha observado una disminución significativa de DA en el bazo junto a un aumento de la concentración de L-DOPA, que corresponde a un sustrato para la síntesis de DA. Sin embargo, éstas alteraciones se revierten hasta alcanzar los niveles fisiológicos una vez que los síntomas clínicos desaparecen (Wesselmann y col., 1987). De manera similar, tanto en EM como en otras enfermedades crónicas autoinmunes ocurre un aumento en la concentración de DA y otras catecolaminas en el plasma sanguíneo (Lechin y col., 1994). Estos hechos sugieren que las alzas de DA podrían constituir un mecanismo de respuesta antiinflamatoria, tal como se ha demostrado para el modelo murino de sepsis (Torres-Rosas y col., 2014). Sin embargo, se desconoce tanto la causa como el efecto que este fenómeno tendría en la aparición y/o progresión de EM.

La destrucción específica de neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra* por medio del agente químico 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) resulta en una drástica reducción de los niveles de DA y una exacerbación en los síntomas de EAE (Balkowiec-Iskra y col., 2007b), sugiriendo que niveles altos de dopamina en el SNC atenuarían la inflamación. Por esto, algunas drogas que aumentan la liberación del neurotransmisor y/o disminuyen su captación y oxidación como Amantadine, han sido usadas como tratamientos efectivos para algunos síntomas de EM (Ledinek y col., 2013). Junto a esto, el tratamiento usual para EM

(IFN- β) aumenta la producción y liberación de DA por parte de las células mononucleares presente en la sangre (PBMCs) de humanos, aunque este efecto es contrarrestado por señales proinflamatorias como IFN- γ (Cosentino y col., 2005).

Mediante citometría de flujo se ha demostrado que la mayoría de las poblaciones celulares humanas presentes en PBMCs expresan DARs. Dentro de los Tipo I, el D5R es el más frecuente (D1R casi indetectable) y dentro de los Tipo II es el D3R es el más representado (McKenna y col., 2002). Esto sugiere que la DA puede modular la fisiología de las células del sistema inmune mediante la estimulación de sus receptores, los cuales presentan distinta afinidad por el ligando siendo $D3R > D5R > D4R > D2R > D1R$ [K_i (nM) = 27, 228, 450, 1705 y 2340, respectivamente] (Jean-Martin Beaulieu & Raul R. Gainetdinov, 2011). Dentro del contexto de la EM, pacientes con el desarrollo remitente remanente (forma más recurrente de EM) no tratados, mantienen inalterado el nivel de transcripción de D3R y disminuyen la transcripción y expresión de D5R en PBMCs (Giorelli y cols., 2005). Sin embargo, el efecto en la transcripción del gen que codifica para D5R puede revertirse completamente bajo el tratamiento sostenido por 12 meses con IFN- β (Zaffaroni y cols, 2008).

Lo anterior apunta que la señalización de D5R podría tener un efecto inmunoregulador en las distintas poblaciones celulares en EM, sugiriendo que la disminución en la expresión de éste receptor beneficiaría un papel inflamatorio más resistente a los efectos inmunosupresores de la DA. De acuerdo a esta idea, se ha observado que por medio de D5R, la proliferación y citotoxicidad de LT CD4⁺ y CD8⁺ son inhibidas en humano (Saha y col., 2001).

La relación en la señalización de DA así como la regulación dopaminérgica entre EM y EAE ha sido complejo de homologar por las distintas situaciones experimentales (y especies) en las que se han recolectado los datos. Por ejemplo, ratones tratados de manera sistémica con el antagonista de los DARs Tipo I, SCH 23390, desarrollan un EAE menos severo que estaría dado por una menor polarización de LT autoreactivos hacia T_H17 (Nakano y col., 2008). Estos resultados están en oposición a lo que se hubiese esperado en humanos, donde la ausencia de la señalización mediada por D5R en PBMCs estaría asociado a eventos patogénicos. Sin embargo, es importante considerar que las PBMCs no son las únicas células involucradas dentro de la respuesta celular en EM o EAE y, la actividad de ellas no se puede distinguir por la aplicación sistémica del fármaco SCH23390, el cual además presenta selectividad por los receptores de Serotonina (Millan y col., 2001). No obstante, antecedentes genéticos han logrado determinar que la señalización por D5R está involucrada en la patogenicidad de EAE, ya que ratones deficientes en D5R (D5RKO) presentan una menor severidad de la enfermedad en comparación con animales tipo silvestres o *wild type* (WT). Mediante experimentos de transferencia adoptiva, se logró determinar que la menor patogenicidad en EAE de los ratones D5RKO está dada en parte, por la señalización del D5R en DCs, las cuales son las responsables del ensamblaje de la respuesta inmune adaptativa. Las DCs D5RKO presentan una menor producción de IL-23, la cual es una citoquina importante para la adquisición del fenotipo T_H17 en los LT $CD4^+$ (Prado y col., 2012).

Pese al claro efecto de D5R en DCs, estas no son las únicas células que expresan el receptor y que están involucradas en EAE. De hecho, solo una disminución parcial de la severidad en los ratones D5RKO es atribuido al afecto de las DCs (Prado y col.,

2012) sugiriendo que el D5R expresado en otra u otras poblaciones celulares es relevante en la regulación de la respuesta inmune durante la EAE.

Debido a que los LT CD4⁺ expresan los DARs y que varias funciones efectoras pueden ser moduladas por DA (figura 1), se postula que la función de éstas células en EAE puede ser modulada por D5R. Esto debido a que la transferencia adoptiva de LT CD4⁺ WT totales (figura 3A) y *naïve* (figura 3B) a ratones D5RKO, potencia el desarrollo de EAE (datos propios, no publicados).

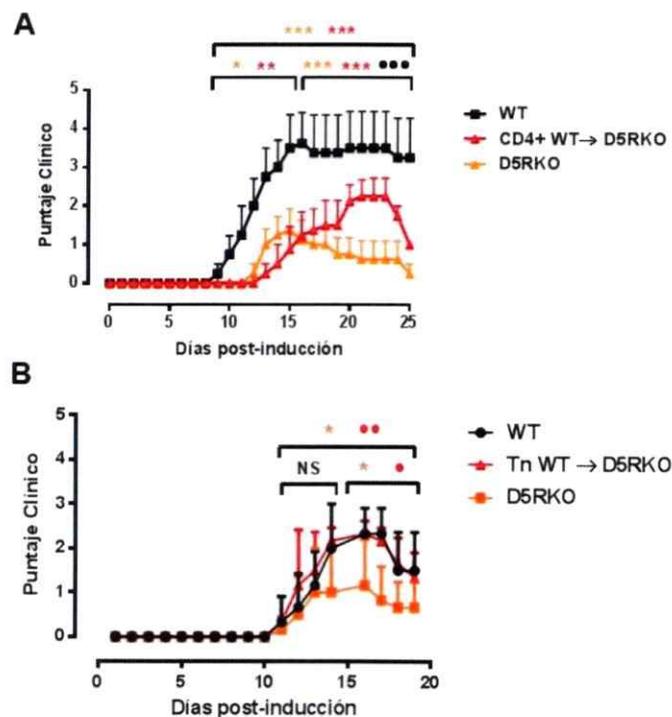


Figura 3: El D5R expresado en los LT CD4⁺ totales y vírgenes favorece el desarrollo de EAE.

La EAE fue inducida en ratones WT (negro), D5RKO (naranja) y ratones D5RKO transferidos previamente con 5×10^6 LT CD4⁺ WT totales (arriba, rojo) o 3×10^6 LT CD4⁺ vírgenes (abajo, rojo). **A y B.** Se grafica el puntaje clínico promedio de cada grupo de experimentación en función del tiempo desde que se realiza la inmunización. En A y B se utiliza *U-test* de Mann-Whitney; desde la aparición de los síntomas (~día 10) hasta el pico de manifestación (~día 15) [corchete izquierda], desde el pico de manifestación hasta la fase de recuperación (~día 20-25) [corchete derecha] o desde el inicio de la enfermedad hasta la fase de recuperación [corchete

central]. (*) indica las diferencias estadísticas con respecto al grupo WT. (*) indica las diferencias entre los grupos con animales receptores D5RKO. * $p < 0.05$; ** ó ** $p < 0.01$; *** ó *** $p < 0.0001$. Se muestra un experimento representativo de tres, con 3-4 ratones por grupo.

El mecanismo por el cual D5R expresado en los LT CD4⁺ podría potenciar el desarrollo de EAE es favoreciendo un fenotipo T_H17 asociado a funciones patogénicas (T_H17P), ya que en presencia de IL-23 y TGF-β3, D5R favorece significativamente la transcripción de RORγt *in vitro*, el cual es el factor de transcripción maestro de este tipo celular. Por el contrario, en presencia de TGF-β1, D5R inhibe significativamente la transcripción del gen que codifica para IL-10, clásicamente asociado a inmunoregulación, como se puede observar en la figura 4.

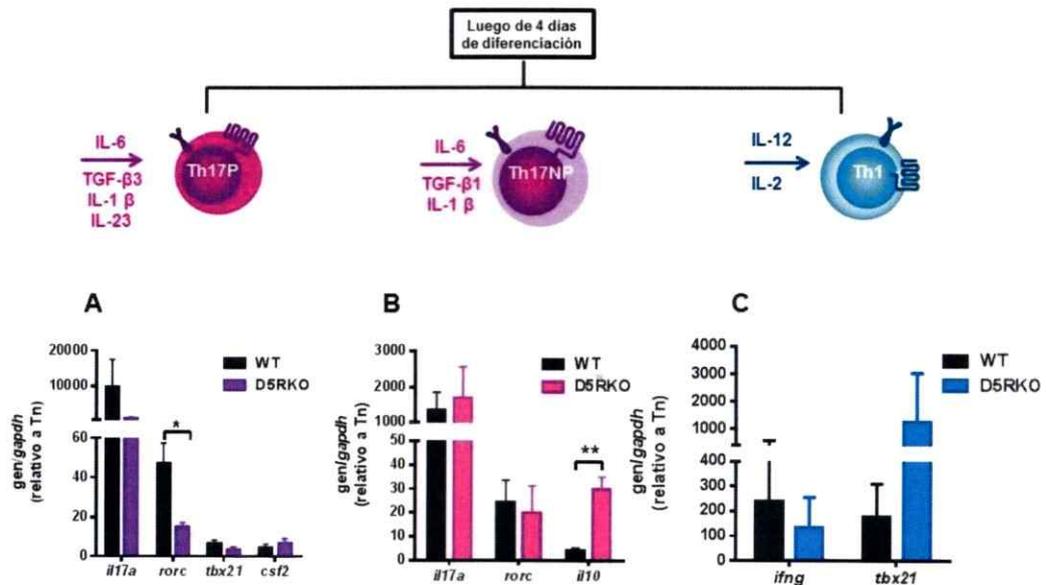


Figura 4: Perfil de transcripción de los distintos fenotipos de LT CD4⁺ involucrados en EAE. Niveles de transcripción de distintos genes para el fenotipo T_H17 patogénico (T_H17P) (A), T_H17 no patogénico (T_H17NP) (B) y T_H1 (C). En negro se presentan los niveles de transcripción de cada cultivo obtenido a partir de LT CD4⁺ WT y a color la contraparte D5RKO. Se muestran los datos recolectados de al menos tres experimentos independientes. *il-17a*: citoquina IL-17A; *rorc*: factor de transcripción RORγt; *tbx21*: factor de transcripción T-bet; *csf2*: citoquina GM-CSF; *il-10*: citoquina IL-10; *ifng*: citoquina IFN-γ. Para cada gen, se realizó *t*-test de Student no pareado comparando WT vs D5RKO. Las diferencias son asignadas por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2.5- Enfermedades Intestinales Inflamatorias

Las enfermedades inflamatorias intestinales forman un conjunto de enfermedades crónicas que afectan el tracto digestivo, dentro de las cuales las más comunes son la Colitis Ulcerosa (UC) y la Enfermedad de Crohn (CD). Si bien, tanto UC como CD comparten sintomatología como dolor abdominal, pérdida de peso y diarrea (entre otros), se diferencian en las ubicaciones de las lesiones que se generan en el epitelio intestinal. Mientras las lesiones de CD pueden ocurrir desde la boca hasta el ano, siendo preferentes en el íleon, en UC las lesiones están preferentemente en el colon (Baumgart & Sandborn, 2007). Semejante a EM, en estudios realizados en pacientes con UC y CD, se ha logrado establecer que la inflamación en las lesiones intestinales estaría mediada por LT $CD4^+$ T_H1 y T_H17 (Olsen y col., 2011; Granlund y col., 2013).

Gracias al establecimiento de modelos murinos como la colitis crónica o inducida, actualmente se entiende que los desórdenes inflamatorios intestinales surgen por una excesiva respuesta inmune frente antígenos de la microbiota comensal en el intestino de individuos predispuestos genéticamente (Round & Mazmanian, 2009). Debido a que se generan discontinuidades en la barrera epitelial, un excesivo flujo de antígenos microbianos presentes en el lumen pueden ser tomados por DCs y macrófagos intraepiteliales (Kamada y col., 2005; Abe y col., 2007), generando ulteriormente una gran respuesta inmune efectora en el lumen y en la mucosa intestinal, que no puede ser apropiadamente suprimida por Treg (Saruta y col., 2007).

2.5.1- Sistema dopaminérgico en el intestino

Sumado a las fuentes de DA mencionadas con anterioridad (terminales nerviosas, plasma sanguíneo y células inmunes), las células presentes en el tracto digestivo

además poseen una fuente intrínseca de DA secretada por el sistema nervioso entérico y por las capas del epitelio intestinal (Eaker y col., 1988). Pese a esto, y a diferencia de lo que ocurre en el sitio de inflamación de EAE y EM, se ha reportado que en la mucosa de pacientes con UC y CD hay una baja considerable del contenido de DA (Magro y col., 2002), que podría alterar la activación o diferenciación de las distintas células presentes.

En homeostasis, DA en alta concentración regularía el correcto funcionamiento de la mucosa intestinal ya que suprime tanto el aumento de la movilidad intestinal como la formación de úlceras producidas por agentes químicos (Miyazawa y col., 2003). Además, controla las contracciones agudas inducidas por estrés en colon distal (Zhang y col., 2012) y regula la secreción epitelial de K^+ (Feng y col., 2013). Sin embargo, el papel de DA en las células inmunes que median el estado inflamatorio en CD y UC no ha sido extensamente estudiado.

Considerando que los niveles de DA disminuyen de ~ 140 pg/mL a ~ 45 pg/mL en pacientes con CD y UC (Magro y col., 2002), es razonable pensar que, además de interrumpir el correcto funcionamiento del intestino, se altera la señalización mediada por DA en las células inmunes presentes en el tejido. Por ejemplo, a altas concentraciones de DA en el intestino se puede estimular D2R en los LT $CD4^+$ y con ello promover la producción de IL-10 (Besser y col., 2005), una clásica citoquina asociada a efectos antiinflamatorios y protectivos. Por el contrario, en el estado patológico, al disminuir la concentración de DA se podría asumir que D3R y D5R serían los principales receptores estimulados ya que presentan la mayor afinidad por el ligando (J. M. Beaulieu & R. R. Gainetdinov, 2011). Bajo ese contexto, se puede especular que a bajas concentraciones de DA se promueve el desarrollo de la

inflamación intestinal, ya que D3R expresado en LT CD4⁺ ha sido relacionado con la adquisición del fenotipo T_H1 en inflamación (Gonzalez y col., 2013) y D5R expresado en DCs favorece la secreción de IL-23 y con ello la diferenciación de T_H17 (Prado y col., 2012).

Pese a lo comentado anteriormente, el papel de D3R y D5R expresado en LT CD4⁺ no ha sido estudiado a profundidad en la inmunidad de intestino. Por lo que, dado que D5R en LT CD4⁺ potencia la patogenicidad de EAE en ratones D5RKO (figura 3) y además, favorece la adquisición de un patrón transcripcional asociado a un fenotipo patogénico de T_H17 *in vitro* (figura 4), se propone investigar en este trabajo el papel de D5R en los LT CD4⁺ en colitis.

2.5.2- Relación entre EAE y colitis.

Considerando que la colitis y EAE son modelos de enfermedades autoinmunes mediadas inicialmente por LT CD4⁺, se propone estudiar si el D5R expresado en estas células cumple papeles distintos dependiendo del contexto autoinmune. Para esto, se analizarán distintos aspectos de la respuesta efectora, ya que como se ha comentado con anterioridad, la concentración y disponibilidad de DA es diametralmente opuesta en éstos cuadros de inflamación. Por efecto de lo anterior, se espera que la señalización de D5R tenga consecuencias distintas en los modelos a estudiar

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a los antecedentes previamente expuestos, se plantea como hipótesis de trabajo que el receptor D5 de dopamina (D5R) expresado en linfocitos T CD4⁺ promueve el potencial inflamatorio de estas células, favoreciendo así el desarrollo de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T CD4⁺.

Para evaluar la hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

1. **Determinar si el D5R favorece la polarización *in vivo* hacia poblaciones T_H patogénicas en modelos de EAE.**
 - a. Determinar si el D5R expresado en el compartimento hematopoyético afecta el desarrollo y severidad de EAE.
 - b. Determinar si la presencia del D5R en linfocitos T antígeno-específico afecta el desarrollo y severidad de EAE.

2. **Determinar si D5R regula funciones efectoras de células T_H17 *in vitro*.**
 - a. Determinar si el D5R regula el patrón transcripcional asociado a T_H17.
 - b. Evaluar si el D5R regula la expresión de moléculas efectoras en los T_H17.
 - c. Determinar si el D5R afecta la plasticidad asociada a T_H17 *in vitro*.

3. Evaluar el papel de D5R en los LT CD4⁺ en un modelo de colitis crónica.

- a. Determinar si el D5R expresado en LT CD4⁺ está implicado en la patogénesis de colitis crónica en ratón.
- b. Evaluar si el D5R favorece un fenotipo patogénico de LT CD4⁺ en la lámina propia de ratones con colitis.
- c. Determinar si el D5R expresado en LT CD4⁺ afecta el número o frecuencia de estas células en el intestino de ratones con colitis.

4. Evaluar si D5R está relacionado con la migración de LT CD4⁺ colitogénicos.

- a. Evaluar si el D5R expresado en LT CD4⁺ está asociado a la expresión de moléculas de *homing* a intestino.
- b. Mediante la generación *ex vivo* de LT CD4⁺ colitogénicos, estudiar el papel del D5R en la migración hacia distintos órganos.
- c. Utilizando ensayos de migración *in vitro*, evaluar si el D5R regula la migración bajo el estímulo CCL25.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



4.1- Animales y Anticuerpos.

Animales. Ratones de fondo genético C57BL/6, usualmente de entre 7 y 12 semanas de edad fueron utilizados para todos los experimentos. Todos los ratones utilizados expresaban el alelo CD45.2, excepto los ratones *wild type* WT B6.SJL-PTPRC (CD45.1) que fueron donados amablemente por la Dr. María Rosa Bono. Los ratones WT CD45.2 junto con los ratones que carecen de la recombinasa 1 (RAG1KO) y los ratones "2D2" que presentan el complejo receptor en LT CD4⁺ específico para un péptido de mielina derivado de microglías y oligodendrocitos (pMOG), fueron adquiridos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Los ratones que carecen del receptor D5 de dopamina (D5RKO) fueron generados y donados por el laboratorio del Dr. David Sibley (Hollon y col., 2002) y, los ratones reporteros para la actividad de IL-17 (IL-17-GFP) fueron donados amablemente por la Dra. Daniela Sauma. Junto a éstos, en nuestro laboratorio, para ciertos diseños experimentales se generaron ratones D5RKO para las cepas 2D2 (2D2/D5RKO) e IL17-GFP (IL-17^{GFP}/D5RKO). Todas las cepas fueron mantenidas de acuerdo a las condiciones y normas del Bioterio de la Fundación Ciencia & Vida.

Anticuerpos. Para análisis de Citometría de Flujo y para la purificación de poblaciones celulares por medio del *cell sorter*, se utilizaron anticuerpos monoclonales asociados a fluoróforos específicos. De Biolegend (San Diego, CA, USA) se adquirió α -CD4 (clon GK1.5) asociado a Isocianato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), Peridina Clorofila (PerCP), PE-cianina7 (PE-Cy7), alofocianina (APC), APC-Cy7; Brilliant Violet 421[®] (Bv421) y Brilliant Violet 510[®] (Bv510); α -CD25 (clon PC61) asociado a FITC o APC; α -CD44 (clon IM7) asociado a PE; α -CD62L (clon MEL14) asociado a APC-Cy7; α -IL-10 (clon JES5-16E3) asociado a PE, PE-Cy7 o Bv421; α -IL-17A (clon TC11-18H10.1) asociado a PE, PE-Cy7, APC o Alexa Flúor[®] (AF) 700; α -GM-CSF (clon MP21-22E9) asociado a PE; α -IFN γ (clon XMG1.2) asociado a APC; α -LAG3 (clon C9B7W) asociado a APC; α -CTLA4 (clon UC10-4B9) asociado a Bv421; α -CD45 (clon 30-F11) asociado a PE o PE-Cy7; α -CD49d (clon R1-2) asociado a PE; α -CCR6 (clon 29-2L17) asociado a PerCP o APC; α -LFA-1 (clon H155-78) asociado a PerCP; α -CD103 (clon 2E7) asociado a PerCP; α -CD45.1 (clon A20) asociado a AF488 y α -CD45.2 (clon 104) asociado a PerCP-Cy5.5 o APC-Cy7. De eBioscience (San Diego, CA, EUA) se adquirió α -LPAM-1 o α 4 β 7 (clon DATKA32) asociado a PE; α -CCR9 (clon C.W.1-2) asociado a APC y α -IFN γ (clon JFK-16s) asociado a PE-Cy7. Para cultivos celulares se utilizaron anticuerpos monoclonales purificados con Bajo índice de Endotoxinas y Libres de Azida (LEAF), como α -IL-4 (clon 11B11), α -IFN γ (clon AN-18), α -CD28 (clon 37.51) y α -CD3 ϵ (clon 145-2C11), los cuales fueron adquiridos de Biolegend.

4.2- Obtención de quimeras.

Generación de ratones quiméricos de médula ósea. Para eliminar el compartimento hematopoyético de ratones CD45.1, ratones de entre 5-6 semanas de edad se irradiaron sub-letalmente con dos dosis de 550 rads (con Co^{60}), separadas entre sí por 3 horas. Las irradiaciones se realizaron en el Laboratorio de Irradiación de la Comisión Chilena de Energía Nuclear. Un día después de la irradiación, los ratones recibieron por inyección intravenosa entre $10\text{-}15 \times 10^6$ de células provenientes de la médula ósea de ratones WT o D5RKO (ambos CD45.2). Posteriormente, los ratones fueron mantenidos con antibióticos (Gorban[®] 0.1%) y en cajas con microfiltro durante 8 semanas. La posible deshidratación de los ratones durante la primera semana post-irradiación, fue prevenida inyectando entre 0,5-1 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS; Na_2HPO_4 8,1 μM , KH_2PO_4 1,47 μM , NaCl 64,2 mM, KCl 2,68 mM) vía intraperitoneal.

Obtención de precursores de médula ósea y transferencia a ratones irradiados.

Ratones WT y D5RKO fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se obtuvieron los fémures y tibias de ambas patas traseras. Los huesos se sumergieron en agua y luego en etanol 70%. Enseguida los huesos fueron cortados en ambos extremos y la médula ósea fue obtenida inyectando PBS al interior de ellos. Luego de recolectar y resuspender en PBS todas las células provenientes de la médula ósea, se procedió a eliminar eritrocitos, mediante incubación con una solución de Amonio-Cloro-Potasio (ACK; NH_4Cl 170 mM; KHCO_3 10 mM; EDTA disódico 0,1 mM; pH 7.2). Finalmente, las células fueron contadas y resuspendidas en PBS a una concentración de $50\text{-}75 \times 10^6$ células/mL, para inyectar 200 μL por ratón por la vena de la cola.

4.3- Inducción de la EAE y obtención de linfocitos infiltrantes en el SNC de ratones enfermos.

Inducción de EAE activo y evaluación del progreso de la enfermedad. Ratones CD45.1 quiméricos fueron inmunizados con 50 µg de pMOG₃₅₋₅₅ (Genetel Laboratories, Madison, WI, EUA) emulsionado en Adyuvante Completo de Freund (CFA; InvitrogenTM, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA inactivada por calor (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). Cada ratón recibió un volumen total de 200 µL de emulsión (relación 1:1 entre pMOG y CFA) de manera subcutánea en la zona abdominal, utilizando una aguja 25G x 5/8". Adicionalmente, los ratones recibieron dos inyecciones de 500 ng de Toxina Pertussis (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) en 100 µL de solución, por vía intraperitoneal utilizando una jeringa insulínica (29G), al día 0 y 2 post-inducción. Ratones RAG1KO, previamente transferidos con LT CD4⁺ 2D2, fueron inmunizados con 200 µg de pMOG₃₅₋₅₅ y se les suministró dosis de 50 ng de Toxina Pertussis. La evaluación del progreso de la enfermedad fue idéntica para todos los ratones inmunizados. Los síntomas clínicos fueron evaluados diariamente de acuerdo a los siguientes criterios: 0, sin signos detectables; 1, flacidez de la cola; 2, debilidad de las patas traseras; 3, parálisis de las patas traseras; 4, parálisis de las patas delanteras; 5, moribundo o muerte.

Obtención de células mononucleares (MNCs) infiltrantes en el SNC. En el día 12 después de la inducción de EAE en ratones RAG1KO, se obtuvo el SNC (médula espinal y cerebro) de los ratones sobrevivientes, siguiendo la metodología descrita en (Lee y col., 2012). A continuación, las MNCs infiltrantes fueron separadas realizando un gradiente de densidad 40-70% con PercollTM (General Electrics Healthcare,

Uppsala, Suecia). Luego, las células fueron re-estimuladas *in vitro* y teñidas para la determinación de las poblaciones linfocitarias involucradas en la enfermedad.

4.4- Inducción de colitis y obtención de linfocitos infiltrantes en la lámina propia del colon.

Inducción de colitis crónica. Linfocitos T *naïve* CD4⁺ (Tn) WT y/o D5RKO fueron purificados mediante *cell sorting* y luego transferidos a ratones RAG1KO para la inducción de colitis crónica. Cada ratón recibió 5×10^5 Tn mediante inyección intraperitoneal en la cavidad abdominal o intravenosa por la vena de la cola, en 100 μ L de PBS. El desarrollo de la enfermedad fue monitoreado semanalmente de acuerdo al cambio en la masa corporal de cada ratón, comparando la masa medida con la que se registró el día en que los ratones recibieron adoptivamente los Tn.

Obtención de MNCs infiltrantes en la lámina propia de colon (cLP). Después de 10-12 semanas de la inducción de colitis (grupo experimental WT alcanza ~90% de la masa corporal inicial), los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y el colon distal fue removido, considerando éste como la extensión comprendida entre el término del ciego hasta el recto. Subsecuentemente, el colon fue lavado dos veces con 10 mL de Solución Salina Balanceada de Hank 1X (HBBS; Gibco®, Life Technologies™) frío, utilizando una cánula de entubación 18Gx75". Posteriormente, el colon fue totalmente cortado longitudinalmente y, a partir de éste, se obtuvieron trozos de aproximadamente 0,5 cm. Los trozos de colon fueron incubados durante 30 minutos a 37°C en Medio IEL que contenía Medio de Dulbecco modificado por Iscove 1X (IMDM; Gibco®) con 2% de Suero Fetal Bovino (FBS; Gibco®) y HEPES 20 mM. Más tarde, los trozos fueron incubados en Medio IEL suplementado con colagenasa IV

(1mg/mL; Gibco®) y DNasa I (0,25 mg/mL; Roche Diagnostics, Basel, Suiza) durante 45 minutos a 37°C. Luego, la solución fue filtrada usando *cell strainer* de 70 µm (Falcon®, Corning, Pittston, PA, EUA) y posteriormente las MNCs fueron separadas mediante un gradiente 67-44% de Percoll™ (General Electric Healthcare). Ulteriormente, las células fueron re-estimuladas *in vitro* y teñidas para la determinación de poblaciones de LT CD4⁺.

4.5- Re-estimulación de linfocitos infiltrantes, citometría de flujo y purificación de LT CD4⁺.

Re-estimulación *in vitro*, tinción intracelular y Citometría de Flujo. Para la determinación de la expresión de citoquinas, las células fueron estimuladas por 3-4 horas con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 50 ng/mL; Sigma-Aldrich, Alemania) e Ionomicina (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) en presencia de Brefeldina A (5 µg/mL; Molecular Probes®, Life Technologies) en medio IMDM suplementado que contenía 10% FBS, 1% de Penicilina/Estreptomina (Invitrogen™), L-Glutamina 1X (Gibco®) y 2-Mercaptoetanol (28,6 nM; Sigma-Aldrich).

Independiente del ensayo, todas las células fueron recolectadas, lavadas y teñidas para la determinación de sobrevida o viabilidad utilizando el kit comercial *Zombie Aqua™* (Biolegend) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después, las células fueron teñidas para marcadores extracelulares en PBS durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. Luego las células fueron fijadas y, en el caso de ser necesario, permeabilizadas utilizando un kit comercial de tinción para FoxP3 (eBioscience). Posterior a esto, las muestras fueron incubadas con anticuerpos para detectar marcadores intracelulares. Todas las tinciones fueron realizadas con anticuerpos

monoclonales conjugados a fluorocromos. Las células inmunoetiquetadas fueron analizadas usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). El procesamiento de los datos se realizó mediante los *Softwares FACSDiva* (BD Bioscience) y *FlowJo vX* (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

Purificación de LT CD4⁺. Para obtener LT CD4⁺, bazos de ratones WT o D5RKO fueron obtenidos, perfundidos y luego disgregados mecánicamente en PBS. Posteriormente, los eritrocitos presentes en la mezcla celular fueron lisados mediante el uso de ACK. Una vez descartados los glóbulos rojos, los LT CD4⁺ totales fueron purificados mediante selección negativa usando un kit comercial basado en la utilización de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos para marcadores de superficie celular (*MACS*[®]; Miltenyi-biotec, Bergisch Gladbach, Cologne, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El grado de pureza de LT CD4⁺ fue de al menos 93%. Para la purificación de LT CD4⁺ vírgenes o *naïve* (Tn), los LT CD4⁺ purificados fueron incubados durante 20 minutos a 4°C en PBS 5%-FBS con anticuerpos monoclonales que permiten la identificación y selección de la población CD4⁺CD25⁻CD62L⁺CD44⁻. Finalmente, la separación de la población Tn fue realizada utilizando un *cell sorter* FACS Aria II (BD Bioscience). El grado de pureza de Tn fue de al menos 98%.

4.6- Cultivos de diferenciación y conversión de T_H17.

Cultivos de diferenciación *in vitro* hacia T_H17. Linfocitos Tn WT y D5RKO obtenidos mediante *cell sorting* fueron resuspendidos en medio IMDM suplementado a una concentración de 5x10⁵ células/mL. Luego, 200 µL o 1 mL fueron depositados en una placa activada de 96 o 24 pocillos de fondo plano, respectivamente. Para la obtención

de T_H17 no patogénicos (T_H17 NP), los Tn fueron incubados 2-3 días en presencia de IL-6 murina (m-IL-6; 25 ng/mL), m-IL-1 β (20 ng/mL), TGF- β 1 humana (h-TGF- β 1; 5 ng/mL), α -CD28 (2 μ g/mL) y los anticuerpos bloqueadores α -IFN γ , α -IL-4 y α -IL-2 (5 μ g/mL cada uno). Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas y cultivadas en presencia de m-IL-6 (25 ng/mL) y h-TGF- β 1 (5 ng/mL) durante los siguientes 4 días. Para la obtención de T_H17 patogénicos (T_H17 P), las células fueron incubadas en presencia de m-IL-6 (25 ng/mL), m-IL-1 β (20 ng/mL), h-TGF- β 3 (5 ng/mL), α -CD28 (2 μ g/mL) además de α -IFN γ , α -IL-4 y α -IL-2 (5 μ g/mL cada uno) durante 2-3 días. Posteriormente, las células fueron cultivadas durante 4 días en presencia de m-IL-6 (25 ng/mL), m-IL-1 β (20 ng/mL) y m-IL-23 (20 ng/mL). Durante todos los días de cultivo, independientemente del proceso de diferenciación, las células estuvieron en presencia de Antibiótico/Antimicótico 1X (Gibco[®]) y Gentamicina (250 μ g/mL; Gibco[®]). Los cultivos se mantuvieron constantemente a 37°C, con 90% de humedad y 5% de CO₂. Todas las citoquinas utilizadas eran *carrier free* y fueron adquiridas de Biolegend. Las placas utilizadas fueron activadas previamente mediante una incubación de 3 horas con 50 μ L/pocillo de α -CD3 ϵ (2-4 μ g/mL) para la placa de 96 pocillos y 250 μ L/pocillo para la de 24 pocillos. Para la segunda etapa de cultivo, se utilizaron placas activadas con α -CD3 ϵ (2-4 μ g/mL) y α -CD28 (2 μ g/mL).

Conversión de T_H17 a T_H1 . Linfocitos Tn provenientes de ratones IL-17^{GFP}/WT e IL-17^{GFP}/D5RKO fueron diferenciados *in vitro* hacia T_H17 Patogénico. Una vez finalizado el cultivo, las células fueron resuspendidas hasta alcanzar los 10x10⁶/mL en IMDM suplementado. Luego, los LT CD4⁺ fueron re-estimulados *in vitro* sin añadir Brefeldina A durante 4 horas a 37°C en agitación. Más tarde, las células fueron teñidas para detectar viabilidad y los T_H17 vivos fueron purificados mediante *cell sorter* según la

expresión del gen reportero (IL-17-GFP). Finalmente, los T_H17 Patogénicos fueron incubados en presencia de m-IL-12 (10 ng/mL) durante 48 horas en una placa P96 activada previamente con α -CD3 ϵ y α -CD28, en las mismas condiciones mencionadas para otros cultivos celulares. Posteriormente, la "retención" del fenotipo T_H17 fue evaluado por citometría de flujo.

4.7- Obtención de LT CD4⁺ con tropismo hacia el intestino y ensayos de migración.

Generación de LT CD4⁺ colitogénicos. Para generar LT CD4⁺ que tuvieran migración preferencial hacia el intestino, se procedió de manera similar a (Kurmaeva y col., 2013). Brevemente, LT CD4⁺ WT y D5RKO fueron purificados a partir de bazo y luego dejados a una concentración de 1×10^6 células/mL en Medio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado con 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, L-Glutamina 1X, MEM aminoácidos no esenciales (Gibco[®]) 1X, Piruvato Sódico (Gibco[®]) 1X y 2-Mercaptoetanol (28,6 nM). Para favorecer la migración hacia el intestino, las células fueron incubadas en presencia de ácido retinoico (RA; 100 nM; Sigma-Aldrich), m-IL-2 (20 ng/mL) y α -CD28 (2 μ g/mL) durante 2-3 días en una Placa de 96 o 24 pocillos previamente activada con α -CD3 ϵ . Posteriormente, las células fueron cosechadas y subsecuentemente cultivadas 2-3 días en presencia de RA (100 nM) y m-IL-2 (20 ng/mL), en una placa activada con α -CD3 ϵ y α -CD28.

Migración *in vivo*. Para estudiar si D5R regula la migración hacia los tejidos, entre $5-10 \times 10^6$ LT CD4⁺ colitogénicos WT (CD45.1 o CD45.1-CD45.2) y D5RKO (CD45.2) generados *ex vivo* (RA e IL-2), fueron transferidos por la vena de la cola a ratones RAG1KO en una proporción de 1:1. Luego de 16 horas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el bazo, ganglios mesentéricos (MLN) y colon distal fueron

disecados desde cada animal. Posteriormente, la presencia de LT CD4⁺ fue determinada en cada tejido por citometría de flujo. Más tarde, el índice de migración y la relación de competencia entre los genotipos fue determinado según (Villablanca & Mora, 2011).

Migración *in vitro*. LT CD4⁺ WT y D5RKO fueron purificados a partir de bazo y dejados a $5-10 \times 10^6$ células/mL en Medio RPMI. Más tarde, 100 μ L de la solución con las células fueron depositados en el espacio superior de cámaras Transwell[®] (Costar[®], Corning) de membranas de 5 μ m. En el espacio inferior de las cámaras, previamente fueron depositados 600 μ L de CCL25 (25-100 ng/mL) en RPMI-0,1% Albumina Sérica Bovina (BSA; Rockland Immunochemicals Inc, Limerick, PA, EUA). El sistema fue incubado durante 3 horas a 37°C, 90% de humedad y 5% de CO₂. Luego del tiempo de incubación, 300 μ L del pocillo inferior fueron recolectados y mezclados con 100 μ L de *123 Count Beads* (eBioscience) para determinar el número de células que lograron migrar por citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.8- Determinación de los niveles de transcripción y análisis estadísticos.

RT-PCR y *real time* PCR. Las células provenientes de los distintos cultivos de diferenciación fueron colectadas y el RNA total fue obtenido utilizando EZNA Total RNA Kit I (Ω Bio-Tek, Norcross, GA, EUA). Posteriormente, el RNA fue tratado con el TURBO DNA-free kit (Ambion[®], Life Technologies) y luego fue cuantificado en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Más tarde, 1 μ g de RNA fue retrotranscrito utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen[™]), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la transcripción de genes que codifican para citoquinas y factores de transcripción, se utilizó el método empleado en (Prado y col.,

2012). Todas las reacciones fueron realizadas en un equipo Stratagene Mx300P (Agilent). Para la cuantificación relativa de los fragmentos amplificados, todos los resultados fueron normalizados de acuerdo a la transcripción del gen constitutivo que codificada para la enzima Glicer aldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH). Las secuencias de los partidores utilizados para la cuantificación de cada transcrito medido son especificadas en la tabla II.

Tabla II: Partidores utilizados en los ensayos de *real time* PCR.

gen	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Referencia
<i>rorc</i>	CAGAGGAAGTCAATGTGGGA	GTGGTTGTTGGCATTGTAGG	No publicado (N-P)
<i>runx1</i>	TGGCACTCTGGTCACCGTCAT	GAAGCTCTTGCCTCTACCGC	(Logan y col., 2013)
<i>runX3</i>	CGACCGTTTGGAGACCTGC	GCGTAGGGAAGGAGCGGTCA	(Y. Wang y col., 2014)
<i>tbx21</i>	CCTGTTGTGGTCCAAGTTCAAC	CACAAACATCCTGTAATGGCTTGT	(Smeltz y col., 1999)
<i>il9</i>	CTGATGATTGTACCACACCGTGC	GCCTTTGCATCTCTGTCTTCTGG	(Li y col., 2014)
<i>il10</i>	GAAGACAATAACTGCACCCA	CAACCCAAGTAACCCCTTAAAGTC	(N-P)
<i>il17a</i>	TTCATCTGTGTCTCTGATGCT	AACGTTGAGGTAGTCTGAG	(N-P)
<i>il22</i>	GACAGGTTCCAGCCCTA CAT	ATCGCCTTGATCTCTCCACT	(Peng y col., 2014)
<i>csf2</i>	ACCACCTATGCGGATTTTCAT	TCATTACGCAGGCACAAAAG	(Kim y col., 2008)
<i>grzb</i>	ATCAAGGATCAGCAGCCTGA	TGATGTCATTGGAGAATGTCT	N-P
<i>ifng</i>	GAGCCAGATTATCTCTTTCTACC	GTTGTTGACCTCAAACCTTGG	N-P
<i>tgfb1</i>	GCAACAACGCCATCTATGAG	TATTCCGTCTCCTTGGTTCAG	N-P
<i>tgfb3</i>	AGCGCACAGAGCAGAGAAT	GTCAGTGACATCGAAAGACAG	(Yin y col., 2013)
<i>gapdh</i>	TCCGTGTTCTACCCCAATG	GAGTGGGAGTTGCTGTTGAAG	(Prado y col., 2012)

Análisis Estadísticos. Las diferencias entre los diferentes genotipos fueron evaluadas por el test t de Student no pareado de dos colas, con o sin la corrección de Welch dependiendo del número de réplicas del experimento. Para el análisis con más de 2 grupos de estudio se utilizó el test de ANNOVA de una vía seguido por la comparación múltiple de Tukey, comparando el promedio de cada grupo con respecto a otro. Para el análisis de las diferencias en el curso de EAE, se utilizó el U-test de dos colas de Mann-Whitney. Todo el procesamiento estadístico se realizó utilizando el *Software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1.1- La expresión del D5R en el compartimento hematopoyético favorece el desarrollo de una respuesta más severa en EAE.

Además de su extensamente estudiada función en el SNC, el D5R ha sido implicado en variadas funciones inmunes (Pacheco y col., 2014). Notablemente, en un estudio previo de nuestro laboratorio se ha observado que al inducir la EAE en ratones D5RKO, los síntomas de la enfermedad aparecen en forma tardía y se produce una menor severidad de la enfermedad. Lo anterior, se ha atribuido parcialmente a la función de D5R expresado en las células dendríticas (Prado y col., 2012). Sin embargo, la deficiencia de éste receptor en todas las células del ratón, podría estar alterando funciones fisiológicas locales y/o sistémicas y con ello, influir en el fenotipo observado en EAE. Por lo tanto en este trabajo se propuso estudiar la función de D5R en EAE, considerando específicamente el compartimento hematopoyético. Para esto, se irradiaron ratones CD45.1 y se reconstituyeron con células provenientes de médula ósea de ratones WT o D5RKO, ambos CD45.2. Luego de 8 semanas (75-85% de las PBMCs corresponden al donante, dato no mostrado), se les indujo la EAE a los ratones

quiméricos y se evaluó el desarrollo de la enfermedad, el cual puede observarse en la figura 5.

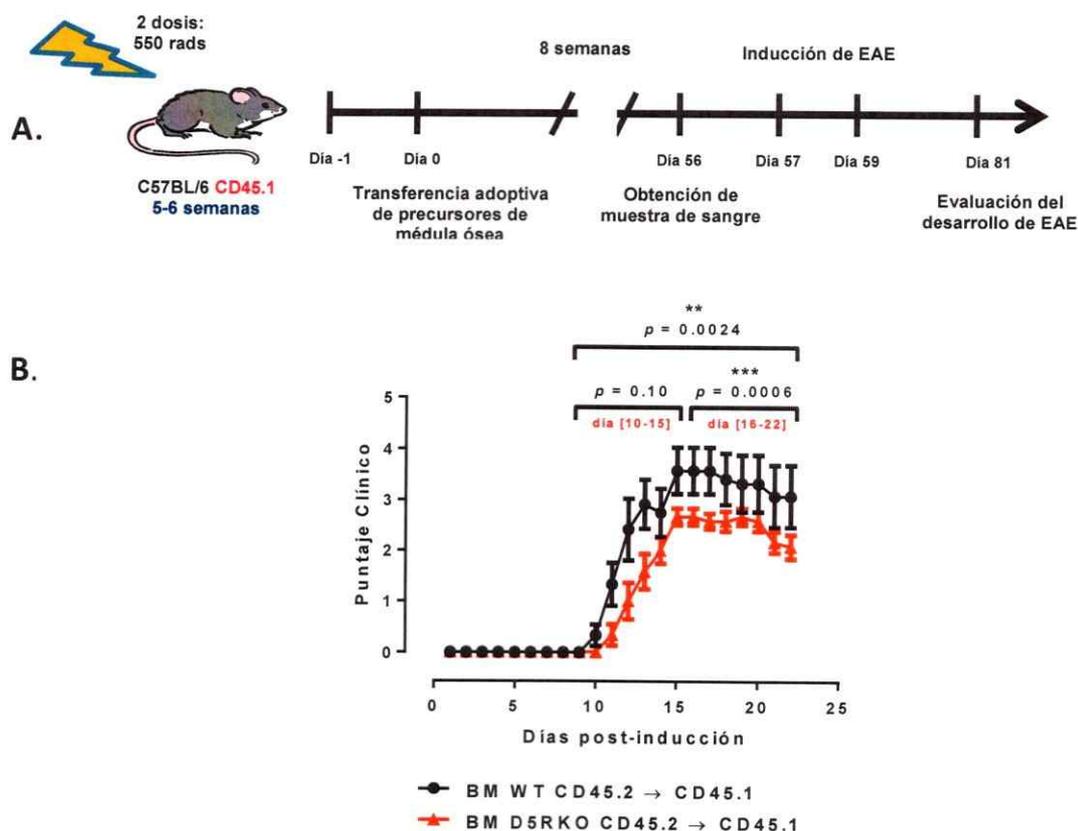


Figura 5: El D5R expresado en el compartimento hematopoyético favorece el desarrollo de EAE en ratones quiméricos. A. Esquema del diseño experimental: Ratones de entre 5-6 semanas fueron irradiados con 2 dosis de 550 rads y un día más tarde, fueron reconstituidos con precusores de médula ósea (BM) WT o D5RKO. Luego de 8 semanas, la EAE fue inducida y el curso de la enfermedad fue evaluado diariamente. **B.** Los ratones CD45.1 reconstituidos con BM WT se representan en negro y, aquellos reconstituidos con BM D5RKO en naranja. El gráfico muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. Los valores corresponden al puntaje clínico promedio \pm SEM de 6 ratones por genotipo por día. Para establecer diferencias estadísticas, se realizó un U-test de Mann-Whitney entre los días 10-15, 16-22 y 10-22, tal como se indica mediante corchetes. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Los datos acumulados del día de aparición de los síntomas, máximo puntaje clínico y la mortalidad, se detallan en la Tabla III.

Tabla III: El D5R expresado en el compartimento hematopoyético favorece el desarrollo de EAE.

Genotipo de recipiente	Genotipo del compartimento hematopoyético	Día de aparición de los síntomas	Máximo puntaje clínico	% Mortalidad
WT	WT	12,33 ± 0,44	3,73 ± 0,28	39,43 ± 10,56
	D5RKO	13,55 ± 0,98	2,86 ± 0,28*	11,1 ± 11,1

Los valores indicados corresponden al promedio ± SEM calculado a partir datos de tres experimentos independientes. Para ratones con compartimento hematopoyético WT se consideraron 15 ratones y 11 para aquellos con compartimento D5RKO. * $p=0.04$ según el test t de Student.

Los resultados en la figura 5 muestran que ratones que poseen un compartimento hematopoyético D5RKO desarrollan una EAE significativamente menos severa. Esto se debe a que en el *peak* de la enfermedad estos ratones presentan un puntaje clínico menor, en comparación a aquellos que tienen un compartimento hematopoyético WT (tabla III). Lo anterior sugiere que D5R en el sistema inmune, y no en otros compartimentos, es importante para el desarrollo y severidad de EAE.

Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que la transferencia de LT CD4⁺ totales y *naïve* WT a ratones D5RKO promueven una mayor severidad en EAE (figura 3). Considerando lo anterior, la figura 5 sugiere que D5R expresado en LT CD4⁺ tiene una función en la generación de una respuesta autoinmune. Sin embargo, el mecanismo no es claro por lo que se requiere mayor evidencia experimental restringiendo la deficiencia de D5R únicamente a los LT CD4⁺.

5.1.2- El D5R expresado en LT CD4⁺ antígeno-específico no tiene efecto en la aparición, desarrollo y severidad de la enfermedad ni en la mortalidad en un modelo de agresivo de EAE.

Con anterioridad se ha sugerido que D5R expresado en LT CD4⁺ favorece el desarrollo y patogenicidad de EAE. Sin embargo, estos ensayos se han realizado en ratones que carecen del D5R en todas las células (figura 3). Por lo tanto, para estudiar el papel del D5R solamente en los LT CD4⁺ se procedió a inducir la EAE en ratones RAG1KO, puesto que es una cepa que carece de linfocitos T endógenos. Para desarrollar la enfermedad, se transfirieron LT CD4⁺ *naïve* (Tn) 2D2/WT o 2D2/D5RKO y un día después se inmunizó con pMOG (ver materiales y métodos, 4.3) debido a que se ha reportado previamente que la sola transferencia de Tn 2D2, a pesar a ser específicos contra antígenos de la vaina de mielina, fallan en desarrollar la EAE (Williams y col., 2011). Notablemente, como resultado de este protocolo, se obtiene un desarrollo de la enfermedad sin una etapa de recuperación de la movilidad en las extremidades de los ratones, lo que conlleva a una progresión constante de la EAE hasta llegar a la muerte. Lo anterior, es similar a un desarrollo particular de Esclerosis Múltiple, denominado primariamente progresivo. El curso de la enfermedad de los ratones transferidos con Tn WT o D5RKO puede observarse en la figura 6B.

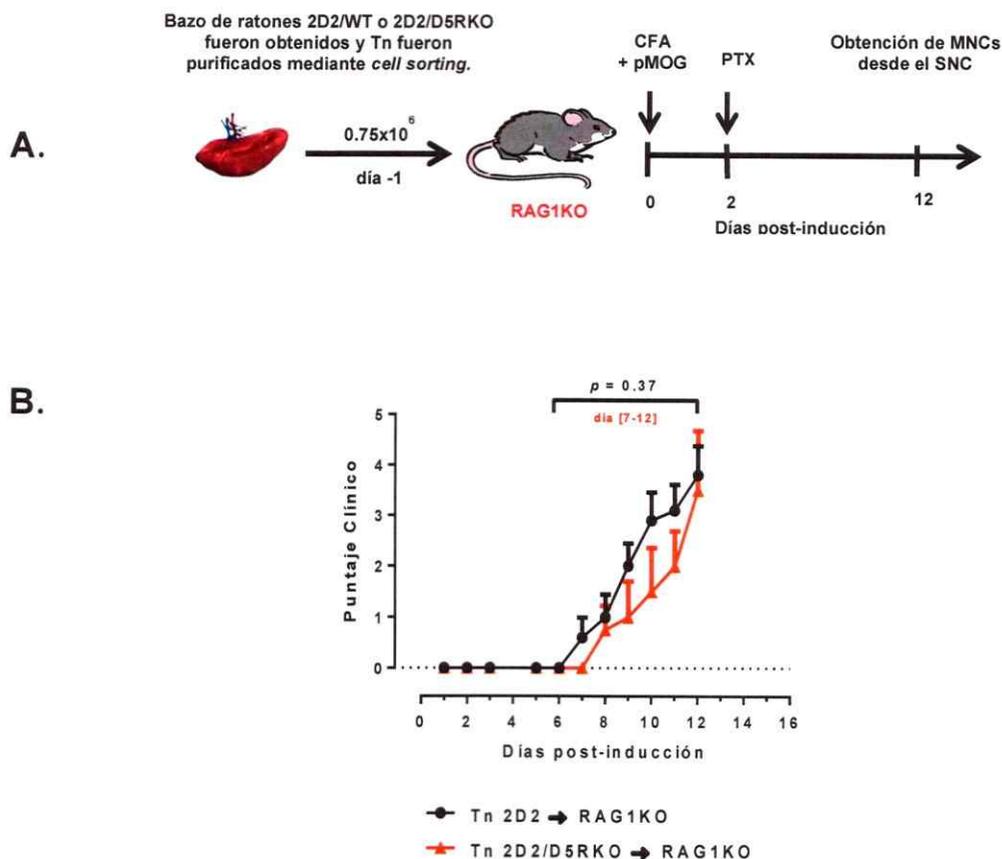


Figura 6: El D5R expresado en LT CD4⁺ no afecta la aparición, desarrollo y severidad de la enfermedad en un modelo agresivo de EAE. A. Esquema del diseño experimental: Bazo de ratones 2D2/WT y 2D2/D5RKO fueron utilizados para la purificación de LT CD4⁺ naïve (Tn) mediante *cell sorter*. Para inducir la EAE, 7,5x10⁵ Tn fueron transferidos a ratones RAG1KO y un día más tarde, los ratones fueron inmunizados con pMOG. Al día 12, los ratones sobrevivientes (>50%) fueron sacrificados y las MNCs infiltradas en el SNC fueron purificadas. **B.** Los ratones RAG1KO receptores de Tn 2D2/WT se representan en negro y aquellos que recibieron Tn 2D2/D5RKO en naranja. El gráfico muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. Los valores corresponden al puntaje clínico promedio \pm SEM de 4-6 ratones por genotipo. Para establecer diferencias estadísticas, se realizó un U test de Mann-Whitney.

Los datos de todos los experimentos realizados del modelo agresivo de la EAE como el porcentaje de incidencia, el máximo puntaje clínico y la mortalidad, son resumidos en la Tabla IV.

Tabla IV: El D5R expresado en LT CD4⁺ encefalitogénico no afecta la incidencia, severidad ni mortalidad en un modelo agresivo de la EAE.

Genotipo de Tn 2D2	% de Incidencia	Día de aparición de los síntomas	Máximo Puntaje Clínico	% de Mortalidad (a día 12)
WT	100% (15/15)	7,9 ± 0,3	3,8 ± 0,3	46,7 ± 3,3
D5RKO	91,7 ± 9,3 (13/14)	8,7 ± 0,4	3,2 ± 0,3	41,7 ± 8,3

Los valores indican el promedio ± SEM calculado a partir de datos de tres experimentos independientes. El test *t* de Student fue realizado para cada comparación, sin encontrar diferencias significativas.

Estos resultados sugieren que el D5R expresado en LT CD4⁺ encefalitogénicos no afecta de manera significativa la incidencia, desarrollo y severidad de la enfermedad ni la mortalidad en un modelo agresivo de la EAE.

5.1.2.1- El D5R expresado en LT CD4⁺ antígeno-específico no afecta la infiltración de estas células en el SNC de ratones con un modelo agresivo de la EAE.

En la Tabla IV se muestra que 12 días después de inducir la EAE, entre 42-47% de los ratones RAG1KO muere. Por consiguiente, se estableció ese día para analizar las poblaciones linfocitarias infiltradas en el SNC. Para ello, los ratones fueron sacrificados y la médula espinal y cerebro fueron disecados para obtener las MNCs infiltrantes. Las células fueron re-estimuladas *in vitro* con PMA e Ionomicina (ver materiales y métodos, sección 4.5) y, de esa forma, los LT CD4⁺ así como las sub-poblaciones de fenotipos efectores presentes en el tejido fueron analizados mediante citometría de flujo como se muestra en la figura 7.

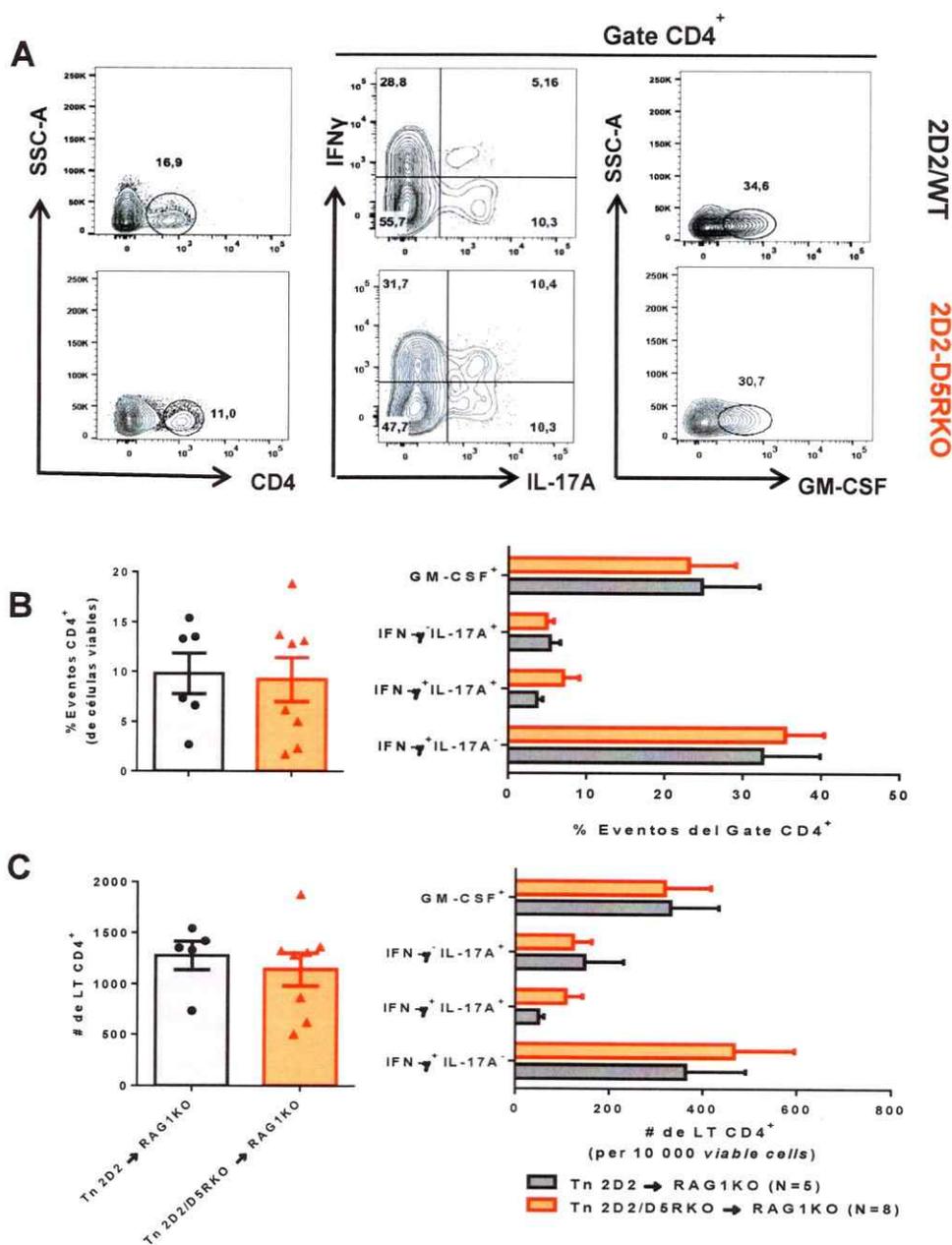


Figura 7: El D5R expresado en $LT CD4^+$ antígeno-específico no afecta la proporción ni el número de $LT CD4^+$ infiltrados en el SNC de ratones RAG1KO con un modelo agresivo de la EAE.

Se realizó el mismo procedimiento indicado en la figura 6A y en el día 12 post-inducción se aislaron las MNCs infiltradas en el SNC de los diferentes grupos experimentales. **A.** Se presentan *Countor plots* representativos de MNCs obtenidas del SNC, las cuales fueron re-estimuladas y teñidas para la evaluación de $LT CD4^+$. En la fila superior se muestran datos de ratones transferidos con Tn 2D2/WT y en la inferior con 2D2/D5RKO. En la columna izquierda se muestra la selección de las células $CD4^+$ dentro de las células viables. En la columna central

la relación T_H1/T_H17 determinada mediante la expresión de IFN γ e IL-17A y, en la derecha, las células positivas para GM-CSF. En todos los gráficos los números indican los porcentajes en el cuadrante o región seleccionada. B. Cuantificación del porcentaje de células CD4⁺ dentro de las células viables (izquierda) y el porcentaje de las células que producen GM-CSF, IFN γ y/o IL-17A (derecha). C. Cuantificación del número de células CD4⁺ infiltradas en el SNC (izquierda) y el número de LT CD4⁺ que expresan GM-CSF, IFN γ y/o IL-17A. En B y C, los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=5 para el grupo receptor de Tn 2D2/WT y n=8 para el grupo receptor de 2D2/D5R). Las diferencias entre ambos grupos experimentales fueron analizadas mediante el test *t* de Student, sin encontrar diferencias.

Los resultados observados en la figura 7 muestran que independiente del genotipo, los LT CD4⁺ encefalitogénicos son capaces de infiltrar en el SNC y adquirir los fenotipos T_H1/T_H17 en proporciones y números similares. De igual modo, no hay diferencias en la capacidad de producir GM-CSF por parte de los LT CD4⁺ evaluados. Sin embargo, aunque no hay significancia estadística, en ratones transferidos con Tn 2D2/D5RKO se observa un aumento en la proporción de células T_H17 productoras de IFN- γ (IL-17⁺ IFN- γ ⁺) lo cual podría ser relevante en modelos de autoinmunidad menos agresivos que este modelo de la EAE. Por este motivo, se estudió a continuación cómo el D5R afecta las relaciones entre las poblaciones efectoras de LT CD4⁺.

5.1.2.2- El D5R afecta la proporción entre linfocitos T_H17 Patogénicos y No Patogénicos en el SNC de ratones RAG1KO con un modelo agresivo de la EAE.

Si bien no existen diferencias significativas en el total de LT CD4⁺ o en los fenotipos dentro de las MNCs infiltrantes en el SNC de ratones RAG1KO (figura 7), se procedió a analizar la relación entre las poblaciones efectoras más importantes en el desarrollo de la EAE: los T_H17 -IFN γ ⁺ (Patogénicos), los T_H17 -IFN γ ⁻ (No Patogénicos) y la proporción de ambos con los T_H1 (Figura 8).

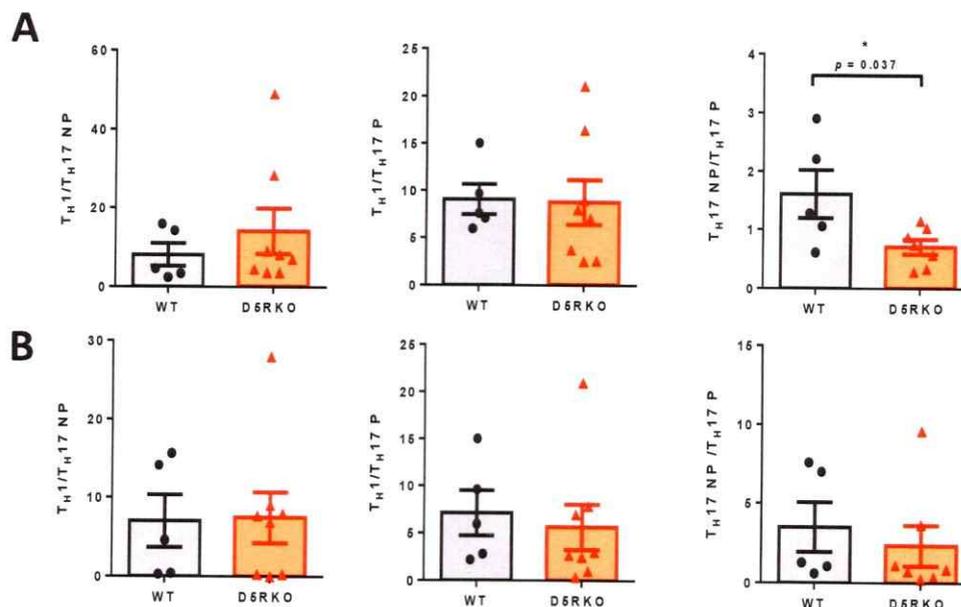


Figura 8: El D5R regula la proporción entre los fenotipos de T_H17 . Se realizó el mismo procedimiento indicado en la figura 6A y el día 12 post-inducción se aislaron las MNCs infiltradas en el SNC de los diferentes grupos experimentales. **A.** Se muestra la relación entre la **proporción** de las células $IFN\gamma^+IL-17A^-$ (T_H1) y las células $IFN\gamma^+IL-17A^+$ ($T_H17 NP$) en la columna izquierda, la relación entre T_H1 y las células $IFN\gamma^+IL-17A^+$ ($T_H17 P$) en la columna central y la relación entre $T_H17 NP$ y T_H17P en la columna derecha. **B.** Se muestra la relación entre el **número** de T_H1 y $T_H17 NP$ (izquierda), T_H1 y T_H17P (centro) y, $T_H17 NP$ y $T_H17 P$ en la derecha. En A y en B los valores corresponden al promedio \pm SEM a partir de los datos del *gate* $CD4^+$, donde cada punto representa un ratón. * $p=0,037$ según el test t de Student.

Los resultados en la figura 8 sugieren que ratones transferidos con Tn 2D2/D5RKO tienen un desbalance en la relación de los T_H17 , debido a que en comparación a los ratones transferidos con Tn 2D2/WT, presentan un aumento en el porcentaje de T_H17 $IFN-\gamma^+$ ($T_H17 P$), sin aumentar proporcionalmente los $IFN-\gamma^-$ ($T_H17 NP$). Curiosamente, al tener más representada la población patogénica de los T_H17 , se esperaría un desarrollo más severo de la enfermedad, lo cual no ocurre. Por consiguiente, se buscó evaluar como el D5R afecta la transcripción de un grupo de moléculas relevantes para la función en los T_H17 .

5.2.1- El D5R regula diferencialmente el patrón transcripcional asociado a los fenotipos T_H17.

Considerando que D5R regula la proporción entre los fenotipos de T_H17 en el SNC de ratones con EAE, se decidió analizar si también afecta la transcripción de genes asociados a las distintas firmas moleculares de T_H17. Para ello, se diferenciaron Tn WT o D5RKO *in vitro* de manera específica para T_H17 Patogénico o No Patogénico (ver materiales y métodos, sección 4.6) y luego diferentes genes fueron evaluados mediante qPCR. La transcripción relativa puede observarse en la figura 9.

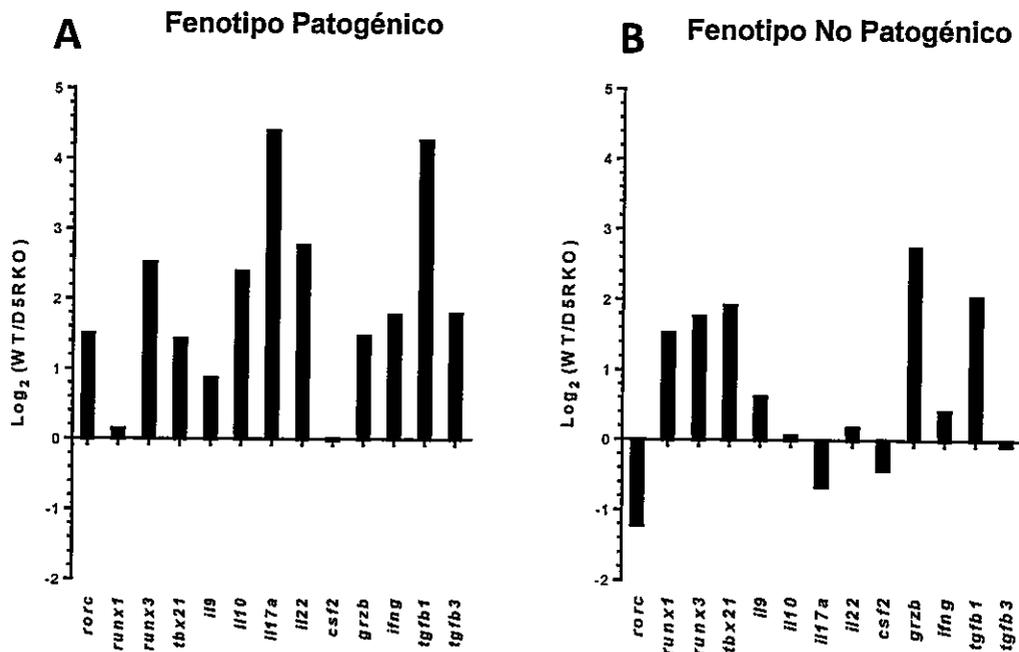


Figura 9: El D5R favorece el patrón transcripcional asociado al fenotipo T_H17 Patogénico y algunos genes involucrados en el fenotipo No Patogénico.

Tn purificados del bazo de ratones WT o D5RKO fueron diferenciados hacia el fenotipo T_H17 Patogénico o T_H17 No Patogénico, luego se extrajo mRNA y el nivel de transcripción de un grupo de genes asociados a la función de T_H17 fue cuantificado por RT-PCR de tiempo real. Posteriormente, se calculó la relación entre los genotipos estableciendo una razón en base logarítmica 2. **A.** Se muestra la relación de transcripción para el fenotipo de T_H17 diferenciados en presencia de TGF-β3 e IL-23. **B.** Se muestra la relación de transcripción para el fenotipo de T_H17 diferenciados en presencia de TGF-β1. En ambos gráficos se muestra la relación promedio determinada a partir de 5 experimentos independientes. Un valor de 0 indica igual

expresión en ambos genotipos; un valor positivo indica mayor expresión en células WT; un valor negativo indica mayor expresión en células D5RKO.

De acuerdo a los resultados, se puede inferir que el D5R favorece el patrón transcripcional patogénico ya que todos los genes evaluados se transcriben en mayor nivel en los T_H17 Patogénicos WT. Por el contrario, al diferenciar T_n hacia T_H17 No Patogénicos y evaluar la contribución de D5R en el patrón transcripcional de esta firma, se observó que no todos los genes se transcriben en mayor nivel en el genotipo WT. Los genes *rorc*, *il17a*, *csf2* y *tgfb3* involucrados tanto en la mantención del fenotipo como en la capacidad efectora, se transcriben en mayor nivel en los T_H17 No Patogénico D5RKO.

Considerando el patrón transcripcional (figura 9), se podría conjeturar que T_H17 generados en presencia de TGF- β 3 e IL-23 WT serían más patogénicos en su acción efectora o que tendrían una mayor conversión hacia el fenotipo T_H1, el cual es un proceso característico en ésta población (Y. Wang y col., 2014). Por el contrario, se podría presumir a la vez que T_H17 D5RKO generados en presencia de TGF- β 1 tendrían una mayor capacidad reguladora o inmunosupresora, puesto que expresan en mayor nivel genes esenciales para la mantención del fenotipo. Sin embargo, la capacidad inmunosupresora ejercida por T_H17 No Patogénico ha sido solo detectada en ensayos *in vitro* y hasta la fecha no existen evidencias *in vivo* que la avalen (Singh y col., 2013; Luz-Crawford y col., 2015). Por consiguiente, se planteó evaluar cómo el D5R afecta la capacidad de expresar moléculas asociadas a la inmunosupresión en T_H17.

5.2.2- El D5R no afecta la expresión de moléculas asociadas a funciones inmunosupresoras en los fenotipos de T_H17.

Debido a que el D5R regula diferencialmente los genes asociados a la función y mantenimiento de T_H17 (figura 9), se cuantificó en estos linfocitos generados por TGF- β 3/IL-23 o TGF- β 1 la expresión de dos moléculas asociadas clásicamente a funciones inmunosupresoras: 1. LAG-3, que es una molécula que inhibe la señalización por TCR y así limita la expansión de los Linfocitos; 2. CTLA4, que es un reconocido regulador negativo de la función linfocitaria. La expresión de ambas moléculas en los T_H17 puede verse en la figura 10.

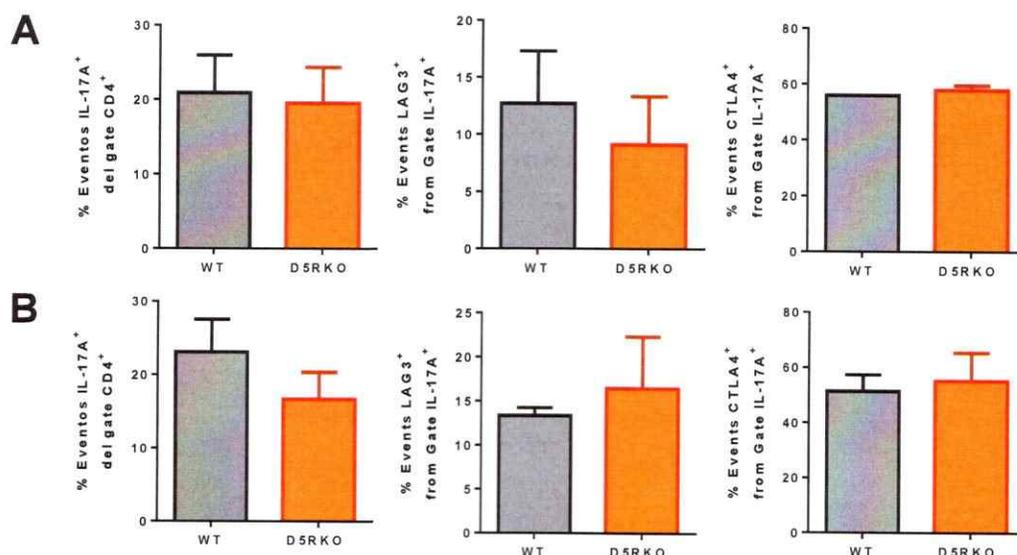


Figura 10: El D5R no afecta la diferenciación a T_H17 Patogénico o No Patogénico, ni tampoco la expresión de LAG3 y CTLA4 en estas poblaciones *in vitro*. Se diferenciaron Tn WT (gris) y D5RKO (naranja) hacia el fenotipo T_H17 Patogénico (A) y No Patogénico (B). **Izquierda.** Se muestra el porcentaje de diferenciación determinado por la expresión de IL-17A⁺. **Centro.** Se muestra el porcentaje de células que expresan LAG3 dentro de las IL-17A⁺. **Derecha.** Se muestra las células que expresan CTLA4 dentro de las células IL-17A⁺. En A y B los valores corresponden al promedio \pm SEM para cada marcador, considerando 3-4 experimentos independientes. Las diferencias entre genotipos fueron analizadas por el test *t* de Student con corrección de Welch.

De acuerdo a lo observado a la figura 10, se puede afirmar que el D5R no afecta la frecuencia de diferenciación *in vitro* hacia T_H17 Patogénico o No Patogénico. Al evaluar las moléculas asociadas a inmunosupresión, se observó que éstas no son exclusivas para el fenotipo no patogénico (TGF-β1) ya que también se expresan bajo condiciones proinflamatorias (TGF-β3 e IL-23). Tampoco se observó que la expresión de LAG3 y CTLA4 se vea afectada por el D5R *in vitro*, ya que no se registraron diferencias significativas entre los genotipos para ninguno de los fenotipos. Debido al poco avance en la literatura acerca del mecanismo efector de los T_H17 No Patogénicos, se procedió a evaluar si D5R afecta la capacidad efectora de los T_H17 Patogénicos, ya que ésta población ha sido más extensamente estudiada (Lee y col., 2012; Wu y col., 2013; Y. Wang y col., 2014).

5.2.3- El D5R no regula la plasticidad fenotípica de los T_H17 *in vitro*.

Los T_H17 que se diferencian a partir de TGF-β3 e IL-23 adquieren un fenotipo patogénico ya que son capaces de inducir EAE y además, pueden convertirse a T_H1 bajo condiciones inflamatorias (Lee y col., 2012; Y. Wang y col., 2014). Durante el desarrollo de este trabajo, se observó que el D5R favorece un patrón transcripcional patogénico *in vitro* (figura 9). Sin embargo, lo anterior no es concordante con el aumento aparente en la proporción de T_H17-IFN-γ⁺ observado en el SNC de ratones RAG1KO transferidos con LT CD4⁺ deficientes en el D5R (figura 7 y 8). Por ello, se buscó evaluar si el D5R está implicado en el paso de T_H17 hacia T_H1, para lo cual LT CD4⁺ fueron diferenciados en presencia de TGF-β3 e IL-23 y luego, los T_H17 resultantes fueron purificados por la expresión de IL-17. Más tarde, estos fueron

cultivados en presencia de IL-12 de acuerdo a (Y. Wang y col., 2014) y el paso a T_H1 fue evaluado, como puede observarse en la figura 11.

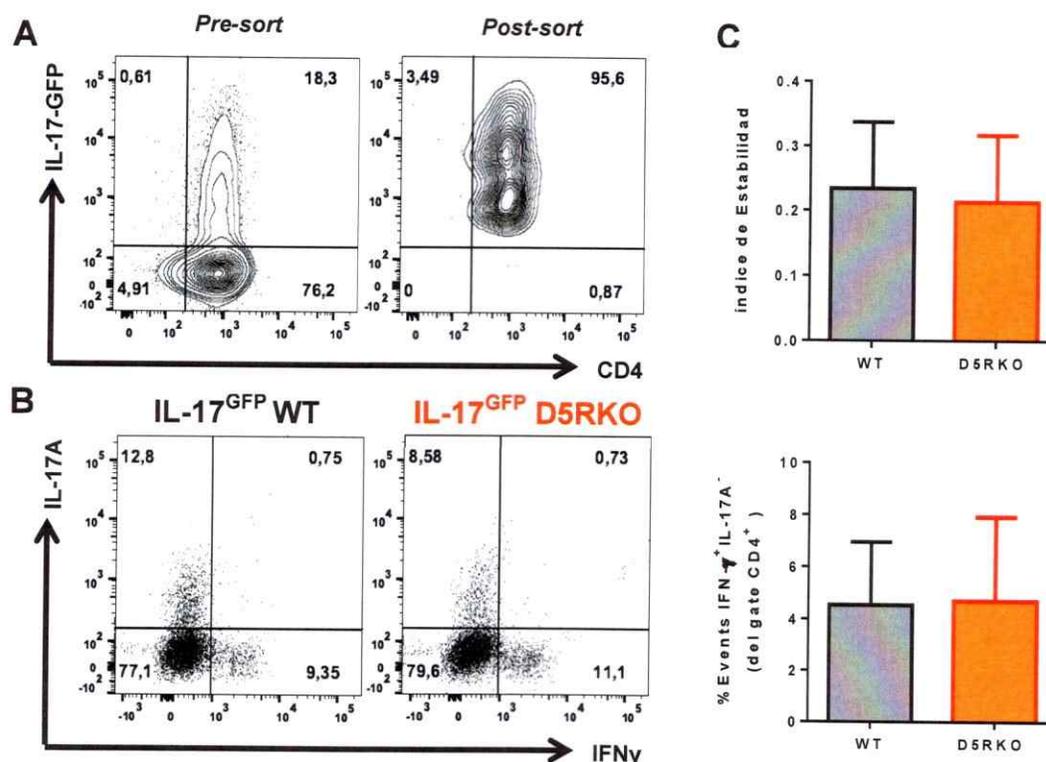


Figura 11: El D5R no afecta la conversión de T_H17 Patogénico a T_H1 *in vitro*.

Linfocitos T_H $IL-17^{GFP}$ WT e $IL-17^{GFP}$ D5RKO fueron purificados y diferenciados *in vitro* hacia T_H17 en presencia de TFG- β 3 e IL-23 durante 6-7 días, para luego evaluar la conversión a T_H1 . **A.** Se muestran *contour plots* representativos en donde se analizan las células $CD4^+IL-17A^+$ del *gate* células viables (izquierda), las cuales fueron purificadas mediante *cell sorter* gracias al reportero GFP (derecha). **B.** Se muestran *dot plots* representativos de T_H17 cultivados con IL-12 (10 ng/mL) que fueron re-estimulados *in vitro* para evaluar la expresión tanto de IL-17A como de IFN γ en células WT (izquierda) y D5RKO (derecha). **C.** Se muestra la cuantificación del índice de estabilidad para el fenotipo de T_H17 (arriba), el cual fue determinado con la razón del nivel de pureza (*post-sort*) y el porcentaje de eventos $IL-17A^+$ después de 48 horas con IL-12. También se gráfica el porcentaje de T_H1 obtenidos (abajo). En C los valores corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En A y B, los números sobre cada región indican el porcentaje de células positivas en el cuadrante correspondiente. No se encontraron diferencias según test *t* de Student.

Los T_H17 patogénicos usados en el ensayo de conversión no expresaban de manera considerable IFN- γ (menor al 1% de los IL-17A⁺, dato no mostrado) al momento de purificarlos por *cell sorter*, aunque si transcribían *ifng* y *tbx21* (figura 9). De manera que los T_H1 observados al término del ensayo fueron generados por la señalización de IL-12. En cuanto a los resultados obtenidos, se puede observar que tanto la mantención del fenotipo T_H17 (determinado por la presencia de IL-17A⁺) como el porcentaje de los T_H1 generados, no difieren mayormente entre WT y D5RKO. Esto sugiere que la acumulación de T_H17-IFN- γ ⁺ observado en el SNC de ratones con EAE transferidos con LT CD4⁺ D5RKO (figura 7) no se debería a una deficiencia en la plasticidad fenotípica de éstos T_H17.

5.3.1- El D5R expresado en LT CD4⁺ favorece el desarrollo de colitis crónica.

Debido al alto contenido de DA intestinal en condiciones fisiológicas y al decremento de este neurotransmisor en eventos patológicos, otro modelo atingente para estudiar el papel del D5R en LT CD4⁺ en cuadros autoinmunes es la colitis crónica. Este modelo murino recapitula los principales eventos de las Enfermedades Inflammatorias Intestinales, que comprende principalmente a UC y CD (ver introducción, sección 2.5).

Para estudiar el papel del D5R en LT CD4⁺ en este modelo, se transfirieron LT CD4⁺ *naïve* (Tn) WT, D5RKO o una mezcla 1:1 de ambos a ratones RAG1KO. Posteriormente, la masa corporal fue registrada semanalmente para determinar el desarrollo de la enfermedad, lo cual puede observarse en la figura 12.

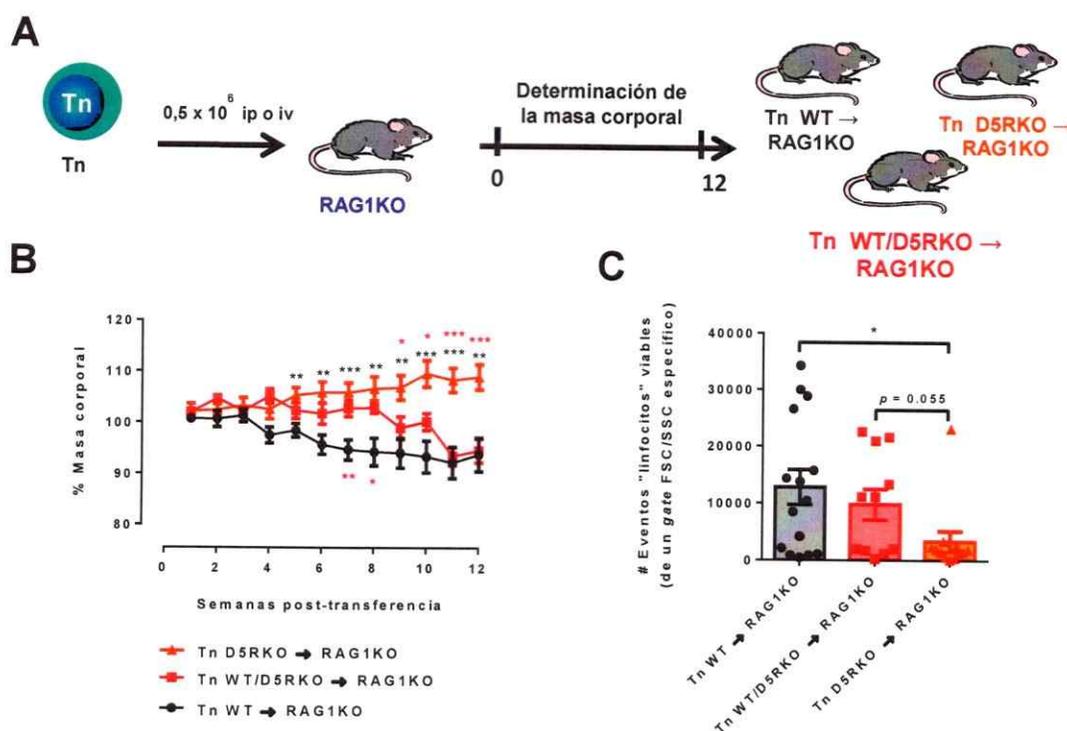


Figura 12: El D5R expresado en Tn favorece la pérdida de peso en un modelo de Colitis Crónica. **A. Esquema del diseño experimental:** Ratones RAG1KO recibieron por vía intraperitoneal o intravenosa, 5×10^5 LT CD4⁺ naïve (Tn) WT, D5RKO o un mix 1:1 entre ellos al día 0. Luego de eso, se determinó la variación de la masa corporal semanalmente durante 12 semanas. **B.** Se muestra el promedio \pm SEM de la variación de la masa corporal del total de ratones utilizados en 4 experimentos independientes, cada uno de ellos con al menos 4 ratones por grupo. De esta manera, el gráfico en B considera Tn WT \rightarrow RAG1KO ($n=17$); Tn D5RKO \rightarrow RAG1KO ($n=16$) y Tn WT/D5RKO \rightarrow RAG1KO ($n=10$). Las diferencias entre los grupos fueron determinadas utilizando el test *t* de Student, comparando 2 grupos simultáneamente en todas las combinaciones posibles desde la semana 5 en adelante. **C.** Cuantificación del número de eventos viables, obtenidos con la estrategia de *gating* para la determinación de linfocitos. Los valores representan el promedio \pm SEM. Cada punto representa el valor otorgado por el citómetro para 1 muestra. En B se muestran los datos de 2-4 experimentos y las diferencias fueron establecidas utilizando el test *t* de Student. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; donde * en negro representa diferencias entre los datos WT y D5RKO y, en rojo, las diferencias entre los grupos WT/D5RKO y WT o D5RKO.

En la figura 12 se agruparon los datos de colitis crónica inducida de manera ip o iv, ya que con ambos tipos de inyecciones se obtenían resultados similares en el porcentaje de pérdida de la masa corporal de los ratones transferidos. Sorprendentemente, ratones RAG1KO transferidos con Tn D5RKO no pierden peso durante el transcurso de las semanas, sino que por el contrario, aumentan en promedio un 10% de su masa corporal (figura 12B). Para descartar una posible falla en la reconstitución por parte de

los Tn D5RKO, éstos se transfirieron en conjunto con Tn WT en una proporción 1:1 (línea roja, figura 12B) observando que durante las 8 primeras semanas, la masa corporal de los ratones transferidos con ésta mezcla se asemeja a la de los ratones transferidos con Tn D5RKO. Sin embargo, durante las últimas 3 semanas pierden súbitamente masa corporal alcanzando los niveles de los ratones transferidos con Tn WT.

Debido a que uno de los principales sitios de inflamación en la colitis crónica es el colon, se procedió a determinar cualitativamente la infiltración linfocitaria mediante citometría de flujo (figura 12C). Los resultados indicaron que ratones transferidos con Tn D5RKO poseían diez veces menos de células en la selección específica de *Forward* y *Side Scatter* para determinar linfocitos. Por consiguiente, el análisis de los fenotipos se realizó en los ratones transferidos con Tn WT y D5RKO puesto que poseen un número similar de células infiltradas en el colon que los ratones transferidos con Tn WT.

5.3.2- La expresión del D5R en LT CD4⁺ no regula la adquisición de un fenotipo efector en el colon de ratones con colitis crónica.

En la colitis crónica, uno de los principales sitios de inflamación es la lámina propia del colon (cLP). En este tejido, ocurre una alta infiltración linfocitaria que responde contra antígenos de la microbiota generando un estado inflamatorio persistente (Rooks y col., 2014). Para determinar si el D5R favorece la adquisición de un fenotipo patogénico en los LT CD4⁺, las células infiltrantes de cLP de ratones transferidos con Tn WT y D5RKO fueron obtenidas (ver materiales y métodos, sección 4.4) y los eventos CD4⁺ fueron analizados según genotipo por la expresión de CD45 (CD45.1 y CD45.2). El

análisis de los fenotipos efectores para cada genotipo, pueden observarse en la figura 13.

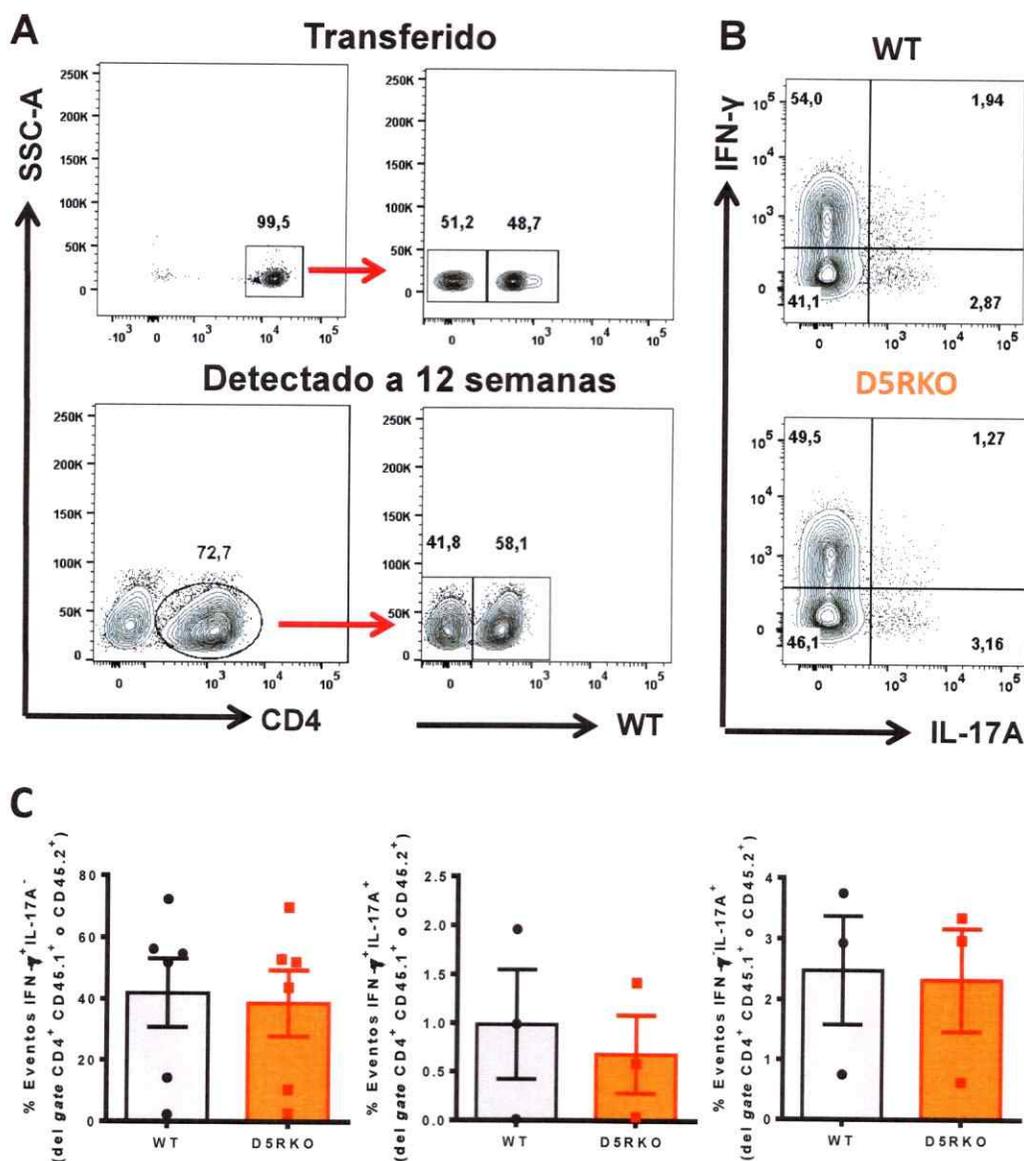


Figura 13: El D5R no regula la adquisición de fenotipos patogénicos en LT CD4⁺ infiltrados en cLP.

A. Estrategia de *gating*. Para inducir la colitis crónica, se realizó una mezcla 1:1 de Tn WT y D5RKO, los cuales fueron transferidos a ratones RAG1KO (*Countor plots*, fila arriba). Luego de 12 semanas, en las MNCs obtenidas de cLP fueron identificados los LT CD4⁺ (abajo, izquierda) y por la expresión de CD45, se pudo determinar el genotipo de ésta población (abajo, derecha). En la columna izquierda se muestran los linfocitos dentro de la selección de células viables y en el eje X la marca CD4. En la columna de la derecha se muestran los CD4⁺ y en el eje X se

establecen los WT (CD45.1⁺) y los D5RKO (CD45.1⁻). Tanto en la columna de la izquierda como en la de la derecha, el número sobre la selección indica el porcentaje de células positivas. B. Se observan *countor plots* representativos que evidencian las células que expresan IFN γ e IL-17A para los LT CD4⁺ WT (arriba) y D5RKO (abajo). El número en cada cuadrante representa el porcentaje de células positivas. C. Cuantificación de la frecuencia de las poblaciones celulares analizadas en (B). Los valores indican el promedio \pm SEM de los T_H1 (izquierda), T_H17-IFN- γ ⁺ (centro) y T_H17-IFN- γ ⁻ (derecha). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón, considerando sólo valores mayores a 0. Se muestran los datos de un grupo experimental con 6 ratones. Las diferencias entre genotipos fueron analizadas mediante test *t* de Student con o sin la corrección de Welch.

Los resultados mostrados en la figura 13, sugieren que el D5R no afecta la polarización hacia los fenotipos T_H1 y T_H17 en el sitio de inflamación evaluado. Lo anterior, debido a que no hay diferencias significativas entre células WT y D5RKO, al comparar el porcentaje de LT CD4⁺ que expresan IFN- γ y/o IL-17A.

Notablemente, al identificar el genotipo de los LT CD4⁺ en cLP luego de 12 semanas, se puede observar que la proporción entre WT y D5RKO difiere con respecto a la mezcla inicialmente transferida (figura 13A). Esto motivó el posterior análisis de la reconstitución por parte de los LT CD4⁺.

5.3.3- El D5R expresado en los LT CD4⁺ favorece la migración hacia cLP en ratones RAG1KO con colitis crónica.

Los resultados previamente obtenidos, sugieren que el D5R podría ser importante en la migración o infiltración de LT CD4⁺ hacia cLP, ya que ratones transferidos con Tn D5RKO, además de no desarrollar colitis inflamatoria, poseen significativamente menos MNCs viables en cLP (figura 12).

Para evaluar si el D5R en los LT CD4⁺ afecta la capacidad de infiltrar en la cLP o regula la capacidad de repoblar órganos inmunes (MLN y bazo) en colitis crónica, se

analizaron las frecuencias de los genotipos de los LT CD4⁺ de ratones transferidos con Tn WT y D5RKO. Los resultados pueden ser observados en la figura 14.

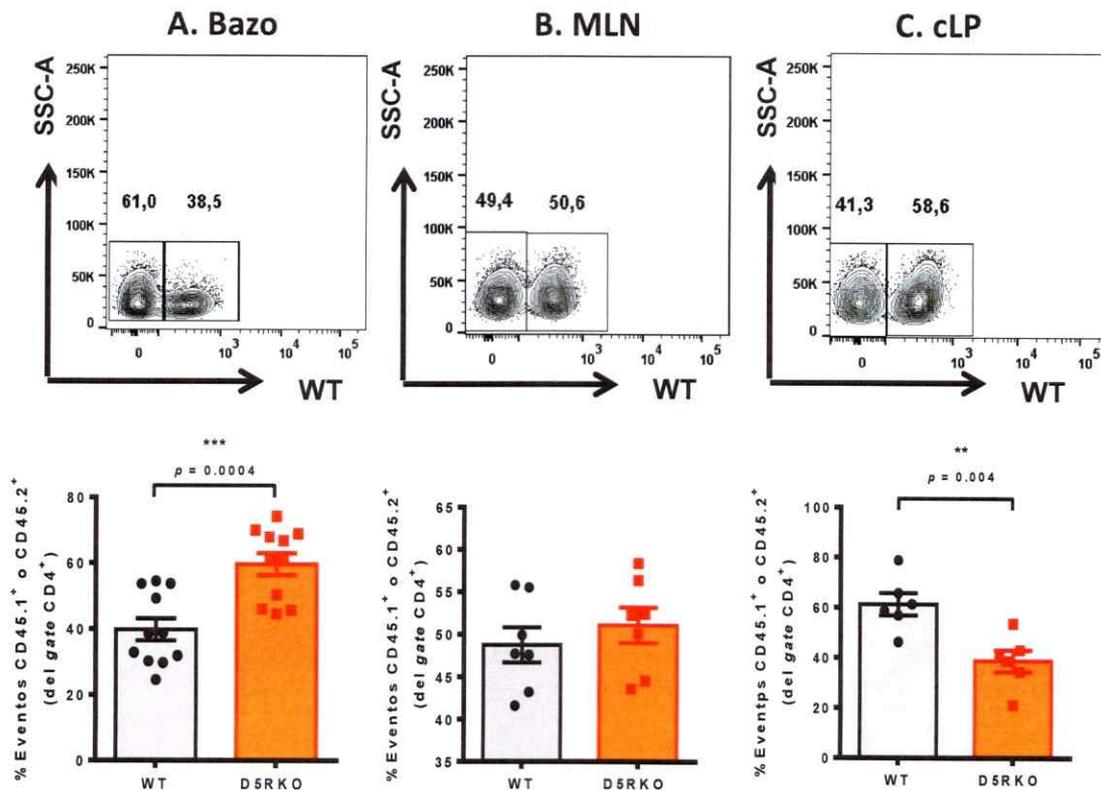


Figura 14: La expresión del D5R en los LT CD4⁺ favorece la migración hacia cLP y regula negativamente la presencia de estas células en el bazo. 12 semanas después de la inducción de colitis crónica, el bazo (A), MNL (B) y cLP (C) fueron extraídos desde los ratones RAG1KO transferidos con una mezcla 1:1 de Tn WT (CD45.1) y D5RKO (CD45.2). **Arriba.** Se muestran *countor plots* representativos de cada órgano o tejido, en el que se seleccionan las poblaciones WT (CD45.1⁺) y D5RKO (CD45.2⁺). En cada región seleccionada se indica el porcentaje correspondiente. **Abajo.** Cuantificación del porcentaje de células WT o D5RKO del *gate* CD4⁺ para cada órgano o tejido. Los valores corresponden al promedio \pm SEM. Cada punto representa los datos obtenidos de un ratón. Se muestran los datos de 2 experimentos independientes con 3-5 ratones por experimento. La significancia de las diferencias entre genotipos fue establecida utilizando el test *t* de Student, donde ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Los resultados de la figura 14 indican que LT CD4⁺ WT y D5RKO se distribuyen diferencialmente en ratones RAG1KO con colitis crónica. Esto se denota ya que en bazo los LT CD4⁺ D5RKO son significativamente más frecuentes que los WT, lo cual se revierte en cLP, donde los LT CD4⁺ WT representan la mayoría. En MLN, por el contrario, la proporción entre WT y D5RKO es similar.

5.4.1- El D5R en LT CD4⁺ está asociado a la regulación de la expresión de moléculas de *homing* a intestino en bazo de ratones con colitis crónica.

Para evaluar las posibles razones de las diferencias observadas en la repoblación de órganos y tejidos entre LT CD4⁺ WT y D5RKO, se determinó el nivel de expresión de moléculas asociadas al *homing* intestinal, tales como el receptor de quimioquinas CCR9 y las integrinas $\alpha 4\beta 7$ y LFA-1. Los resultados del análisis de estas tres moléculas en LT CD4⁺ de bazo, puede observarse en la figura 15.

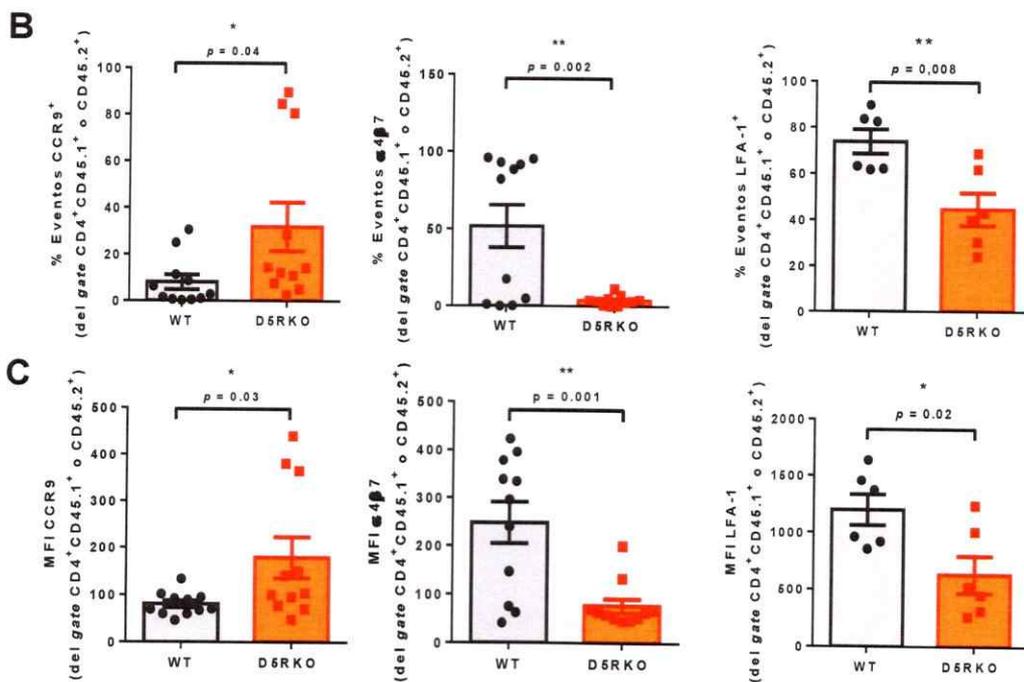
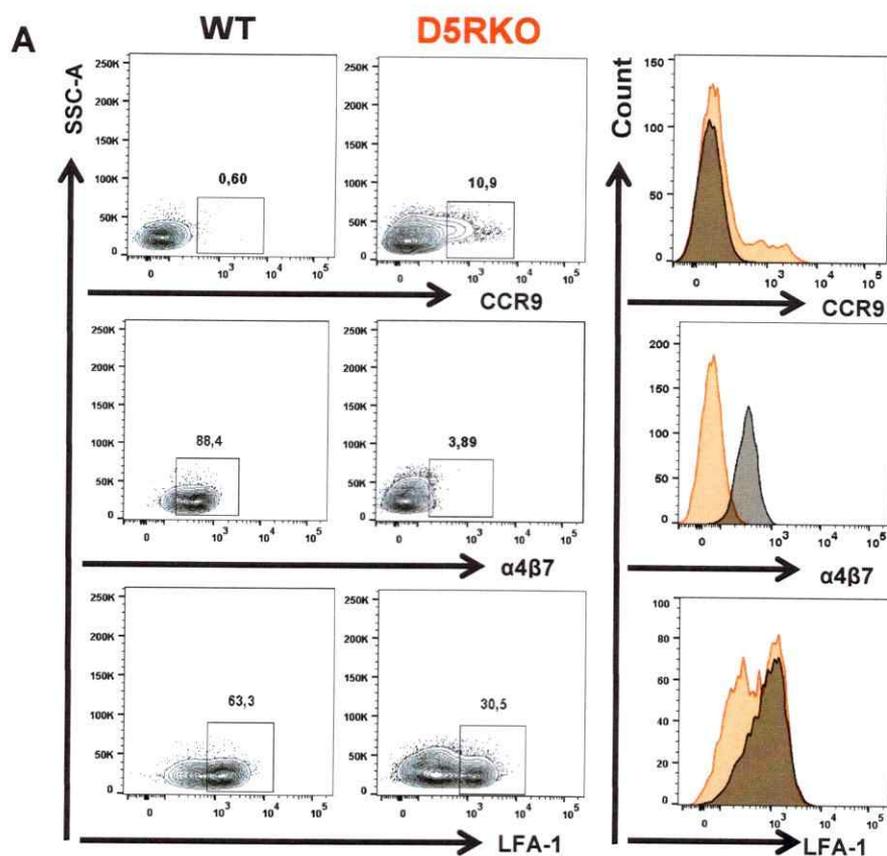


Figura 15: El D5R expresado en LT CD4⁺ regula la expresión de moléculas de *homing* intestinal en el bazo de ratones con colitis crónica. Ratones RAG1KO transferidos con una mezcla 1:1 de Tn WT y D5RKO fueron sacrificados a las 12 semanas y el fenotipo de los LT CD4⁺ en el bazo fue determinado. **A.** *Contour plots* e histogramas representativos son mostrados para la expresión de CCR9 (fila superior), $\alpha 4\beta 7$ (fila centro) y LFA-1 (fila inferior). En la columna de la izquierda se muestran las células positivas para las moléculas previamente mencionadas en el genotipo WT, identificado por el *gate* CD4⁺CD45.1⁺. En la columna central, se muestran las poblaciones positivas para las moléculas evaluadas en el genotipo D5RKO y, en la columna de la derecha, se muestra un histograma para cada medición, donde en negro se representan los eventos WT y en naranja los D5RKO. En la columna izquierda y central, el número anotado sobre la selección indica el porcentaje de células para cada parámetro evaluado. **B.** Cuantificación de los porcentajes de las células positivas para CCR9 (izquierda), $\alpha 4\beta 7$ (centro) y LFA-1 (derecha). **C.** Cuantificación de la densidad de la expresión de CCR9 (izquierda), $\alpha 4\beta 7$ (centro) y LFA-1 (derecha). Los valores corresponden a la intensidad media de fluorescencia (MFI) del *gate* CD4⁺CD45.1⁺ o CD4⁺CD45.2⁺ (dependiendo del genotipo) para cada marcador evaluado. En B y en C, cada punto indica el dato obtenido a partir de un ratón. En estos gráficos, se muestran los datos colectados de 2 experimentos independientes con 3-5 ratones/experimento. Los datos mostrados indican el promedio \pm SEM. La significancia de las diferencias entre genotipos fue establecida utilizando el test *t* de Student, donde * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Los resultados muestran que la carencia del D5R en LT CD4⁺ genera una exacerbación de la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ del bazo, tanto en frecuencia de células expresando este receptor como en la densidad de CCR9 en la superficie celular. Por el contrario, la carencia del D5R resulta en una caída en la frecuencia y densidad de expresión de $\alpha 4\beta 7$ y LFA-1 en los LT CD4⁺ del bazo. Lo anterior, explicaría en parte por qué los LT CD4⁺ D5RKO son más frecuentes en el bazo de ratones RAG1KO transferidos con Tn WT y D5RKO (figura 14). Sin embargo, de manera paradójica, en los LT CD4⁺ D5RKO la mayor expresión de CCR9 (descrita como clave en el *homing* a estestino) no resulta en una mayor frecuencia de estas células en cLP (figura 14).

Para determinar si los resultados anteriormente comentados ocurren solo en bazo, se procedió a analizar el mismo análisis en los LT CD4⁺ de MLN.

5.4.1.2- El D5R regula la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ de MLN en ratones con colitis crónica.

Prosiguiendo con el análisis de la expresión de las moléculas de *homing* a intestino en los LT CD4⁺, se evaluó la expresión de CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos presentes en el MLN. Los resultados pueden observarse en la figura 16.

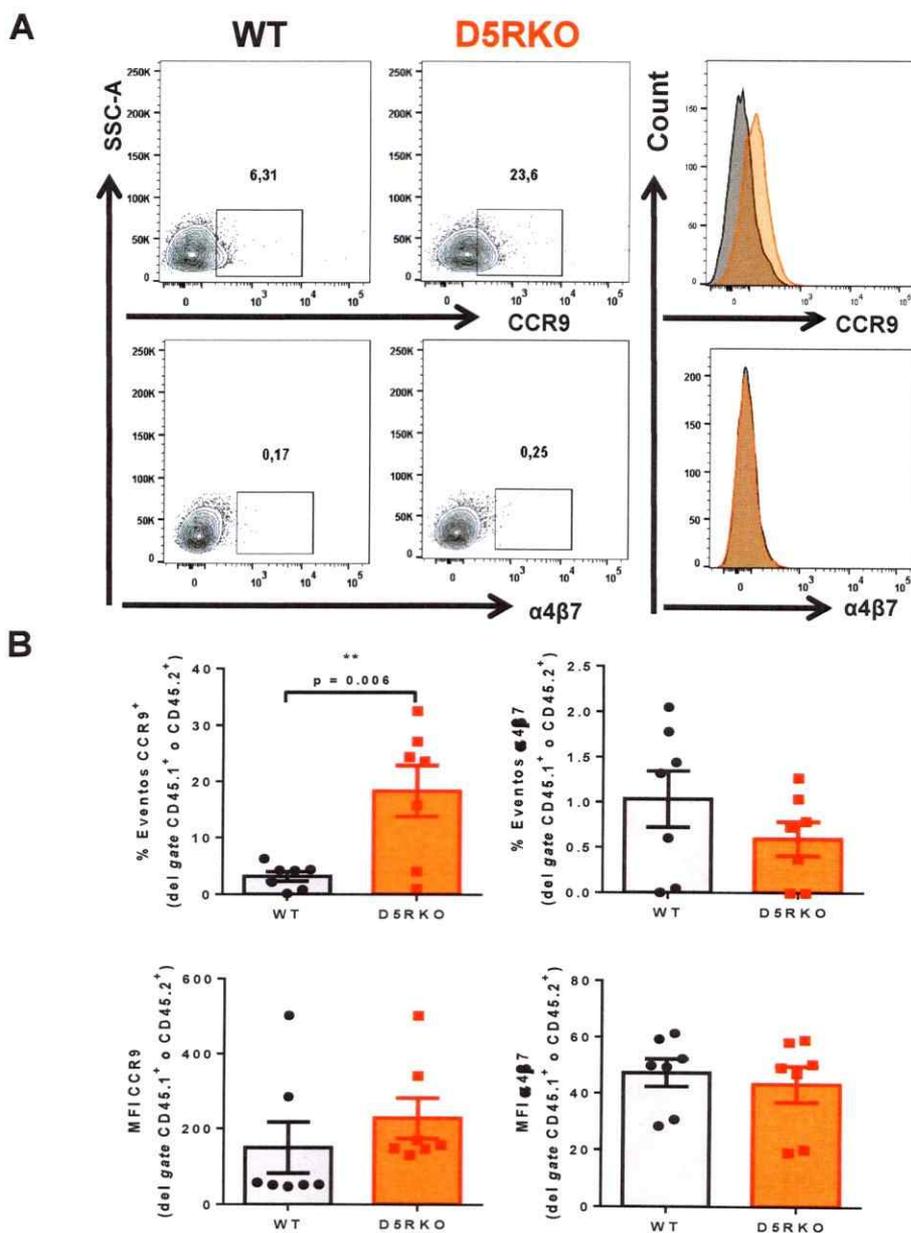


Figura 16: El D5R expresado en LT CD4⁺ regula negativamente la expresión de CCR9 en el MLN de ratones con colitis crónica. Ratones RAG1KO transferidos con una mezcla 1:1 de Tn WT y D5RKO fueron sacrificados a las 12 semanas y el fenotipo de los LT CD4⁺ en el MLN fue determinado. **A.** Se muestran *Countor plots* e histogramas representativos para la expresión de CCR9 (arriba) y $\alpha 4\beta 7$ (abajo). En la columna de la izquierda se muestran las células positivas para las moléculas previamente mencionadas en el genotipo WT, identificado por el gate CD4⁺CD45.1⁺. En la columna central, se muestran las poblaciones positivas para las moléculas evaluadas en el genotipo D5RKO y, en la columna de la derecha, se muestra un histograma para cada medición, donde en negro se representan los eventos WT y en naranja los D5RKO. En la columna izquierda y central, el número anotado sobre la selección indica el porcentaje de células positivas para cada parámetro evaluado. **B.** Cuantificación de los porcentajes de las células positivas para CCR9 (izquierda) y $\alpha 4\beta 7$ (derecha). **C.** Cuantificación de la densidad de la expresión de CCR9 (izquierda) y $\alpha 4\beta 7$ (derecha). Los valores corresponden a la Intensidad media de fluorescencia (MFI) del gate CD4⁺CD45.1⁺ o CD4⁺CD45.2⁺ (dependiendo del genotipo) para cada marcador evaluado. En B y en C, cada punto indica el dato obtenido a partir de un ratón. En estos gráficos, se muestran los datos colectados de 2 experimentos independientes con 3-5 ratones/experimento. Los datos mostrados indican el promedio \pm SEM. La significancia de las diferencias entre genotipos fue establecida utilizando el test *t* de Student, donde *******p*<0,01.

Los resultados en la figura 16 sugieren que D5R regula negativamente la expresión de CCR9 en MLN ya que la población positiva para el receptor de CCL25 es significativamente mayor en LT CD4⁺ D5RKO. Por el contrario, no se observaron diferencias entre WT y D5RKO en la frecuencia o en la densidad $\alpha 4\beta 7$ en los LT CD4⁺ obtenidos de MLN de ratones con colitis crónica.

5.4.1.3- El D5R no regula la expresión de moléculas asociadas a migración intestinal en LT CD4⁺ de ratones sanos.

Debido a que en ratones RAG1KO con colitis crónica se observó una importante diferencia en la expresión de LFA-1, CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ entre los LT CD4⁺ WT y D5RKO, se procedió a analizar si dicha diferencia es observada también en ratones sanos. Para aquello, se analizó la expresión de un panel de receptores de quimioquinas e integrinas

involucrados en migración, mediante citometría de flujo, en bazo de ratones WT y D5RKO. El análisis de las poblaciones de LT CD4⁺ puede observarse en la figura 17.

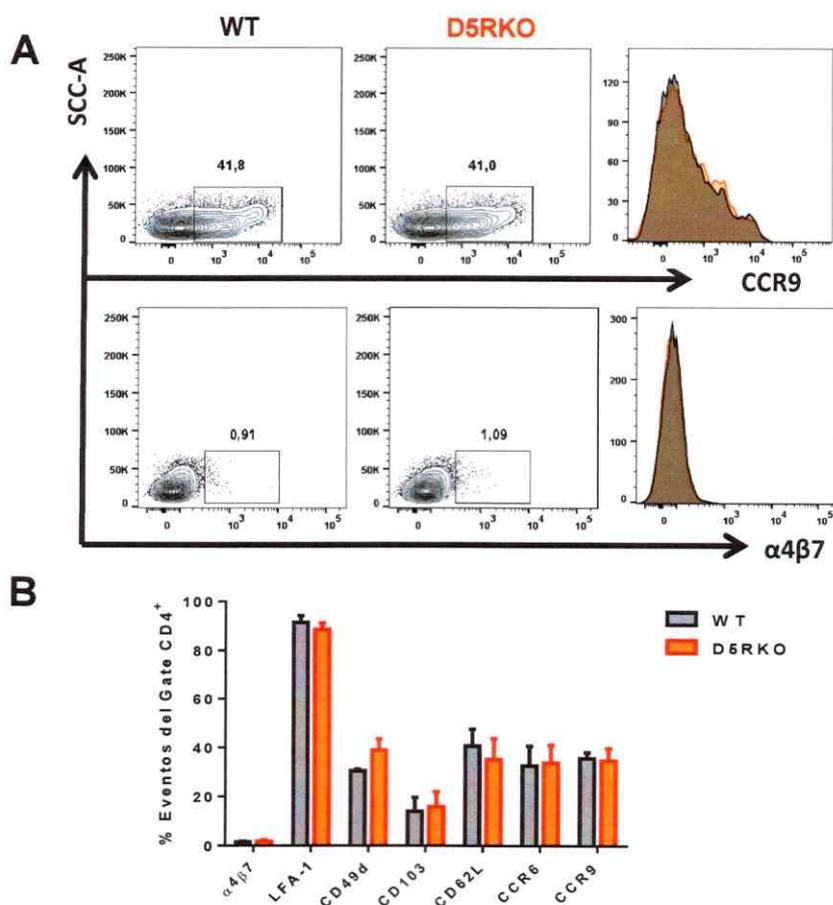


Figura 17: El D5R no afecta la expresión de proteínas asociadas a la migración en LT CD4⁺ provenientes de ratones sanos. La expresión de moléculas asociadas a la migración fue evaluada en LT CD4⁺ de bazo de ratones WT y D5RKO mediante citometría de flujo. **A.** Se muestran *countor plots* representativos con los cuales **Arriba** se determinó la población CCR9⁺ y **abajo** la población α4β7⁺ en LT CD4⁺ WT (izquierda) y D5RKO (centro). Además, se muestran histogramas comparando la expresión de estas moléculas entre ambos genotipos (derecha). El número sobre cada región seleccionada indica el porcentaje de LT CD4⁺ positivos para cada marcador. **B.** Cuantificación de la frecuencia de expresión de todas las moléculas evaluadas. Los valores representan el promedio ± SEM. Se muestran los datos obtenidos de 7 ratones por grupo, divididos en 3 experimentos independientes, cada experimento con 2-3 ratones por genotipo. La significancia de las diferencias entre genotipos fue evaluada utilizando el test *t* de Student con y sin la corrección de Welch. No se encontraron diferencias.

En ratones RAG1KO que desarrollaron colitis crónicas luego de la transferencia de Tn WT y D5RKO, la población de LT CD4⁺ D5RKO positiva para CCR9 es mayor en bazo y en MLN. Sin embargo, esto no se asocia con una mayor proporción de los LT deficientes en D5R en la cLP, ya que éstos están en una menor proporción en el tejido intestinal (figura 14).

Los resultados en la figura 17 sugieren que la desregulación observada para CCR9, LFA-1 y $\alpha 4\beta 7$ en bazo, ocurren específicamente en un contexto de colitis. Lo anterior, ya que en LT CD4⁺ obtenidos de ratones sanos WT y D5RKO los marcadores comentados poseen similar densidad de expresión (dato no mostrado) y están expresados en semejante proporción. De manera similar, otras integrinas y receptores de quimioquinas fueron evaluados sin encontrar diferencias significativas en la proporción dentro de los LT CD4⁺ (figura 17B).

Considerando lo anteriormente expuesto, para evaluar el papel de D5R en la migración hacia la mucosa intestinal es necesario recrear condiciones semejantes a las que se desencadenan durante la colitis, puesto que en condiciones fisiológicas no se observan mayores diferencias entre WT y D5RKO.

5.4.2- El D5R expresado en LT CD4⁺ colitogénicos es necesario para la migración hacia la lámina propia colónica.

Durante el desarrollo de este trabajo se ha observado que en colitis crónica el D5R es relevante para la expresión de moléculas asociadas a la migración a intestino en los LT CD4⁺. Por lo tanto, para evaluar si el D5R tiene un papel en la migración bajo estímulos asociados a la colitis, se generaron LT CD4⁺ *ex vivo* con tropismo hacia el intestino

mediante la acción de ácido retinoico (RA) y luego, éstos se transfirieron a ratones RAG1KO. Después de 16h se comparó la capacidad migratoria hacia la mucosa intestinal y otros órganos, entre LT CD4⁺ WT y D5RKO como puede observarse en la figura 18.

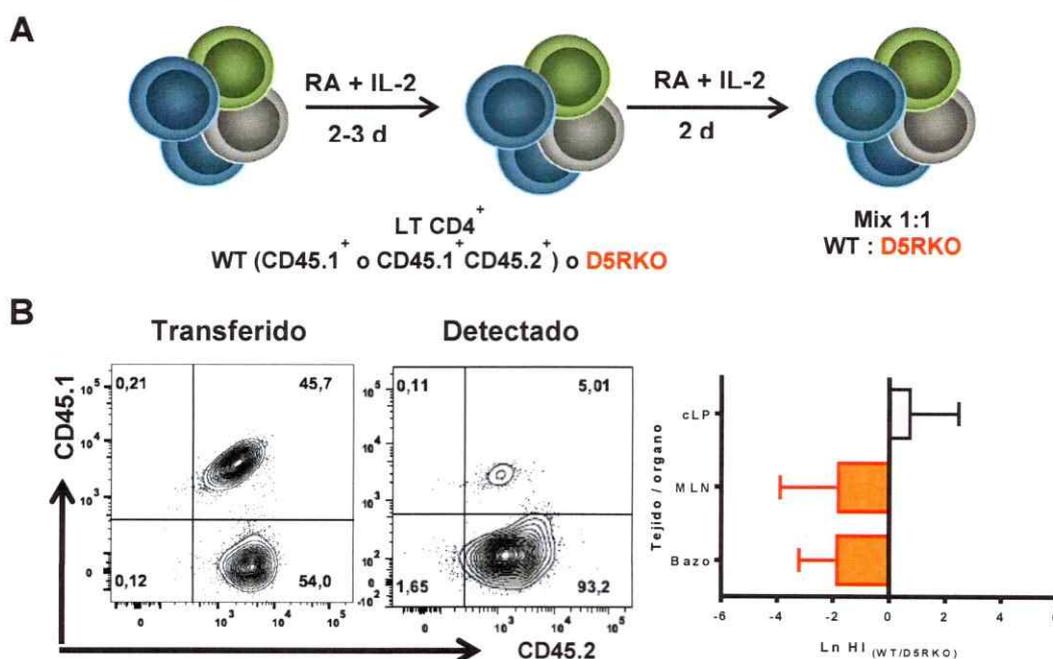


Figura 18: El D5R es requerido para la migración de LT CD4⁺ colitogénicos hacia la lámina propia colónica. **A. Esquema del diseño experimental.** LT CD4⁺ WT (CD45.1⁺ CD45.2⁻ o CD45.1⁺CD45.2⁺) y D5RKO (CD45.1⁻ CD45.2⁺) fueron purificados de bazo y luego cultivados en presencia de RA e IL-2 durante 4-5 días. Luego, las células fueron cosechadas, lavadas y mezcladas 1:1 entre WT y D5RKO. Posteriormente, entre 5-10x10⁶ células fueron transferidas a ratones RAG1KO y, 16 horas más tarde, el bazo, MNL y cLP fueron disecados y analizados para determinar las proporciones de los diferentes genotipos de LT CD4⁺. **B.** se muestran *Countor plots* representativos mostrando el análisis de la mezcla de linfocitos transferida a los ratones (Izquierda) y la determinación de las proporciones de los LT CD4⁺ detectadas en el bazo (centro) luego de 16 horas. Los números en cada cuadrante indican el porcentaje de células positivas en esa región. En base a relación transferido/detectado, se determinó el índice de migración entre los diferentes genotipos (derecha) utilizando la ecuación de Mora y Villablanca (Villablanca & Mora, 2011). Posteriormente, se cuantificó la razón logarítmica WT/D5RKO. Los valores representan el promedio ± SEM de 4 ratones para cLP, 3 con MLN y 10 ratones para bazo. Los datos fueron obtenidos de 4 experimentos independientes con 2-4 ratones por experimento.

Los resultados indican que el D5R expresado en LT CD4⁺ colitogénicos favorece la migración a cLP y regula negativamente la permanencia de éstas células en el bazo. Lo anterior es concordante con lo observado en ratones RAG1KO con colitis crónica, ya que en éstos, los LT CD4⁺ D5RKO se mantienen en una mayor relación en el bazo y en una menor relación en cLP. Sin embargo, bajo el ensayo de migración *in vivo* se observa que el D5R regula negativamente la frecuencia de LT CD4⁺ que llegan al MLN, a diferencia de lo que se observó en ratones con colitis, donde la proporción WT y D5RKO no difería mayormente (figura 14).

Para evaluar si las diferencias observadas en la migración *in vivo* se debe a diferencias en la expresión de los marcadores asociados a *homing* hacia intestino, se determinó la expresión de éstos en cada uno de los órganos y tejidos comentados anteriormente.

5.4.2.1- D5R regula negativa la expresión de CCR9 en LT CD4⁺ colitogénicos que migraron *in vivo* hacia la lámina propia colónica.

Además de determinar si D5R afecta la capacidad de migración *in vivo* de LT CD4⁺ colitogénicos, se determinó la expresión de las moléculas asociadas al *homing* a intestino en los distintos órganos y tejidos evaluados en la sección 5.4.2 como puede observarse en la figura 19.

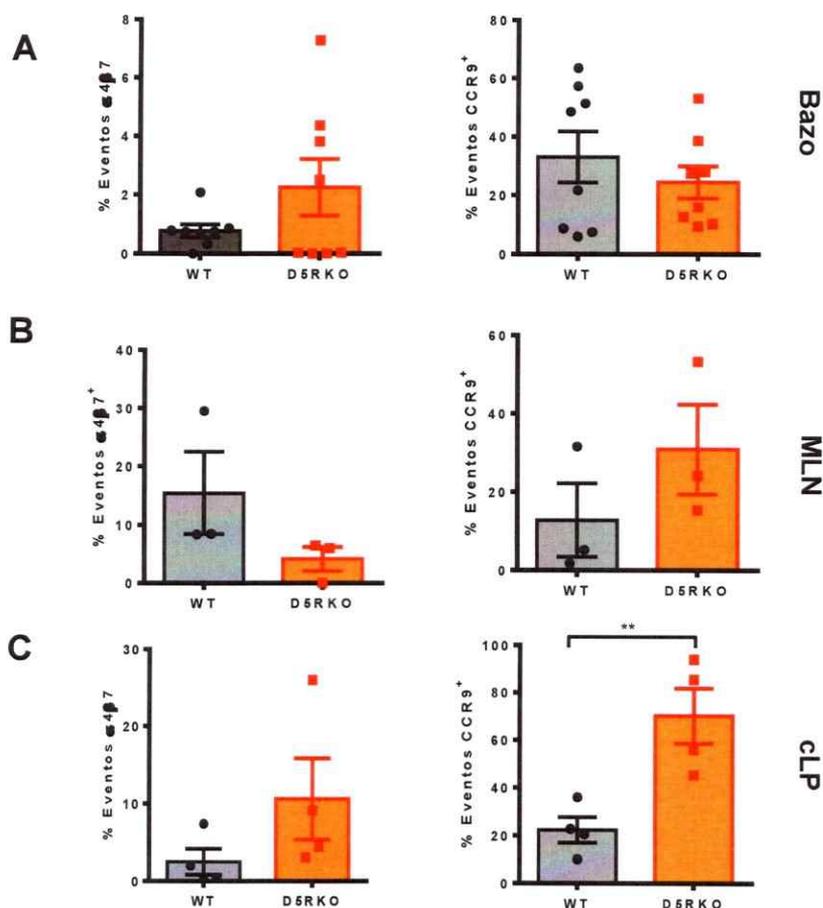


Figura 19: El D5R regula negativamente la expresión de CCR9 en LT CD4⁺ colitogénicos que lograron migrar a cLP *in vivo*. Se determinaron las poblaciones que expresan α4β7 (izquierda) y CCR9 (derecha) en los LT CD4⁺ colitogénicos identificados en bazo (A), MLN (B) y cLP (C) de ratones RAG1KO. En A, B y C se grafica el promedio ± SEM, calculado a partir de los datos obtenidos de 3 experimentos independientes. Cada punto representa los datos obtenidos de un ratón. La significancia de las diferencias entre genotipos fue evaluada utilizando el test *t* de Student con y sin la corrección de Welch. ** *p*<0.01.

Los resultados mostrados sugieren que LT CD4⁺ colitogénicos presentan poblaciones positivas para CCR9 y α4β7 independientemente de la señalización de D5R en bazo y en MLN. Sorprendentemente, en cLP los LT CD4⁺ D5RKO detectados presentan una mayor proporción de CCR9, sugiriendo que D5R regula negativamente a esta población. Sin embargo, hay que notar que los LT CD4⁺ D5RKO, pese a expresar en mayor proporción CCR9, presentan una menor capacidad para migrar hacia cLP.

5.4.3- El D5R regula negativamente la migración *in vitro* en LT CD4⁺ provenientes de ratones sanos.

Para determinar si existe una diferencia en la migración en ausencia de inflamación, LT CD4⁺ WT y D5RKO fueron purificados a partir de bazo de ratones sanos y la migración hacia una quimioquina típica de intestino se evaluó *in vitro*. Los resultados de migración en función de la concentración de CCL25 (ligando de CCR9) pueden observarse en la figura 20.

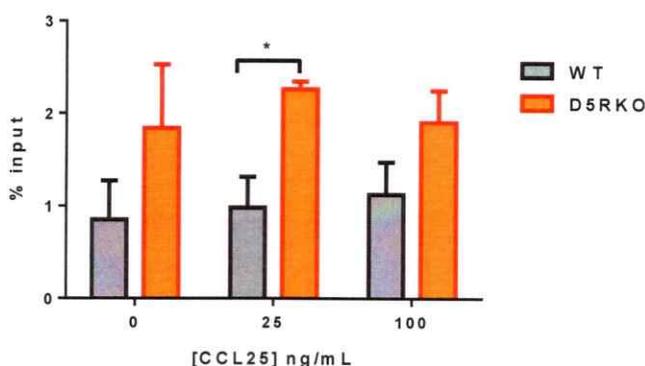


Figura 20: El D5R regula negativamente la migración *in vitro* en LT CD4⁺ provenientes de ratones sanos. LT CD4⁺ WT y D5RKO fueron purificados a partir de bazo y $0,5-1 \times 10^6$ células fueron utilizadas para ensayar la migración *in vitro* en cámaras *Transwell*, usando como quimioatractante CCL25. En el gráfico se muestra la cuantificación del porcentaje de células que migran hacia el compartimento inferior, con respecto al número inicial de células añadidas en el compartimento superior. Para determinar la significancia de las diferencias entre la migración de un genotipo se utilizó el Test de ANNOVA de múltiple comparación con el post-test de Tukey, sin encontrar diferencias. Para establecer las diferencias entre los genotipos para una concentración dada, se utilizó el test *t* de Student, donde * $p < 0.05$.

Los resultados mostrados en la figura 20 sugieren que en LT CD4⁺ provenientes de ratones sanos WT o D5RKO, tienen una baja capacidad basal para migrar hacia CCL25, que no aumenta en función de la concentración del quimioatractante. Sin embargo, a 25 ng/mL los LT CD4⁺ D5RKO poseen una mayor capacidad para migrar hacia CCL25 que la contraparte WT. Este resultado sugiere una mayor actividad de

CCR9 en ausencia de D5R, que es independiente de la expresión del receptor de CCL25 puesto que esta última no difiere de manera significativa entre LT CD4⁺ WT y D5RKO de bazo de ratones sanos (figura 17). Para determinar si éste fenómeno se extiende en contextos patológicos como la colitis crónica, otras aproximaciones *in vitro* son necesarias.

6. DISCUSIÓN

6.1- Papel del receptor D5 de dopamina en los LT CD4⁺ en EAE.

Utilizando herramientas farmacológicas y genéticas, previamente ha sido demostrado que el receptor D5 de dopamina (D5R) posee un papel importante en el desarrollo de la EAE, el modelo murino para Esclerosis Múltiple (ver introducción, sección 2.4.2). Dentro del mecanismo celular implicado en la patogénesis de la enfermedad, se ha demostrado que la señalización por el D5R favorece la producción de IL-23 en las DCs y con ello, se potencia la polarización a LT CD4⁺ T_H17, los cuales son uno de los principales actores patogénicos en la enfermedad (Lee y col., 2012; Prado y col., 2012). No obstante, los estudios previamente comentados se han realizado en animales deficientes en el D5R (D5RKO). La ausencia general del D5R en todas las células del organismo, puede traer consigo alteraciones que contribuyan a atenuar la inflamación, independientemente de la señalización de éste receptor en el sistema inmune. Además, considerando que los órganos linfoides primarios podrían ser estimulados por DA proveniente del sistema nervioso periférico (Mignini y col., 2003; Roggero y col., 2011; Huang y col., 2013), la ausencia de la señalización del D5R podría afectar el desarrollo y/o maduración de las células inmunes. Por lo tanto, para

descartar los fenómenos recién comentados y validar la utilización de los ratones D5RKO en el estudio de EAE, se irradiaron sub-letalmente ratones WT y se reconstituyeron con células precursoras de la médula ósea WT o D5RKO. Bajo este modelo, la mayoría (>80%, datos no mostrados) de las células presentes en la sangre correspondían al genotipo donante después de 8 semanas de reconstitución, momento en que la enfermedad fue inducida.

Los resultados del ensayo con quimeras mostraron que los ratones con el compartimento hematopoyético D5RKO, desarrollan una EAE menos severa que aquellos ratones reconstituidos con precursores WT (figura 5). Lo anterior se manifiesta cuantitativamente en el puntaje clínico que presenta cada ratón durante la enfermedad y en el máximo puntaje clínico en el *peak* de ella. Ratones con el componente hematopoyético WT presentan un puntaje promedio de 3,7 en el *peak*, comparado con el 2,8 de aquellos que tienen un componente hematopoyético D5RKO (Tabla III). Lo anterior, es concordante con el desarrollo de EAE en ratones D5RKO, pese a que éstos últimos además presentan una aparición tardía de los síntomas (Prado y col., 2012). En base a los resultados obtenidos, se puede inferir que la señalización de D5R en el compartimento hematopoyético favorece el desarrollo de una EAE más severa.

En las quimeras WT y D5RKO, además se observó un mayor puntaje clínico durante el desarrollo y en el *peak* de la EAE, en comparación al registrado en ratones WT y D5RKO. Lo anterior podría deberse a que en el SNC de los ratones irradiados y posteriormente reconstituidos se encontraron LT CD4⁺ del huésped y del donante (dato no mostrado). Es por esto, que las quimeras no son apropiadas para estudiar en específico la contribución del D5R en los LT CD4⁺, objetivo principal de éste trabajo.

Para restringir la deficiencia del D5R sólo a LT CD4⁺, linfocitos WT o D5RKO antígeno-específicos contra la vaina de mielina fueron transferidos a ratones RAG1KO y luego la EAE fue inducida. Los resultados obtenidos del diseño experimental anteriormente comentado, mostraron que los ratones RAG1KO transferidos con LT CD4⁺ encefalitogénicos, desarrollan una EAE sin fase de recuperación de los síntomas independiente del genotipo de los LT CD4⁺ transferidos (figura 6). Junto a esto, pese a que en los ratones transferidos con LT CD4⁺ D5RKO se observó un puntaje clínico máximo más bajo (3,8 vs 3,2) y una menor mortalidad, las diferencias no fueron significativas. En base a lo anterior, los resultados sugieren que el D5R expresado en LT CD4⁺ encefalitogénicos no afecta la aparición, desarrollo ni severidad en un modelo agresivo de la EAE.

El diseño experimental de la EAE en ratones RAG1KO, fue útil además para analizar la capacidad efectora y la diferenciación de los LT CD4⁺ en el Sistema Nervioso Central (SNC). La proporción y número de los fenotipos de los LT CD4⁺ infiltrados no varía significativamente entre WT y D5RKO (figura 7). Sin embargo, al analizar la relación entre la proporción de los distintos fenotipos T_H en el SNC, se observó que aquella que involucra a los T_H17 (IL-17A⁺IFN- γ ⁺ y IL-17A⁺IFN- γ ⁻) se ve afectada en los LT CD4⁺ que carecen del D5R (figura 8). Lo anterior sugiere que D5R regula la homeostasis de T_H17 en EAE, ya que en la condición D5RKO hay un aumento aparente de los T_H17 que son capaces de producir IFN- γ (T_H17 Patogénicos), el cual no es proporcional a aquellos que no pueden producir IFN- γ (T_H17 No Patogénico).

La mayor proporción de T_H17-IFN- γ ⁺ en el SNC de ratones RAG1KO transferidos con LT CD4⁺ D5RKO, podría deberse a que el D5R regula de manera negativa la diferenciación hacia éste fenotipo o que impide la conversión de éste a T_H1.

6.2- Papel de D5R en T_H17

Los LT CD4⁺ T_H17 han sido fuertemente asociados a la patogénesis involucrada en autoinmunidad, ya que es un fenotipo estable dentro de la inflamación (Ghoreschi y col., 2010). Para determinar si el D5R afecta el patrón transcripcional asociado a T_H17 No Patogénico (diferenciado en presencia de TGF-β1) o Patogénico (diferenciado en presencia de TGF-β3 y IL-23), LT CD4⁺ *naïve* (Tn) WT y D5RKO fueron purificados y diferenciados de manera específica a estos fenotipos (ver materiales y métodos, sección 4.6). Luego, el RNA de cada fenotipo de T_H17 fue obtenido y diversos genes involucrados en la biología de estos LT CD4⁺ fueron medidos por qPCR. En el caso de T_H17 Patogénicos todos los genes se transcriben en mayor nivel en el genotipo WT (figura 9A), lo que sugiere que el D5R favorecería la diferenciación o mantención (*rorc*), capacidad efectora (*il17a*, *csf2*, *grzb*, *il22*, *ifng*) y plasticidad (*runx1* y *runx3*) en esta población. Sin embargo, el porcentaje de células IL-17A⁺ en cultivos *in vitro* sugiere que el D5R no afecta la frecuencia de diferenciación hacia T_H17 Patogénico (figura 10B). Junto a esto, los resultados obtenidos sugieren que el D5R tampoco afecta el paso de T_H17 → T_H1 en respuesta a IL-12 *in vitro* (figura 11). Por consiguiente, este trabajo deja abierta la incógnita de por qué en el SNC de ratones RAG1KO transferidos con LT CD4⁺ D5RKO hay una mayor proporción aparente de T_H17-IFN-γ⁺.

Al analizar el patrón transcripcional asociado a T_H17 No Patogénico, se observa que el D5R regula diferencialmente algunos genes claves en este fenotipo. Tanto *rorc* como *il17a* se transcriben en mayor nivel en los LT CD4⁺ D5RKO (figura 9B), sin embargo, esto no implica una mayor frecuencia de diferenciación *in vitro* hacia T_H17 No Patogénico por parte de los linfocitos de éste genotipo (figura 10B). En cuanto a la implicancia biológica, se ha descrito que la población de T_H17 No Patogénica

contribuye a mantener la homeostasis en la mucosa intestinal en condiciones fisiológicas (Atarashi y col., 2008). Por consiguiente, debido al hipotético potencial en la función inmunosupresora de estas células, se evaluó la expresión de dos proteínas clásicamente asociadas a la regulación inmune (LAG3 y CTLA4) sin encontrar diferencias en el porcentaje de células que las expresan (figura 10B), ni tampoco en la densidad de éstas en la superficie celular (dato no mostrado) entre WT y D5RKO. Además, estos marcadores inmunosupresores resultaron ser inespecíficos para T_H17 No Patogénicos, puesto que también fueron detectados en T_H17 Patogénicos (figura 10A).

Para poder analizar la relevancia funcional del D5R en la población T_H17, se requieren de modelos *in vivo* particulares para cada firma de éstos. Debido a que el D5R favorece el patrón transcripcional en T_H17 Patogénico *in vitro*, un modelo para evaluar la relevancia del D5R en la capacidad efectora de éstas células sería la EAE pasiva, puesto que los T_H17 generados con IL-23 han sido extensamente asociados a este modelo experimental (Korn y col., 2009; Korn y col., 2010; Peters y col., 2011; Rothhammer y col., 2011). En base a los resultados de este trabajo, se podría suponer que una EAE pasiva inducida por LT CD4⁺ T_H17 Patogénicos WT sería más severa que una inducida por T_H17 Patogénicos D5RKO. Por contraparte, para evaluar la capacidad efectora de T_H17 No Patogénicos *in vivo*, modelos de enfermedades intestinales serían los más apropiados. Sumado a esto, sería aconsejable técnicas de secuenciación masiva para T_H17 WT y D5RKO obtenidos de los modelos *in vivo* mencionados anteriormente, para determinar si las diferencias observadas *in vitro* (en este trabajo) se mantienen en dichos contextos.

6.3- Papel del D5R en LT CD4⁺ en colitis

En las enfermedades inflamatorias intestinales la concentración de DA en la mucosa intestinal disminuye dramáticamente, tanto en humanos como en ratón (Magro y col., 2002). Para evaluar el papel del D5R en los LT CD4⁺ en éste contexto, se transfirieron LT CD4⁺ naïve (Tn) WT o D5RKO a ratones RAG1KO, de manera de inducir un modelo de colitis crónica. Sorprendentemente, ratones transferidos con Tn D5RKO no pierden masa corporal durante las semanas de ensayo, como sí lo hacen ratones transferidos con Tn WT (figura 12B).

Previamente se ha reportado que los LT CD4⁺ por medio de la secreción de citoquinas, serían los responsable de mediar la infiltración de células inmunes que propician el daño en la mucosa intestinal (Do y col., 2014). Considerando que Tn D5RKO fallan en generar un correcto desarrollo de colitis crónica, se podría suponer que el D5R en los LT CD4⁺ podría estar afectando alguna función efectora como, la función mediadora en la infiltración. Para evaluar aquello, se buscó determinar los fenotipos efectores de LT CD4⁺ infiltrantes en la lámina propia del colon (cLP) de ratones RAG1KO transferidos con Tn WT o D5RKO. Sin embargo, en aquellos intestinos de ratones con LT CD4⁺ D5RKO habían muy pocas células mononucleares (MNCs) viables (figura 12C), pese a que los ratones estaban reconstituidos eficientemente (deducido por la presencia de LT CD4⁺ en bazo, dato no mostrado).

Para descartar un sesgo en la reconstitución de ratones RAG1KO, se transfirieron Tn WT y D5RKO a un mismo animal receptor, que luego de 10-12 semanas había perdido una cantidad de masa corporal similar a aquellos ratones transferidos sólo con Tn WT (figura 12B). El análisis posterior de los LT CD4⁺ infiltrantes en la cLP de ratones con LT CD4⁺ WT y D5RKO, no mostraron mayores diferencias para T_H1 (IFN γ ⁺IL-17A⁺),

T_H17 Patogénicos (IFN γ ⁺IL-17A⁺) o T_H17 No Patogénicos (IFN γ ⁻IL-17A⁺) entre los genotipos (figura 13). Por consiguiente, estos resultados sugieren que de manera similar a lo observado en EAE, el D5R no afecta el fenotipo funcional de los LT CD4⁺ en el sitio de inflamación evaluado.

Considerando que ratones transferidos con Tn D5RKO no pierden masa corporal y presentan una infiltración de MNCs fuertemente reducida en cLP, se estudió cómo el D5R afecta la infiltración de los LT CD4⁺ en diferentes órganos y tejidos en ratones co-transferidos con Tn WT y D5RKO. De lo anterior, se observó que hay una distribución diferencial en los ratones dependiente del órgano y genotipo, ya que en bazo (figura 14A) los LT CD4⁺ D5RKO son más frecuentes que los WT (60%-40%), lo cual se revierte en la cLP (figura 14C). En los nodos linfáticos mesentéricos (MLN), en tanto, la distribución es homogénea entre los genotipos (figura 14B). Lo anterior sugiere que D5R está implicado en la migración en colitis, ya que regula negativamente la presencia de LT CD4⁺ en bazo y favorece la infiltración a cLP.

Para evaluar posibles causas que expliquen el papel del D5R en la migración de LT CD4⁺ hacia intestino, se analizó la expresión de CCR9 y α 4 β 7 puesto que han sido asignados como esenciales para el *homing* a este órgano (Iwata y col., 2004; Thomas & Baumgart, 2012; Kurmaeva y col., 2013; Kurmaeva y col., 2014). Sumado a estos, también se determinó la expresión de LFA-1, que ha sido genéricamente involucrado en la migración transendotelial (Vestweber, 2015), como también en la migración hacia MLN y colon (Koboziev y col., 2012). Como resultado, se observó que en el bazo, los LT CD4⁺ WT presentan una mayor densidad y frecuencia de expresión de α 4 β 7 y LFA-1 (figura 15). Paradójicamente, al evaluar el clásico receptor asociado a migración a intestino CCR9 (Wermers y col., 2011; Wurbel y col., 2011), se observó que éste se

expresa en mayor frecuencia y densidad en los LT CD4⁺ D5RKO. De manera análoga, también se observó una mayor frecuencia de CCR9 en los LT CD4⁺ D5RKO obtenidos de MLN de ratones con colitis (figura 16B).

Los datos anteriores sugieren que el D5R favorece la migración a intestino por parte de los LT CD4⁺ beneficiando la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y LFA-1. No obstante, la regulación que tendría D5R sobre CCR9 no es concordante con los resultados, debido a que los LT CD4⁺ D5RKO presentan una expresión exacerbada de este receptor sin favorecer la migración a cLP. En base a esto, hay antecedentes en la literatura que sugieren que no existe el marcador determinante para la migración a intestino, puesto que se ha reportado que LT CD4⁺ deficientes en CCR9 pueden infiltrar la lámina propia siempre y cuando expresen $\alpha 4\beta 7$ (Stenstad y col., 2006), apoyando el fenómeno observado en este trabajo.

Para evaluar si la diferencia en la expresión de CCR9, $\alpha 4\beta 7$ y LFA-1 entre LT CD4⁺ WT y D5RKO ocurre independientemente del contexto patológico de la colitis, la expresión de éstos y otros marcadores fue determinada por citometría de flujo en ratones sanos, no encontrando diferencias para ningún caso (figura 17). Por consiguiente, el control diferencial de D5R sobre la expresión de los marcadores de *homing* a intestino ocurriría exclusivamente en inflamación.

Para determinar si efectivamente el D5R favorece la migración *in vivo* en contexto de colitis, LT CD4⁺ colitogénicos WT y D5RKO fueron generados *ex vivo* en presencia de ácido retinoico y luego fueron transferidos en una relación 1:1 a ratones RAG1KO. Luego de 16 horas, se determinó bajo un modelo congénico la presencia de LT CD4⁺ en los mismos órganos y tejidos analizados previamente. Los resultados obtenidos sugieren que el D5R regula negativa y notablemente la migración a bazo y MLN (figura

18), además de favorecer la migración a cLP. A pesar de que al tiempo evaluado no se encontraron diferencias en la frecuencia de las poblaciones que expresan CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ en bazo y MLN, curiosamente la población minoritaria de LT CD4⁺ D5RKO que logra llegar a cLP presenta una mayor frecuencia de células CCR9⁺ (figura 19).

Para reconfirmar que la diferencia en la migración ocurre exclusivamente bajo un contexto de colitis, LT CD4⁺ WT y D5RKO se obtuvieron de bazo de ratones sanos y se evaluó la migración inducida por CCL25 *in vitro*. En función de la concentración del ligando de CCR9, no se observaron diferencias en la migración en cámaras *transwell* dentro de un mismo genotipo (figura 20). Sin embargo, a la concentración de 25 ng/mL, los LT CD4⁺ D5RKO responden en mayor número a CCL25. Lo anterior, fue totalmente inesperado, puesto que LT CD4⁺ WT y D5RKO expresan de manera similar CCR9 en bazos de ratones sanos (figura 17), lo que sugiere una mayor actividad del receptor de CCL25 en ausencia de D5R.

Los datos recolectados en el modelo de colitis sugieren que cuando ocurre un desbalance en la homeostasis intestinal y se induce el reclutamiento de LT CD4⁺ en el colon, el D5R sería importante para el movimiento linfocitario desde la periferia hacia la lámina propia. Lo anterior debido a que la expresión del D5R en los LT CD4⁺ favorece la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y LFA-1 en el bazo, permitiendo finalmente la extravasación e infiltración en el tejido intestinal. El mecanismo molecular por el cual D5R controlaría a éstos dos complejos proteicos es, sin duda, una importante proyección de éste trabajo. Considerando esto: se ha reportado que el factor de transcripción BATF regula de manera importante la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en LT CD4⁺ colitogénicos (C. Wang y col., 2013). De manera interesante, se ha reportado que BATF sería estimulado por la señalización de los DARs Tipo I (como D5R) en los T_H17 asociados al modelo de asma

agudo (Gong y col., 2013). Por lo que, tomando en conjunto éstos antecedentes, en un futuro se podría evaluar la relación D5R – BATF – α 4 β 7 en LT CD4⁺ colitogénicos.

La relación D5R-CCR9 es otra proyección importante de éste trabajo, pues supone que éstos receptores deben interactuar para mediar una apropiada migración de los LT CD4⁺ hacia intestino. Lo anterior, debido a que pese que LT CD4⁺ D5RKO expresan más CCR9 en bazo, MLN y cLP, no logran llegar en mayor proporción al sitio de inflamación. La unión física/funcional entre dos receptores de 7 segmentos de transmembrana acoplados a proteínas G, como especulativamente estaría estaría ocurriendo con D5R y CCR9, no es novedad. Previamente se ha reportado el complejo funcional D1R/D5R en riñón mediando importantes procesos para el transporte de sodio (Gildea y col., 2014). Sin embargo, establecer este tipo de relación en el sistema inmune y cumpliendo un importante papel en la migración linfocitaria cambiaría la perspectiva que se tiene acerca de la DA y la patogénesis de la colitis.

7. CONCLUSIONES

Los datos recolectados en este trabajo sugieren fuertemente que el receptor D5 de dopamina expresado en los LT CD4⁺ cumple un papel importante en los distintos cuadros de autoinmunidad evaluados.

En condiciones inflamatorias asociadas a una alta concentración de DA en el sistema nervioso central, como es el caso de la EAE, el receptor D5 de dopamina expresado en LT CD4⁺ regularía el balance entre T_H17-IFN- γ ⁺ y T_H17-IFN- γ ⁻. Sumado a esto, la señalización del D5R favorecería en los linfocitos T_H17 un patrón transcripcional asociado a características patogénicas.

En colitis, que es un cuadro inflamatorio asociado a una decrecimiento en la concentración de DA en intestino, los resultados de este trabajo sugieren que el D5R favorece la expresión de las integrinas α 4 β 7 y LFA-1 en LT CD4⁺. Con esto, el D5R expresado en LT CD4⁺ colitogénicos favorece la infiltración hacia a la lámina propia del colon y con ello la patogénesis de la enfermedad.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, K., Nguyen, K.P., Fine, S.D., Mo, J.H., Shen, C., Shenouda, S., Corr, M., Jung, S., Lee, J., Eckmann, L., y col. (2007). Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17022-17027.
2. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., y col. (2008). ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 455, 808-812.
3. Balkowiec-Iskra, E., Kurkowska-Jastrzebska, I., Joniec, I., Ciesielska, A., Czlonkowska, A., & Czlonkowski, A. (2007a). Dopamine, serotonin and noradrenaline changes in the striatum of C57BL mice following myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 and complete Freund adjuvant (CFA) administration. *Acta neurobiologiae experimentalis* 67, 379-388.
4. Balkowiec-Iskra, E., Kurkowska-Jastrzebska, I., Joniec, I., Ciesielska, A., Muszynska, A., Przybylkowski, A., Czlonkowska, A., & Czlonkowski, A. (2007b). MPTP-induced central dopamine depletion exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL mice. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 56, 311-317.
5. Baumgart, D.C., & Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641-1657.
6. Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R.R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews* 63, 182-217.
7. Beaulieu, J.M., & Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* 63, 182-217.
8. Besser, M.J., Ganor, Y., & Levite, M. (2005). Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both. *Journal of neuroimmunology* 169, 161-171.
9. Bhowmick, S., Singh, A., Flavell, R.A., Clark, R.B., O'Rourke, J., & Cone, R.E. (2009). The sympathetic nervous system modulates CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells via a TGF-beta-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 86, 1275-1283.
10. Cosentino, M., Bombelli, R., Ferrari, M., Marino, F., Rasini, E., Maestroni, G.J., Conti, A., Boveri, M., Lecchini, S., & Frigo, G. (2000). HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci* 68, 283-295.

11. Cosentino, M., Fietta, A.M., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Carcano, E., Saporiti, F., Meloni, F., Marino, F., & Lecchini, S. (2007). Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* *109*, 632-642.
12. Cosentino, M., Zaffaroni, M., Ferrari, M., Marino, F., Bombelli, R., Rasini, E., Frigo, G., Ghezzi, A., Comi, G., & Lecchini, S. (2005). Interferon-gamma and interferon-beta affect endogenous catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells: implications for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* *162*, 112-121.
13. Do, J.S., Visperas, A., Freeman, M.L., Iwakura, Y., Oukka, M., & Min, B. (2014). Collitogenic effector T cells: roles of gut-homing integrin, gut antigen specificity and gammadelta T cells. *Immunology and cell biology* *92*, 90-98.
14. Eaker, E.Y., Bixler, G.B., Dunn, A.J., Moreshead, W.V., & Mathias, J.R. (1988). Dopamine and norepinephrine in the gastrointestinal tract of mice and the effects of neurotoxins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *244*, 438-442.
15. Feng, X.Y., Li, Y., Li, L.S., Li, X.F., Zheng, L.F., Zhang, X.L., Fan, R.F., Song, J., Hong, F., Zhang, Y., *et al.* (2013). Dopamine D1 receptors mediate dopamine-induced duodenal epithelial ion transport in rats. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* *161*, 486-494.
16. Franco, R., Pacheco, R., Lluis, C., Ahern, G.P., & O'Connell, P.J. (2007). The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends in immunology* *28*, 400-407.
17. Ganor, Y., & Levite, M. (2014). The neurotransmitter glutamate and human T cells: glutamate receptors and glutamate-induced direct and potent effects on normal human T cells, cancerous human leukemia and lymphoma T cells, and autoimmune human T cells. *Journal of neural transmission*.
18. Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., *et al.* (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* *467*, 967-971.
19. Gildea, J.J., Shah, I.T., Van Sciver, R.E., Israel, J.A., Enzensperger, C., McGrath, H.E., Jose, P.A., & Felder, R.A. (2014). The cooperative roles of the dopamine receptors, D1R and D5R, on the regulation of renal sodium transport. *Kidney international* *86*, 118-126.
20. Gong, S., Li, J., Ma, L., Li, K., Zhang, L., Wang, G., Liu, Y., Ji, X., Liu, X., Chen, P., *et al.* (2013). Blockade of dopamine D1-like receptor signalling protects mice against OVA-induced acute asthma by inhibiting B-cell activating transcription factor signalling and Th17 function. *The FEBS journal* *280*, 6262-6273.
21. Gonzalez, H., Contreras, F., Prado, C., Elgueta, D., Franz, D., Bernales, S., & Pacheco, R. (2013). Dopamine receptor D3 expressed on CD4+ T cells favors neurodegeneration of dopaminergic neurons during Parkinson's disease. *Journal of immunology* *190*, 5048-5056.
22. Granlund, A., Flatberg, A., Ostvik, A.E., Drozdov, I., Gustafsson, B.I., Kidd, M., Beisvag, V., Torp, S.H., Waldum, H.L., Martinsen, T.C., *et al.* (2013). Whole genome gene expression meta-analysis of inflammatory bowel disease colon mucosa demonstrates lack of major differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *PLoS one* *8*, e56818.
23. Hollon, T.R., Bek, M.J., Lachowicz, J.E., Ariano, M.A., Mezey, E., Ramachandran, R., Wersinger, S.R., Soares-da-Silva, P., Liu, Z.F., Grinberg, A., *et al.* (2002). Mice lacking D5 dopamine receptors have increased sympathetic tone and are hypertensive. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22, 10801-10810.
24. Hornykiewicz, O. (1966). DOPAMINE (3-HYDROXYTYRAMINE) AND BRAIN FUNCTION. *Pharmacological Reviews* 18, 925-964.
 25. Huang, J., Zhu, C., Zhang, P., Zhu, Q., Liu, Y., Zhu, Z., Wang, M., Li, W., Yang, G., Dong, N., *y col.* (2013). S100+ cells: a new neuro-immune cross-talkers in lymph organs. *Scientific reports* 3, 1114.
 26. Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., & Song, S.Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21, 527-538.
 27. Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Sato, T., Matsuoka, K., Arai, K., Nakai, T., Hasegawa, A., Inoue, N., Watanabe, N., *y col.* (2005). Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *Journal of immunology* 175, 6900-6908.
 28. Kim, D.H., Sandoval, D., Reed, J.A., Matter, E.K., Tolod, E.G., Woods, S.C., & Seeley, R.J. (2008). The role of GM-CSF in adipose tissue inflammation. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295, E1038-1046.
 29. Kipnis, J., Cardon, M., Avidan, H., Lewitus, G.M., Mordechay, S., Rolls, A., Shani, Y., & Schwartz, M. (2004). Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4+CD25+ regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *J Neurosci* 24, 6133-6143.
 30. Kobozev, I., Karlsson, F., Ostanin, D.V., Gray, L., Davidson, M., Zhang, S., & Grisham, M.B. (2012). Role of LFA-1 in the activation and trafficking of T cells: implications in the induction of chronic colitis. *Inflammatory bowel diseases* 18, 2360-2370.
 31. Koch-Henriksen, N., & Sorensen, P.S. (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9, 520-532.
 32. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27, 485-517.
 33. Korn, T., Mitsdoerffer, M., & Kuchroo, V.K. (2010). Immunological basis for the development of tissue inflammation and organ-specific autoimmunity in animal models of multiple sclerosis. *Results and problems in cell differentiation* 51, 43-74.
 34. Kurmaeva, E., Boktor, M., Zhang, S., Bao, R., Berney, S., & Ostanin, D.V. (2013). Roles of T cell-associated L-selectin and beta7 integrins during induction and regulation of chronic colitis. *Inflammatory bowel diseases* 19, 2547-2559.
 35. Kurmaeva, E., Lord, J.D., Zhang, S., Bao, J.R., Kevil, C.G., Grisham, M.B., & Ostanin, D.V. (2014). T cell-associated alpha4beta7 but not alpha4beta1 integrin is required for the induction and perpetuation of chronic colitis. *Mucosal immunology* 7, 1354-1365.
 36. Lechin, F., van der Dijs, B., Lechin, A., Orozco, B., Lechin, M., Baez, S., Rada, I., Leon, G., & Acosta, E. (1994). Plasma neurotransmitters and cortisol in chronic illness: role of stress. *Journal of medicine* 25, 181-192.
 37. Ledinek, A.H., Sajko, M.C., & Rot, U. (2013). Evaluating the effects of amantadin, modafinil and acetyl-L-carnitine on fatigue in multiple sclerosis--result of a pilot randomized, blind study. *Clinical neurology and neurosurgery* 115 Suppl 1, S86-89.
 38. Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., *y col.* (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* 13, 991-999.

39. Li, P., Zheng, S.J., Jiang, C.H., Zhou, S.M., Tian, H.J., Zhang, G., & Gao, Y.Q. (2014). Th2 lymphocytes migrating to the bone marrow under high-altitude hypoxia promote erythropoiesis via activin A and interleukin-9. *Experimental hematology* 42, 804-815.
40. Logan, T.T., Villapol, S., & Symes, A.J. (2013). TGF-beta superfamily gene expression and induction of the Runx1 transcription factor in adult neurogenic regions after brain injury. *PloS one* 8, e59250.
41. Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., *et al.* (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337-341.
42. Luz-Crawford, P., Tejedor, G., Mausset-Bonnefont, A.L., Beaulieu, E., Morand, E.F., Jorgensen, C., Noel, D., & Djouad, F. (2015). Glucocorticoid-induced leucine zipper governs the therapeutic potential of mesenchymal stem cells by inducing a switch from pathogenic to regulatory Th17 cells in a mouse model of collagen-induced arthritis. *Arthritis & rheumatology* 67, 1514-1524.
43. Magro, F., Vieira-Coelho, M.A., Fraga, S., Serrao, M.P., Veloso, F.T., Ribeiro, T., & Soares-da-Silva, P. (2002). Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences* 47, 216-224.
44. McKenna, F., McLaughlin, P.J., Lewis, B.J., Sibbring, G.C., Cummerson, J.A., Bowen-Jones, D., & Moots, R.J. (2002). Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *Journal of neuroimmunology* 132, 34-40.
45. Mignini, F., Streccioni, V., & Amenta, F. (2003). Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol* 23, 1-25.
46. Millan, M.J., Newman-Tancredi, A., Quentric, Y., & Cussac, D. (2001). The "selective" dopamine D1 receptor antagonist, SCH23390, is a potent and high efficacy agonist at cloned human serotonin2C receptors. *Psychopharmacology* 156, 58-62.
47. Miyazawa, T., Matsumoto, M., Kato, S., & Takeuchi, K. (2003). Dopamine-induced protection against indomethacin-evoked intestinal lesions in rats--role of anti-intestinal motility mediated by D2 receptors. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 9, BR71-77.
48. Nakano, K., Higashi, T., Hashimoto, K., Takagi, R., Tanaka, Y., & Matsushita, S. (2008). Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochemical and biophysical research communications* 373, 286-291.
49. Nakano, K., Higashi, T., Takagi, R., Hashimoto, K., Tanaka, Y., & Matsushita, S. (2009). Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* 21, 645-654.
50. Nylander, A., & Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 122, 1180-1188.
51. Olsen, T., Rismo, R., Cui, G., Goll, R., Christiansen, I., & Florholmen, J. (2011). TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation. *Cytokine* 56, 633-640.
52. Pacheco, R., Contreras, F., & Zouali, M. (2014). The dopaminergic system in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology* 5, 117.

53. Pacheco, R., Prado, C.E., Barrientos, M.J., & Bernales, S. (2009). Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *Journal of neuroimmunology* 216, 8-19.
54. Pacheco, R., Riquelme, E., & Kalergis, A.M. (2010). Emerging evidence for the role of neurotransmitters in the modulation of T cell responses to cognate ligands. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 10, 65-83.
55. Peng, Y., Gao, X., Yang, J., Shekhar, S., Wang, S., Fan, Y., Zhao, W., & Yang, X. (2014). Interleukin-22 promotes T helper 1 (Th1)/Th17 immunity in chlamydial lung infection. *Molecular medicine* 20, 109-119.
56. Peters, A., Pitcher, L.A., Sullivan, J.M., Mitsdoerffer, M., Acton, S.E., Franz, B., Wucherpfennig, K., Turley, S., Carroll, M.C., Sobel, R.A., y col. (2011). Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity* 35, 986-996.
57. Prado, C., Contreras, F., Gonzalez, H., Diaz, P., Elgueta, D., Barrientos, M., Herrada, A.A., Lladser, A., Bernales, S., & Pacheco, R. (2012). Stimulation of dopamine receptor D5 expressed on dendritic cells potentiates Th17-mediated immunity. *Journal of immunology* 188, 3062-3070.
58. Ransohoff, R.M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 12, 623-635.
59. Roggero, E., Besedovsky, H.O., & del Rey, A. (2011). The role of the sympathetic nervous system in the thymus in health and disease. *Neuroimmunomodulation* 18, 339-349.
60. Rooks, M.G., Veiga, P., Wardwell-Scott, L.H., Tickle, T., Segata, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Beal, C., van Hylckama-Vlieg, J.E., Ballal, S.A., y col. (2014). Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *The ISME journal* 8, 1403-1417.
61. Rosas-Ballina, M., Olofsson, P.S., Ochani, M., Valdes-Ferrer, S.I., Levine, Y.A., Reardon, C., Tusche, M.W., Pavlov, V.A., Andersson, U., Chavan, S., y col. (2011). Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334, 98-101.
62. Rothhammer, V., Heink, S., Petermann, F., Srivastava, R., Claussen, M.C., Hemmer, B., & Korn, T. (2011). Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. *The Journal of experimental medicine* 208, 2465-2476.
63. Round, J.L., & Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews Immunology* 9, 313-323.
64. Saha, B., Mondal, A.C., Majumder, J., Basu, S., & Dasgupta, P.S. (2001). Physiological concentrations of dopamine inhibit the proliferation and cytotoxicity of human CD4+ and CD8+ T cells in vitro: a receptor-mediated mechanism. *Neuroimmunomodulation* 9, 23-33.
65. Saruta, M., Yu, Q.T., Fleshner, P.R., Mantel, P.Y., Schmidt-Weber, C.B., Banham, A.H., & Papadakis, K.A. (2007). Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clinical immunology* 125, 281-290.
66. Singh, B., Schwartz, J.A., Sandrock, C., Bellemore, S.M., & Nikoopour, E. (2013). Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *The Indian journal of medical research* 138, 591-594.

67. Smeltz, R.B., Wolf, N.A., & Swanborg, R.H. (1999). Inhibition of autoimmune T cell responses in the DA rat by bone marrow-derived NK cells in vitro: implications for autoimmunity. *Journal of immunology* *163*, 1390-1397.
68. Stenstad, H., Ericsson, A., Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Marsal, J., Mack, M., Picarella, D., Soler, D., Marquez, G., Briskin, M., *y col.* (2006). Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* *107*, 3447-3454.
69. Thomas, S., & Baumgart, D.C. (2012). Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* *20*, 1-18.
70. Torres-Rosas, R., Yehia, G., Pena, G., Mishra, P., del Rocio Thompson-Bonilla, M., Moreno-Eutimio, M.A., Arriaga-Pizano, L.A., Isibasi, A., & Ulloa, L. (2014). Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nature medicine* *20*, 291-295.
71. Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature reviews Immunology* *15*, 692-704.
72. Villablanca, E.J., & Mora, J.R. (2011). Competitive homing assays to study gut-tropic t cell migration. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
73. Voskuhl, R.R., & Gold, S.M. (2012). Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nat Rev Neurol* *8*, 255-263.
74. Wang, C., Thangamani, S., Kim, M., Gu, B.H., Lee, J.H., Taparowsky, E.J., & Kim, C.H. (2013). BATF is required for normal expression of gut-homing receptors by T helper cells in response to retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* *210*, 475-489.
75. Wang, Y., Godec, J., Ben-Aissa, K., Cui, K., Zhao, K., Pucsek, A.B., Lee, Y.K., Weaver, C.T., Yagi, R., & Lazarevic, V. (2014). The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon-gamma-producing T helper 17 cells. *Immunity* *40*, 355-366.
76. Wermers, J.D., McNamee, E.N., Wurbel, M.A., Jedlicka, P., & Rivera-Nieves, J. (2011). The chemokine receptor CCR9 is required for the T-cell-mediated regulation of chronic ileitis in mice. *Gastroenterology* *140*, 1526-1535 e1523.
77. Wesselmann, U., Konkol, R.J., Leo, G.L., Roerig, D.L., & Harder, D.R. (1987). Altered splenic catecholamine concentrations during experimental allergic encephalomyelitis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* *26*, 851-854.
78. Williams, J.L., Kithcart, A.P., Smith, K.M., Shawler, T., Cox, G.M., & Whitacre, C.C. (2011). Memory cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) govern the transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* *234*, 84-92.
79. Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., & Kuchroo, V.K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* *496*, 513-517.
80. Wurbel, M.A., McIntire, M.G., Dwyer, P., & Fiebiger, E. (2011). CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis. *PLoS one* *6*, e16442.
81. Xiu, F., Stanojic, M., & Jeschke, M.G. (2013). Norepinephrine inhibits macrophage migration by decreasing CCR2 expression. *PLoS one* *8*, e69167.
82. Yin, Y., Wang, G., Liang, N., Zhang, H., Liu, Z., Li, W., & Sun, F. (2013). Nuclear export factor 3 is involved in regulating the expression of TGF-beta3 in an mRNA export

- activity-independent manner in mouse Sertoli cells. *The Biochemical journal* 452, 67-78.
83. Zhang, X., Guo, H., Xu, J., Li, Y., Li, L., Zhang, X., Li, X., Fan, R., Zhang, Y., Duan, Z., *et al.* (2012). Dopamine receptor D1 mediates the inhibition of dopamine on the distal colonic motility. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 159, 407-414.