

UCH-FC
MAG-B
F 363
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE POSTGRADO

“ROL DE LAS ECTONUCLEOTIDASAS CD39 Y CD73 EN LA PLASTICIDAD DE LOS LINFOCITOS TH17”

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Dominique Pamela Fernández Quezada

Directora de Tesis:
Dra. María Rosa Bono

Co-Directora de Tesis:
Dra. Daniela Sauma

Julio 2016
Santiago – Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE POSTGRADO

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

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

Dominique Pamela Fernández Quezada

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 12 de julio de 2016.

Dr. María Rosa Bono M.
Directora de Tesis

Dra. Daniela Sauma M.
Co-directora de Tesis

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandro Roth M.
Presidente Comisión

Dr. Elías Utreras
Evaluador

Santiago de Chile, Julio de 2016.

**“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”**

T.S. Elliot.

BIOGRAFÍA



Nací un día miércoles 2 de agosto del año 1989, en la ciudad de Chillán, Chile. Desde pequeña fui muy curiosa y me interesaba saber cómo funcionaban las cosas, experimentaba con plantas y flores, me gustaba desarmar y armar objetos, muchos de los cuales arruiné por completo. Durante mi enseñanza media, en el Liceo de Niñas Marta Brunet de Chillán, participé en talleres de biología y química, los cuales me incentivaron a buscar una carrera ligada al mundo científico. Fue así que decidí estudiar Ingeniería en Biotecnología en la Universidad de Chile, en un lugar alejado de mi hogar, buscando poder aprender de los mejores científicos. Sin duda eso lo conseguí, pero además me permitió conocer a gente maravillosa. En el año 2012 me incorporé al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias, donde desarrollé mi tesis de pregrado y luego de magíster. Fue sin duda en este lugar en donde aprendí a desarrollarme como investigadora, a superar obstáculos y a no darme por vencida cuando las cosas no resultan como uno las planifica.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis tutores Daniela Sauma, María Rosa Bono y Mario Rosemblatt, por ser mis guías y mi apoyo. Gracias por la confianza depositada en mí y, sobre todo, por ser las personas que me entregaron todas las herramientas necesarias para iniciarme como investigadora. En especial quisiera agradecer a Daniela, por la paciencia, la disposición y por motivarme siempre a dar lo mejor. También agradezco a mi comisión evaluadora por los aportes que permitieron mejorar el presente trabajo.

Agradezco a mi familia por su infinito amor, cariño y comprensión. Gracias a mis padres, por apoyarme todos estos años que he estado lejos de casa. A mis hermanas y mi cuñado, por siempre darme cariño y ánimo en los momentos difíciles. A mi tía Angélica y a mi tía Pilar, por cuidarme y preocuparse de mí, por darme un hogar en Santiago y, por sobre todo, por hacerme sentir siempre como si estuviera en casa. A mis sobrinas, por darme su amor incondicional y alegría, a mis abuelitos y a todos mis tíos y tías, por todo el cariño y la preocupación.

A mis queridos biotec, por todos los buenos momentos que viví dentro y fuera de la universidad. Por todas las locuras y momentos de risa. Creo que tuve la fortuna de conocer un grupo de personas maravillosas. En especial agradezco a mí querido amigo Kessi por su apoyo, por animarme y motivarme cuando lo necesitaba.

Especialmente quisiera agradecer a mi amiga Caro, que siempre ha estado conmigo, en las buenas y en las malas, por ser mi apoyo cuando más lo necesitaba. Y por supuesto agradecer a su familia por todo el cariño y la preocupación, por hacerme sentir como una más en su casa.

Quisiera agradecer a toda la gente del laboratorio. A la Pame, Zoila y al Leito, gracias por todo el cariño y la preocupación. A mis compañeras Gabi, Yessia, Sarah, Cote y Bárbara, gracias por la ayuda, la buena onda y el cariño. Y por supuesto a mi compañero de equipo, Felipe, gracias por apoyarme y ayudarme siempre, sin ti no podría haber hecho todo este trabajo.

Agradecer también a la Dra. Victoria Guixé, del Laboratorio de Bioquímica, al Dr. Rodrigo Pacheco y a Francisco Osorio, de la Fundación Ciencia & Vida, y al Dr. Gonzalo Ureta, de Medivation, quienes nos orientaron y nos ayudaron a desarrollar algunos experimentos.

Quisiera agradecer también a las instituciones que financiaron este trabajo: CONICYT (PFB-16), FONDECYT (11121478 y 1140431) y FONDEQUIP/EQM114137.

ÍNDICE

BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURA	x
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 El Sistema Inmune.....	5
3.2 Linfocitos Th17.....	7
3.3 Señalización Purinérgica y Sistema Inmune.....	9
3.4 Función de CD39 y CD73 en Linfocitos T.....	12
3.5 Función de CD39 y CD73 en Linfocitos Th17.....	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo General	14
5.2 Objetivos Específicos.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Ratones	15
6.2 Anticuerpos.....	15
6.3 Citometría de flujo.....	16
6.4 Procesamiento de órganos linfoides secundarios y lámina propia.....	18
6.5 Obtención de linfocitos CD4+ mediante separación inmunomagnética	19
6.6 Adherir los anticuerpos α -CD3 y α -CD28 a placa.....	20

6.7 Generación <i>in vitro</i> de linfocitos Th17 _{TGF-β1} o linfocitos Th17 _{IL-23}	21
6.8 Purificación de células Th17 mediante <i>cell sorting</i>	22
6.9 PCR en tiempo real.....	23
6.10 Análisis de la hidrólisis de ATP/AMP mediante HPLC.....	24
6.11 Ensayo de sobrevida en presencia de ATP.....	25
6.12 Transferencia de linfocitos Th17 a ratones Rag ^{-/-}	26
6.13 Reactivación de linfocitos Th17 <i>in vitro</i>	26
6.14 Análisis de citoquinas por CBA	26
6.15 Análisis estadístico.....	28
7. Resultados	29
7.1 Generación <i>in vitro</i> de linfocitos Th17 _{TGF-β1} y linfocitos Th17 _{IL-23}	29
7.2 Caracterización de los linfocitos Th17 _{TGF-β1} o Th17 _{IL-23} generados <i>in vitro</i>	31
7.3 Los linfocitos Th17 _{TGF-β1} generados <i>in vitro</i> producen adenosina.....	36
7.4 Los linfocitos Th17 _{TGF-β1} son resistentes a altas concentraciones de ATP	39
7.5 Los linfocitos Th17 _{IL-23} son más patogénicos que los linfocitos Th17 _{TGF-β1}	40
7.6 La transferencia de linfocitos Th17 _{TGF-β1} y Th17 _{IL-23} induce la producción de IL-10 y citoquinas pro-inflamatorias en el intestino de ratones Rag ^{-/-}	42
7.7 Los linfocitos Th17 se transforman en células productoras de IL-10 e IFN-γ luego de ser transferidas a ratones Rag ^{-/-}	44
7.8 La inhibición de CD39 disminuye la secreción de IL-10 en los linfocitos Th17 al ser reactivados <i>in vitro</i> en presencia de ATP	45
8. Discusión.....	48
9. Resumen de Resultados	56
10. Conclusiones.....	57
11. Bibliografía	58
12. Anexo	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la diferenciación de linfocitos Th17 _{TGF-β1} o linfocitos Th17 _{IL-23}	21
Tabla 2. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la segunda ronda de diferenciación de los linfocitos Th17 _{TGF-β1} o linfocitos Th17 _{IL-23}	22
Tabla 3. Partidores utilizados en el PCR en tiempo real.	24
Tabla 4. Límite de detección del kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las células Th17 _{TGF-β1} o Th17 _{IL-23} generadas <i>in vitro</i> presentan una expresión diferencial de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.....	30
Figura 2. Expresión relativa del mRNA de factores de transcripción y citoquinas en linfocitos Th17 _{TGF-β1} y Th17 _{IL-23}	32
Figura 3. Análisis mediante citometría de flujo de los factores de transcripción RORγt, T-bet, GATA-3 y Foxp3 en las células Th17 _{TGF-β1} y Th17 _{IL-23}	33
Figura 4. Expresión de CCR6 en los linfocitos Th17 _{TGF-β1} y Th17 _{IL-23}	34
Figura 5. Producción de GM-CSF por los linfocitos Th17 _{TGF-β1} y Th17 _{IL-23}	34
Figura 6. Los linfocitos Th17 _{IL-23} secretan mayores cantidades de citoquinas proinflamatorias que los linfocitos Th17 _{TGF-β1}	36
Figura 7. Los linfocitos Th17 _{TGF-β1} hidrolizan el ATP y AMP a adenosina.	38
Figura 8. Los linfocitos Th17 _{TGF-β1} sobreviven en ambientes ricos en ATP.	40
Figura 9. Potencial inflamatorio de los linfocitos Th17 _{IL-23}	42
Figura 10. La mucosa intestinal de ratones Rag ^{-/-} inyectados con linfocitos Th17 _{TGF-β1} producen IL-10 y citoquinas proinflamatorias.....	43
Figura 11. Los linfocitos Th17 transferidos a ratones Rag ^{-/-} se transforman en células productoras de IL-10 e IFN-γ.	45
Figura 12. La inhibición de CD39 disminuye la secreción de IL-10 en los linfocitos Th17 _{TGF-β1} al ser reactivados <i>in vitro</i> en presencia de ATP.	47

LISTA DE ABREVIATURA

ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Célula presentadora de antígeno
ATP	Adenosín trifosfato
BCR	Receptor de linfocito B
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	Quimioquina con motivo C-C
CCR	Receptor de quimioquina con motivo C-C
CD	Clúster de diferenciación
CXCL	Quimioquina con motivo C-X-C
CXCR	Receptor de quimioquina con motivo C-X-C
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad

NK	Células asesinas naturales (<i>Natural Killer</i>)
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PLN	Linfonodo periférico
ROR	Receptor huérfano relacionado a RAR
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
Real Time PCR	PCR en tiempo real (<i>Real time polymerase chain reaction</i>)
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor de linfocito T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocito T " <i>helper</i> "
Tc	Linfocito T citotóxico
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tr1	Linfocito T regulador de tipo 1
Treg	Linfocito T regulador

1. RESUMEN

Los linfocitos Th17 han sido caracterizados como células inflamatorias que cumplen un rol fundamental en la respuesta contra infecciones producidas por hongos y bacterias extracelulares en las mucosas. Además, estas células están involucradas en el desarrollo de una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Sin embargo, nuevos estudios sugieren que los linfocitos Th17 son capaces de transformarse en células productoras de IL-10 durante una respuesta inmune y de esta manera limitar la inflamación. Las ectonucleotidasas CD39 y CD73, capaces de hidrolizar el ATP hacia adenosina, han sido relacionadas con propiedades inmunosupresoras. Por otra parte, se ha descrito que el ATP es capaz de inhibir la producción de IL-10, por lo que la depleción del ATP por CD39 y CD73 podría favorecer la producción de esta citoquina.

Utilizando diferentes condiciones de diferenciación *in vitro*, logramos generar linfocitos Th17_{TGF-β1} o Th17_{IL-23}, los cuales presentan altos y bajos niveles de expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, respectivamente. Se observó que los linfocitos Th17_{TGF-β1} expresan mayores niveles del factor de transcripción T-bet y secretan IL-10, mientras que los linfocitos Th17_{IL-23} secretan mayores cantidades de la citoquina inflamatoria GM-CSF. Al estudiar la funcionalidad de CD39 y CD73 en las células generadas, se observó que los linfocitos Th17_{TGF-β1} hidrolizan el ATP y AMP hasta formar adenosina, y que esto les permite sobrevivir en ambientes ricos en ATP. Por otra parte, los linfocitos Th17_{IL-23}, al no expresar ni CD39 ni CD73, no pueden hidrolizar el ATP y son susceptibles a la muerte celular inducida por ATP.

Con el fin de evaluar la patogenicidad y producción de IL-10 por las células Th17 *in vivo*, se transfirieron los linfocitos Th17_{IL-23} o Th17_{TGF-β1} a ratones inmunodeficientes Rag^{-/-} y se evaluó la pérdida de peso y el fenotipo *ex vivo* de las células transferidas. Nuestros resultados demuestran que los linfocitos Th17_{IL-23} presentan una mayor patogenicidad comparado a Th17_{TGF-β1}. Por otra parte, solo detectamos producción directa de IL-10 en la mucosa intestinal de los ratones inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1}. Finalmente, demostramos que solo los linfocitos Th17_{TGF-β1} pueden transformarse en células productoras de IL-10, tanto *in vivo* como *in vitro*. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la producción de IL-10 por los linfocitos Th17_{TGF-β1} estaría relacionada principalmente con la expresión de CD39 y la capacidad de depletar el ATP, produciendo un ambiente inmunosupresor que los hace menos patogénicos.

2. ABSTRACT

T helper 17 (Th17) lymphocytes have been widely characterized as inflammatory cells that play a key role in the response against fungus and extracellular bacteria in the epithelial mucosa. These cells are also involved in the development of a variety of autoimmune and inflammatory diseases. However, new studies suggest that Th17 cells can transdifferentiate into cells that produce anti-inflammatory IL-10 during an immune response to limit inflammation. CD39 and CD73 ectonucleotidases, able to hydrolyze ATP into adenosine, have been associated with immunosuppressive properties. Moreover, it has been described that ATP can inhibit IL-10 production, and thus ATP depletion by CD39 and CD73 could favor the production of this cytokine.

Using different *in vitro* polarizing conditions we generated Th17_{TGF- β 1} and Th17_{IL-23} lymphocytes, which express high and low levels of CD39 and CD73, respectively. We observed that Th17_{TGF- β 1} expressed high levels of the transcription factor T-bet and secrete IL-10 while Th17_{IL-23} secrete higher amounts of the inflammatory cytokine GM-CSF. By studying the functionality of CD39 and CD73 ectonucleotidases, we observed that Th17_{TGF- β 1} cells are capable of hydrolyzing ATP and AMP to form adenosine, and this allows them to survive in ATP-rich environments. On the other hand, Th17_{IL-23} cells did not express CD39 or CD73 and were unable to hydrolyze ATP rendering them susceptible to ATP-induced cell death.

To assess the pathogenicity and IL-10 production by both types of Th17 cells *in vivo*, we transferred Th17 cells into Rag^{-/-} mice and evaluated their capacity to induce

body weight loss and the *ex vivo* phenotype of transferred cells. Our results demonstrated that Th17_{IL-23} are more pathogenic than Th17_{TGF-β1} cells. Moreover, we only detected direct IL-10 production in the intestinal mucosa of mice injected with Th17_{TGF-β1} cells. Finally, we demonstrated that only Th17_{TGF-β1} transdifferentiated into IL-10 producing cells, both *in vivo* and *in vitro*. In conclusion, our results suggested that IL-10 production by Th17_{TGF-β1} cells it would be regulated by CD39 expression and the ability to deplete ATP, producing an immunosuppressive environment that restrains their pathogenic function.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El Sistema Inmune

Las principales funciones del sistema inmune consisten en controlar la homeostasis en los tejidos, ofrecer protección contra los microorganismos patógenos que invaden nuestro cuerpo y eliminar células dañadas y transformadas (Abbas y col., 2008; Visser y col., 2006). El sistema inmune está compuesto por varios tipos celulares, los cuales forman redes complejas y dinámicas que aseguran una protección contra los patógenos, mientras que simultáneamente se encargan de mantener la tolerancia contra antígenos propios (Visser y col., 2006).

El sistema inmune se clasifica en sistema inmune innato y sistema inmune adaptable, aunque estas dos ramas del sistema inmune forman un solo conjunto (Kapsenberg, 2003). El sistema inmune innato aporta la primera línea de defensa contra los microorganismos patógenos. Está constituido por barreras físicas, como la piel y las mucosas, células capaces de eliminar células alteradas como son las células NK, células con capacidad fagocítica como neutrófilos y macrófagos, y son estas mismas células las encargadas de efectuar la fase final de la respuesta inmune adaptable (Akira y col., 2006; Abbas y col., 2008). Por otra parte, el sistema inmune adaptable provee de memoria inmunológica contra infecciones (Janeway y Medzhitov, 2002) y está involucrado directa o indirectamente en la eliminación de patógenos en fases tardías de la infección (Akira y col., 2006). Por otra parte, la respuesta inmune

adaptable está involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, alergias y en el rechazo de trasplantes (Janeway y Medzhitov, 2002).

Los linfocitos T CD4+ o T *helper* (Th), tienen una participación clave en la respuesta inmune adaptable ya que promueven la producción de anticuerpos por los linfocitos B y orquestan la función de los linfocitos T CD8+ y macrófagos contra una gran variedad de microorganismos patógenos (Zhu y col., 2010). Luego de la activación por células presentadoras de antígenos profesionales (APC), los linfocitos T CD4+ se diferencian hacia células efectoras, las que se clasifican en base a la función y el patrón de citoquinas que secretan (Cosmi y col., 2014). Los linfocitos T CD4+ fueron clasificados inicialmente en dos tipos, los denominados linfocitos Th1 y Th2 (Mosmann y Coffman, 1989). Los linfocitos Th1 se caracterizan por secretar IFN- γ , TNF- α y linfotoxina, moléculas esenciales en la erradicación de patógenos intracelulares y en la respuesta antitumoral (Dong, 2006). Por otra parte, los linfocitos Th2 secretan interleuquina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13, citoquinas que tienen un rol crucial en la eliminación de patógenos extracelulares y en la producción y cambio de clase de las inmunoglobulinas (Dong, 2006).

En 1995 se describió otro tipo de linfocito T CD4+, los linfocitos T reguladores (Treg) (Sakaguchi y col., 1995). Los linfocitos Treg tienen un rol fundamental previniendo enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas, además de limitar la respuesta antitumoral (Vignali y col., 2008). Los linfocitos Treg suprimen la activación y función efectora de otras células del sistema inmune a través de mecanismos que dependen del contacto celular, la producción de TGF- β e IL-10 y la generación de

adenosina (Vignali y col., 2008; Kim, 2010). En 1997 se describió otro tipo de linfocito T CD4+ con propiedades inmunoregulatoras, los linfocitos T reguladores de tipo 1 (Tr1) (Groux y col., 1997). Estos linfocitos se caracterizan por producir IL-10 y TGF- β , lo que les permite suprimir a los linfocitos T de forma antígeno específica mediante un mecanismo dependiente de la producción de citoquinas (Roncarolo y col., 2006).

3.2 Linfocitos Th17

Por muchos años el paradigma Th1/Th2, descrito por Mosmann y Coffman (Mosmann y Coffman, 1989), ayudó a explicar la mayoría de los fenómenos relacionados con la respuesta inmune adaptable. Sin embargo, en 2005 se describió un nuevo tipo de linfocito T CD4+ caracterizado por la producción de IL-17A (IL-17), el cual se denominó linfocito Th17 (Harrington y col., 2005; Park y col., 2005).

Los linfocitos Th17, cumplen un rol fundamental en la respuesta contra infecciones producidas por hongos y bacterias extracelulares en las mucosas (tracto digestivo, vías respiratorias, piel) (Ouyang y col., 2008; Khader y col., 2009). Además de secretar IL-17, los linfocitos Th17 son capaces de secretar IL-17F, IL-21, IL-22, GM-CSF, y potencialmente TNF- α e IL-6 (Korn y col., 2009). Los linfocitos Th17 se caracterizan además por expresar el receptor de quimioquina CCR6, el cual está involucrado en la migración de los linfocitos Th17 hacia sitios inflamados (Hirota y col., 2007; Wang y col., 2009).

La diferenciación de un linfocito T CD4+ virgen hacia una célula Th17 se produce debido a la acción conjunta de dos citoquinas TGF- β e IL-6. Ambas citoquinas

son capaces de inducir la expresión del factor de transcripción maestro ROR γ t (Zhou y col., 2007), el cual se une al promotor del gen que codifica para la IL-17, induciendo su expresión (Maddur y col., 2012). La IL-6 además induce la activación del factor de transcripción STAT3 (Korn y col., 2009), el cual aumenta los niveles de expresión de ROR γ t (Maddur y col., 2012). Por otra parte, la IL-6 induce la expresión de IL-21 y del receptor de IL-23 (IL-23R) (Zhou y col., 2007). La IL-21 actúa como señal autocrina, amplificando el número de linfocitos Th17 (Miossec y col., 2009; Zhou y col., 2007). La IL-23, secretada por células presentadoras de antígenos, permite la estabilización y la diferenciación completa de los linfocitos Th17, aumentando la producción de IL-17 e induciendo la expresión de citoquinas inflamatorias (GM-CSF, IL-22), y suprimiendo la producción de IL-10 e IFN- γ (Korn y col., 2009; Miossec y col., 2009; El-Behi y col., 2011).

Debido a las características inflamatorias de los linfocitos Th17, éstos han sido estudiados en una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Por ejemplo, en psoriasis se ha detectado que en los linfocitos T aislados desde las lesiones en la piel predomina el fenotipo Th17. En artritis reumatoide y esclerosis múltiple se han detectado altos niveles de IL-17 en las heridas y suero de pacientes enfermos (Korn y col., 2009). En pacientes con lupus eritematoso sistémico se ha observado un incremento en los niveles de IL-17 como resultado de una expansión de los linfocitos Th17 (Yang y col., 2009a). En pacientes asmáticos se ha observado un aumento en el número de linfocitos Th17 en sangre periférica y un incremento en los niveles de IL-17 en pulmón, esputo y fluido bronqueoalveolar (Miossec y col., 2009). Por otra parte, pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal presentan niveles

elevados de IL-17, IL-21 e IL-22 en suero y tejidos provenientes de biopsias de colon inflamado, así como una mayor infiltración de linfocitos Th17 en las mucosas intestinales (Fujino y col., 2003).

En los últimos años se ha planteado la existencia de una variedad de linfocitos Th17, los cuales se diferenciarían en su función efectora y potencial inflamatorio (Peters y col., 2011). Linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* en presencia de TGF- β 1 e IL-6 (Th17_{TGF- β 1}) han sido caracterizados como células con un menor potencial inflamatorio, capaces de producir IL-10, la cual ha sido descrita como una citoquina con propiedades anti-inflamatorias y regulatorias (McGeachy y col., 2007; Lee y col., 2012). Por otra parte, los linfocitos Th17 diferenciados en presencia de IL-23 y en ausencia de TGF- β (Th17_{IL-23}) poseen un perfil patogénico (Ghoreschi y col., 2010; El-Behi y col., 2011), caracterizado por una mayor producción de GM-CSF (El-Behi y col., 2011; Hirota y col., 2011; Lee y col., 2012). GM-CSF es un factor de crecimiento de macrófagos y granulocitos, pero actúa principalmente como citoquina pro-inflamatoria, promoviendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-23 e IL-6, en las células presentadoras de antígeno (El-Behi y col., 2011).

3.3 Señalización Purinérgica y Sistema Inmune

Mediadores purinérgicos, como el ATP y la adenosina, pueden ser liberados al medio extracelular y actuar sobre células del sistema inmune, activando o suprimiendo la respuesta inmune. En tejidos sanos, el ATP se encuentra principalmente en el interior de las células alcanzando concentraciones del orden milimolar, mientras que el ATP extracelular se encuentra a muy bajas concentraciones, del orden nanomolar

(Burnstock, 2007). Cuando hay inflamación y daño en los tejidos el ATP es liberado al medio extracelular debido a la lisis de las células dañadas, y allí promueve el reclutamiento de células inmunes con capacidad fagocítica, lo que favorece la eliminación de las células dañadas (Elliott y col., 2009). Por otra parte, se ha reportado que los linfocitos T y neutrófilos activados liberan ATP a través de los canales Panexina 1 (Chen y col., 2006; Schenk y col., 2008), mientras que los linfocitos B liberan ATP almacenado en vesículas secretoras sensibles a calcio luego de ser estimulados a través del BCR (Schena y col., 2013).

El ATP extracelular es detectado a través receptores purinérgicos del tipo P2, los cuales se clasifican de acuerdo a su estructura molecular en receptores P2X y P2Y. Los receptores P2X corresponden a receptores ionotrópicos permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , mientras que los receptores P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Di Virgilio y col., 2001). Se ha descrito la expresión de estos receptores en células epiteliales y del sistema inmune, como por ejemplo eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B (Trautmann, 2009). En estas células, la activación de los receptores de tipo P2 por ATP extracelular puede inducir respuestas pro-inflamatorias a través de la activación del inflamasoma y la secreción de citoquinas inflamatorias, como IL-1 β , IL-8, TNF- α e IL-23 (Trautmann, 2009). Por otra parte, se ha demostrado que la activación del receptor P2X7 por altas concentraciones de ATP es capaz de inducir lisis necrótica en los linfocitos T (Aswad y col., 2005).

Por otro lado, la adenosina es un nucleósido purínico que se encuentra constitutivamente presente en el medio extracelular a bajas concentraciones (<1 μM) (Kumar, 2013), no obstante, su concentración se puede elevar considerablemente (10-

20 veces) bajo condiciones de estrés metabólico, como por ejemplo durante la inflamación y el cáncer (Kumar, 2013), por lo que su acumulación sirve como reportero de daño tisular excesivo.

La adenosina es detectada por receptores purinérgicos del tipo P1, los cuales están acoplados a proteínas G y se clasifican en 4 tipos: A1, A2A, A2B y A3. Los receptores A1 y A3 están acoplados a la subunidad Gi/o, por lo que su estimulación conlleva a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de AMP cíclico. Por otra parte, los receptores A2A y A2B están acoplados a la subunidad Gs, por lo que su estimulación aumenta los niveles de AMP cíclico (Ralevic y Burnstock, 1998; Allard y col., 2012). Se ha descrito que la estimulación de los receptores A2A y A2B en linfocitos T, células dendríticas, neutrófilos y macrófagos genera un efecto inmunosupresor e inmunomodulador (Stagg y Smyth, 2010).

La concentración extracelular de adenosina depende del balance entre la cantidad que es secretada por las células, su re-captación a través de transportadores bi-direccionales, su degradación por la enzima adenosín deaminasa (ADA) y la generación a nivel extracelular a partir de la desfosforilación de ATP por las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Sakowicz-Burkiewicz y Pawelczyk, 2011). CD39 se encarga de hidrolizar el ATP y ADP hacia AMP, mientras que CD73 hidroliza el AMP para generar adenosina (Regateiro y col., 2013). Debido a esto, CD39 y CD73 han sido consideradas enzimas claves en la generación de ambientes inmunosupresores (Beavis y col., 2012; Antonioli y col., 2013).

3.4 Función de CD39 y CD73 en Linfocitos T

Las ectonucleotidasas CD39 y CD73 se expresan en una variedad de células del sistema inmune, incluyendo monocitos, neutrófilos, células dendríticas, células mieloides supresoras, linfocitos B y en algunos tipos de linfocitos T (Airas y Jalkanen, 1996; Kansas y col., 1991; Pulte y col., 2007; Ryzhov y col., 2011). En el caso de los linfocitos Treg, se ha descrito que la expresión de estas enzimas y la consecuente producción de adenosina a partir de ATP constituye uno de los mecanismos a través del cual suprimen la respuesta inmune (Deaglio y col., 2007; Chatterjee y col., 2014).

Sin embargo, no solo se ha descrito la expresión de las ectonucleotidasas como parte de un mecanismo inmunosupresor, si no que se ha propuesto que la producción de adenosina mediada por CD73 favorecería la formación de linfocitos T de memoria. Interesantemente, la estimulación de los receptores A2A por adenosina disminuye la activación de AKT dependiente del TCR (Kim y col., 2001; Cekic y col., 2013; Flores-Santibáñez y col., 2015; Bono y col., 2015), favoreciendo la formación de linfocitos T de memoria (Macintyre y col., 2011; Crompton y col., 2015).

Por otra parte, se ha postulado que la expresión de CD39 en los linfocitos T permite disminuir los niveles de ATP por debajo de los niveles tóxicos, favoreciendo la supervivencia de estas células en ambientes ricos de ATP (Aswad y col., 2005; Borsellino y col., 2007). También, se ha descrito que la depleción del ATP extracelular por CD39 promueve la diferenciación de los linfocitos T hacia un fenotipo Tr1 (Mascanfroni y col.,

2015), esto debido a que el ATP favorece la degradación del factor de transcripción AHR, el cual promueve la producción de IL-10 (Apetoh y col., 2010).

3.5 Función de CD39 y CD73 en Linfocitos Th17

De acuerdo a las citoquinas presentes en la diferenciación de los linfocitos Th17, estas células pueden expresar o no las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Se ha descrito que los linfocitos Th17_{TGF-β1}, los cuales se diferencian en presencia de TGF-β1 e IL-6, expresan altos niveles de CD39 y CD73, mientras que los linfocitos Th17_{IL-23}, que se diferencian en presencia de IL-23, IL-6 e IL-1β, se caracterizan por expresar bajos niveles de CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012).

Se ha planteado que la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 les confiere propiedades inmunoregulatoras, debido a la producción de adenosina a partir del ATP extracelular (Chalmin y col., 2012). Sin embargo, no existen mayores antecedentes acerca de otras funciones que podrían cumplir estas ectonucleotidasas en los linfocitos Th17. Por ejemplo, a pesar que se ha descrito que las ectonucleotidasas cumplen un rol crucial en la producción de IL-10 en los linfocitos Tr1 (Mascanfroni y col., 2015), no existen referencias que relacionen la expresión de CD39 y CD73 con la producción de IL-10 en los linfocitos Th17, aun cuando se ha descrito que estas células son capaces de transformarse en células productoras de IL-10 durante el transcurso de una respuesta inflamatoria (Esplugues y col., 2011; Gagliani y col., 2015). En conjunto, estos antecedentes permiten postular la hipótesis siguiente:

4. HIPÓTESIS

La expresión de CD39 y CD73 favorece la conversión de células Th17 en células productoras de IL-10.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la contribución de CD39 y CD73 en la conversión de células Th17 a células productoras de IL-10.

5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotípicamente a los linfocitos Th17 generados *in vitro* que expresan altos y bajos niveles de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.
- Evaluar *in vitro* la funcionalidad de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17.
- Evaluar la capacidad de los linfocitos Th17 que expresan altos y bajos niveles de CD39 y CD73 de transformarse a células productoras de IL-10 durante un proceso inflamatorio.
- Evaluar el efecto de la inhibición de CD39 en la producción de IL-10 por células Th17 *in vitro*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ratones

Ratones C57BL/6 (WT), C57BL/6-II17a^{tm1Bcgen/J} (IL-17-GFP), y ratones B6.129S7-Rag1^{tm1Mom/J} (Rag1^{-/-}) fueron comprados a *The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)*. Los ratones IL-17-GFP expresan la proteína EGFP como marcador de la producción de IL-17. Todos los ratones fueron mantenidos en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida en condiciones libres de patógenos específicos. Todos los experimentos fueron supervisados y aprobados por el comité de Bioética y Bioseguridad de Fundación Ciencia y Vida y de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Para los experimentos se utilizaron ratones de 6 a 12 semanas de edad.

6.2 Anticuerpos

Los anticuerpos contra CD4 APC-eFluor780 (clon GK1.5), CD39 PE (clon 24DMS1), CD73 PE-Cy7 (clon TY/11.8), CD73 PerCP-eFluo710 (clon TY/11.8), CD16/32 (clon 93), IL-17 eFluor660 (clon eBio17B7), IFN- γ eFluor660 (clon XMG1.2), IFN- γ FITC (clon XMG1.2), IFN- γ PECy7 (clon XMG1.2), CD25 APC (clon PC61.5), Foxp3 PE-Cy7 (clon FJK-16s), T-bet PECy7 (clon eBio4B10), ROR γ t (clon AFKJS-9), GATA-3 (clon TWAJ), GM-CSF (clon MP1-22E9) se compraron a eBioscience. Los anticuerpos contra CD4 FITC (clon GK1.5CD), CD4 APC (clon GK1.5), B220 APC (clon

Ra3-6B2), CD45.1 PE-Cy7 (clon A20), CCR6 (clon 29-2L17) PE, Armenian Hamster IgG (clon HTK888) PE, IL-10 (clon JES5-16E3) APC se compraron a BioLegend.

6.3 Citometría de flujo

Para la detección de moléculas de superficie mediante citometría de flujo se incubaron las células con un anticuerpo contra CD16/CD32 (Fc Block) en medio PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C y oscuridad, con el fin de bloquear receptores Fc. Luego, se lavaron las células con PBS + 2% SFB y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes diluidos en PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C y en la oscuridad. Para descartar las células muertas se agregó, junto con los anticuerpos, un reactivo para determinar viabilidad (*Fixable Viability Dye eFluor 780*, eBiosciences; *LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Violet*, Invitrogen). Finalmente, las células se lavaron con PBS + 2% SFB, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 µL de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro de flujo.

Para analizar la expresión de citoquinas y factores de transcripción por los linfocitos Th17, éstos fueron activados antes de realizar el marcaje intracelular. Para esto se incubaron en RPMI + 10% SFB a una concentración de 2×10^6 células/mL y fueron activados en presencia de PMA 0,25 µM (Sigma), ionomicina 1 µg/mL (Sigma) y brefeldina A 1 µL/mL (GolgiPlug, BD Biosciences), durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a

4°C, se resuspendieron en PBS + 2% SFB y se realizó el marcaje extracelular de la forma descrita anteriormente. Luego las células se fijaron y permeabilizaron con BD *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit* (BD Biosciences) para el marcaje de citoquinas, o con el kit *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience) en los casos en que se marcaron factores de transcripción.

Para fijar y permeabilizar las células usando BD *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit* (BD Biosciences), las células se incubaron con 200 µL de *BD Cytofix/Cytoperm* durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 µL de *Permwash* y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos diluidos en 50 µL de *Permwash*, durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 700 µL de *Permwash* y se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 µL de PBS + 2% SFB.

Para fijar y permeabilizar las células utilizando el kit *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience), las células se incubaron con 300 µL de *Fixation/Permeabilization* (eBioscience), durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 µL de *Permeabilization Buffer* y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos diluidos en 100 µL de *Permeabilization Buffer*, durante 30 minutos a 4°C y en la oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 700 µL de *Permeabilization Buffer*, se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 µL de PBS + 2% SFB.

Las células se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences), y los datos fueron procesados con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

6.4 Procesamiento de órganos linfoides secundarios y lámina propia

Para la obtención de esplenocitos se extrajo el bazo del ratón y se recibió en una placa de Petri con 10 mL de RPMI + 10% SFB. El bazo se perfundió para obtener una suspensión celular, la cual se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Luego, se resuspendió en 2 mL buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC Lysis Buffer, eBioscience) durante 5 minutos en hielo. La lisis se detuvo agregando 8 mL RPMI + 10% SFB a las células y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 10 mL de RPMI + 10% SFB.

Para la obtención de células desde los ganglios linfáticos, éstos se extrajeron y se disgregaron mecánicamente con una tijera. Finalmente, la suspensión celular se filtró por una malla metálica de 90 µm, llevando a un volumen de 5 mL con RPMI + 10% SFB.

Para aislar linfocitos de la lámina propia, el intestino delgado se aisló de su unión con el estómago e intestino grueso, se colocó en una placa con HBSS y se eliminó el tejido conectivo. Luego se cortó el intestino en forma longitudinal y se limpió el interior con HBSS, asegurándose de que quedara libre de heces. Posteriormente se cortó en trozos de 2-3 cm y se incubó en 20 mL de RPMI + HEPES 25Mm + β-

mercaptoetanol 50 μ M + EDTA 5 mM + 0,145 mg/mL DTT, durante 20 minutos con agitación suave a 37°C. Al término de la incubación, los tubos se agitaron vigorosamente durante 10 segundos y los pedazos de intestino fueron transferidos a un nuevo tubo con 10 mL de RPMI + HEPES 25Mm + β -mercaptoetanol 50 μ M + EDTA 2 mM. Esta operación se repitió dos veces con el objetivo de eliminar los linfocitos intraepiteliales. El tejido intestinal restante se sometió a una digestión enzimática en 10 mL RPMI + HEPES 25 Mm + β -mercaptoetanol 50 μ M con 0,1 mg/mL de Liberasa (Roche) y 10 mg/mL de DNAsa I (Roche) a 37°C con agitación suave durante 45 minutos. Al terminar la digestión, el tejido se disgregó mecánicamente utilizando una malla de 100 μ m (*Cell Strainer*, BD) y se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Luego, las células se resuspendieron en 4 mL de Percoll 40%. Con una pipeta Pasteur se agregaron 2 mL de Percoll 67% bajo la suspensión celular y se centrifugó a 600 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente, usando una aceleración/desaceleración igual a 1. Se recuperó el anillo que se produce entre las dos fases, el cual contiene los linfocitos, y se traspasó a otro tubo donde se lavaron con 8 mL RPMI + 10% SFB y se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C para eliminar el Percoll existente. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 mL de RPMI + 10% SFB.

6.5 Obtención de linfocitos CD4+ mediante separación inmunomagnética

Se obtuvieron esplenocitos a partir del bazo de ratones IL-17-GFP. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 2 mL buffer de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos. Tras la lisis de glóbulos rojos, las células se lavaron con 8 mL RPMI + 10% SFB y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos

a 4°C, luego se resuspendieron en 10 mL de RPMI + 10% SFB. Para aislar los linfocitos T CD4+, los esplenocitos se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se incubaron con perlas magnéticas MACS α -CD4 (Miltenyi Biotec) (75 μ L de perlas por cada 100 x 10⁶ esplenocitos) diluídas en Verseno + 0,5% SFB, durante 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria suave. Luego de la incubación, las células se lavaron con 8 mL Verseno + 0,5 % SFB y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C, enseguida se resuspendieron en 1 mL de Verseno + 0,5% SFB. La suspensión celular se traspasó a una columna (Columna LS, Miltenyi Biotec) y se realizó la selección positiva de los linfocitos T CD4+ mediante separación inmunomagnética. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 10% de SFB, 0,5 μ g/mL de Fungizona y 0,055 mM de β -mercaptoetanol. La pureza de la preparación se verificó cada vez mediante citometría de flujo, obteniéndose siempre sobre un 85% de células CD4+.

6.6 Adherir los anticuerpos α -CD3 y α -CD28 a placa

Para adherir los anticuerpos α -CD3 y α -CD28 a placa, estas se incubaron con los anticuerpos disueltos en PBS durante 4 horas a 37 °C. En el caso de placas de 96 pozos, cada pozo se incubó con 100 μ L de la mezcla de anticuerpos, y las placas de 24 pozos se incubaron con 1mL de la mezcla de anticuerpos por pozo. Posteriormente, los pozos se lavaron dos veces con 200 μ L de PBS, en el caso de placas de 96 pozos, o con 2 mL de PBS en el caso de placas de 24 pozos.

6.7 Generación *in vitro* de linfocitos Th17_{TGF-β1} o linfocitos Th17_{IL-23}

Para generar linfocitos Th17 con alta y baja expresión de CD39 y CD73 se aislaron linfocitos T CD4⁺ mediante separación inmunomagnética a partir del bazo de ratones IL-17-GFP, los cuales se activaron de forma policlonal con anticuerpos contra CD3 y CD28 en diferentes condiciones de polarización. Para esto, se cultivaron 100.000 linfocitos T CD4⁺ por pozo en 200 μL de medio de cultivo IMDM, en placas de 96 pozos de fondo plano durante 4 días a 37°C y 5% CO₂, en presencia de un cóctel de diferentes anticuerpos y citoquinas según se muestra en la Tabla 1. Los anticuerpos α-CD3 y α-CD28 se utilizaron adheridos a la placa.

Tabla 1. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la diferenciación de linfocitos Th17_{TGF-β1} o linfocitos Th17_{IL-23}.

Th17 _{TGF-β1}	Th17 _{IL-23}
α-CD3 (2 μg/mL)	α-CD3 (2 μg/mL)
α-CD28 (2 μg/mL)	α-CD28 (2 μg/mL)
TGF-β1 (2 ng/mL)	TGF-β3 (2 ng/mL)
IL-6 (20 ng/mL)	IL-6 (20 ng/mL)
IL-1β (10 ng/mL)	IL-1β (10 ng/mL)
α-IFN-γ (5 μg/mL)	α-IFN-γ (5 μg/mL)

Luego de 4 días de cultivo se realizó una segunda ronda de diferenciación. Se recuperaron las células de los pocillos, se lavaron con PB2 + 10% SFB y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Este lavado se repitió dos veces, tras lo cual las células se resuspendieron en medio de cultivo. Se cultivaron a una densidad

de 1×10^6 linfocitos Th17 por pozo en 2 mL de medio de cultivo IMDM, en placas de 24 pozos. Las células se activaron nuevamente de forma policlonal en presencia de anticuerpos contra CD3 y CD28 (adheridos a placa en el caso de los linfocitos Th17_{TGF- β 1} o solubles en el caso de los linfocitos Th17_{IL-23}).

Los linfocitos Th17 se diferenciaron en presencia de las citoquinas y anticuerpos descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la segunda ronda de diferenciación de los linfocitos Th17_{TGF- β 1} o linfocitos Th17_{IL-23}.

Th17 _{TGF-β1}	Th17 _{IL-23}
α -CD3 (1 μ g/mL) adherido a placa	α -CD3 (1 μ g/mL) soluble
α -CD28 (1 μ g/mL) adherido a placa	α -CD28 (1 μ g/mL) soluble
IL-6 (20 ng/mL)	IL-6 (20 ng/mL)
TGF- β 1 (2 ng/mL)	IL-1 β (10 ng/mL)
	IL-23 (25 ng/mL)

Las células se incubaron durante 3 días a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se verificó el fenotipo de los linfocitos resultantes mediante citometría de flujo.

6.8 Purificación de células Th17 mediante *cell sorting*

Las células Th17 generadas *in vitro* se aislaron mediante *cell sorting* en base a la expresión de IL-17-GFP y CD4. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se incubaron con el anticuerpo fluorescente CD4 en PBS + 2% SFB, a una concentración de 100×10^6 células/mL, durante 20 minutos a 4°C y oscuridad.

Posteriormente, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en RPMI + 10% SFB para ser aisladas por el Cell Sorter FACSAria II (BD Biosciences).

6.9 PCR en tiempo real

Las células Th17 fueron aisladas mediante *cell sorting* y posteriormente fueron lisadas utilizando un buffer en base a Guanidina Tiocinato y Etanol 70% (Ω Bio-Tek). El RNA total fue obtenido utilizando *EZNA Total RNA Kit I* (Ω Bio-Tek) y posteriormente fue tratado con DNAsa utilizando el *TURBO DNA-free kit* (Invitrogen). Se cuantifico el RNA utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y 1µg de RNA fue retrotranscrito utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). La reacción de PCR en tiempo real se realizó utilizando 1 µL cDNA, 10 µL *Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix* (Agilent Technologies), 2 µL partidores y 7 µL agua, siguiendo las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 20 µL. Todas las reacciones fueron realizadas utilizando un equipo Stratagene Mx3000P. Para la cuantificación relativa de los fragmentos amplificados los resultados fueron normalizados de acuerdo a la transcripción del gen constitutivo que codifica para la enzima Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH). Las secuencias de los partidores utilizados para la cuantificación de cada transcrito medido se detallan en la Tabla 3. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Laboratorio del Dr. Rodrigo Pacheco.

Tabla 3. Partidores utilizados en el PCR en tiempo real.

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (3'-5')
<i>rorc</i>	CAGAGGAAGTCAATGTGGGA	GTGGTTGTTGGCATTGTAGG
<i>tbx21</i>	CCTGTTGTGGTCCAAGTTCAAC	CACAAACATCCTGTAATGGCTTGT
<i>il17a</i>	TTCATCTGTGTCTCTGATGCT	AACGGTTGAGGTAGTCTGAG
<i>il9</i>	CTGATGATTGTACCACACCGTGC	GCCTTTGCATCTCTGTCTTCTGG
<i>il10</i>	GAAGACAATAACTGCACCCA	CAACCCAAGTAACCCTTAAAGTC
<i>il22</i>	GACAGGTTCCAGCCCTA CAT	ATCGCCTTGATCTCTCCACT
<i>csf2</i>	ACCACCTATGCGGATTTTCA	TCATTACGCAGGCACAAAAG
<i>ifng</i>	GAGCCAGATTATCTCTTTCTACC	GTTGTTGACCTCAAACCTTGG
<i>grzb</i>	ATCAAGGATCAGCAGCCTGA	TGATGTCATTGGAGAATGTCT
<i>gapdh</i>	TCCGTGTTCTACCCCAATG	GAGTGGGAGTTGCTGTTGAAG

6.10 Análisis de la hidrólisis de ATP/AMP mediante HPLC

La actividad enzimática de CD39 y CD73 fue evaluada en base al porcentaje de hidrólisis de ATP o AMP, respectivamente, mediante HPLC. Células Th17 aisladas mediante *cell sorting* fueron resuspendidas en medio HBSS. En placas de 96 pozos de fondo plano se cultivaron 50.000 linfocitos Th17 por pozo en 200 μ L de medio HBSS. Las células se cultivaron con ATP 10 μ M (Sigma-Aldrich) en presencia o ausencia del inhibidor de CD39 ARL67156 (Sigma-Aldrich), a una concentración de 50 μ M. En otros experimentos las células se cultivaron durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂ en presencia de AMP 10 μ M (Sigma-Aldrich) con o sin el inhibidor de CD73 APCP (Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 μ M. Posteriormente se recuperaron las células y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Luego, las células se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes, los cuales se guardaron a -20°C hasta

que fueron analizados. Se utilizó el sistema HPLC Breeze (Waters) con una columna de intercambio aniónico Mono Q (GE Healthcare), facilitado por el Laboratorio de la Dra. Victoria Guixé. La fase móvil consistió en un gradiente lineal desde el buffer A (Tris-HCl 100 mM, pH 7.8) hasta el buffer B (Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, pH 7.8). La absorbancia del efluente se monitorizó a 257 nm utilizando un detector UV. La columna fue calibrada utilizando ATP, ADP, AMP y adenosina como estándar.

6.11 Ensayo de sobrevida en presencia de ATP

Células Th17 aisladas mediante *cell sorting* fueron resuspendidas en medio HBSS y cultivadas en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 100.000 células por pozo en 200 μ L de medio HBSS. Las células se cultivaron en presencia o ausencia de ATP (100, 500 ó 1000 μ M) (Sigma-Aldrich), durante 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se recuperaron las células y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 100 μ L de *Binding Buffer* (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH = 7,4) que contenía 0,5 μ L de Anexina V APC (Biolegend) y 2 μ L de yoduro de propidio (50 μ g/mL) (Sigma). Las células se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego de la incubación se agregaron 300 μ L de *Binding Buffer* y se analizó la sobrevida y muerte celular mediante citometría de flujo.

6.12 Transferencia de linfocitos Th17 a ratones Rag^{-/-}

Ratones Rag^{-/-} machos fueron inyectados por vía intravenosa con $1,3 \times 10^6$ linfocitos Th17_{TGF- β 1} o Th17_{IL-23} aislados mediante *cell sorting*. Los ratones controles fueron inyectados con PBS. El peso de los ratones fue evaluado semanalmente.

6.13 Reactivación de linfocitos Th17 *in vitro*

Linfocitos Th17_{TGF- β 1} o Th17_{IL-23} fueron aislados mediante *cell sorting* y resuspendidos en medio de cultivo IMDM. Los linfocitos Th17 se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 100.000 linfocitos Th17 por pozo en 200 μ L de medio de cultivo. Las células se reactivaron de forma policlonal con anticuerpos contra CD3 (adherido a placa) y CD28 (soluble) a una concentración de 2 μ g/mL, en presencia o ausencia de TGF- β 1 (2 ng/mL), IL-27 (20 ng/mL) e IL-21 (50 ng/mL) o con TGF- β 1 (2 ng/mL), IL-27 (20 ng/mL) e IL-21 (50 ng/mL) en presencia o ausencia de ATP 50 μ M (Sigma-Aldrich) y del inhibidor de CD39 ARL67156 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 250 μ M. Luego de 3 días se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -80°C para ser posteriormente analizados por CBA.

6.14 Análisis de citoquinas por CBA

Células Th17_{TGF- β 1} o Th17_{IL-23} se activaron con PMA 0,25 μ M (Sigma) e ionomicina 1 μ g/mL (Sigma), a una concentración de 1×10^6 células/mL en RPMI + 10% FCS, durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, se centrifugaron las células a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante.

Para analizar las citoquinas producidas en el intestino, fragmentos de intestino de 1 cm de longitud fueron incubados en 1 mL de IMDM + 10% FCS durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, se recolectó el medio y se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C, para posteriormente recolectar el sobrenadante.

Las citoquinas en los sobrenadantes se analizaron mediante el kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences), el cual detecta IL-10, IL-17, TNF- α , IL-4, IL-6, IFN- γ e IL-2. Los límites de detección de cada citoquina se especifican en la Tabla 4. La detección de GM-CSF se realizó mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Mouse GM-CSF ELISA Set, BD Biosciences).

Tabla 4. Límite de detección del kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17

Citoquina	Límite de detección (pg/mL)
IL-2	0,1
IL-4	0,03
IL-6	1,4
IFN- γ	0,5
TNF- α	0,9
IL-17	0,8
IL-10	16,8

6.15 Análisis estadístico

Los datos son presentados como el promedio \pm el error estándar. Los análisis estadísticos de la intensidad media de fluorescencia (IMF) y porcentaje de células se realizaron con el test no paramétrico de Mann-Whitney, o el test paramétrico t-Test si las muestras seguían una distribución normal, lo que se evaluó mediante el Test de Shapiro-Wilk. Para el análisis estadístico de las concentraciones de citoquinas en los intestinos se utilizó el test de Kruskal-Wallis con post test de Dunn. Para el análisis estadístico de las curvas de peso entre distintos tratamientos o sobrevida a ATP se utilizó un análisis de ANOVA de 2 vías con corrección de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). En todos los casos se considera la significancia con un valor de $p < 0,05$. (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$).

7. Resultados

7.1 Generación *in vitro* de linfocitos Th17_{TGF-β1} y linfocitos Th17_{IL-23}

Se ha demostrado que la adición de IL-6 y TGF-β1 durante la diferenciación de células Th17 induce la expresión de CD39 y CD73 en estas células (Chalmin y col., 2012). Estos autores demostraron además que el cultivo de linfocitos T CD4+ en ausencia de TGF-β1 y en presencia de IL-6, IL-1β e IL-23 induce la generación de linfocitos Th17 que no expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012). Sin embargo, en nuestras manos, el porcentaje de células Th17 que se generan en ausencia de TGF-β1 es muy bajo (alrededor de un 10%). Por otra parte, se ha descrito que TGF-β3 es capaz de inducir un perfil patogénico o inflamatorio en los linfocitos Th17, caracterizado por una mayor expresión del receptor de IL-23 (Lee y col., 2012). En este trabajo desarrollamos un protocolo para producir células Th17 con diferentes niveles de expresión de CD39 y CD73 realizando dos rondas de activación. En una primera etapa de activación, las células se diferenciaron por 4 días en presencia de TGF-β1 o TGF-β3 para generar células Th17_{TGF-β1} o Th17_{IL-23}, respectivamente. En una segunda etapa de activación, las células se mantuvieron por 3 días, en presencia de TGF-β1 e IL-6 para generar células Th17_{TGF-β1}, mientras que las células Th17_{IL-23} se obtuvieron en ausencia de TGF-β3, pero en presencia de IL-6, IL-1β e IL-23 (Ver tablas 1 y 2 de la sección de materiales y métodos).

En la Fig. 1A se muestra que ambos protocolos generan células productoras de IL-17 sin que existan diferencias significativas entre linfocitos Th17_{TGF-β1} y linfocitos

Th17_{IL-23} en la producción de IL-17 (Fig. 1B). Al analizar la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Fig. 1C) observamos que todos los linfocitos Th17_{TGF-β1} expresan CD73, y cerca de un 75% de las células expresa CD39. En el caso de los linfocitos Th17_{IL-23}, aproximadamente un 60% de las células no expresa CD39 ni CD73 y solo un 6% de las células expresa ambas moléculas. Por lo tanto, la diferenciación en presencia de TGF-β1 e IL-6 favorece la generación de linfocitos Th17 con altos niveles de expresión de CD39 y CD73, mientras que la diferenciación en presencia de IL-6, IL-1β e IL-23 favorece la generación de linfocitos Th17 con bajos niveles de expresión de CD39 y CD73.

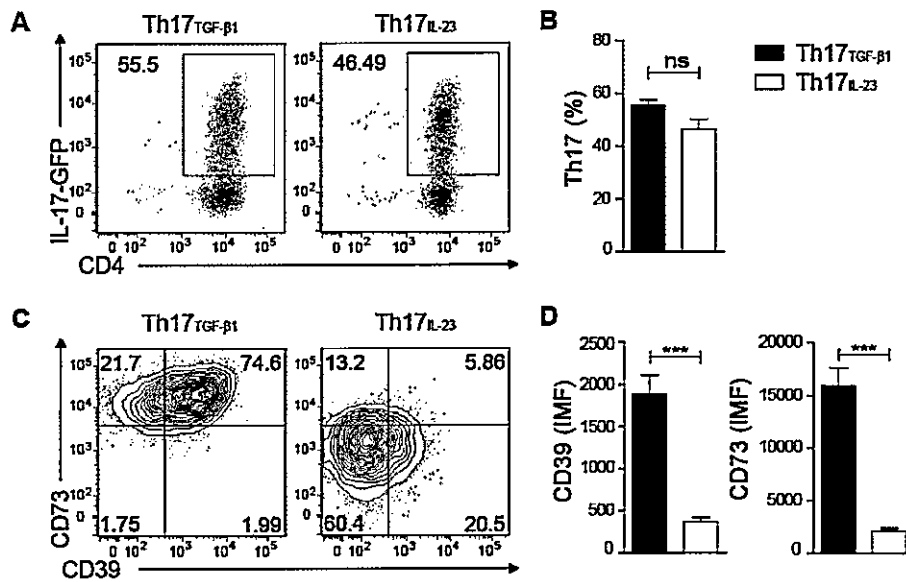


Figura 1. Las células Th17_{TGF-β1} o Th17_{IL-23} generadas *in vitro* presentan una expresión diferencial de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.

Células T CD4⁺ aisladas del bazo de un ratón IL-17-GFP se activaron por 4 días con α-CD3 y α-CD28 en presencia de TGF-β1, IL-6, IL-1β y α-IFN-γ o TGF-β3, IL-6, IL-1β y α-IFN-γ. Posteriormente, los linfocitos fueron nuevamente activados durante 3 días con α-CD3 y α-CD28 en presencia de TGF-β1 e IL-6 para generar Th17_{TGF-β1} o en presencia de IL-6, IL-1β e IL-23 para generar Th17_{IL-23}. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de IL-17-GFP en las células diferenciadas *in vitro* según los protocolos. Figura representativa de 12 experimentos independientes. (B) Porcentaje de células productoras de IL-17 (CD4⁺ IL-17-GFP⁺) generadas en cada condición de diferenciación (n=12). (C) Análisis de la expresión de CD39 y CD73 en las células Th17 (CD4⁺ IL-17-GFP⁺). Figura representativa de 7 experimentos. (D) Comparación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD39 y CD73 en las células Th17 (CD4⁺ IL-17-GFP⁺) (n=7). Los datos en B y D se muestran como la media ± SEM. ***p<0,001; t-Test.

7.2 Caracterización de los linfocitos Th17_{TGF-β1} o Th17_{IL-23} generados *in vitro*

Para esto evaluamos en los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} los niveles de expresión de genes que codifican para citoquinas y factores de transcripción, con el fin de determinar si estas poblaciones de linfocitos Th17 presentan un perfil regulador o inflamatorio. Los análisis de PCR en tiempo real (Fig. 2) demuestran que los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} expresan niveles similares de *rorc*, el gen que codifica para el factor de transcripción RORγt. Por otra parte, observamos que los linfocitos Th17_{TGF-β1} expresan mayores niveles de *tbx21*, el gen que codifica para el factor de transcripción T-bet, comparados a linfocitos Th17_{IL-23}. Respecto a las citoquinas, se observó que los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} expresan niveles similares de los genes que codifican para IL-17 e IFN-γ. Interesantemente, las células Th17_{TGF-β1} presentan una mayor expresión de los genes que codifican las citoquinas IL-10 e IL-9, mientras que los linfocitos Th17_{IL-23} expresan mayores niveles del gen que codifica para la citoquina IL-22. A pesar que no se obtuvieron diferencias significativas, se observa una clara tendencia de los linfocitos Th17_{IL-23} a expresar mayores niveles de los genes que codifican para la citoquina GM-CSF y granzima B (*csf2* y *gzmb*) sugiriendo un fenotipo inflamatorio de estos linfocitos.

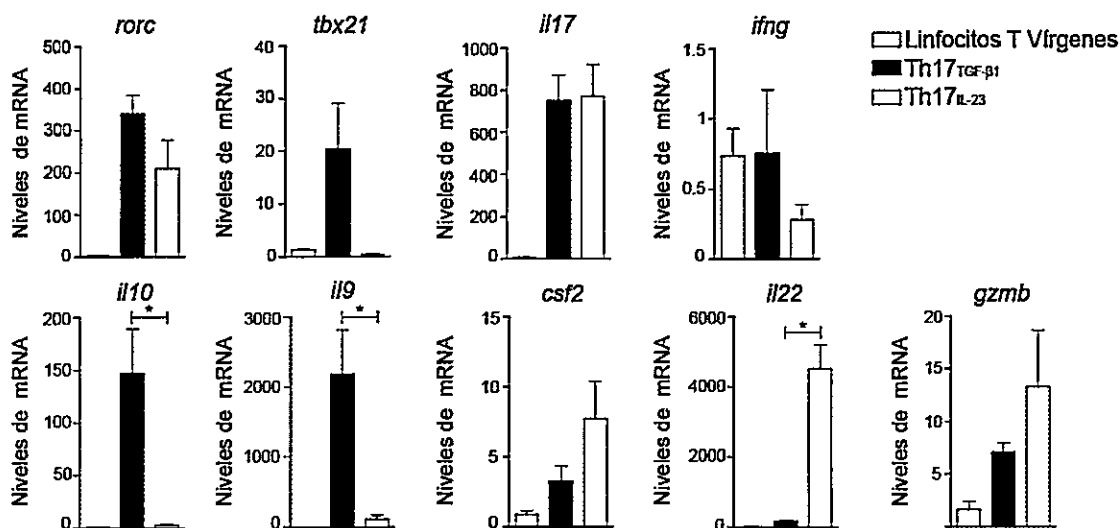


Figura 2. Expresión relativa del mRNA de factores de transcripción y citoquinas en linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}.

Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} generados *in vitro* fueron seleccionados en base a la expresión de CD4 e IL-17-GFP. Se extrajo el RNA y se cuantificaron los niveles de mRNA de factores de transcripción y citoquinas por PCR en tiempo real. Las barras indican la expresión relativa respecto a la expresión del gen constitutivo *gapdh*, normalizados respecto a la expresión en linfocitos T CD4⁺ vírgenes (n=3). Los datos se muestran como la media ± SEM. *p<0,05; t-Test.

Para confirmar los resultados obtenidos a nivel transcripcional, se estudió la expresión de diversos factores de transcripción encargados de la diferenciación de diversos linajes de linfocitos T CD4⁺ mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la Fig. 3A y 3B, los linfocitos Th17_{TGF-β1} y los linfocitos Th17_{IL-23} expresan niveles similares del factor de transcripción RORγt, descrito como el factor de transcripción maestro para la diferenciación de los linfocitos Th17 (Ivanov y col., 2006).

Interesantemente observamos que los linfocitos Th17_{TGF-β1} expresan el factor de transcripción T-bet (Fig. 3A y 3B), caracterizado como el factor de transcripción maestro encargado de la diferenciación de los linfocitos a Th1 (Szabo y col., 2000), a diferencia de los linfocitos Th17_{IL-23}. Por otra parte, no se observó expresión de los factores de transcripción GATA-3 y Foxp3 en los linfocitos Th17_{IL-23} ni Th17_{TGF-β1} (Fig

3A y 3B). GATA-3 y Foxp3 han sido descritos como los factores de transcripción maestros encargados de la diferenciación de los linfocitos Th2 y Treg, respectivamente (Zheng y Flavell, 1997; Fontenot y col., 2005).

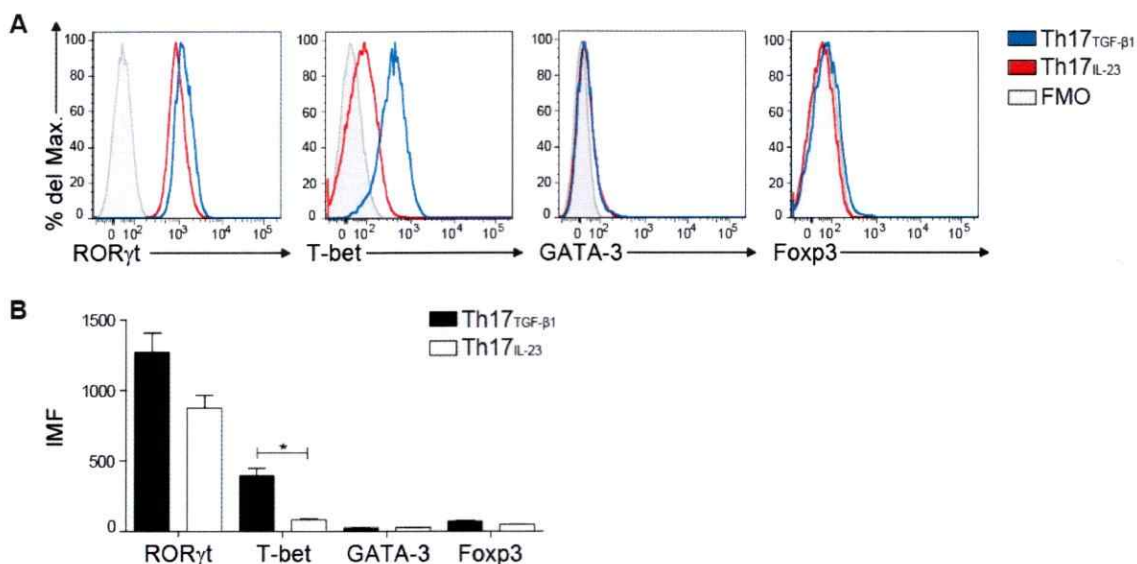


Figura 3. Análisis mediante citometría de flujo de los factores de transcripción RORγt, T-bet, GATA-3 y Foxp3 en las células Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}.

Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} generados *in vitro* se activaron durante 4 hrs en presencia PMA, ionomicina y brefeldina A, para posteriormente analizar mediante citometría de flujo la expresión intracelular de diversos factores de transcripción. (A) Histogramas de la expresión de RORγt, T-bet, GATA-3 y Foxp3 en las células Th17_{TGF-β1} (azul) y Th17_{IL-23} (rojo). El histograma gris corresponde al control negativo o FMO (fluorescence minus one). Figura representativa de 4 experimentos independientes. (B) Comparación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los factores de transcripción estudiados en las células Th17 (n=4). Los datos en B se muestran como la media ± SEM. *p<0,05; Test de Mann-Whitney.

Luego, analizamos la expresión de moléculas relacionadas con propiedades inflamatorias de los linfocitos Th17. Primero evaluamos la expresión del receptor de quimioquina CCR6, el cual está involucrado en la migración de los linfocitos Th17 hacia sitios inflamados e intestino (Hirota y col., 2007; Wang y col., 2009). La Fig. 4A muestra que, tanto los linfocitos Th17_{TGF-β1} como los linfocitos Th17_{IL-23} expresan CCR6. Sin embargo, a pesar de no obtener una diferencia estadísticamente

significativa, se observa que un mayor porcentaje de linfocitos Th17_{IL-23} comparado a Th17_{TGF-β1}, expresan CCR6 (Fig. 4B).

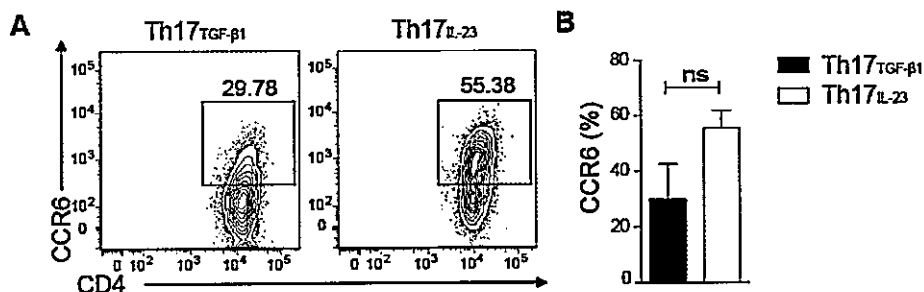


Figura 4. Expresión de CCR6 en los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}.

Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} fueron generados *in vitro* y posteriormente analizados mediante citometría de flujo. (A) Análisis de la expresión de CCR6 en los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}. Figura representativa de 6 experimentos independientes. (B) Porcentaje de células CCR6+ (CD4+ IL-17-GFP+) en cada condición de diferenciación (n=6). Los datos en B se muestran como la media ± SEM. Test de Mann-Whitney.

En segundo lugar analizamos la producción de la citoquina GM-CSF en los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}, ya que la producción de esta citoquina se ha relacionado con la capacidad inflamatoria de los linfocitos Th17 (El-Behi y col., 2011). En la Fig. 5A y 5B se muestra que un mayor porcentaje de linfocitos Th17_{IL-23} produce GM-CSF comparado a los linfocitos Th17_{TGF-β1}.

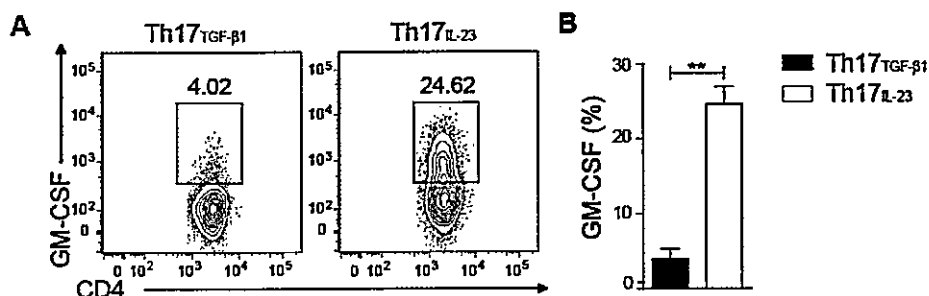


Figura 5. Producción de GM-CSF por los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}.

Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} fueron generados *in vitro* y posteriormente activados con PMA, ionomicina y brefeldina A. Determinación intracelular de GM-CSF analizado mediante citometría de flujo. (A) Análisis de la producción de GM-CSF en los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}. Figura representativa de 5 experimentos independientes. (B) Porcentaje de células GM-CSF+ (CD4+ IL-17-GFP+) en cada condición de diferenciación (n=5). Los datos en B se muestran como la media ± SEM. **p<0,01; Test de Mann-Whitney.

Luego, se determinó la secreción de citoquinas por parte de los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} luego de la activación con PMA e ionomicina por 3 horas. En la Fig. 6 se puede observar que los linfocitos Th17_{IL-23} secretan mayores cantidades de IL-17 que los Th17_{TGF-β1}, a pesar de que ambos tipos de células expresan cantidades similares del mensajero de IL-17 (Fig. 2). De forma similar a lo obtenido a nivel transcripcional (Fig.2) y de proteína (Fig.5), se observó una mayor secreción de GM-CSF por los linfocitos Th17_{IL-23}. Además, se observó que los linfocitos Th17_{IL-23} secretan mayores cantidades de IL-2 y TNF. Por otra parte, los linfocitos Th17_{TGF-β1} secretan mayores cantidades de IL-10, lo que concuerda con la mayor cantidad de mensajero de IL-10 observada en los linfocitos Th17_{TGF-β1} (Fig. 2). En relación a la producción de IFN-γ e IL-4, no se observaron diferencias entre ambos tipos de linfocitos Th17. Además, los bajos niveles de producción de IFN-γ por ambos tipos de células concuerda con los bajos niveles del mensajero para IFN-γ (Fig. 2), tanto en los linfocitos Th17_{TGF-β1} linfocitos Th17_{IL-23}.

En conjunto, estos resultados muestran que los linfocitos Th17 generados *in vitro* presentan diferentes características. Mientras que los linfocitos Th17_{TGF-β1} poseen un perfil regulatorio caracterizado por la producción de IL-10, los linfocitos Th17_{IL-23} presentan un perfil inflamatorio caracterizado por la producción de altas cantidades de GM-CSF.

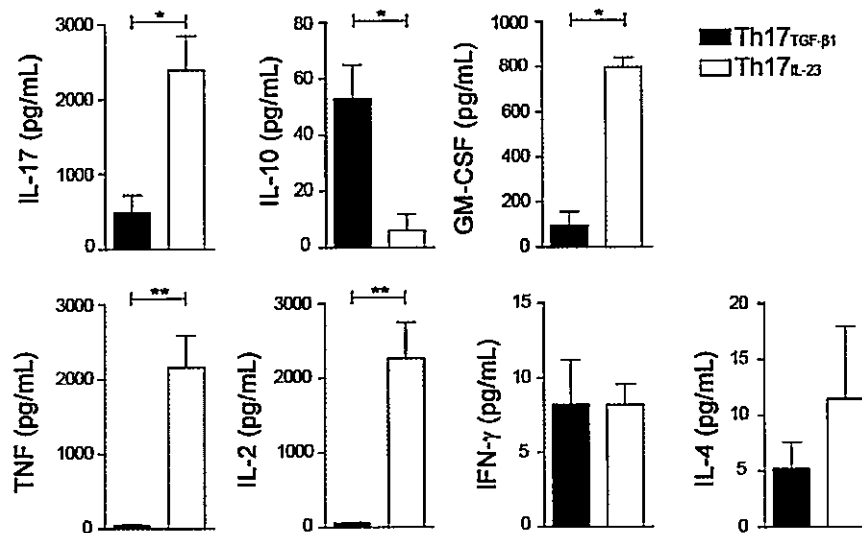


Figura 6. Los linfocitos Th17_{IL-23} secretan mayores cantidades de citoquinas proinflamatorias que los linfocitos Th17_{TGF-β1}.

Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} fueron seleccionados en base a la expresión de CD4 e IL-17-GFP. Posteriormente fueron estimuladas con PMA e ionomicina durante 3 horas. Las concentraciones de las citoquinas en los sobrenadantes fueron determinadas mediante CBA utilizando el kit Th1/Th2/Th17 y GM-CSF se determinó mediante ELISA (n=5). Los datos se muestran como la media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01; Test de Mann-Whitney.

7.3 Los linfocitos Th17_{TGF-β1} generados *in vitro* producen adenosina

La función principal de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 se relaciona con su actividad enzimática. CD39 se encarga de hidrolizar el ATP y ADP hacia AMP, mientras que CD73 hidroliza el AMP para generar adenosina (Regateiro y col., 2013). Se ha descrito que la expresión de estas enzimas en los linfocitos Treg, y la consecuente producción de adenosina a partir de ATP, constituye uno de los mecanismo por el cual estos linfocitos pueden suprimir la repuesta inmune (Deaglio y col., 2007; Chatterjee y col., 2014). Debido a esto, se analizó la actividad enzimática de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17.

Para estudiar la actividad enzimática de CD39, linfocitos Th17 seleccionados en base a la expresión de IL-17-GFP y CD4 se incubaron durante una hora en presencia de 10 μ M ATP y luego los sobrenadantes se analizaron mediante HPLC. Como se observa en la Fig.7A, en los sobrenadantes de los linfocitos Th17_{TGF- β 1} se detectó mayor presencia de ADP y AMP que en los sobrenadantes de los linfocitos Th17_{IL-23}. Cuando se utilizó el inhibidor de CD39, ARL67156, observamos una disminución en la cantidad de ADP y AMP. Al comparar el porcentaje de ATP hidrolizado, se observa que los linfocitos Th17_{TGF- β 1} hidrolizan más ATP que los linfocitos Th17_{IL-23} (50% versus 15%, en promedio), y esta cantidad disminuye a aproximadamente la mitad cuando se utiliza ARL67156 (Fig. 7B).

Posteriormente, se estudió la actividad enzimática de CD73. En este caso los linfocitos Th17 se incubaron en presencia de 10 μ M AMP durante una hora y luego los sobrenadantes se analizaron mediante HPLC. Como se observa en la Fig.7C, sólo en los sobrenadantes de los linfocitos Th17_{TGF- β 1} se detecta adenosina. En promedio los linfocitos Th17_{TGF- β 1} hidrolizan 50% de AMP mientras que los linfocitos Th17_{IL-23} solo hidrolizan alrededor de un 5% (Fig. 7D). Cuando las células se incubaron en presencia del inhibidor de CD73. APCP, observamos que la adenosina disminuye casi completamente. El conjunto de estos resultados indican que los linfocitos Th17_{TGF- β 1} pueden hidrolizar el ATP a adenosina gracias a la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.

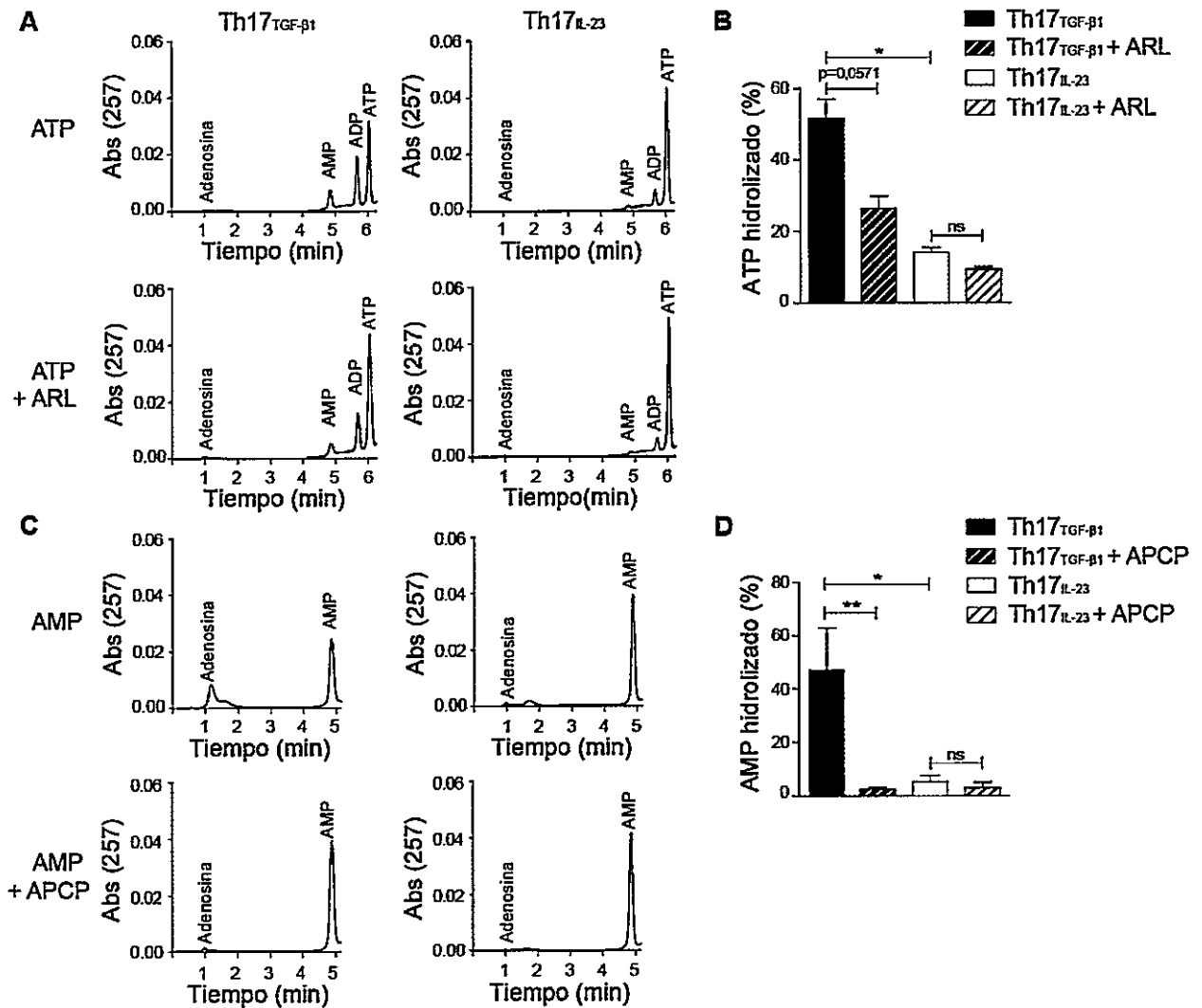


Figura 7. Los linfocitos Th17_{TGF-β1} hidrolizan el ATP y AMP a adenosina.

Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} fueron seleccionados en base a la expresión de CD4 e IL-17-GFP. Posteriormente, se incubaron durante una hora con 10 μM ATP o 10 μM AMP. Se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron mediante HPLC. (A) Cromatograma de los sobrenadante de linfocitos Th17_{TGF-β1} o Th17_{IL-23} incubados con ATP en presencia o ausencia del inhibidor de CD39 (50 μM ARL67156). (B) Porcentaje de ATP hidrolizado (n=3-4). (C) Cromatograma de los sobrenadante de linfocitos Th17_{TGF-β1} o Th17_{IL-23} incubados con AMP en presencia o ausencia del inhibidor de CD73 (50 μM APCP). (D) Porcentaje de AMP hidrolizado (n=5). Los datos en B y D se muestran como la media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01; Test de Mann-Whitney.

7.4 Los linfocitos Th17_{TGF-β1} son resistentes a altas concentraciones de ATP

Se ha descrito que la expresión de CD39 en los linfocitos T reguladores (Treg) permite disminuir los niveles de ATP por debajo de los niveles tóxicos, lo que evita la muerte inducida por ATP. Este efecto ocurriría a través de la señalización por el receptor P2X7 (Aswad y col., 2005). En base a estos antecedentes investigamos si la expresión de CD39 en los linfocitos Th17_{TGF-β1} podría otorgarles la capacidad de sobrevivir a altas concentraciones de ATP.

Para esto comparamos la sobrevivencia de linfocitos Th17_{TGF-β1} versus la de linfocitos Th17_{IL-23} tratados en forma aguda (30 minutos) con altas dosis de ATP (1000 μM). El porcentaje de células Th17_{TGF-β1} vivas, definidas como negativas para Anexina V y PI, es cercana al 100% a concentraciones crecientes de ATP mientras que el porcentaje de linfocitos Th17_{IL-23} vivos disminuye a un 70% cuando son incubados con la mayor dosis de ATP (1000 μM) (Fig. 8B). Estos resultados indican que la expresión de CD39 en los linfocitos Th17 les permite sobrevivir a altas concentraciones de ATP.

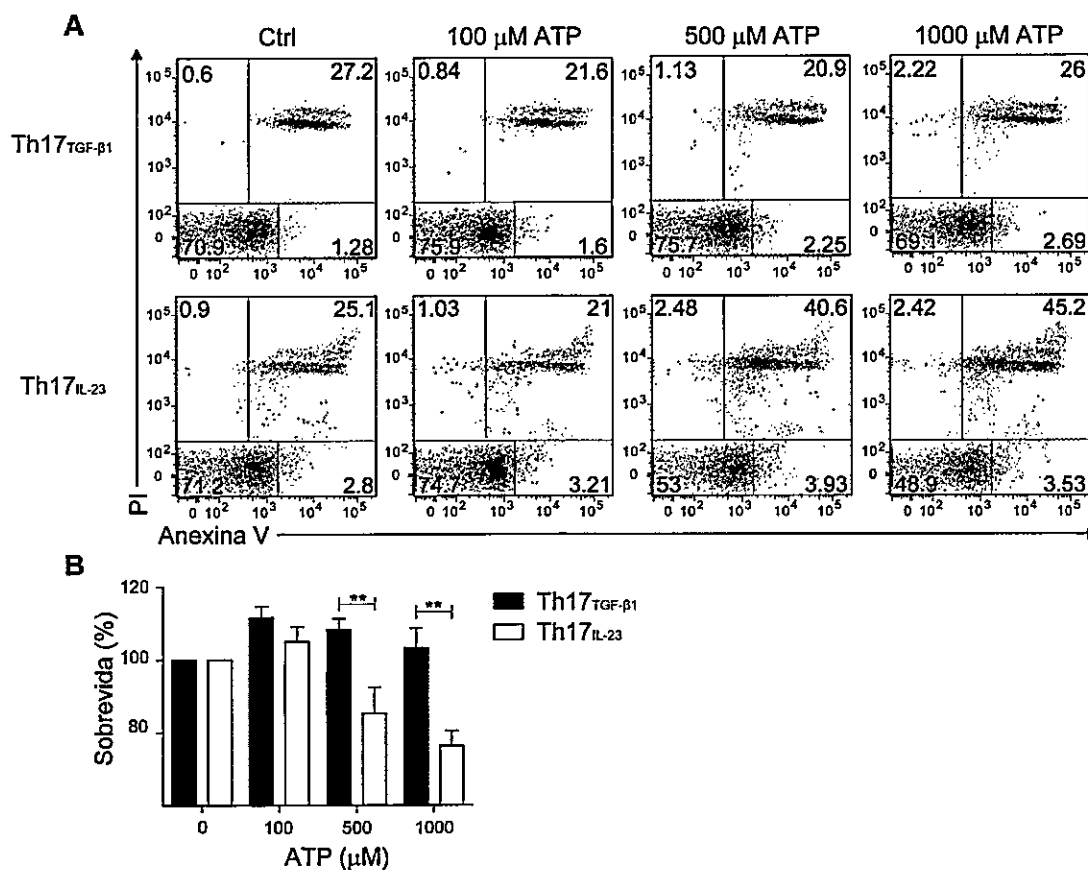


Figura 8. Los linfocitos Th17_{TGF-β1} sobreviven en ambientes ricos en ATP. Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} fueron seleccionados en base a la expresión de CD4 e IL-17-GFP. Las células se incubaron durante 30 minutos con diversas concentraciones de ATP y posteriormente se analizó la supervivencia mediante el marcaje Anexina V y PI. (A) Análisis de la expresión de Anexina V y PI en los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} incubados con ATP. Figura representativa de 3 experimentos independientes. (B) Porcentaje de células vivas (Anexina V -, PI -) respecto a la condición control (n=3) **p<0,01; Test Anova de 2 vías.

7.5 Los linfocitos Th17_{IL-23} son más patogénicos que los linfocitos Th17_{TGF-β1}

Los linfocitos Th17 han sido descrito como células altamente inflamatorias, por lo que han sido relacionados con una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Fujino y col., 2003; Korn y col., 2009; Miossec y col., 2009; Yang y col., 2009). Por lo tanto en este trabajo evaluamos el potencial inflamatorio de los linfocitos

Th17_{TGF-β1} y de los linfocitos Th17_{IL-23} en un modelo de colitis inducida en ratones inmunodeficientes (Rag^{-/-}). Los ratones Rag^{-/-} carecen de linfocitos T y linfocitos B, por lo tanto la inyección de linfocitos T produce una excesiva proliferación y secreción de citoquinas por parte de los linfocitos T transferidos, provocando una masiva inflamación en el intestino (Zenewicz y col., 2008).

Como se puede observar en la Fig.9, los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} comienzan a bajar de peso a partir de la semana 2 luego de transferidos los linfocitos, pero a partir de la semana 4 los ratones son capaces comenzar a recuperar su peso hasta alcanzar valores cercanos al 100% del peso original. Por el contrario, los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{IL-23} comienzan a bajar de peso desde la semana 3 luego de transferidos los linfocitos, lo que ocurre de forma crónica, sin que los ratones sean capaces de recuperar su peso dentro de las semanas en que se evaluó el peso (Fig 9). Esto indicaría que los linfocitos Th17_{IL-23} tienen un mayor potencial inflamatorio que los linfocitos Th17_{TGF-β1}.

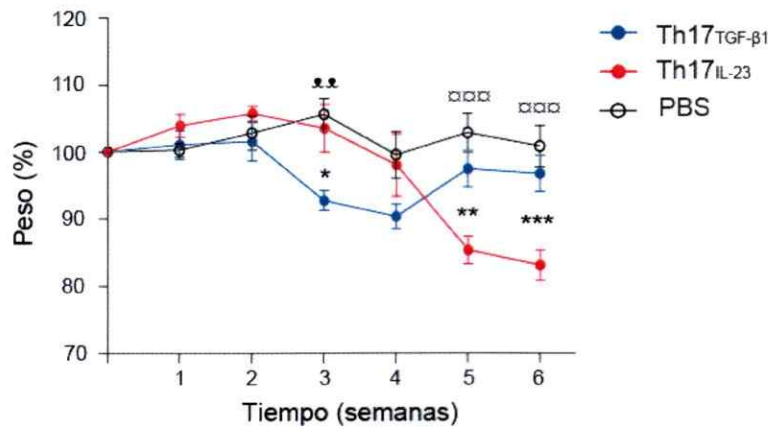


Figura 9. Potencial inflamatorio de los linfocitos Th17_{IL-23}.

Ratones Rag^{-/-} fueron inyectados con $1,3 \times 10^6$ linfocitos Th17_{TGF-β1} o linfocitos Th17_{IL-23} seleccionados en base a la expresión de CD4 e IL-17-GFP. Los ratones controles fueron inyectados con PBS. Se evaluó la pérdida de peso semanalmente (n=5-8). Los resultados se muestran como la media ± SEM. * Th17_{TGF-β1} vs Th17_{IL-23}; † PBS vs Th17_{TGF-β1}; ‡ PBS vs Th17_{IL-23}. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; Test Anova de 2 vías.

7.6 La transferencia de linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} induce la producción de IL-10 y citoquinas pro-inflamatorias en el intestino de ratones Rag^{-/-}

Con el objetivo de determinar el nivel de inflamación intestinal de los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} o linfocitos Th17_{IL-23} se analizó la producción directa de citoquinas en fragmentos de intestino delgado. Para esto se sacrificaron los ratones y se disectó el intestino, el que luego fue incubado en IMDM + 10% FCS durante 24 hrs y en este líquido se evaluaron citoquinas mediante un kit de CBA. Como se puede observar en la Fig. 10, se detectaron citoquinas en los sobrenadantes de los fragmentos de intestino de los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} o linfocitos Th17_{IL-23}, mientras que en los ratones inyectados con PBS (control) no se detectaron citoquinas. En los fragmentos de intestino de los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} como con linfocitos Th17_{IL-23} se observaron, en promedio,

niveles similares de IL-17 (Fig. 10). Respecto a las otras citoquinas analizadas, se observó que en los fragmentos de intestino de los ratones $Rag^{-/-}$ inyectados con linfocitos $Th17_{TGF-\beta 1}$ habían mayores niveles de IL-10, IFN- γ , TNF, IL-6 y GM-CSF, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Interesantemente, las mayores cantidades de IL-10 en el tejido intestinal de los ratones $Rag^{-/-}$ inyectados con linfocitos $Th17_{TGF-\beta 1}$ podría explicar la recuperación del peso del en estos ratones, esto debido a que la IL-10 ha sido descrita como una citoquina con propiedades anti-inflamatorias (Moore y col., 2001).

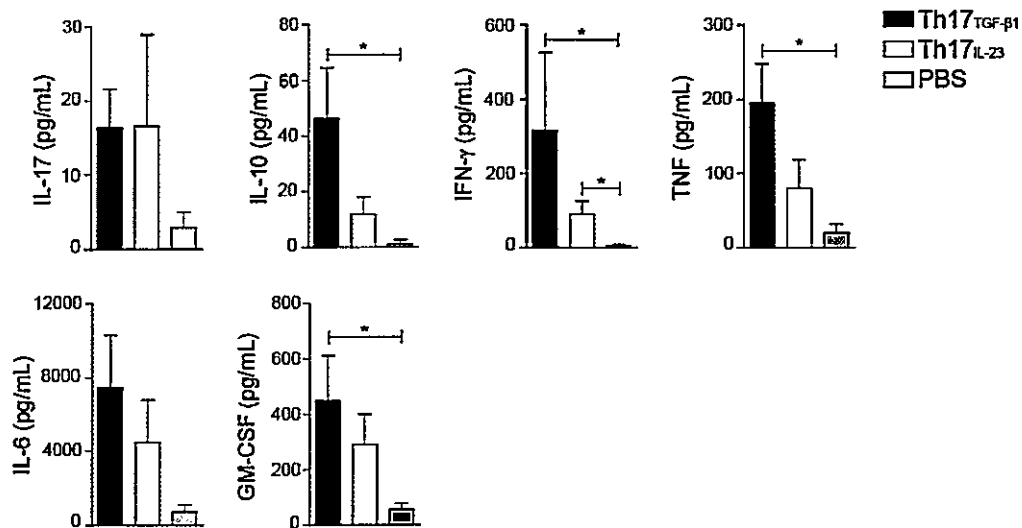


Figura 10. La mucosa intestinal de ratones $Rag^{-/-}$ inyectados con linfocitos $Th17_{TGF-\beta 1}$ producen IL-10 y citoquinas proinflamatorias.

Fragmentos de intestino de los ratones $Rag^{-/-}$ inyectados con linfocitos $Th17_{TGF-\beta 1}$ o linfocitos $Th17_{IL-23}$ fueron incubados durante 24 horas en medio IMDM + 10% FCS. La concentración de las diferentes citoquinas en los sobrenadantes fue determinada mediante CBA utilizando el kit Th1/Th2/Th17. La concentración de GM-CSF se determinó mediante ELISA (n=6). Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; Test de Kruskal-Wallis.

7.7 Los linfocitos Th17 se transforman en células productoras de IL-10 e IFN- γ luego de ser transferidas a ratones Rag^{-/-}

Se ha descrito que los linfocitos Th17 son capaces de diferenciarse hacia células productoras de IL-10 durante el transcurso de una respuesta inmune (Gagliani y col., 2015). Por otra parte, se ha descrito que los linfocitos Th17 son capaces de convertirse en células productoras de IFN- γ (Muranski y col., 2008). Debido a esto, estudiamos si los linfocitos Th17_{TGF- β 1} o los linfocitos Th17_{IL-23} pueden transformarse en el intestino en células productoras de IL-10 e IFN- γ al ser transferidos en los ratones Rag^{-/-}.

Como se observa en la Fig. 11, 42 días post transferencia sólo un pequeño porcentaje de células Th17 transferidas continúa produciendo IL-17 (8% de los Th17_{IL-23} y 6% de los Th17_{TGF- β 1}). Interesantemente, solo se ve producción de IL-10 en los linfocitos del intestino de los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF- β 1} (Fig. 11A). A pesar de que el porcentaje es bajo (1%), este resultado se correlaciona con la mayor cantidad de IL-10 detectada en los sobrenadantes de los fragmentos de intestino de los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF- β 1} (Fig. 10).

Por otra parte, se observó que la mayor parte de los linfocitos, ya sea linfocitos Th17_{TGF- β 1} como linfocitos Th17_{IL-23}, dieron origen a células productoras de IFN- γ . Alrededor de un 50% de los linfocitos del intestino de los ratones inyectados con linfocitos Th17_{TGF- β 1} producen IFN- γ , mientras que solo un 34% de los linfocitos del intestino de los ratones inyectados con linfocitos Th17_{IL-23} produce IFN- γ (Fig. 11B).

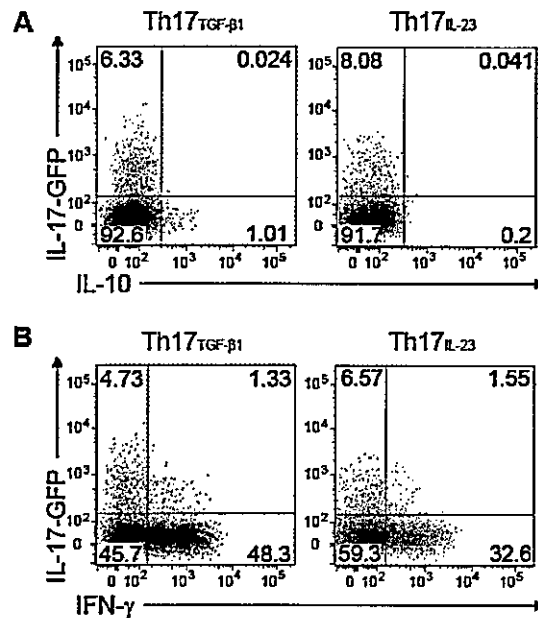


Figura 11. Los linfocitos Th17 transferidos a ratones Rag^{-/-} se transforman en células productoras de IL-10 e IFN-γ.

Ratones Rag^{-/-} fueron inyectados con $1,3 \times 10^6$ linfocitos Th17_{TGF-β1} o linfocitos Th17_{IL-23} seleccionados en base a la expresión de CD4 e IL-17-GFP. Al día 43 se procesaron los ratones y se aislaron los linfocitos de la lámina propia. (A) Análisis de la expresión de IL-17-GFP e IL-10 en las células transferidas (en una gate CD3⁺ CD4⁺). (B) Análisis de la expresión de IL-17-GFP e IFN-γ en las células transferidas (en una gate CD3⁺ CD4⁺).

7.8 La inhibición de CD39 disminuye la secreción de IL-10 en los linfocitos Th17 al ser reactivados *in vitro* en presencia de ATP

Se ha descrito que TGF-β1 sería una citoquina clave en la diferenciación de los linfocitos Th17 hacia células productoras de IL-10 (Gagliani y col., 2015). Por otra parte, se ha descrito que las citoquinas IL-27 e IL-21 inducen la producción de IL-10 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Spolski y col., 2009; Apetoh y col., 2010). Debido a esto, se decidió reactivar a los linfocitos Th17 en presencia de estas citoquinas con el fin de evaluar la producción de IL-10. En la Fig.12 se puede observar que los linfocitos Th17_{TGF-β1} secretan mayores cantidades de IL-10 que los linfocitos Th17_{IL-23} al ser

reactivados solo con α -CD3 y α -CD28. Al incubar las células con un coctel de citoquinas compuesto de TGF- β 1, IL-21 e IL-27 se observa un aumento en la cantidad de IL-10 secretada por los linfocitos Th17_{TGF- β 1}, a diferencia de lo que ocurre con los linfocitos Th17_{IL-23} (Fig. 12). Estos resultados confirman que los linfocitos Th17_{TGF- β 1} poseen un perfil más regulatorio que las células Th17_{IL-23}.

Por otra parte, se ha descrito que la depleción del ATP por CD39 favorece la producción de IL-10 en los linfocitos Tr1 (Mascanfroni y col., 2015). En esta tesis investigamos si la presencia de CD39 favorece la secreción de IL-10 en los linfocitos Th17. Por lo tanto, reactivamos los linfocitos Th17_{TGF- β 1} o Th17_{IL-23} *in vitro* con una mezcla de citoquinas (TGF- β 1, IL-27 más IL-21) que favorece la producción de IL-10, en presencia de ATP y del inhibidor de CD39. Como se puede observar en la Fig. 12, la adición del inhibidor de CD39 (ARL67156) o de ATP disminuyen levemente la cantidad de IL-10 secretada por los linfocitos Th17_{TGF- β 1}, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se inhibe CD39 en presencia de ATP disminuye de forma significativa la cantidad de IL-10 secretada por los linfocitos Th17_{TGF- β 1}, lo que confirmaría que el ATP extracelular inhibe la producción de IL-10 en los linfocitos Th17. Interesantemente, los niveles de IL-10 secretados por los linfocitos Th17_{IL-23} son muy inferiores a los producidos por los linfocitos Th17_{TGF- β 1} en todas las condiciones, lo que podría explicarse por los bajos niveles de CD39 que expresan los linfocitos Th17_{IL-23}. Estos resultados confirman que CD39 tendría un rol fundamental en la producción de IL-10 por los linfocitos Th17 en ambientes ricos en ATP.

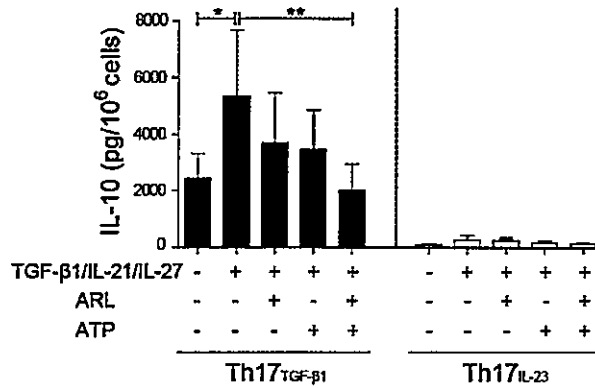


Figura 12. La inhibición de CD39 disminuye la secreción de IL-10 en los linfocitos Th17_{TGF-β1} al ser reactivados *in vitro* en presencia de ATP.

Linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23} fueron seleccionadas en base a la expresión de CD4 e IL-17-GFP. Las células se reactivaron *in vitro* con α-CD3 y α-CD28 más las citoquinas TGF-β1, IL-27 e IL-21, en presencia o ausencia de 50 μM ATP y 250 μM del inhibidor de CD39, ARL67156. Luego de 3 días se recuperó el sobrenadante y se analizó las concentraciones de IL-10 mediante CBA utilizando el kit Th1/Th2/Th17. Los datos se muestran como la media ± SEM (n=4). Test Anova de medidas repetidas.

8. Discusión

Los linfocitos Th17 han sido caracterizados como células con propiedades inflamatorias que cumplen un rol fundamental en la respuesta inmune de las mucosas contra infecciones producidas por hongos y bacterias extracelulares (Ouyang y col., 2008; Khader y col., 2009). Desde su descubrimiento se ha estudiado el rol de los linfocitos Th17 en una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y asma (Korn y col., 2009), donde se les ha asignado un rol patogénico. Sin embargo, nuevos estudios sugieren que los linfocitos Th17 son capaces de transformarse en células productoras de IL-10, limitando de esta forma la inflamación (Gagliani y col., 2015).

Se ha descrito que dependiendo de las citoquinas utilizadas al momento de la diferenciación *in vitro* de los linfocitos Th17, estos presentan diferente expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012). La hidrólisis de ATP extracelular por CD39 y CD73 (Regateiro y col., 2013) permite la generación de adenosina, una molécula con propiedades inmunosupresoras (Huang y col., 1997). Recientemente se describió que la expresión de CD39 es importante para la producción de IL-10 por los linfocitos Tr1 (Mascanfroni y col., 2015). Por otra parte se ha demostrado que la depleción del ATP extracelular por CD39 favorece la expresión del factor de transcripción AHR, el cual induce la producción de IL-10 (Apetoh y col., 2010). Estos antecedentes nos llevaron a plantear que las ectonucleotidasas CD39 y CD73 podrían tener un rol importantes en la transformación de los linfocitos Th17 a células productoras de IL-10.

Para determinar si la expresión de las ectonucleotidasas se relaciona con la capacidad de producir IL-10, en este trabajo utilizamos diferentes cocteles de citoquinas y generamos dos tipos de linfocitos Th17: linfocitos con una alta expresión de CD39 y CD73, que llamamos linfocitos Th17_{TGF-β1}, y linfocitos con baja expresión de CD39 y CD73, que llamamos linfocitos Th17_{IL-23}. Ambos protocolos generan el mismo porcentaje de células productoras de IL-17. Analizamos en ambos tipos de linfocitos Th17 la expresión de ROR γ t, factor de transcripción maestro característico de este linaje (Ivanov y col., 2006), y ambas poblaciones celulares expresan niveles similares de este factor de transcripción.

Para confirmar el linaje de los linfocitos Th17 analizamos por citometría de flujo y PCR en tiempo real la expresión de factores de transcripción maestros para otros linajes de linfocitos T. Estos análisis demostraron que los linfocitos Th17_{TGF-β1} expresan el factor de transcripción T-bet que es el factor de transcripción maestro de la diferenciación de los linfocitos Th1 (Szabo y col., 2000). Esto concuerda con resultados de la literatura que demuestran que los linfocitos Th17 pueden expresar T-bet al ser diferenciados en presencia de bajas dosis de TGF-β1, o al ser diferenciados con TGF-β1 e IL-6 y re-estimulados en presencia de bajas dosis de TGF-β1 (Yang y col., 2009b). Por otra parte, ni los linfocitos Th17_{IL-23} ni los linfocitos Th17_{TGF-β1} expresan GATA-3, el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th2 (Zheng y Flavell, 1997), ni Foxp3, el factor de transcripción maestro de los linfocitos Treg (Fontenot y col., 2005).

Los linfocitos Th17 se caracterizan principalmente por secretar IL-17, sin embargo, esta no es la única citoquina que producen. Se ha descrito que los linfocitos

Th17 son capaces de secretar IL-17F, IL-21, IL-22, GM-CSF, y potencialmente TNF- α e IL-6 (Korn y col., 2009). Evaluamos la producción de IL-17 de los linfocitos Th17_{TGF- β 1} y los linfocitos Th17_{IL-23} y encontramos que los linfocitos Th17_{IL-23} producen mayores cantidades de IL-17 que los linfocitos Th17_{TGF- β 1}, aun cuando en ambos casos las células se purificaron por la expresión de IL-17-GFP. Cabe destacar que ambos tipos de linfocitos Th17 expresan los mismos niveles del RNA mensajero para IL-17, sugiriendo que la producción de IL-17 necesita modificaciones postranscripcionales que no ocurren en los linfocitos Th17_{TGF- β 1} o que el mensajero para IL-17 podría estar siendo degradado. Interesantemente observamos que los linfocitos Th17_{TGF- β 1} secretan IL-10 mientras que los linfocitos Th17_{IL-23} no producen esta citoquina. Además, los linfocitos Th17_{TGF- β 1} expresan mayores niveles del RNA mensajero de IL-10 e IL-9 que los linfocitos Th17_{IL-23}. Estos resultados concuerdan con datos de la literatura que muestran que los linfocitos Th17 diferenciados en presencia de TGF- β 1 e IL-6 producen IL-10 e IL-9 (McGeachy y col., 2007; Lee y col., 2009; Elyaman y col., 2009) y aumentan la expresión de genes involucrados en la producción de IL-10 (Lee y col., 2012), mientras que la presencia de IL-23 inhibe la producción de IL-9 (Elyaman y col., 2009), lo que explicaría por qué los linfocitos Th17_{IL-23} no producen IL-9. Por otra parte, los linfocitos Th17_{IL-23} producen GM-CSF, lo que se relaciona directamente con la presencia de la IL-23 y del TGF- β 3 en la generación de estas células, ya que se ha descrito que el TGF- β 3 es capaz de inducir la expresión del receptor de IL-23 (Lee y col., 2012) y, a su vez, la IL-23 es capaz de inducir la expresión de GM-CSF (El-Behi y col., 2011). Los linfocitos Th17_{IL-23} producen además TNF e IL-2, citoquinas que han sido relacionadas con un fenotipo inflamatorio (Esplugues y col., 2011). También se observó que los linfocitos Th17_{IL-23} expresan mayores niveles del RNA mensajero de IL-22. Esta citoquina se induce en presencia de IL-23 e IL-6 y su expresión se inhibe en

presencia de TGF- β 1 (Zheng y col., 2007; Lee y col., 2009), lo que explicaría por qué solo los linfocitos Th17_{IL-23} producen esta citoquina.

La expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Treg y la consecuente producción de adenosina han sido descritos como uno de los mecanismos de supresión de la respuesta inmune utilizado por estas células (Deaglio y col., 2007). Sin embargo, en un trabajo anterior nosotros demostramos que los linfocitos Th17_{TGF- β 1} y los linfocitos Th17_{IL-23} no suprimen la proliferación de linfocitos T efectores en ensayos *in vitro* (Fernández, 2015). Por otra parte, la expresión de CD39 no solo se ha relacionado con la producción de adenosina, si no que sería importante para la supervivencia de los linfocitos en ambientes inflamados ricos en ATP. Se ha descrito que concentraciones de ATP extracelular en el rango milimolar inducen la formación de un macroporo que produce la muerte de las células (Junger, 2011). En los linfocitos Treg CD39 permite disminuir los niveles de ATP por debajo de los niveles tóxicos, lo que evita la muerte inducida por ATP a través de la señalización por el receptor P2X7 (Aswad y col., 2005). Mediante un ensayo *in vitro* demostramos que los linfocitos Th17_{TGF- β 1}, los cuales expresan CD39, son capaces de sobrevivir a altas dosis de ATP (1000 μ M). Por el contrario, dosis de ATP superiores a 100 μ M inducen necrosis en los linfocitos Th17_{IL-23}. El conjunto de estos resultados indica que la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th17_{TGF- β 1} favorece la supervivencia de estas células en un ambiente inflamatorio.

Por otra parte, se ha descrito que la depleción del ATP extracelular por CD39 favorece la producción de IL-10 en linfocitos Tr1 (Mascanfroni y col., 2015). Además, se ha demostrado que los linfocitos Th17 pueden diferenciarse a células productoras

de IL-10 durante el transcurso de una respuesta inmune (Gagliani y col., 2015). Estas evidencias nos llevaron a preguntarnos si existe una relación entre la expresión de CD39 y la producción de IL-10 en los linfocitos Th17_{TGF-β1}. Para responder a esta pregunta utilizamos el modelo de colitis inducida por la transferencia de linfocitos T en ratones inmunodeficientes (Rag^{-/-}). Los ratones Rag^{-/-} carecen de linfocitos T y B, por lo tanto la inyección de linfocitos T produce excesiva proliferación de linfocitos T y gran producción de citoquinas debido a la ausencia de linfocitos Treg. lo que provoca una masiva inflamación en el intestino (Zenewicz y col., 2008). En los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} se observó una menor pérdida de peso que en los ratones inyectados con linfocitos Th17_{IL-23}, lo que indica que los linfocitos Th17_{IL-23} son más patogénicos que los linfocitos Th17_{TGF-β1}. Estos resultados confirman datos de la literatura donde linfocitos Th17 diferenciados en presencia de IL-23 inducen colitis de forma más severa que los linfocitos Th17 diferenciados en ausencia de IL-23 (Lee y col., 2009). Estos autores sugieren que la IL-23 tiene un efecto pro-inflamatorio potente debido a que induce la producción de IL-17A, la cual tiene una mayor afinidad por el receptor de IL-17 (IL-17RA) que la IL-17F (Lee y col., 2009).

Para estudiar en nivel de inflamación en el intestino de los ratones Rag^{-/-} inyectados con los linfocitos Th17, se analizaron las citoquinas producidas directamente en la mucosa intestinal. Tanto en los ratones inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} como linfocitos Th17_{IL-23} se observaron niveles similares de IL-17. Interesantemente, se observaron mayores niveles de IL-10 en los intestinos de los ratones inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1}, lo que podría explicar la menor pérdida de peso en estos ratones. La IL-10 ha sido descrita como una citoquina que tiene un rol crítico limitando las respuestas inflamatorias (Moore y col., 2001). Sin embargo, pese a

que se observó que los linfocitos Th17_{TGF-β1} secretan IL-10, no podemos asegurar que la IL-10 producida en la mucosa intestinal de los ratones Rag^{-/-} provenga de los linfocitos Th17 transferidos, ya que se ha descrito que la IL-10 puede ser secretada por otras células, como por ejemplo macrófagos (Moore y col., 2001). Es por esto que se rastrearon las células Th17 transferidas y se observó su fenotipo. Se observó que, después de 43 días, entre un 6-8% de los linfocitos T en el intestino producían IL-17. Esto concuerda con otros trabajos en los que se ha demostrado que los linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* rápidamente pierden la expresión de IL-17 luego de ser transferidos a ratones inmunodeficientes (Nurieva y col., 2009). Interesantemente, solo se observó expresión de IL-10 en los linfocitos T provenientes del intestino de los ratones inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1}. El bajo porcentaje de células productoras de IL-10 se puede deber a la temporalidad de estos experimentos ya que el peak de producción de IL-10 podría estar en el momento en que los ratones bajan más de peso y no cuando ya se ha resuelto la inflamación, que es el día en que se analizaron los ratones.

Estos resultados nos llevaron a estudiar si los linfocitos Th17 generados *in vitro* producen IL-10 al ser reactivados, tratando de emular el experimento de transferencia adoptiva realizado en los ratones Rag^{-/-}. Luego de estimular a los linfocitos Th17 observamos que los linfocitos Th17_{TGF-β1} producen mayores cantidades de IL-10 que los linfocitos Th17_{IL-23}. Cuando estimulamos los linfocitos Th17_{TGF-β1} y los linfocitos Th17_{IL-23} en presencia de TGF-β1, IL-27 e IL-21, citoquinas que favorecen la producción de IL-10 (Spolski y col., 2009; Apetoh y col., 2010; Gagliani y col., 2015), observamos que los linfocitos Th17_{TGF-β1} secretan mayores cantidades de IL-10 que los linfocitos Th17_{IL-23}. Ya que se ha demostrado que la expresión de CD39, promueve la

expresión de IL-10 a través de la depleción del ATP (Apetoh y col., 2010; Mascanfroni y col., 2015), investigamos el papel de CD39 en la producción de IL-10 por los linfocitos Th17_{TGF-β1} y Th17_{IL-23}. Para esto realizamos la estimulación *in vitro* de los linfocitos Th17 en presencia ATP y del inhibidor de CD39. Solo se observó una disminución significativa en los niveles de IL-10 secretados por los linfocitos Th17_{TGF-β1} cuando se incubaron con ATP en presencia del inhibidor de CD39. Estos resultados concuerdan con datos de la literatura, que demuestran que la presencia de CD39 y la consecuente depleción del ATP extracelular favorecen la producción de IL-10 en los linfocitos T (Mascanfroni y col., 2015).

Finalmente, estudiamos si los linfocitos Th17 se convierten en células productoras de IFN-γ al ser transferidas a ratones linfopénicos, tal como ha sido descrito en la literatura (Nurieva y col., 2009). Estos resultados son muy relevantes ya que se ha demostrado que los linfocitos Th17 son más colitogénicos que los linfocitos Th1 al ser transferidos en ratones Rag^{-/-} (Feng y col., 2011). Efectivamente 43 días después de la transferencia adoptiva de Th17_{TGF-β1} o Th17_{IL-23}, un gran porcentaje de los linfocitos T presentes en el intestino delgado producen IFN-γ. Sin embargo, en los ratones inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} se produjo una mayor conversión a linfocitos T productores de IFN-γ que en los ratones inyectados con linfocitos Th17_{IL-23}. Esto sugiere que los linfocitos Th17_{TGF-β1} son menos colitogénicos que los linfocitos Th17_{IL-23} debido a un mayor potencial para transformarse a células productoras de IFN-γ.

En resumen, estos resultados indican que las ectonucleotidasas CD39 y CD73 cumplen un rol fundamental en la plasticidad de los linfocitos Th17. La hidrólisis del ATP extracelular mediada por CD39 y CD73 favorecería la adquisición de un fenotipo anti-inflamatorio productor de IL-10 en los linfocitos Th17.

9. Resumen de Resultados

Los resultados más importantes de esta tesis son:

- Generamos *in vitro* linfocitos Th17 que difieren en la expresión de CD39 y CD73 (alta o baja expresión de CD39 y CD73).
- Los linfocitos Th17_{TGF-β1}, que expresan altos niveles de CD39 y CD73, pueden hidrolizar ATP a adenosina y esto les permitiría a los linfocitos sobrevivir en ambientes ricos en ATP.
- Los linfocitos Th17_{TGF-β1} son células con un perfil inmunosupresor debido a que secretan IL-10 e inducen colitis de forma leve.
- Los linfocitos Th17_{IL-23} son células altamente patogénicas que se caracterizan por secretar GM-CSF e inducir una colitis crónica.
- La mucosa intestinal de los ratones Rag^{-/-} inyectados con linfocitos Th17_{TGF-β1} produce mayores niveles de IL-10 que la de los ratones inyectados con linfocitos Th17_{IL-23}.
- Los linfocitos Th17_{TGF-β1} producen IL-10 e IFN-γ *in vivo* y al ser estimulados *in vitro* con TGF-β1, IL-27 e IL-21 producen notablemente mayores cantidades de IL-10 comparados a linfocitos Th17_{IL-23}.
- La inhibición de CD39 en los linfocitos Th17_{TGF-β1} disminuye la producción de IL-10 al ser estimulados *in vitro* con TGF-β1, IL-27 e IL-21 en presencia de ATP.

10. Conclusiones

En este trabajo demostramos que las células Th17 generadas con TGF- β 1 expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73, gracias a lo cual hidrolizan el ATP extracelular y sobreviven en ambientes inflamados ricos en ATP. A su vez la hidrólisis de ATP produce adenosina y favorece la generación de un ambiente inmunosupresor que disminuye la inflamación. Interesantemente, la adición de TGF- β 1 durante la diferenciación de los linfocitos Th17 favorece la transdiferenciación hacia células productoras de IFN- γ e IL-10. Por lo tanto es posible sugerir que la hidrólisis del ATP podría contribuir en el proceso de plasticidad de los linfocitos Th17.

11. Bibliografía

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai. 2008. Propiedades Generales de las Respuestas Inmunitarias. *En Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier, Barcelona, España. 3–18.
- Airas, L., and S. Jalkanen. 1996. CD73 Mediates Adhesion of B Cells to Follicular Dendritic Cells. *Blood*. 88:1755–1764.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783–801.
- Allard, B., M. Turcotte, and J. Stagg. 2012. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:485156.
- Antonoli, L., P. Pacher, E.S. Vizi, and G. Haskó. 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* 19:355–67.
- Apetoh, L., F.J. Quintana, C. Pot, N. Joller, S. Xiao, D. Kumar, E.J. Burns, D.H. Sherr, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 11:854–861.
- Aswad, F., H. Kawamura, and G. Dennert. 2005. High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J. Immunol.* 175:3075–3083.
- Beavis, P. a, J. Stagg, P.K. Darcy, and M.J. Smyth. 2012. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 33:231–7.
- Bono, M.R., D. Fernández, F. Flores-Santibáñez, M. Roseblatt, and D. Sauma. 2015. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 589:3454–3460.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Höpner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rötzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110:1225–32.
- Burnstock, G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87:659–797.
- Cekic, C., D. Sag, Y.-J. Day, and J. Linden. 2013. Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance. *J. Exp. Med.* 210:2693–706.

Chalmin, F., G. Mignot, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Végran, A. Hichami, S. Ladoire, V. Derangère, J. Vincent, D. Masson, S.C. Robson, G. Eberl, J.R. Pallandre, C. Borg, B. Ryffel, L. Apetoh, C. Rébé, and F. Ghiringhelli. 2012. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*. 36:362–73.

Chatterjee, S., K. Thyagarajan, P. Kesarwani, J.H. Song, M. Soloshchenko, J. Fu, S.R. Bailey, C. Vasu, a. S. Kraft, C.M. Paulos, X.-Z. Yu, and S. Mehrotra. 2014. Reducing CD73 Expression by IL1 -Programmed Th17 Cells Improves Immunotherapeutic Control of Tumors. *Cancer Res*. 74:6048–6059.

Chen, Y., R. Corriden, Y. Inoue, L. Yip, N. Hashiguchi, A. Zinkernagel, V. Nizet, P.A. Insel, and W.G. Junger. 2006. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science (80-.)*. 314:1792–1795.

Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarlasci, F. Liotta, and F. Annunziato. 2014. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry. A*. 85:36–42.

Crompton, J.G., M. Sukumar, R. Roychoudhuri, D. Clever, A. Gros, R.L. Eil, E. Tran, K.-i. Hanada, Z. Yu, D.C. Palmer, S.P. Kerkar, R.D. Michalek, T. Upham, A. Leonardi, N. Acquavella, E. Wang, F.M. Marincola, L. Gattinoni, P. Muranski, M.S. Sundrud, C. a. Klebanoff, S. a. Rosenberg, D.T. Fearon, and N.P. Restifo. 2015. Akt Inhibition Enhances Expansion of Potent Tumor-Specific Lymphocytes with Memory Cell Characteristics. *Cancer Res*. 75:296–305.

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

Dong, C. 2006. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat. Rev. Immunol*. 6:329–33.

El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G.-X. Zhang, B.N. Dittel, and A. Rostami. 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol*. 12:568–75.

Elliott, M.R., F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, and K.S. Ravichandran. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 461:282–286.

Elyaman, W., E.M. Bradshaw, C. Uyttenhove, V. Dardalhon, A. Awasthi, J. Imitola, E. Bettelli, M. Oukka, J. van Snick, J.-C. Renauld, V.K. Kuchroo, and S.J. Khoury. 2009. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 106:12885–90.

Esplugues, E., S. Huber, N. Gagliani, A.E. Hauser, T. Town, Y.Y. Wan, W. O'Connor,

A. Rongvaux, N. Van Rooijen, A.M. Haberman, Y. Iwakura, V.K. Kuchroo, J.K. Kolls, J. a Bluestone, K.C. Herold, and R. a Flavell. 2011. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. 475:514–8.

Feng, T., H. Qin, L. Wang, E.N. Benveniste, C.O. Elson, and Y. Cong. 2011. Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J. Immunol*. 186:6313–6318.

Fernández. D. 2015. Función de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17. Seminario de Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.

Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity*. 22:329–341.

Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and F. Y. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 52:65–71.

Gagliani, N., M.C.A. Vesely, A. Iseppon, L. Brockmann, H. Xu, N.W. Palm, M.R. de Zoete, P. Licona-Limón, R.S. Paiva, T. Ching, C. Weaver, X. Zi, X. Pan, R. Fan, L.X. Garmire, M.J. Cotton, Y. Drier, B. Bernstein, J. Geginat, B. Stockinger, E. Esplugues, S. Huber, and R. a Flavell. 2015. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 523:221–225.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X.-P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H.L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.-W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid, D.J. Cua, W. Chen, and J.J. O'Shea. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*. 467:967–71.

Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. Vries, and M.-G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 389:737–742.

Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol*. 6:1123–32.

Hirota, K., J.H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D.J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A.J. Potocnik, and B. Stockinger. 2011. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol*. 12:255–263.

Hirota, K., H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in

rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* 204:2803–2812.

Huang, S., S. Apasov, M. Koshiba, and M. Sitkovsky. 1997. Role of A2a Extracellular Adenosine Receptor-Mediated Signaling in Adenosine-Mediated Inhibition of T-Cell Activation and Expansion. *Blood.* 90:1600–1610.

Ivanov, I.I., B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell.* 126:1121–33.

Janeway, C. a, and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197–216.

Junger, W.G. 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11:201–12.

Kansas, G.S., G.S. Wood, and T.F. Tedder. 1991. Expression , Distribution , and Biochemistry of Human CD39: Role in Activation-Associated Homotypic Adhesion of Lymphocytes. *J. Immunol.* 146:2235–2244.

Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3:984–93.

Khader, S. a, S.L. Gaffen, and J.K. Kolls. 2009. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2:403–11.

Kim, J.M. 2010. Molecular mechanisms of regulatory T cell development and suppressive function. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 92:279–314.

Kim, S., K. Jee, D. Kim, H. Koh, and J. Chung. 2001. Cyclic AMP Inhibits Akt Activity by Blocking the Membrane Localization of PDK1. *J. Biol. Chem.* 276:12864–12870.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:485–517.

Kumar, V. 2013. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal.* 9:145–65.

Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F.J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. a Hafler, R. a Sobel, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* 13:991–9.

Lee, Y.K., H. Turner, C.L. Maynard, J.R. Oliver, D. Chen, C.O. Elson, and C.T. Weaver. 2009. Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. *Immunity.* 30:92–107.

Macintyre, A.N., D. Finlay, G. Preston, L. V. Sinclair, C.M. Waugh, P. Tamas, C. Feijoo,

K. Okkenhaug, and D. a. Cantrell. 2011. Protein Kinase B Controls Transcriptional Programs that Direct Cytotoxic T Cell Fate but Is Dispensable for T Cell Metabolism. *Immunity*. 34:224–236.

Maddur, M.S., P. Miossec, S. V Kaveri, and J. Bayry. 2012. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am. J. Pathol.* 181:8–18.

Mascanfroni, I.D., M.C. Takenaka, A. Yeste, B. Patel, Y. Wu, J.E. Kenison, S. Siddiqui, A.S. Basso, L.E. Otterbein, D.M. Pardoll, F. Pan, A. Priel, C.B. Clish, S.C. Robson, and F.J. Quintana. 2015. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat. Med.* 21:638–46.

McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D.J. Cua. 2007. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* 8:1390–7.

Miossec, P., T. Korn, and V.K. Kuchroo. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361:888–98.

Moore, K.W., R.D.W. Malefyt, R.L. Coffman, and A.O. Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19:683–765.

Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. Th1 and Th2 cells: Different Patterns of Lymphokine Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145–173.

Muranski, P., A. Boni, P. a Antony, L. Cassard, K.R. Irvine, A. Kaiser, C.M. Paulos, D.C. Palmer, C.E. Touloukian, K. Ptak, L. Gattinoni, C. Wrzesinski, C.S. Hinrichs, K.W. Kerstann, L. Feigenbaum, C.-C. Chan, and N.P. Restifo. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 112:362–73.

Nurieva, R., X.O. Yang, Y. Chung, and C. Dong. 2009. Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts. *J. Immunol.* 182:2565–8.

Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 28:454–67.

Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133–41.

Peters, A., Y. Lee, and V.K. Kuchroo. 2011. The many faces of Th17 cells. *Curr. Opin. Immunol.* 23:702–6.

Pulte, E.D., M.J. Broekman, K.E. Olson, J.H.F. Drosopoulos, J.R. Kizer, N. Islam, and A.J. Marcus. 2007. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes.

Thromb. Res. 121:309–17.

Ralevic, V., and G. Burnstock. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50:413–492.

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

Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 212:28–50.

Ryzhov, S., S. V Novitskiy, A.E. Goldstein, A. Biktasova, M.R. Blackburn, I. Biaggioni, M.M. Dikov, and I. Feoktistov. 2011. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *J. Immunol.* 187:6120–9.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor α -Chains (CD25). *J. Immunol.* 155:1151–1164.

Sakowicz-Burkiewicz, M., and T. Pawelczyk. 2011. Recent advances in understanding the relationship between adenosine metabolism and the function of T and B lymphocytes in diabetes. *J. Physiol. Pharmacol.* 62:505–512.

Schena, F., S. Volpi, C. Faliti, F. Penco, S. Santi, M. Proietti, U. Schenk, G. Damonte, A. Salis, M. Bellotti, F. Fais, C. Tenca, M. Gattorno, H. Eibel, M. Rizzi, K. Warnatz, M. Idzko, C.K. Ayata, M. Rakhmanov, T. Galli, A. Martini, M. Canossa, F. Grassi, and E. Traggiai. 2013. Dependence of Immunoglobulin Class Switch Recombination in B Cells on Vesicular Release of ATP and CD73 Ectonucleotidase Activity. *Cell Rep.* 3:1824–1831.

Schenk, U., A.M. Westendorf, E. Radaelli, A. Casati, M. Ferro, M. Fumagalli, C. Verderio, J. Buer, E. Scanziani, and F. Grassi. 2008. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci. Signal.* 1:ra6.

Spolski, R., H.-P. Kim, W. Zhu, D.E. Levy, and W.J. Leonard. 2009. IL-21 mediates suppressive effects via its induction of IL-10. *J. Immunol.* 182:2859–2867.

Stagg, J., and M.J. Smyth. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 29:5346–5358. doi:10.1038/onc.2010.292.

Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100:655–669.

Trautmann, A. 2009. Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal”. *Sci. Signal.* 2:pe6.

- Vignali, D. a a, L.W. Collison, and C.J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8:523–32.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J.M. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi, and O.R. Baricordi. 2001. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 97:587–600.
- de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer.* 6:24–37.
- Wang, C., S.G. Kang, J. Lee, Z. Sun, and C.H. Kim. 2009. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol.* 2:173–83.
- Yang, J., Y. Chu, X. Yang, D. Gao, L. Zhu, X. Yang, L. Wan, and M. Li. 2009a. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 60:1472–1483.
- Yang, Y., J. Weiner, Y. Liu, A.J. Smith, D.J. Huss, R. Winger, H. Peng, P.D. Cravens, M.K. Racke, and A.E. Lovett-Racke. 2009b. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 206:1549–64.
- Zenewicz, L.A., G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, S. Stevens, and R. a. Flavell. 2008. Innate and Adaptive Interleukin-22 Protects Mice from Inflammatory Bowel Disease. *Immunity.* 29:947–957.
- Zheng, W., and R.A. Flavell. 1997. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell.* 89:587–598.
- Zheng, Y., D.M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang. 2007. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature.* 445:648–651.
- Zhou, L., I.I. Ivanov, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, and D.R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8:967–74.
- Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28:445–89.

12. Anexo

Los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en la revista PLoS ONE, en el artículo *Purinergic Signaling as a Regulator of Th17 Cell Plasticity* (2016) PLoS ONE 11(6):e0157889, el cual se adjunta a continuación.

RESEARCH ARTICLE

Purinergic Signaling as a Regulator of Th17 Cell Plasticity

Dominique Fernández¹, Felipe Flores-Santibáñez¹, Jocelyn Neira^{2,3}, Francisco Osorio-Barrios³, Gabriela Tejón¹, Sarah Nuñez¹, Yessia Hidalgo¹, Maria Jose Fuenzalida¹, Daniel Meza¹, Gonzalo Ureta³, Alvaro Lladser³, Rodrigo Pacheco^{2,3}, Claudio Acuña-Castillo⁴, Victoria Guixé¹, Francisco J. Quintana⁵, Maria Rosa Bono¹, Mario Roseblatt^{1,2,3}, Daniela Sauma¹*

1 Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile, **2** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile, **3** Fundación Ciencia & Vida, Santiago, Chile, **4** Departamento de Biología y Centro de Biotecnología Acuicola (CBA), Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile, **5** Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America

* dsauma@u.uchile.cl



click for updates

Abstract

T helper type 17 (Th17) lymphocytes, characterized by the production of interleukin-17 and other pro-inflammatory cytokines, are present in intestinal lamina propria and have been described as important players driving intestinal inflammation. Recent evidence, supporting the notion of a functional and phenotypic instability of Th17 cells, has shown that Th17 differentiate into type 1 regulatory (Tr1) T cells during the resolution of intestinal inflammation. Moreover, it has been suggested that the expression of CD39 ectonucleotidase endows Th17 cells with immunosuppressive properties. However, the exact role of CD39 ectonucleotidase in Th17 cells has not been studied in the context of intestinal inflammation. Here we show that Th17 cells expressing CD39 ectonucleotidase can hydrolyze ATP and survive to ATP-induced cell death. Moreover, *in vitro*-generated Th17 cells expressing the CD39 ectonucleotidase produce IL-10 and are less pathogenic than CD39 negative Th17 cells in a model of experimental colitis in Rag^{-/-} mice. Remarkably, we show that CD39 activity regulates the conversion of Th17 cells to IL-10-producing cells *in vitro*, which is abrogated in the presence of ATP and the CD39-specific inhibitor ARL67156. All these data suggest that CD39 expression by Th17 cells allows the depletion of ATP and is crucial for IL-10 production and survival during the resolution of intestinal inflammation.

OPEN ACCESS

Citation: Fernández D, Flores-Santibáñez F, Neira J, Osorio-Barrios F, Tejón G, Nuñez S, et al. (2016) Purinergic Signaling as a Regulator of Th17 Cell Plasticity. PLoS ONE 11(6): e0157889. doi:10.1371/journal.pone.0157889

Editor: Mathias Chamailard, INSERM, FRANCE

Received: April 26, 2016

Accepted: June 6, 2016

Published: June 20, 2016

Copyright: © 2016 Fernández et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by FONDECYT 1140431 (MRB), FONDECYT 11121478 (DS), PAI 79110009 (MRB, DS), FONDEQUIP/EQM114137 (MRB) and CONICYT PFB-16 (MR).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

T helper 17 (Th17) cells play a fundamental protective role against infections caused by fungi and extracellular bacteria [1,2]. Th17 cells have been associated with inflammation and the pathogenesis of several autoimmune diseases in mice and humans [1], such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [3], experimental colitis [4,5] and human inflammatory bowel disease (IBD) [6–10].

Th17 cells are endowed with remarkable functional plasticity, being able to differentiate into Th1 cells in lymphopenic hosts, during EAE and in antitumor immune responses [11–15]. Some groups have also reported the presence of IFN- γ -producing Th17 cells in humans and patients with Crohn's disease [16,17]. Th17 cells can also differentiate into IL-10-producing cells during the resolution of inflammation [18–20]. Interestingly, using fate mapping mouse models, Flavell and colleagues have recently demonstrated that in the course of an inflammatory immune response, Th17 cells can transdifferentiate into type 1 regulatory T (Tr1) cells [21].

Two distinct types of Th17 cells have been defined: pathogenic or encephalitogenic Th17 cells and the so-called non-pathogenic Th17 cells. Some reports have demonstrated that Th17 cells generated with TGF- β 1 and IL-6 are not pathogenic in the setting of EAE [18], whereas Th17 cells produced with IL-23 and without TGF- β 1 are highly pathogenic in the same model [22–24]. Depending on the experimental setting, different cytokines produced by Th17 cells seem to drive their effector function. For instance, in tumor immunity, the production of IFN- γ by Th17 cells has proved to be determining the potential of Th17 cells to eradicate an established tumor [14]. Other studies revealed that the encephalitogenic properties of Th17 cells depend on GM-CSF production [23,25], whereas IL-10 production has been strongly related to non-pathogenic Th17 cells in EAE [18]. Moreover, IL-10 production by Th17 cells has been strongly related to the acquisition of regulatory properties by Th17 cells and the resolution of intestinal inflammation [20,21].

Extracellular ATP (eATP) is a danger signal released by dying and damaged cells, and it functions as an immunostimulatory signal that promotes inflammation [26,27]. eATP can be sensed by purinergic P2 receptors including the cation-selective receptor channels (P2X) and metabotropic G protein-coupled receptors (P2Y) [28]. eATP has been shown to engage P2 receptors on T cells to induce Th17 differentiation [29]. On the other hand, high doses of eATP induces necrotic lysis through P2X7 receptor signaling in T cells [30,31].

CD39 (NTPDase-1) and CD73 (ecto-5'-nucleotidase) ectonucleotidases are two cell-surface ectoenzymes that dephosphorylate ATP into its metabolites ADP, AMP and adenosine thus shifting the balance from inflammatory to suppressive microenvironments [32]. Recently, it has been reported that ATP signaling through P2X7 receptor inhibits the conversion of naive T cells to Tr1 cells and that CD39 can promote Tr1 differentiation through eATP hydrolysis [33].

It has been described that Th17 cells generated with TGF- β 1 and IL-6 express CD39 and CD73 ectonucleotidases endowing these cells with the capacity to produce adenosine and promote immunosuppressive microenvironments [34]. However, the role of CD39 expression in other aspects such as in depleting eATP to reduce P2X7 receptor-mediated cytotoxicity or promoting the plasticity of this subset of T cells has not been explored. In the current study, we present a comprehensive comparison of *in vitro*-generated Th17 cells expressing high and low levels of CD39 and CD73 ectonucleotidases. We found that Th17 cells generated with TGF- β 1 (Th17_{TGF- β 1}) which express the CD39 and CD73 ectonucleotidases and Th17 cells generated with IL-23 (Th17_{IL-23}) which do not express these ectonucleotidases constitute two fundamentally different Th17 subsets, evidenced at the transcriptional level and by the types of cytokines they secrete. In agreement with their transcriptional profile, Th17_{TGF- β 1} cells were significantly less pathogenic than Th17_{IL-23} cells in a model of experimental colitis, as they induce a transient reduction in weight loss in Rag^{-/-} mice and the production of IL-10 in the intestine. Interestingly, Th17_{TGF- β 1} cells can hydrolyze ATP in a CD39-dependent manner, providing Th17_{TGF- β 1} cells a superior survival capacity when exposed to high levels of ATP. Furthermore, here we show that Th17_{TGF- β 1} cells produce higher levels of IL-10 than Th17_{IL-23} cells when reactivated *in vitro* in the presence of Tr1-polarizing cytokines. Finally, we report that CD39 activity is important for IL-10 production by Th17_{TGF- β 1} cells since CD39 inhibition using the specific inhibitor ARL67156 reduced IL-10 production by *in vitro* re-activated Th17 cells.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6, B6SJL-PTPRC (CD45.1), OT-II, IL-17-GFP, Rag1^{-/-}, P2X7R^{-/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory. All mice were kept in an animal facility under standard housing guidelines. Animal work was carried out under institutional regulations of Fundación Ciencia & Vida and was approved locally by the ethical review committee of the Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Generation of Th17 cells

CD4⁺ T cells were purified from spleens of IL-17-GFP and P2X7R^{-/-} mice. The spleen was perfused with RPMI + 10% FCS, and CD4⁺ T cells were positively selected using anti-CD4 MACS (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's instructions. CD4⁺ T cells were cultured in a 96-well flat bottom microplate (0.1 x 10⁶ CD4⁺ T cells/well) and were activated with plate-bound a-CD3 (2 µg/ml; clone 145-2C11, eBioscience) and a-CD28 (2 µg/ml; clone 37.51) for 4 days in the presence of different cytokine cocktails. To generate Th17_{TGF-β1} cells, CD4⁺ T cells were differentiated in the presence of 2 ng/ml recombinant human TGF-β1 (eBioscience), 20 ng/ml recombinant mouse IL-6 (eBioscience), 10 ng/ml IL-1β (eBioscience) and 5 µg/ml of anti-IFN-γ (clone XMGI.2, Biolegend) and then reactivated for another 3 days in the presence of 2 ng/ml recombinant human TGF-β1 (eBioscience) and 20 ng/ml recombinant mouse IL-6 (eBioscience). Th17_{IL-23} cells were differentiated in the presence of 2 ng/ml recombinant human TGF-β3 (eBioscience), 20 ng/ml recombinant mouse IL-6 (eBioscience), 10 ng/ml IL-1β (eBioscience) and 5 µg/ml of anti-IFN-γ (clone XMGI.2, Biolegend) and then reactivated in the presence of 20 ng/ml recombinant mouse IL-6 (eBioscience), 10 ng/ml IL-1β (eBioscience) and 25 ng/ml recombinant mouse IL-23 (Biolegend). Cells were then isolated by cell sorting for adoptive transfer experiments, RNA extraction, intracellular cytokine staining and flow cytometry.

Induction of colitis in Rag^{-/-} mice

For experimental colitis experiments, 1.3x10⁶ Th17_{TGF-β1} or Th17_{IL-23} cells were sorted based on IL-17 production (GFP⁺) and then transferred into Rag^{-/-} mice. The body weight was measured every 2 days. Six weeks after adoptive transfer, the mice were sacrificed, and the entire colon was removed from cecum to anus. The colon length was measured as an indicator of inflammation. Clinical score was calculated based on weight loss and colon length. Weight-loss scores were determined as 0 = 0–2.5% weight loss; 1 = 2.5–5% weight loss; 2 = 5–7.5% weight loss; 3 = 7.5–10% weight loss; and 4 = >10% weight loss. This score was calculated using the weight of each mouse at the end point. Each weight data was compared to the average weight of control group. Colon length scores were determined as 0 = no colon size reduction; 1 = 0–5% colon size reduction; 2 = 5–10% colon size reduction; 3 = 10–15% colon size reduction; and 4 = >15% colon size reduction. This score was calculated using colon length normalized by the weight of each mouse. For each mouse, these scores were combined and divided by two to give an overall clinical score ranging from 0 (healthy) to 4 (maximal colitis).

Analysis of transferred cells in Rag^{-/-} mice

Six to eight weeks after adoptive transfer of Th17_{TGF-β1} or Th17_{IL-23} cells into Rag^{-/-} mice, the mice were sacrificed and lymphoid organs and lamina propria were dissected. The cells were analyzed by flow cytometry to assess the percentage of the transferred cells (CD3⁺ CD4⁺) within a lymphoid gate and the production of cytokines by intracellular cytokine staining.

Intracellular staining and flow cytometry

Cells obtained from lamina propria, lymph nodes and *in vitro*-generated Th17 cells were re-stimulated with 0.25 μ M PMA (Sigma-Aldrich) and 1 μ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of GolgiPlug (BD Biosciences) for 4 h. Cells were stained with antibodies against the cell surface markers CD4, CD39, CD73, and then resuspended in a fixation/permeabilization solution (Cytotfix/Cytoperm; BD Pharmingen). Following fixation and permeabilization, the cells were incubated with antibodies against IFN- γ , IL-17 and IL-10 for 30 min at 4°. The cells were then washed with permeabilization buffer and resuspended in PBS + 2% FCS for FACS analysis (FACSCanto II; BD Bioscience). In some cases, Fixable Viability Dye (eBioscience) was used to discard dead cells from the analysis. Analysis of FACS data was performed using the FLOWJO software (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Cytokine secretion measurements

Th17_{TGF- β 1} or Th17_{IL-23} cells were activated for 3 h at 1×10^6 cells/ml with 0.25 μ M PMA (Sigma-Aldrich) and 1 μ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich). After activation, the supernatants were harvested and analyzed using the mouse Th1/Th2/Th17 CBA Kit (BD Biosciences), following the manufacturer's instructions. GM-CSF was analyzed by ELISA using the BD OptEIA kit (BD Biosciences, 555167).

To analyze the cytokines produced in the intestine of Rag^{-/-} mice transferred with Th17 cells, the intestine was cut into fragments of 1 cm of length and incubated in 1 ml IMDM + 10% FCS for 24 h at 37°C and 5% CO₂. The medium was collected and centrifuged at 600 x g for 7 min. The supernatant was analyzed using the CBA Kit Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences).

qPCR

Th17 cells were isolated by cell sorting, and total RNA was obtained using EZNA Total RNA Kit I (Ω Bio-Tek). 1 μ g of RNA was reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The PCR reaction was performed using Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) in a Stratagene Mx3000P real-time PCR machine. For relative quantitation, the amplified fragments were normalized according to constitutive transcription of the housekeeping gene GAPDH. The sequences of the primers used for quantification of each measured transcript were the following:

rorc forward 5'-CAGAGGAAGTCAATGTGGGA-3',
reverse 5'-GTGGTTGTTGGCATTGTAGG-3';
tbx21 forward 5'-CCTGTTGTGGTCCAAGTTCAAC-3'
reverse 5'-CACAAACATCCTGTAATGGCTTGT-3';
il17a forward 5'TTCATCTGTGTCTCTGATGCT-3'
reverse 5'-AACGGTTGAGGTAGTCTGAG-3';
il9 forward 5'-CTGATGATTGTACCACACCGTGC-3'
reverse 5'-GCCTTTGCATCTCTGTCTTCTGG-3';
il10 forward 5'GAAGACAATAACTGCACCCA-3'
reverse 5'-CAACCCAAGTAACCCCTAAAGTC-3';
Il22 forward 5'GACAGGTTCCAGCCCTACAT-3'
reverse 5'ATCGCCTTGATCTCTCCACT-3';
csf2 forward 5'ACCACCTATGCGGATTCAT-3'
reverse 5'TCATTACGCAGGCACAAAAG-3';
ifng forward 5'GAGCCAGATTATCTCTTTCTACC-3'
reverse 5'GTTGTTGACCTCAAACCTTG-3';
grzb forward 5'ATCAAGGATCAGCAGCCTGA-3'

reverse 5'TGATGTCATTGGAGAATGTCT-3';
 ahr forward 5'-CAGCAGATGCCTTGGTCTTCT-3'
 reverse 5'-ATACGCTCTGATGGATGACATCA-3';
 cmaf forward 5'-AGCAGTTGGTGACCATGTCG-3'
 reverse 5'-TGGAGATCTCCTGCTTGAGG-3';
 p2rx7 forward 5'-CCAGGAAGCAGGAGAGAACTT-3'
 reverse 5'-ATCCGIGTTCTTGTTCATCCAG-3';
 hpri forward 5'-CTCCTCAGACCGCTTTTTC-3'
 reverse 5'-TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC-3';
 gapdh forward 5'TCCGTGTTCCCTACCCCAATG-3'
 reverse 5'GAGTGGGAGTTGCTGTTGAAG-3'.

Determination of ATP/AMP hydrolysis by HPLC

The enzymatic activity of CD39 and CD73 was evaluated based on the percentage of hydrolysis of ATP or AMP respectively by HPLC. Briefly, Th17 cells generated *in vitro* were diluted in Hanks' balanced salt solution (HBSS) and incubated in a 96-well flat-bottom plates at 0.5×10^5 cells/well with 10 μ M ATP (Sigma-Aldrich) in the presence or absence of the CD39 inhibitor ARL67156 (Sigma-Aldrich) at a concentration of 50 μ M or with 10 μ M AMP (Sigma-Aldrich), with or without the CD73 inhibitor APCP (Adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate) (50 μ M) (Sigma-Aldrich). After 1 h, the cells were harvested, transferred to ice for 15 min, and then centrifuged at 1000 x g for 10 min. Supernatants were collected and stored at -20°C until further analysis. HPLC analysis was carried out in a Water Breeze system using an anion exchanger column (Mono Q; GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). The mobile phase used consisted of a linear gradient from buffer A (Tris-HCl 100 mM, pH 7.8) to buffer B (Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, pH 7.8). The effluent was monitored at 257 nm using an online UV detector. The column was calibrated using ATP, AMP and adenosine as standards.

Determination of Th17 cell survival in high concentrations of ATP

Th17 cells isolated by cell sorting were resuspended at 1×10^5 cells/well in HBSS medium. Cells were cultured in the presence or absence of ATP (100, 500 or 1000 μ M) (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C and 5% CO_2 . Cells were then harvested and centrifuged at 600 x g for 7 min and resuspended in 100 μ L of Binding Buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4) containing 0.5 μ L of Annexin V APC (Biolegend) and 2 μ L of propidium iodide (50 μ g/mL) (Sigma). Cells were incubated for 20 min at room temperature and 300 μ L of Binding Buffer was added. Live and dead cells were analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were determined using Mann-Whitney test or two-tailed t-test. Where indicated, differences were analysed using Kruskal-Wallis or two-way analysis of variance paired with Bonferroni post-tests. Statistical analysis and graphs were obtained with GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Results

In vitro generated Th17 cells expressing high levels of CD39 ectonucleotidase present a regulatory phenotype

To evaluate a putative role of CD39 and CD73 in Th17 cells we generated Th17 cells expressing high or low levels of these ectonucleotidases. It has been reported that TGF- β 1 induces CD39

and CD73 expression in Th17 cells; however after a second round of restimulation in the absence of TGF- β 1, Th17 cells lose ectonucleotidase expression [34]. For this reason, we generated Th17 cells using two rounds of activation. Th17 cells expressing high levels of CD39 and CD73 were generated with TGF- β 1, IL-6, and IL-1 β , and reactivated in the presence of TGF- β 1 and IL-6 (Th17_{TGF- β 1}). Th17 cells expressing low levels of ectonucleotidases were generated with TGF- β 3, IL-6, and IL-1 β , and reactivated in the presence of IL-6, IL-1 β , and IL-23 (Th17_{IL-23}). As shown in Fig 1A and 1B, a similar percentage of IL-17 producing cells were obtained in Th17_{TGF- β 1} and Th17_{IL-23} culturing conditions. Accordingly, Th17_{TGF- β 1} and Th17_{IL-23} cells expressed similar levels of ROR γ t, the master transcription factor of Th17 cells and neither expressed GATA-3 nor Foxp3 transcription factors. Interestingly, although it has been reported that Th17 cells generated with IL-23 express higher levels of T-bet than cells generated with TGF- β 1 [24,35], in our setting Th17_{TGF- β 1} cells expressed higher levels of this master transcription factor compared to Th17_{IL-23} cells (Fig 1C and 1D).

Next, we analyzed CD39 and CD73 expression by these *in vitro*-generated Th17 cells. As expected, Th17_{TGF- β 1} cells acquired high levels of CD39 and CD73 ectonucleotidases expression whereas Th17_{IL-23} cells presented low expression of both ectonucleotidases (Fig 1E and 1F). A fraction of Th17_{TGF- β 1} cells (approx. 25%) also expressed significant levels of CD49b and Lag-3, markers of Tr1 cells [36], whereas a fraction of Th17_{IL-23} cells only expressed Lag-3. Although a fraction of Th17_{TGF- β 1} cells showed Tr1 markers, these do not constitute *bona fide* Tr1 cells, since they express ROR γ t transcription factor and produce IL-17. Although both Th17 cell subsets expressed CCR6, Th17_{TGF- β 1} cells showed lower levels of this chemokine receptor compared to Th17_{IL-23} cells (Fig 1G and 1J).

We further investigated the expression of Th17-associated genes in Th17_{TGF- β 1} and Th17_{IL-23} cells. The expression of mRNAs encoding T-bet, IFN- γ , IL-9, AHR, c-Maf and IL-10 was higher in Th17_{TGF- β 1} cells whereas expression of mRNAs encoding GM-CSF and IL-22 was higher in Th17_{IL-23} cells (Fig 2A). Interestingly, following *in vitro* reactivation, Th17_{TGF- β 1} cells secreted higher levels of IL-10, and lower levels of IL-17, GM-CSF, TNF, IL-2 compared to Th17_{IL-23} cells (Fig 2B–2D). Taken together, these results strongly suggest that Th17_{TGF- β 1} cells rapidly lose their inflammatory potential and present a regulatory phenotype upon reactivation.

In vitro generated Th17 cells expressing high levels of CD39 and CD73 can hydrolyze ATP and survive to ATP-induced death

We next tested the enzymatic activity of CD39 and CD73 ectonucleotidases in Th17 cells. As shown in Fig 3A–3D, only Th17_{TGF- β 1} cells, which express the CD39 and CD73 ectonucleotidases, can hydrolyze ATP and AMP. Moreover, ATP hydrolysis was partially blocked in Th17_{TGF- β 1} cells by inhibiting CD39 enzymatic activity using the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 while adenosine production was blocked using the CD73 inhibitor APCP in these cells.

As Th17_{TGF- β 1} cells express the CD39 and CD73 ectonucleotidases and produce adenosine, we tested whether these cells present suppressive capacity *in vitro*. For this, Th17_{TGF- β 1} or Th17_{IL-23} cells were sorted based on IL-17-GFP expression and co-cultured with Violet-labeled CD4⁺ effector T cells from OT-II mice activated with OVA₃₂₃₋₃₃₉ and antigen presenting cells for 3 days. As shown in S1 Fig, both Th17_{TGF- β 1} and Th17_{IL-23} cells displayed a low suppressive capacity only when co-cultured in direct contact with effector cells at high Th17/Teff ratios (1:1). No suppression was observed when the cells were cultured using transwell chambers (S1 Fig), suggesting that soluble factors such as adenosine are not involved in this process.

Since Th17_{TGF- β 1} cells can hydrolyze ATP, we sought to determine whether these cells were more resistant to ATP-induced cell death. As shown in Fig 3E and 3F, Th17_{TGF- β 1} cells were more resistant than Th17_{IL-23} cells to rapid cell death induced by high doses of ATP

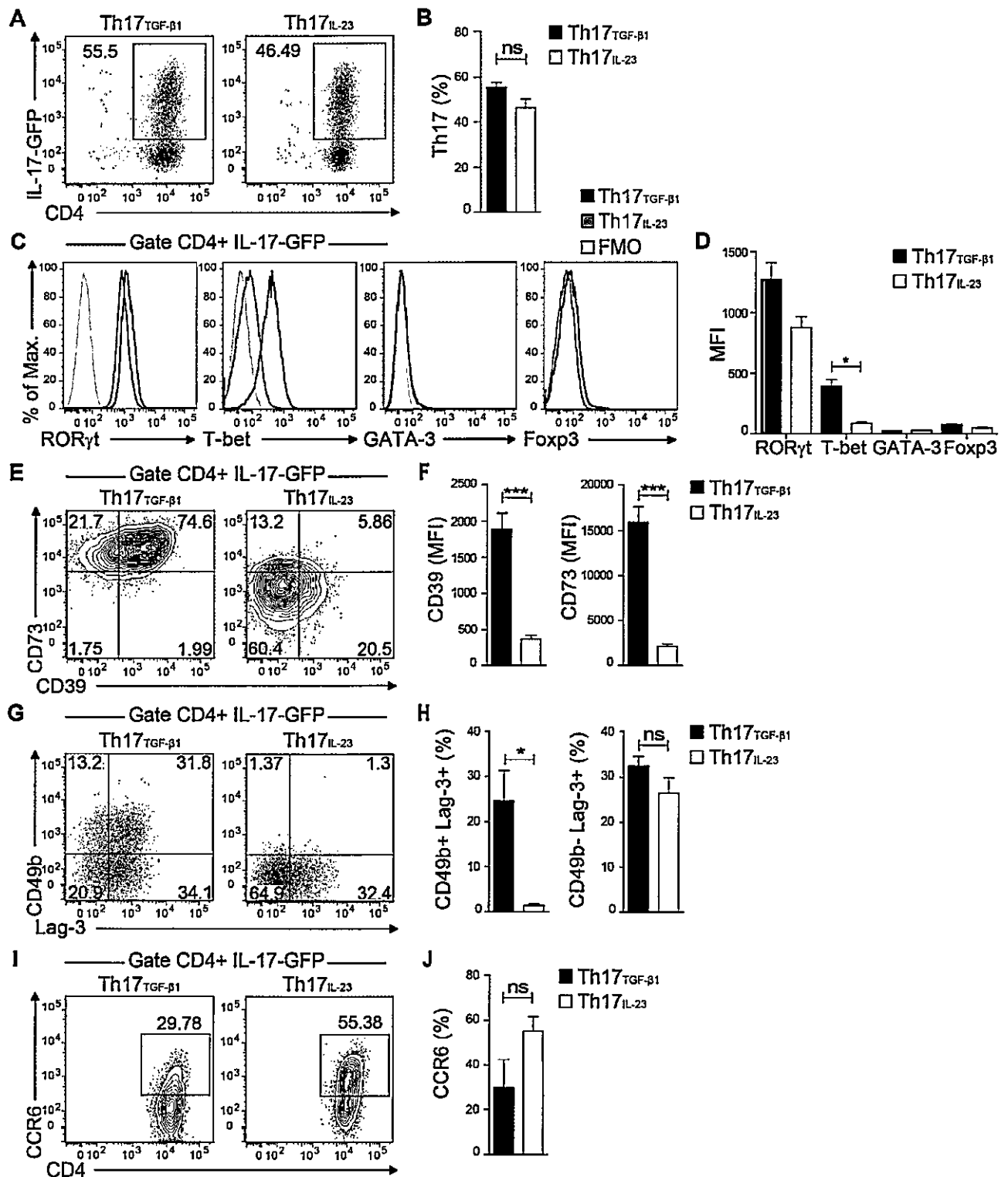


Fig 1. *In vitro*-generated Th17_{TGF-β1} but not Th17_{IL-23} cells express CD39 and CD73 ectonucleotidases. (A) IL-17-GFP expression in Th17 cells differentiated in the presence of TGF-β1 and IL-6 (Th17_{TGF-β1} cells) or IL-23, TGF-β3 and IL-1β (Th17_{IL-23} cells). (B) Percentage of IL-17-GFP⁺ cells among total CD4⁺ cells (n = 12). (C and D) FACS analysis and mean fluorescence intensity for RORγt, T-bet, GATA-3 and Foxp3 transcription factors in IL-17-GFP⁺ Th17 cells (n = 4). (E and F) Representative FACS analysis and mean fluorescence intensity for CD39 and

CD73 ectonucleotidases (n = 7). (G) CD49b and Lag-3 (n = 4) expression in IL-17-GFP+ Th17 cells. (H) Percentage of CD49b+/Lag-3+ cells and percentage of CD49b-/Lag-3+ cells in IL-17-GFP+ Th17 cells (n = 4). (I and J) CCR6 expression in IL-17-GFP+ Th17 cells (n = 6). Data are presented as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ determined by t-test (B and F) or Mann-Whitney test (D, G and I).

doi:10.1371/journal.pone.0157889.g001

(>500 μ M). Since both types of Th17 cells express similar levels of the mRNA encoding the P2X7 receptor (Fig 3G), this suggests that ATP signaling through the P2X7 receptor is reduced

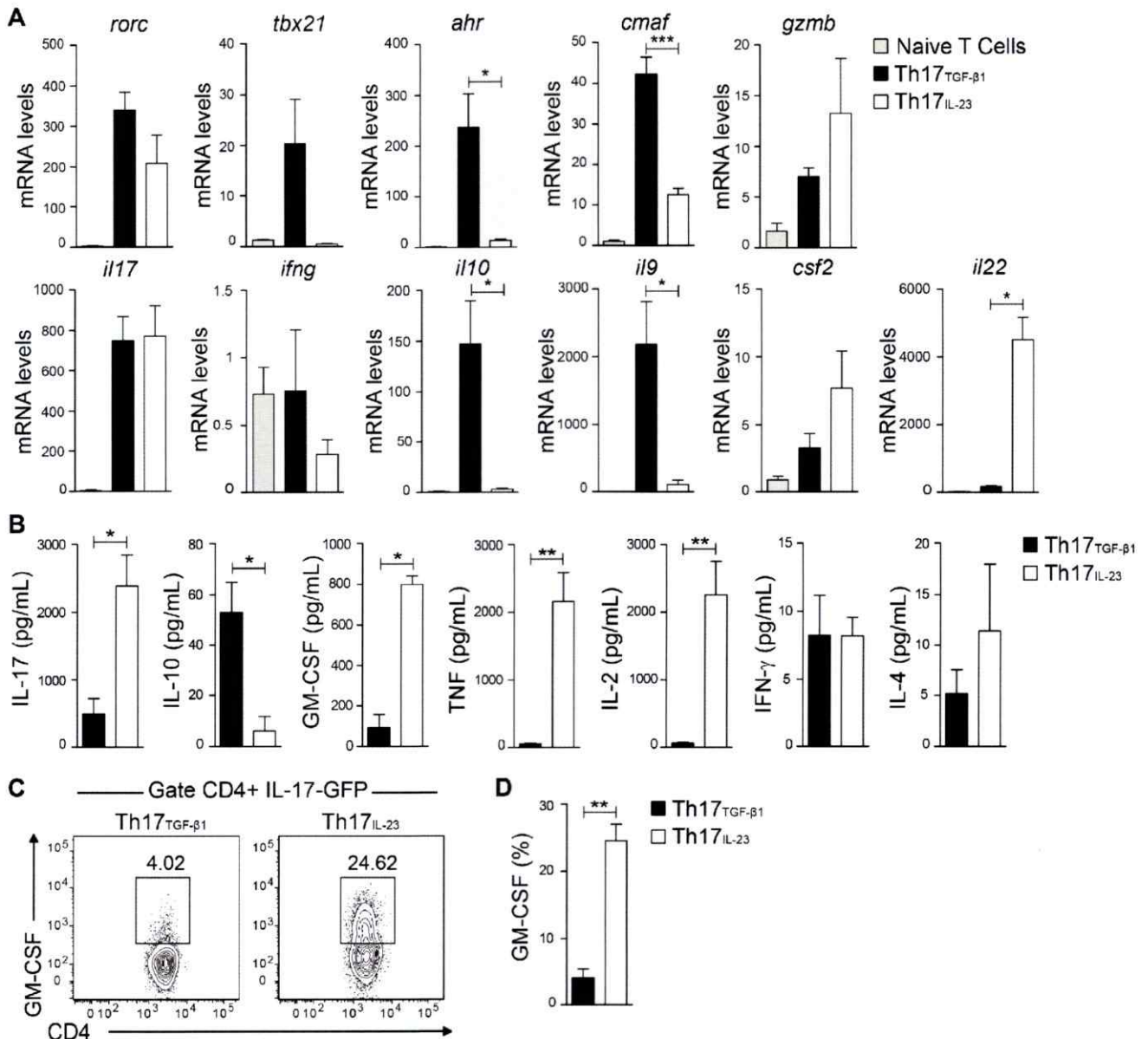


Fig 2. Th17_{TGF-β1} cells present a regulatory phenotype. (A) IL-17-GFP+ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells were sorted and then analyzed by real-time PCR for mRNA expression of several transcription factors and cytokines (n = 3). (B) IL-17-GFP+ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells were sorted and then reactivated for 4 hrs with PMA plus ionomycin to assess cytokine production by CBA or (C) in the presence of PMA, ionomycin and brefeldin A to analyze GM-CSF production by FACS (n = 5). (D) Percentage of GM-CSF+ cells within IL-17-GFP+ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells (n = 5). Data are presented as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ determined by t-test (A) or Mann-Whitney test (B and D).

doi:10.1371/journal.pone.0157889.g002

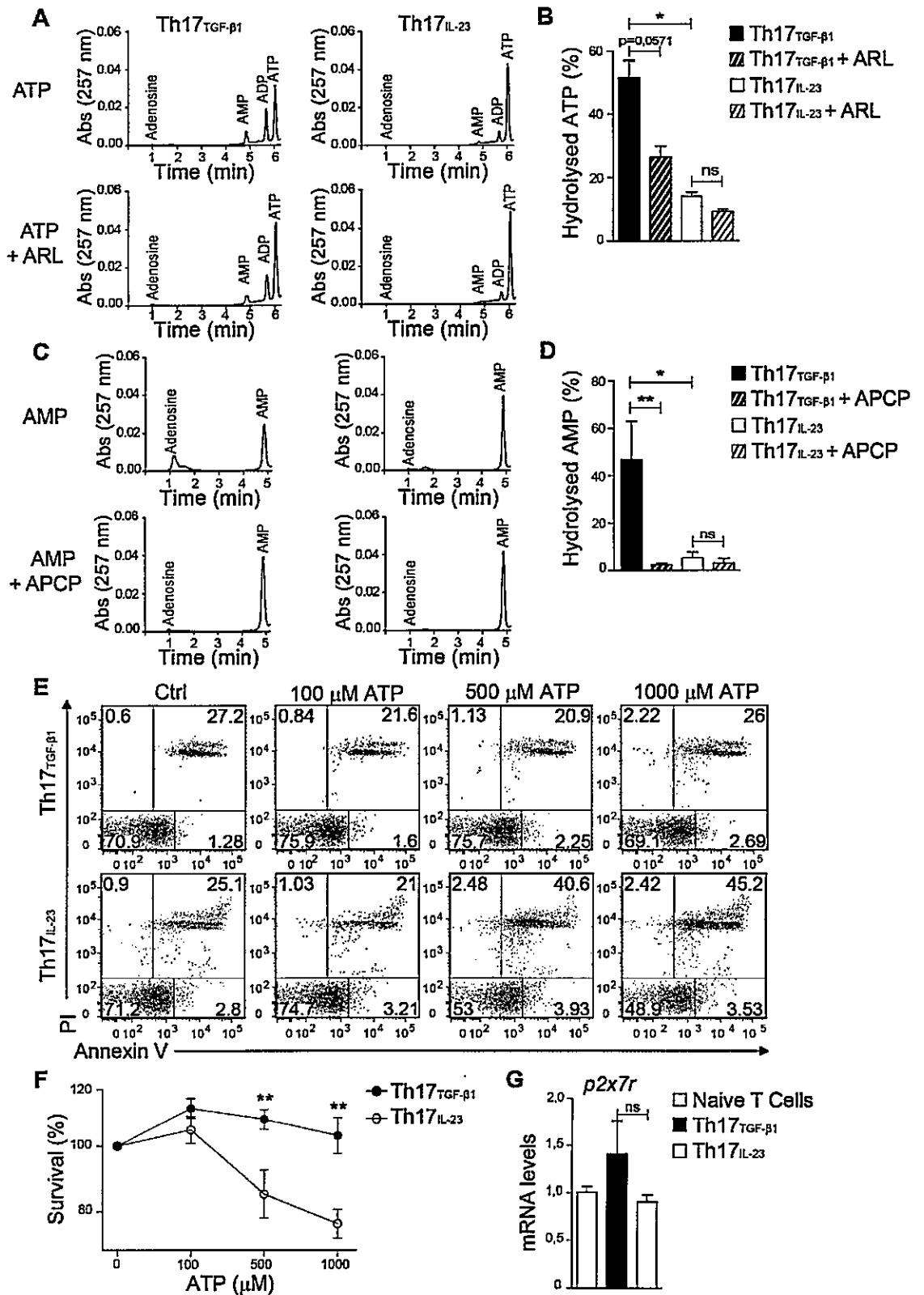


Fig 3. Th17_{TGF-β1} but not Th17_{IL-23} cells hydrolyze ATP to adenosine in a CD39- and CD73-dependent manner and survive in the presence of high doses of ATP. IL-17-GFP⁺ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells were sorted and cultured for 1 hr with 10 μM ATP in the presence of 50 μM ARL67156 or 50 μM APCP. Supernatants were then analyzed by HPLC to assess (A and B) ATP and (C and D) AMP hydrolysis (n = 5). (E) Representative FACS analysis of Th17 cell survival (Annexin V-/PI-) in the presence of graded doses of ATP. (F) Percentage of Th17 cell survival in the presence of ATP (n = 3). (G) IL-17-GFP⁺ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells were sorted and then analyzed by real-time PCR to assess mRNA encoding P2X7 receptor (n = 4). Data are presented as mean ± S.E.M. *p<0.05 and **p<0.01 determined by Mann-Whitney test (B and D), two-way analysis of variance (F) or t-test (G).

doi:10.1371/journal.pone.0157889.g003

in Th17_{TGF-β1} cells due to CD39 activity. These results also raise the possibility that CD39 expression confers Th17_{TGF-β1} cells with a superior survival capacity when faced with toxic doses of ATP.

In vitro generated Th17 cells expressing high levels of CD39 ectonucleotidase convert to IL-10 producing cells during intestinal inflammation

It has been reported that Th17 cells generated with TGF-β1 and IL-6 are less pathogenic than Th17 cells differentiated with IL-23 [18]. To evaluate the pathogenicity of our Th17 cells in a model of experimental colitis, we transferred Th17_{TGF-β1} or Th17_{IL-23} cells into Rag^{-/-} mice and measured body weight loss and colon length in these mice. As shown in Fig 4A, mice treated with Th17_{TGF-β1} cells started losing body weight 3 weeks after adoptive transfer whereas mice transferred with Th17_{IL-23} cells presented a delay in the onset of weight loss and started losing weight 5 weeks following adoptive transfer. Moreover, Rag^{-/-} mice treated with Th17_{TGF-β1} cells presented a transient weight loss and began to recover by week 5, whereas mice treated with Th17_{IL-23} cells presented severe weight loss and had to be sacrificed by 6 weeks after the adoptive transfer (Fig 4A). In agreement with the severe and persistent weight loss, mice treated with Th17_{IL-23} cells presented a significant reduction in the colon length compared to mice receiving PBS (Fig 4B). Although not statistically significant, mice treated with Th17_{TGF-β1} cells presented a lower clinical score compared to mice treated with Th17_{IL-23} cells (Fig 4C). H&E and alcian blue staining of distal colonic sections revealed severe wall thickening, extensive leukocyte infiltration, and disruption of intestinal crypts and goblet cells in mice treated with Th17_{TGF-β1} or Th17_{IL-23} cells compared to controls (Fig 4D). This suggests that although mice treated with Th17_{TGF-β1} cells recover and gain weight, the damage to the colon is not reversed in these mice at this time point.

In agreement with the less severe body weight loss, mice treated with Th17_{TGF-β1} cells secreted higher levels of IL-10 as determined directly in their small intestine compared to mice treated with Th17_{IL-23} cells (Fig 4E). We next analyzed the stability of Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells 6 weeks after adoptive transfer and found that both Th17 cell subsets lost IL-17 production and a significant fraction of transferred cells produced IFN-γ (Fig 4G). Notably, a small fraction of transferred Th17_{TGF-β1} cells, but not of Th17_{IL-23} cells, were able to produce IL-10 (Fig 4F). The differences observed in body weight loss were not due to a differential capacity of Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cell subsets to survive or persist in the host, since both populations were found at similar percentages within spleen, mesenteric lymph nodes and small intestine lamina propria up to 8 weeks following adoptive transfer into Rag^{-/-} mice (S2 Fig). Taken together, these data suggest that Th17_{TGF-β1} cells are able to induce the production of IL-10 in the intestine of Rag^{-/-} mice and can convert into IL-10-producing cells during the recovery from intestinal inflammation, which may explain the transient weight loss observed in mice treated with Th17_{TGF-β1} cells.

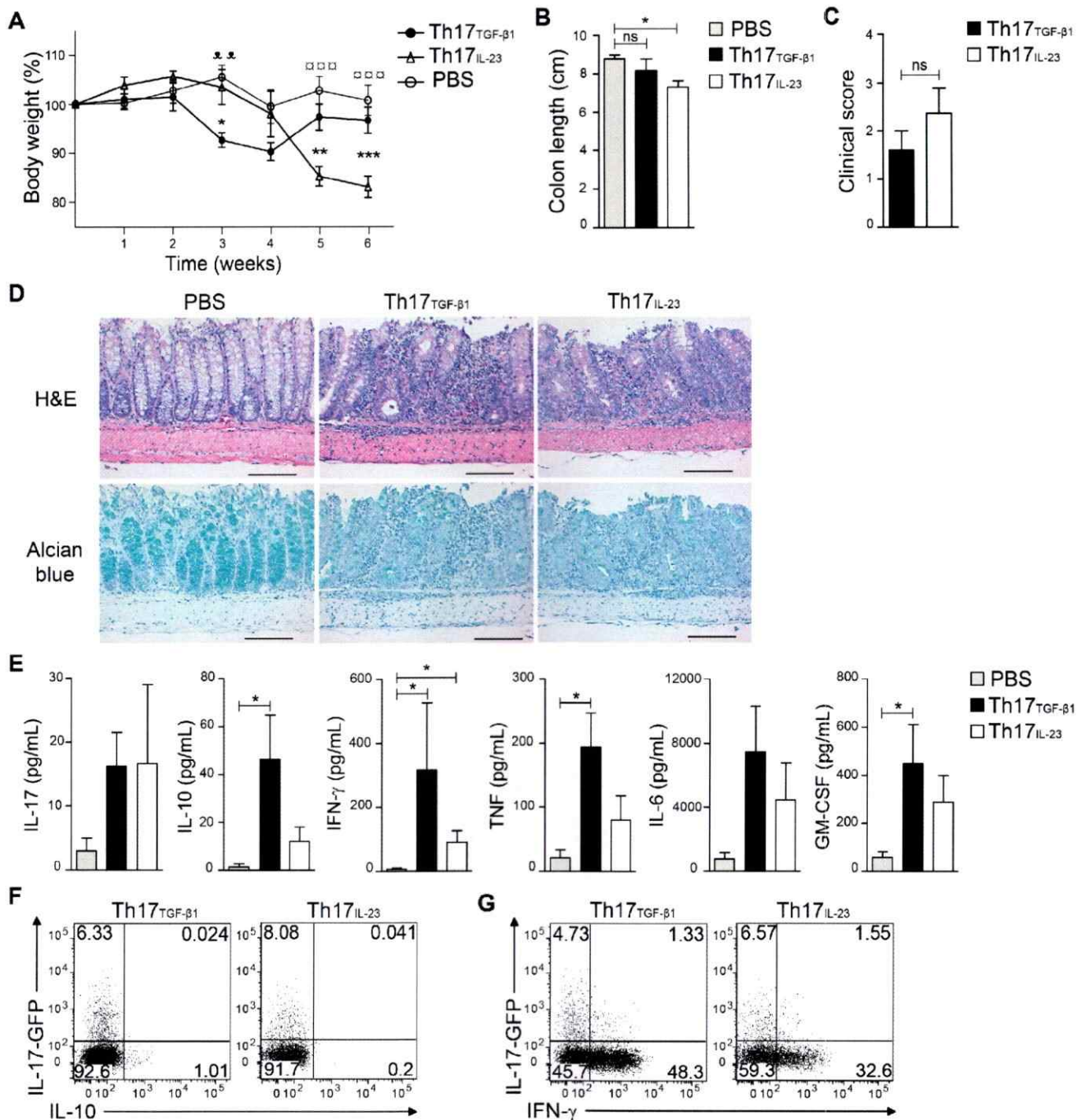


Fig 4. Th17_{TGF-β1} cells are less colitogenic than Th17_{IL-23} cells and produce IL-10 and IFN-γ *in vivo*. 1.3×10^6 IL-17-GFP+ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells were transferred to Rag1^{-/-} mice. (A) The weight of mice was measured over the course of 6 weeks after adoptive transfer of Th17 cells (n = 5–8 mice per group). (B) Colon length was measured 6 weeks following transfer of Th17 cells (n = 5). (C) Clinical score was calculated based on weight loss and colon length 6 weeks after adoptive transfer of Th17 cells (n = 5). (D) Colonic histopathology. H&E and alcian blue staining, original magnification 20X. Scale bar 100 μm (E) To determine intestinal cytokine production, intestinal tissues of Th17 recipient mice were cultured for 24 hs at 37°C and 5% CO₂ and production of several cytokines was analyzed by CBA (n = 6). (F and G) Representative FACS analysis of IL-17, IL-10 and IFN-γ production by Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells 6 weeks after adoptive transfer to Rag1^{-/-} mice. Data are presented as mean ± S.E.M. *p<0,05, **p<0,01 and ***p<0,001 comparing Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23}; ****p<0,01 comparing PBS and Th17_{TGF-β1}; *****p<0,001 comparing PBS and Th17_{IL-23} determined by two-way analysis of variance (A). *p<0,05 determined by Kruskal-Wallis test (B,C and E).

doi:10.1371/journal.pone.0157889.g004

CD39-mediated ATP hydrolysis is crucial for *in vitro* Th17 conversion to IL-10 producing cells

To test the possibility that Th17_{TGF-β1} cells differentiate into IL-10-producing cells more efficiently than Th17_{IL-23} cells, we reactivated IL-17 (GFP+) Th17 cells with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 days and evaluated IL-10 production *in vitro*. As shown in Fig 5A, Th17_{TGF-β1} cells produced higher levels of IL-10 than Th17_{IL-23} cells following activation. Moreover, the addition of TGF-β1, IL-21, and IL-27 (an improved cytokine cocktail to stimulate IL-10 production and Tr1 cell differentiation) during the reactivation increased the levels of IL-10 production by Th17_{TGF-β1} cells.

Since it has been described that ATP inhibits naive T cell conversion to Tr1 cells via P2X7 receptor signaling [33], we tested whether CD39 and ATP hydrolysis is necessary for the conversion of Th17 cells to Tr1 cells. For this, both subsets of Th17 cells were tested in their ability to convert to IL-10-producing cells in the presence of Tr1 polarizing cytokines (TGF-β1/IL-21/IL-27), ATP and the CD39 specific inhibitor, ARL67156. As shown in Fig 5A, the addition of ATP reduced the ability of Th17_{TGF-β1} cells to produce IL-10 in the presence of ARL67156, demonstrating that CD39 enzymatic activity is important for IL-10 production. Interestingly, Th17_{IL-23} cells generated from P2X7 receptor knockout mice, produced higher levels of IL-10 when compared to Th17_{IL-23} cells generated from wild-type mice (Fig 5B). These results suggest that CD39 enzymatic activity is crucial for limiting P2X7 receptor signaling in Th17 cells, promoting the production of IL-10 and the conversion of Th17 cells into Tr1-like cells.

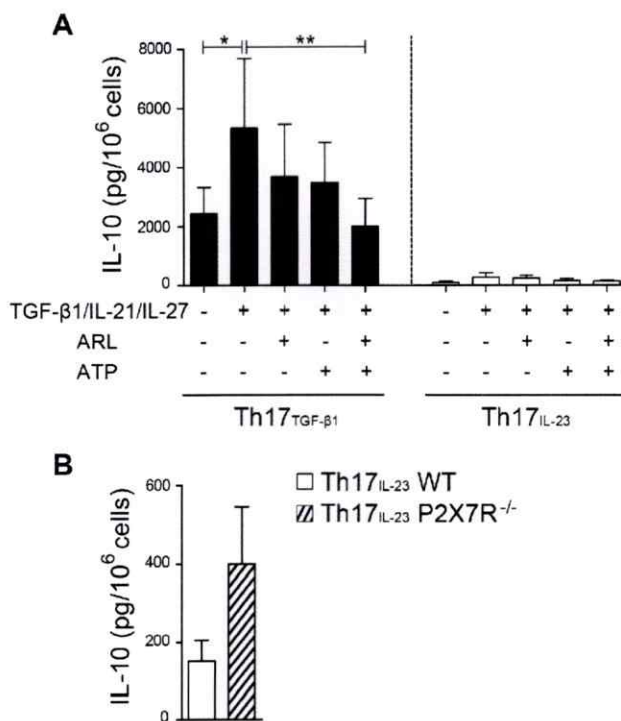


Fig 5. ATP hydrolysis by CD39 on Th17_{TGF-β1} cells promotes their conversion into IL-10-producing cells. (A) IL-10 production by IL-17-GFP+ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells restimulated for 3 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence and absence of Tr1 polarizing cytokines (TGF-β1, IL-21 and IL-27), 50 μM ATP and 250 μM ARL67156. IL-10 production was analyzed by CBA (n = 4). (B) Th17_{IL-23} cells from wild-type and P2X7R knockout mice were restimulated for 3 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and IL-10 production was analyzed by CBA (n = 3). Data are presented as mean ± S.E.M. *p<0.05; **p<0.01 determined by repeated measures analysis of variance.

doi:10.1371/journal.pone.0157889.g005

Discussion

Extracellular ATP (eATP) is a danger signal released by dying and damaged cells, and it functions as an immunostimulatory signal that promotes inflammation [26,27]. CD39 and CD73 are two cell-surface ectoenzymes that dephosphorylate eATP into its metabolites, ADP, AMP, and adenosine, in a tightly regulated process. CD39 catalyzes the conversion of eATP into AMP, whereas CD73, catalyzes the dephosphorylation of AMP into adenosine [37–39]. The coordinated action of these ectonucleotidases results in the generation of extracellular adenosine, a molecule known for its immunosuppressive properties [40].

It has been described that the addition of TGF- β and IL-6 during the *in vitro* differentiation of Th17 cells induces the expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases by Th17 cells [34] and that tumor-infiltrating Th17 cells may express these ectonucleotidases. Although the expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases has been related to their potential to generate adenosine and create an immunosuppressive microenvironment [34], they may also serve to deplete eATP. In this line of evidence, Falk and colleagues have reported that CD39 expression by Foxp3+ regulatory T cells (Tregs) is involved in eATP depletion and reduces the cytotoxic effects of this molecule [41]. Thus, CD39 expression may endow Tregs with the capacity to enter into inflamed sites and mediate immunosuppression by preventing P2X7 receptor-mediated cell death. Our results demonstrate that this mechanism may also be active on Th17 cells, where ATP-induced cell death is reduced in the population of Th17 cells (Th17_{TGF- β 1}) expressing the CD39 ectonucleotidase. This result puts forward the idea that Th17 cells expressing CD39 may survive in ATP-rich sites such as an inflamed tissue.

Th17 cells have been defined as a plastic subset of T cells, being able to differentiate into several other T cell population during inflammation [42]. We and others have reported that Th17 cells can differentiate into IFN- γ -producing cells when transferred into lymphopenic hosts, during EAE or in a murine melanoma model [11,13–15]. Moreover, Flavell and colleagues have shown that Th17 cells are also able to differentiate into IL-10-producing Tr1 cells during the resolution of inflammation and that this population of Tr1 cells present regulatory properties as they abolished Th17 cell-mediated colitis [20,21]. In this study, we confirmed that Th17 cells generated with TGF- β 1 are a highly plastic subset of T helper cells, as they can differentiate into IFN- γ - and IL-10-producing cells following transfer into Rag^{-/-} mice.

Tr1 cells constitute an important subset of CD4+ T cells that help to control excessive inflammatory responses mainly through the production of IL-10 [43]. It has been reported that AHR and c-Maf transcription factors physically interact enabling the transactivation of the IL-10 promoter and thus are involved in the differentiation of Tr1 cells [44,45]. Importantly, eATP and hypoxia have been shown to suppress the generation of Tr1 cells by triggering AHR inactivation through HIF1- α [46]. It has been demonstrated that eATP increases the interaction of HIF1- α to ARNT decreasing AHR binding to ARNT [33], resulting in the reduction of the transcription of AHR controlled genes. Interestingly, the group of Quintana reported that CD39 expression is important for the production of IL-10 by Tr1 cells as it allowed the depletion of eATP favoring AHR/ARNT interaction [33]. Based on this evidence, we tested whether CD39 may also play a role in promoting Th17 cell differentiation into IL-10-producing cells. In agreement with this hypothesis, Th17 cells expressing the CD39 ectonucleotidase (Th17_{TGF- β 1}) induce an IL-10-rich microenvironment when transferred in a setting of intestinal inflammation. Furthermore, Th17_{TGF- β 1} cells produce higher levels of IL-10 compared to Th17_{IL-23} cells when re-activated *in vitro*. Importantly, in the presence of eATP and the CD39 inhibitor ARL67156 Th17_{TGF- β 1} cells reduced their ability to produce IL-10.

Although we demonstrated adenosine production by Th17_{TGF- β 1} cells, we could not detect a strong suppressive activity of Th17 cells over effector T cells, which could be due to the strong

activation stimulus we used to induce effector T cell activation. These results are different from those reported by the group of Ghiringelli who suggest that adenosine produced by Th17 cells have a suppressor activity [34]. Our data strongly argue in favor of the idea that CD39 may not only be involved in generating a suppressive microenvironment, but also may deplete eATP allowing these cells to survive into inflamed tissues. On the other hand, CD39 expression may be a determining factor in the differentiation of Th17 cells to Tr1-like cells.

Supporting Information

S1 Fig. Th17 cells delay effector T cell proliferation in a contact-dependent manner.

Proliferation of effector CD4⁺ T cells during *in vitro* suppression assays with Th17_{TGF-β1} or Th17_{IL-23} cells. Th17_{TGF-β1} or Th17_{IL-23} cells were sorted based on IL-17-GFP expression and co-cultured for 3 days at different ratios with Violet-labeled CD4⁺ effector T cells from OT-II mice activated with OVA₃₂₃₋₃₃₉ and antigen presenting cells. (n = 3). (TIF)

S2 Fig. Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} subsets present similar *in vivo* persistence. 1.3x10⁶ IL-17-GFP⁺ Th17_{TGF-β1} and Th17_{IL-23} cells were transferred to Rag1^{-/-} mice and the percentage of CD4⁺ CD3⁺ was analyzed 8 weeks after adoptive transfer in the spleen (A), mesenteric lymph node (B) and small intestine lamina propria (C) (n = 6–7 mice per group). Data are presented as mean ± S.E.M. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GU ALL RP CAC VG FJQ MRB MR DS. Performed the experiments: DF FFS JN FOB GT SN YH MJF DM GU. Analyzed the data: DF FFS FOB GU. Contributed reagents/materials/analysis tools: ALL RP CAC VG MRB MR DS. Wrote the paper: DF FFS SN FJQ MRB MR DS.

References

1. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008; 28: 454–67. doi: [10.1016/j.immuni.2008.03.004](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004) PMID: [18400188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18400188/)
2. Khader S a, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol*. 2009; 2: 403–11. doi: [10.1038/mi.2009.100](https://doi.org/10.1038/mi.2009.100) PMID: [19587639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19587639/)
3. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005; 201: 233–40. PMID: [15657292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15657292/)
4. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, et al. Monoclonal Anti-Interleukin 23 Reverses Active Colitis in a T Cell-Mediated Model in Mice. *Gastroenterology*. 2007; 132: 2359–2370. PMID: [17570211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17570211/)
5. Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, et al. RORγ-Expressing Th17 Cells Induce Murine Chronic Intestinal Inflammation via Redundant Effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology*. 2009; 136: 257–267. doi: [10.1053/j.gastro.2008.10.018](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.018) PMID: [18992745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18992745/)
6. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003; 52: 65–71. PMID: [12477762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12477762/)
7. Nielsen OH, Kirman I, Rüdiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2003; 38: 180–185. PMID: [12678335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12678335/)
8. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): Upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: 437–445. PMID: [18088064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18088064/)

9. Holttta V, Klemetti P, Sipponen T, Kociubinski G, Westerholm-Ormio M, Salo H, et al. IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: 1175–1184. doi: [10.1002/ibd.20475](https://doi.org/10.1002/ibd.20475) PMID: [18512248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18512248/)
10. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2008; 57: 1682–1689. doi: [10.1136/gut.2007.135053](https://doi.org/10.1136/gut.2007.135053) PMID: [18653729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18653729/)
11. Nurieva R, Yang XO, Chung Y, Dong C. Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts. *J Immunol*. 2009; 182: 2565–8. doi: [10.4049/jimmunol.0803931](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803931) PMID: [19234148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19234148/)
12. Feng T, Qin H, Wang L, Benveniste EN, Elson CO, Cong Y. Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol*. 2011; 186: 6313–6318. doi: [10.4049/jimmunol.1001454](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001454) PMID: [21531892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21531892/)
13. Nuñez S, Saez JJ, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Alvarez K, Tejon G, et al. T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology*. 2013; 139: 61–71. doi: [10.1111/imm.12055](https://doi.org/10.1111/imm.12055) PMID: [23278668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23278668/)
14. Muranski P, Boni A, Antony P a, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 2008; 112: 362–73. doi: [10.1182/blood-2007-11-120998](https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-120998) PMID: [18354038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18354038/)
15. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2011; 12: 255–263. doi: [10.1038/ni.1993](https://doi.org/10.1038/ni.1993) PMID: [21278737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278737/)
16. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007; 204: 1849–61. PMID: [17635957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17635957/)
17. Acosta-Rodriguez E V, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007; 8: 942–949. PMID: [17676045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17676045/)
18. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007; 8: 1390–7. PMID: [17994024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17994024/)
19. Xu J, Yang Y, Qiu G, Lal G, Wu Z, Levy DE, et al. c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *J Immunol*. 2009; 182: 6226–36. doi: [10.4049/jimmunol.0900123](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900123) PMID: [19414776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19414776/)
20. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. 2011; 475: 514–8. doi: [10.1038/nature10228](https://doi.org/10.1038/nature10228) PMID: [21765430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21765430/)
21. Gagliani N, Vesely MCA, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015; 523: 221–225. doi: [10.1038/nature14452](https://doi.org/10.1038/nature14452) PMID: [25924064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25924064/)
22. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. 2010; 467: 967–71. doi: [10.1038/nature09447](https://doi.org/10.1038/nature09447) PMID: [20962846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962846/)
23. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2011; 12: 568–75. doi: [10.1038/ni.2031](https://doi.org/10.1038/ni.2031) PMID: [21516111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21516111/)
24. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. 2012; 13: 991–9. doi: [10.1038/ni.2416](https://doi.org/10.1038/ni.2416) PMID: [22961052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22961052/)
25. Codarri L, Gyölvérszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. RORyt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2011; 12: 560–7. doi: [10.1038/ni.2027](https://doi.org/10.1038/ni.2027) PMID: [21516112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21516112/)
26. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009; 461: 282–286. doi: [10.1038/nature08296](https://doi.org/10.1038/nature08296) PMID: [19741708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19741708/)
27. Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci Signal*. 2009; 2: pe6. doi: [10.1126/scisignal.256pe6](https://doi.org/10.1126/scisignal.256pe6) PMID: [19193605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19193605/)
28. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2016; 16: 177–192. doi: [10.1038/nri.2016.4](https://doi.org/10.1038/nri.2016.4) PMID: [26922909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922909/)
29. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2008; 455: 808–12. doi: [10.1038/nature07240](https://doi.org/10.1038/nature07240) PMID: [18716618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716618/)
30. Aswad F, Kawamura H, Dennert G. High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol*. 2005; 175: 3075–3083. PMID: [16116196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16116196/)

31. Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*. 2009; 56: 208–215. doi: [10.1016/j.neuropharm.2008.06.067](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.067) PMID: [18657557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18657557/)
32. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204: 1257–65. PMID: [17502665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17502665/)
33. Mascanfroni ID, Takenaka MC, Yeste A, Patel B, Wu Y, Kenison JE, et al. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat Med*. 2015; 21: 638–46. doi: [10.1038/nm.3868](https://doi.org/10.1038/nm.3868) PMID: [26005855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26005855/)
34. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*. 2012; 36: 362–73. doi: [10.1016/j.immuni.2011.12.019](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.019) PMID: [22406269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22406269/)
35. Gocke AR, Cravens PD, Ben L-H, Hussain RZ, Northrop SC, Racke MK, et al. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol*. 2007; 178: 1341–1348. PMID: [17237380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237380/)
36. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med*. 2013; 19: 739–46. doi: [10.1038/nm.3179](https://doi.org/10.1038/nm.3179) PMID: [23624599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23624599/)
37. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006; 2: 409–430. doi: [10.1007/s11302-006-9003-5](https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5) PMID: [18404480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18404480/)
38. Beavis P a, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 2012; 33: 231–7. doi: [10.1016/j.it.2012.02.009](https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009) PMID: [22487321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22487321/)
39. Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol*. 2013; 171: 1–7. doi: [10.1111/j.1365-2249.2012.04623.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04623.x) PMID: [23199317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23199317/)
40. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M. Role of A2a Extracellular Adenosine Receptor-Mediated Signaling in Adenosine-Mediated Inhibition of T-Cell Activation and Expansion. *Blood*. 1997; 90: 1600–1610. PMID: [9269779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9269779/)
41. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007; 110: 1225–32. PMID: [17449799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17449799/)
42. Annunziato F, Romagnani S. The transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol*. 2010; 40: 3312–6. doi: [10.1002/eji.201041145](https://doi.org/10.1002/eji.201041145) PMID: [21110314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21110314/)
43. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006; 212: 28–50. PMID: [16903904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16903904/)
44. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2010; 11: 854–861. doi: [10.1038/ni.1912](https://doi.org/10.1038/ni.1912) PMID: [20676095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20676095/)
45. Gandhi R, Kumar D, Burns EJ, Nadeau M, Dake B, Laroni A, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2010; 11: 846–53. doi: [10.1038/ni.1915](https://doi.org/10.1038/ni.1915) PMID: [20676092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20676092/)
46. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev*. 2013; 65: 1148–61. doi: [10.1124/pr.113.007823](https://doi.org/10.1124/pr.113.007823) PMID: [23908379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23908379/)