

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



**PARTICIPACIÓN DE NEUROPILINA-1 EN LA FUNCIÓN  
INMUNE DE CÉLULAS T REGULADORAS EN LA  
INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A ALOINJERTOS**

**MAURICIO ALEJANDRO CAMPOS MORA**

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

**DIRECTORES DE TESIS:**

Dra. Karina Pino L.

Dr. Óscar Cerda A.

2020

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

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

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

**MAURICIO ALEJANDRO CAMPOS MORA**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 08-01-2020.

**Dr. Óscar Cerda A.**

Director de Tesis

Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**Dra. Karina Pino L.**

Directora de Tesis

Centro de Investigación e Innovación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes

**COMISION EVALUADORA DE TESIS**

**Dra. Fabiola Osorio**  
Presidente de Comisión

**Dra. Lisette Leyton**

**Dra. Maria Rosa Bono**

**Dra. M<sup>a</sup> Isabel Yuseff**

*A Claudia, Ana Luisa y René.*

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

En primer lugar, a mi familia por ser un apoyo fundamental e incondicional en mi vida, siempre dispuestos a brindarme una mano. A mi madre Ana Luisa, por todo el esfuerzo y postergación que significó darnos educación, por sus sabios consejos, su desvelo y cariño. A mi padre René, por todo su sacrificio y entrega, su buen humor y su ejemplo a seguir. A ambos por su amor infinito. A mis hermanos Claudio y Carlos, por ser mi contraparte, cómplices y amigos incondicionales. A mi cuñada Nicole, por su fortaleza y por traernos a Cristóbal, una alegría inmensa para nuestra familia. A mi amor, Claudia, por llenar mi vida de momentos increíbles, por su amor y confianza, su apoyo imprescindible, por compartir este largo camino e iniciar juntos nuestro futuro. Por hacerme muy, muy feliz, ¡gracias mi vida!

A mis amigos de siempre: Jessa, Matías, Gabriel, Amanda, Silvia y Francisco, por su valiosa amistad y por todas las locuras vividas e historias que siempre atesoraré. A Fabián, por todos los años de amistad desde hace tanto tiempo. Por estar siempre para animarme, por ser parte de esta historia y de las muchas que vendrán.

A mis compañeros de grupo del laboratorio: Felipe, Carolina, Pamina, Darío, Tania, y Carla por su gran ayuda, apoyo y buenos momentos. A Patricia, Karinita y Roberto, de quienes aprendí muchísimo, son y seguirán siendo un gran ejemplo a seguir. A Rafael, Maria José y Noymar, por tantas memorables tardes de conversaciones y los mejores cafés. Y a todos los otros integrantes del Lab que aportaron al desarrollo de este proyecto. A José, Constanza, Ian, Diego, Jimena y Alhejandra, de la Universidad de Chile, por sus comentarios y ayuda para completar experimentos necesarios para esta tesis.

A mi tutora, Karina, por su guía y apoyo para realizar este trabajo. Por tantos años de formación, su infinita paciencia, por cada uno de sus comentarios críticos que permitieron sacar lo mejor de mí y hacer una investigación de calidad. A mi tutor, Óscar, por su paciencia, sus comentarios constructivos y su apoyo constante para realizar este trabajo. Gracias a ambos por formarme como científico.

Al Centro de Investigación e Innovación Biomédica, que fue el lugar donde me sentí a gusto, donde entablé buenas relaciones laborales y conocí a grandes personas. A todo el personal profesional y técnico que hizo posible el trabajo de esta tesis.

Y finalmente, gracias a todos aquellos que me ayudaron a creer y crecer durante el desarrollo de este proyecto. Con su ayuda, creo ser mejor científico y –espero– mejor persona.

## **AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES**

Esta Tesis de Doctorado se desarrolló bajo la tutoría de la Dra. Karina Pino en el Centro de Investigación e Innovación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes; bajo la tutoría y supervisión del Dr. Óscar Cerda en el Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Esta tesis fue posible gracias a los siguientes proyectos y becas:

Financiamiento otorgado a Karina Pino L.:

- FONDECYT 1160347

Financiamiento otorgado a Óscar Cerda A.:

- FONDECYT 1160518
- Millenium Nucleus of Ion Channel-Associated Diseases (MiNICAD), Iniciativa Científica Milenio, Subsecretaría de Economía y Empresas de Menor Tamaño, Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, Gobierno de Chile.

Financiamiento otorgado a Mauricio Campos M.:

- Beca CONICYT Doctorado Nacional, período 2015-2019.

**Parte de la investigación derivada de este trabajo o bien relacionada con éste, ha sido publicada en los siguientes artículos:**

**Manuscritos publicados:**

**Campos-Mora M.**, Contreras-Kallens P., Gálvez-Jirón F., Rojas M., Rojas C., Refisch A., Cerda O. and Pino-Lagos K. CD4+Foxp3+ T regulatory cells promote transplantation tolerance by modulating effector CD4+ T cells in a Neuropilin-1 dependent manner. *Frontiers in Immunology* (2019). Vol 10, Article 882. doi: 10.3389/fimmu.2019.00882

Oyarce K., **Campos-Mora M.**, Gajardo-Carrasco T. and Pino-Lagos K. Vitamin-C fosters the *in vivo* differentiation of peripheral CD4+ Foxp3- T cells into CD4+ Foxp3+ regulatory T cells but impairs their ability to prolong skin allograft survival. *Frontiers in Immunology* (2018). Vol 9, Article 112. doi: 10.3389/fimmu.2018.00112.

**Presentaciones a congresos internacionales:**

**Campos-Mora M.**, Oyarce KA., Contreras-Kallens P., Vergara D., Cerda O., Pino-Lagos K. Role of Neuropilin-1 in Foxp3+ Treg-dependent suppression mechanisms. XII Congress of the Latin American Association of Immunology (ALAI) – XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology (SMI). Cancún, Quintana Roo, Mexico, May 14-18, 2018

**Campos-Mora M.**, Gajardo T., Contreras-Kallens P., Cerda O., Pino-Lagos K. Role of Neuropilin-1 in Foxp3+ Treg-dependent suppression mechanisms. FASEB Science Research Conference on Autoimmunity. Saxtons River, Vermont, USA, July 9-14, 2017

**Presentaciones a congresos nacionales:**

**Campos-Mora, M.**; Galvez-Jirón, F.; Rojas, C.; Refisch, A.; Pino-Lagos, K. Marcadores de tolerancia inmune en trasplante de órganos: Exosomas de células T reguladoras y rol de Neuropilina-1. VII Congreso Chileno de Trasplante. Santiago, Chile. 2019

**Campos-Mora, M.;** Gajardo, T.; Contreras-Kallens, P.; Oyarce, K.; Pino-Lagos, K. Marcadores de tolerancia inmune en trasplante de órganos: Células T reguladoras y rol de Neuropilina-1. III Jornadas Científicas en Salud. Santiago, Chile. 2019

**Campos-Mora M.;** Gajardo, T.; Oyarce, K.; Contreras-Kallens, P.; Pino-Lagos, K. Rol of Neuropilin-1 in Foxp3+ Treg-dependent suppression mechanism. XXXI Annual Meeting Sociedad de Biología Celular de Chile (SBCCH). Puerto Varas, Chile. 2017

**Campos-Mora, M.;** Gajardo, T.; Contreras-Kallens, P.; Oyarce, K.; Pino-Lagos, K. Rol del receptor Neuropilina-1 en células T reguladoras Foxp3+ en la inducción de tolerancia a trasplantes. VI Congreso Chileno de Trasplante. Santiago, Chile. 2017

**Campos-Mora, M.;** Gajardo, T.; Contreras-Kallens, P.; Oyarce, K.; Pino-Lagos, K. Rol de Neuropilina-1 en células T reguladoras Foxp3+ en la inducción de tolerancia a trasplantes. II Jornadas Científicas en Salud. Santiago, Chile. 2017

**Campos-Mora, M.;** Gajardo, T.; Contreras-Kallens, P.; Pino-Lagos, K. Role of Neuropilin-1 in Foxp3+ Treg-dependent suppression mechanism. I Annual Meeting of Chilean Association of Immunology (ASOCHIN). Curauma, Valparaíso, Chile. 2017

## INDICE GENERAL

<b>1. INDICE DE FIGURAS</b> .....	10
<b>2. INDICE DE TABLAS</b> .....	12
<b>3. ABREVIATURAS</b> .....	13
<b>4. RESUMEN</b> .....	15
<b>5. ABSTRACT</b> .....	16
<b>6. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
6.1. Células T reguladoras: marcadores y mecanismos de función.....	17
6.1.1. Secreción de citoquinas anti-inflamatorias.....	19
6.1.2. Producción de vesículas extracelulares (EVs).....	20
6.1.3. Receptores de superficie con función supresora .....	21
6.2. Neuropilina-1 y la respuesta inmune.....	23
6.3. Trasplante de órganos y rechazo alógeno.....	26
6.4. Neuropilina-1 y tolerancia inmunológica.....	27
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>8. OBJETIVO GENERAL</b> .....	29
<b>9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	29
<b>10. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
<b>11. RESULTADOS</b> .....	43
<b>11.1. Obtención de animales con células Treg deficientes en Neuropilina-1</b> .....	43
<b>11.2. La deficiencia de Nrp1 no altera la expresión de otros marcadores característicos de células Tregs</b> .....	45
<b>11.3. La delección de Nrp1 en células Tregs Foxp3+ no afecta la capacidad inhibitoria en células T CD4+</b> .....	51
<b>11.4. Nrp1 en células Tregs Foxp3+ es necesaria para la modulación <i>in vitro</i> del fenotipo de células Tconv</b> .....	54
<b>11.5. Nrp1 contribuye a la función de células Tregs Foxp3+ contacto-independiente</b> .....	56
<b>11.6. Células Tregs Foxp3+ requieren Nrp1 para la inducción de tolerancia a trasplantes</b> .....	59
<b>11.7. Células Tregs requieren Nrp1 para modular el fenotipo de Tconv <i>in vivo</i></b> .....	62
<b>11.8. La deficiencia de Nrp1 en células Tregs altera su perfil de expresión de citoquinas</b> .....	65
<b>11.9. IL-10 participa en la modulación del fenotipo de células Tconv <i>in vitro</i></b> .....	68
<b>11.10. Células Tregs Nrp1+ disminuyen la frecuencia de células Tconv productoras de IFN-<math>\gamma</math> <i>in vivo</i></b> .....	71

11.11.	Células Tregs Nrp1+ convierten células Tconv a células T supresoras <i>in vivo</i> a través de tolerancia infecciosa. ....	73
11.12.	Células Tregs Foxp3+ producen EVs independiente de su expresión de Nrp1. ....	75
11.13.	Nrp1 está presente en EVs derivadas de células Treg <i>wt</i> . ....	78
11.14.	La deficiencia de Nrp1 no altera la presencia de marcadores de EVs derivadas de células Tregs Foxp3+. ....	80
11.15.	EVs derivadas de Treg <i>Nrp1KO</i> poseen función supresora deficiente <i>in vitro</i> . ....	82
11.16.	Medios condicionados derivados de la ultracentrifugación carecen de EVs y no poseen función supresora. ....	84
11.17.	EVs derivadas de células Tregs <i>wt</i> inducen tolerancia a injertos de piel <i>in vivo</i> . ....	88
12.	DISCUSION .....	91
13.	CONCLUSIONES .....	105
14.	MODELO PROPUESTO .....	106
15.	BIBLIOGRAFÍA .....	107

## 1. INDICE DE FIGURAS

<b>Figura A.</b> Mecanismos de supresión inmune de células Tregs Foxp3+.....	23
<b>Figura B.</b> Funciones conocidas de Nrp1 en células Tregs Foxp3+.....	26
<b>Figura 1.</b> Obtención de animales <i>Nrp1KO</i> condicionales a células Tregs Foxp3+ .....	44
<b>Figura 2.</b> La deficiencia de Nrp1 específica de Tregs Foxp3+ no altera la expresión de moléculas inmunomoduladoras.....	48
<b>Figura 3.</b> Análisis de expresión de marcadores inmunoregulatorios en animales <i>wt</i> , <i>het</i> y <i>Nrp1KO</i> mediante viSNE.....	50
<b>Figura 4.</b> La deficiencia de Nrp1 en células Tregs no altera su capacidad inhibitoria en ensayos de supresión <i>in vitro</i> .....	52
<b>Figura 5.</b> Nrp1 es requerida para la modulación de fenotipo <i>in vitro</i> de células T CD4+ convencionales mediado por Tregs Foxp3+.....	55
<b>Figura 6.</b> Nrp1 es requerida para la modulación de fenotipo <i>in vitro</i> y la función supresora en “ <i>transwell</i> ” de células Tregs sobre células Tconv.....	57
<b>Figura 7.</b> Las Treg <i>Nrp1KO</i> son incapaces de inducir tolerancia a largo plazo a trasplante de piel alogénica.....	61
<b>Figura 8.</b> Células Tregs Nrp1+ son requeridas para el incremento de expresión de Nrp1 y Eos por células Tconv durante la generación de tolerancia a trasplantes de piel.....	63
<b>Figura 9.</b> La ausencia de Nrp1 altera la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$ e IL-10 de células Tregs Foxp3+.....	66
<b>Figura 10.</b> IL-10 participa en la modulación del fenotipo de células Tconv <i>in vitro</i> .....	70
<b>Figura 11.</b> Células Tregs Nrp1+ modulan el perfil de secreción de citoquinas de Tconv durante la aceptación de trasplantes <i>in vivo</i> .....	72
<b>Figura 12.</b> Células Tregs Nrp1+ modulan la función inmune de Tconv durante la respuesta a trasplante <i>in vivo</i> .....	74

<b>Figura 13.</b> Las células Tregs Foxp3+ producen EVs independiente de su expresión de Nrp1.....	76
<b>Figura 14.</b> Nrp1 está presente en EV de células Treg <i>wt</i> .....	79
<b>Figura 15.</b> EV La deficiencia de Nrp1 no altera la presencia de marcadores canónicos de EVs derivadas de células Tregs Foxp3+.....	81
<b>Figura 16.</b> EV derivadas de células Tregs <i>Nrp1KO</i> tienen función supresora <i>in vitro</i> deficiente.....	83
<b>Figura 17.</b> Medios condicionados de células Tregs, provenientes de la purificación de EVs, están depletados de EVs.....	86
<b>Figura 18.</b> Inducción de tolerancia a aloinjertos mediada por EV derivadas de células Tregs <i>wt</i> .....	89
<b>Figura 19.</b> Nrp1 es requerida para la inducción de tolerancia a trasplantes mediada por células Tregs Foxp3+.....	106

## 2. INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Estatus de injertos de piel alogénica en animales Rag1-KO trasplantados.....60

**Tabla 2.** Número de células cultivadas, concentración relativa y tamaño aparente de las EVs determinado por NTA.....77

**Tabla 3.** Estado y sobrevivencia de trasplantes de piel en animales tratados con células Tregs *wt* o con EVs derivadas de células Tregs *wt* o Tregs *Nrp1KO*.....90

### 3. ABREVIATURAS

<b>ALIX:</b>	<i>ALG-2-interacting protein X</i> , proteína interactuante con ALG-2
<b>APC:</b>	<i>Allophycocyanin</i> , Aloficocianina
<b>APC-Cy7:</b>	<i>Allophycocyanin-Cyanine 7</i> , Aloficocianina-cianina 7
<b>BSA:</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CD:</b>	<i>Cluster of differentiation</i> , Grupo de diferenciación
<b>CFSE:</b>	Carboxifluoresceinasuccinimidilester
<b>CPA:</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>CTV:</b>	Trazador celular violeta
<b>CTLA-4:</b>	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i> , marcador de Tregs
<b>DCs:</b>	Célula Dendrítica
<b>DLS:</b>	<i>Dynamic Light Scattering</i> , Dispersión dinámica de luz
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA:</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>EV:</b>	Vesícula extracelular
<b>FACS:</b>	<i>Fluorescent-activated Cell Sorting</i> , Separación de células activado por fluorescencia
<b>FBS:</b>	Suero fetal bovino
<b>FITC:</b>	<i>Fluorescein-isothiocyanate</i> , Fluoresceina-isotiocianato
<b>Foxp3:</b>	<i>Forkhead box protein 3</i> , factor de transcripción
<b>F1:</b>	Ratón producto de camada entre C57Bl/6 y Balb/c
<b>HRP:</b>	Peroxidasa de rábano ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
<b>IB:</b>	Inmunoblot
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón-gamma
<b>IL:</b>	Interleuquina
<b>LPS:</b>	Lipopolisacarido
<b>LNd:</b>	Ganglios linfáticos drenantes
<b>MHC-I:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
<b>MHC-II:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
<b>MFI:</b>	Mediana de la intensidad de fluorescencia
<b>mRNA:</b>	ARN mensajero
<b>miRNA:</b>	microARN
<b>MV:</b>	Microvesícula
<b>Myt-C:</b>	Mitomicina-C
<b>NIR:</b>	<i>Near infrared</i> , cercano al infrarrojo
<b>NRS:</b>	<i>Normal rat serum</i> , suero normal de rata
<b>Nrp1:</b>	Neuropilina-1
<b><i>Nrp1KO</i>:</b>	Deficiente en el gen codificante para Nrp1 ( <i>knock-out</i> )
<b>NTA:</b>	<i>Nanoparticle tracking analysis</i> , Análisis de seguimiento de nanopartículas
<b>GFP:</b>	Proteína fluorescente verde
<b>PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PB:</b>	Fluoróforo Pacific Blue
<b>PBS:</b>	Amortiguador fosfato salino

<b>PE:</b>	<i>Phicoerythrin</i> , Ficoeritrina
<b>PerCP:</b>	<i>Peridinin chlorophyll</i> , ClorofilaPeridina
<b>PE-Cy7</b>	<i>Phicoerythrin-Cyanine 7</i> , Ficoeritrina-Cianina-7
<b>pLN:</b>	Ganglios linfáticos periféricos
<b>PS:</b>	<i>Post-sorting</i> , posterior a la separación por FACS
<b>Rag1KO:</b>	Animales deficientes en el gen activador de la recombinación-1 (Rag1)
<b>RIPA:</b>	Amortiguador de radioinmunoprecipitación
<b>RPMI:</b>	Medio de cultivo ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SEM:</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>Tconv:</b>	Célula T convencional CD4+Foxp3-
<b>TMB:</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>Treg:</b>	Célula T reguladora CD4+Foxp3+
<b>TSG101:</b>	<i>Tumor susceptibility gene 101</i> , gen de susceptibilidad tumor 101
<b>t-SNE:</b>	<i>t-distributed Stochastic Neighbor Embedding</i> , Incrustación estocástica de vecinos con distribución tipo-t
<b>viSNE:</b>	Visualización de t-SNE
<b>WT:</b>	<i>Wild-type</i> , fenotipo silvestre, sin mutaciones
<b>YFP:</b>	Proteína fluorescente amarilla
<b>2-ME:</b>	2-mercaptoetanol

#### 4. RESUMEN

Las células T reguladoras (Tregs) disminuyen la respuesta inmune, y su principal función es generar tolerancia hacia antígenos propios. Las células Tregs ejercen supresión a través de distintos mecanismos que involucran la expresión de superficie de moléculas co-inhibitorias, la producción de metabolitos anti-inflamatorios, la secreción de citoquinas y la liberación de vesículas extracelulares (EVs) con actividad supresora. Neuropilina-1 (Nrp1) es un receptor de membrana expresado en altos niveles en células Tregs, pero su contribución en la función de estas células no está del todo descrita. Considerando la relevancia clínica del uso de células Tregs humanas como terapia para tratar el rechazo a trasplante de órganos, es necesario elucidar sus mecanismos de función para aprovechar su potencial terapéutico.

En este trabajo se buscó determinar si Nrp1 participa en la función de células Tregs en la respuesta inmune a trasplantes mediada por células T convencionales (Tconv). Utilizando animales deficientes en *Nrp1* específicamente en células Tregs Foxp3+ (*Nrp1KO*), demostramos que la ausencia de Nrp1 no afecta la expresión de otros marcadores en células Tregs. En ensayos funcionales *in vitro*, se encontró que la función supresora contacto-independiente (*transwell*) de células Tregs *Nrp1KO* resultó ser deficiente. Tanto en los ensayos *in vitro* como en el modelo murino de trasplante de piel, se observó que las células Tregs requieren Nrp1 para ejercer función supresora y para inducir tolerancia a trasplantes alogénicos. Las células Tregs Nrp1+ fueron capaces de inducir la expresión de marcadores inmunoregulatorios (Nrp1 y Eos) y disminuir la producción de IFN- $\gamma$  en células Tconv en animales trasplantados. Estas células Tconv “moduladas” adquieren parcialmente función inmunoreguladora *ex vivo* a través de tolerancia infecciosa. Notablemente, se encontró que Nrp1 es necesaria en células Tregs para la producción de IL-10, y que IL-10 *per sé* gatilla la expresión de Nrp1 en células Tconv. Para determinar si la función disminuida de células Tregs *Nrp1KO* se debe a una alteración en la producción de EVs, se estudió la participación de Nrp1 en la secreción y función de EVs obtenidas de células Tregs. La deficiencia de *Nrp1* en células Tregs no afecta la secreción *in vitro* de EVs. Adicionalmente, Nrp1 se encontró presente en EVs derivadas de células Tregs *wt*, y no en aquellas provenientes de Tregs *Nrp1KO*. La función supresora *in vitro* y la capacidad de inducir tolerancia *in vivo* (modelo de trasplante de piel) de EVs derivadas de células Tregs *Nrp1KO* es menor en comparación con las EVs provenientes de Tregs *wt*.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que Nrp1 es clave en la función de células Tregs Foxp3+, en la modulación del fenotipo y función de células T CD4+ efectoras. Nrp1 controlaría la producción de IL-10 en las células Tregs y estaría involucrada en la expresión de Nrp1 y Eos por parte de células T CD4+ efectoras. Finalmente, Nrp1 estaría además jugando un papel importante en la supresión inmunológica de células Tregs mediada por la liberación de EVs, lo cual se demostró tanto en ensayos *in vitro* como en el modelo murino de trasplante de piel. El trabajo aquí expuesto entrega nuevos antecedentes del rol de Nrp1 en la supresión mediada por células Tregs y sus EVs. Comprender la participación de este receptor en los mecanismos de función de células Tregs abre nuevas interpretaciones sobre los procesos celulares y fisiológicos que modulan la respuesta inmune a trasplantes.

## 5. ABSTRACT

Regulatory T cells (Tregs) decrease the immune response. Their main function consists of generating tolerance towards self-antigens. Tregs cells exert suppression through different mechanisms that involve the surface expression of co-inhibitory molecules, the production of anti-inflammatory metabolites, the secretion of cytokines, and the release of extracellular vesicles (EVs) with suppressive activity. The membrane receptor Neuropilin-1 (Nrp1) is highly expressed in Tregs cells, but its contribution to the function of these cells is not fully described. Since the use of human Tregs has clinical relevance as a cell therapy to treat organ transplant rejection, it is necessary to elucidate their functional mechanisms to take advantage of their therapeutic potential.

This work sought to determine whether Nrp1 participates in the function of Tregs cells in the immune response to transplants mediated by conventional T cells (Tconv). Using mice deficient in Nrp1, specifically in Foxp3+Tregs cells (*Nrp1KO*), we demonstrate that the absence of Nrp1 does not affect the expression of other markers in Tregs cells. The contact-independent suppressive function (*transwell*) of *Nrp1KO* Tregs cells is deficient in *in vitro* functional assays. Tregs cells required Nrp1 to exert suppressive function and to induce tolerance to allogeneic transplants in both *in vitro* assays and the murine skin transplantation models. Nrp1+ Tregs cells induced the expression of immunoregulatory markers (Nrp1 and Eos) and decreased IFN- $\gamma$  production in Tconv cells in transplanted animals. These "modulated" Tconv cells partially acquire *ex vivo* immunoregulatory function through infectious tolerance. Notably, Nrp1 is necessary for the production of IL-10 in Tregs cells, and IL-10 *per se* triggers Nrp1 expression in Tconv cells. The participation of Nrp1 in the secretion and function of EVs obtained from Tregs cells was studied to determine whether *Nrp1KO* Tregs cells decreased function by altering the production of EVs. Nrp1 deficiency does not affect the *in vitro* secretion of EVs in Tregs cells. Also, Nrp1 is expressed in EVs derived from *wt* Tregs cells, but not in those derived from *Nrp1KO* Tregs cells. Both the *in vitro* suppressive function and the ability to induce *in vivo* tolerance (skin transplant model) of EVs derived from *Nrp1KO* Tregs cells were lower compared to the EVs derived from *wt* Tregs.

Together, these results indicate that Nrp1 is critical in the function of Tregs Foxp3+ cells in the modulation of the phenotype and function of CD4+ T effector cells. Nrp1 would control the IL-10 production of Tregs cells and would be involved in the expression of Nrp1 and Eos by CD4+ T effector cells. Finally, Nrp1 could also play an important role in the immune suppression of Tregs cells mediated by the release of EVs, in both *in vitro* assays and the murine model of skin transplantation. The work presented here offers new evidence of the role of Nrp1 in Tregs cell-mediated suppression and their EVs. Understanding the participation of this receptor in Tregs cell function mechanisms opens up new interpretations of the cellular and physiological processes that modulate the immune response to transplants.

## 6. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es la conjunción de todas las estructuras, células y procesos biológicos que protegen al organismo de agentes biológicos extraños y/o patógenos, distinguiendo entre células sanas y alteradas. Mientras que el sistema inmune innato se compone de células y moléculas originadas congénitamente en el organismo (receptores de especificidad fija), el sistema inmune adaptativo consta de diferentes tipos celulares con funciones especializadas, con receptores de especificidad variable debido a recombinación génica (1).

La respuesta inmune se inicia cuando las células presentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cell*) tales como células dendríticas y macrófagos, captan proteínas de estos agentes extraños y en presencia de señales de inflamación maduran y migran hacia ganglios linfáticos drenantes (LNd). En estos ganglios, exhiben antígenos provenientes de los agentes extraños en su superficie celular a células T vírgenes, a través de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*), iniciando la respuesta inmune adaptativa. En este contexto, las células T activadas proliferan y se diferencian en distintos sub-tipos dependiendo de factores como la naturaleza biológica del patógeno (viral o bacteriana), las señales de coestimulación y la presencia de citoquinas pro-inflamatorias, entre otras. Estas células T activadas migran al foco inicial de inflamación, donde ejercen su función efectora para eliminar la fuente del antígeno o agente extraño.

### 6.1. Células T reguladoras: marcadores y mecanismos de función

Las células T reguladoras (Treg) son un subtipo de célula T con una función opuesta: restaurar la homeostasis inmunológica una vez culminada la respuesta inmune, con el fin de evitar que células efectoras sobre-reativas dañen a células sanas del organismo (2). A diferencia de las células T vírgenes, las Treg son células comprometidas con un linaje regulador e inmuno-supresor, y están presentes en la sangre así como en distintos órganos. En condiciones normales, las células Treg mantienen la tolerancia inmune en tejidos periféricos del organismo, previniendo el inicio y progresión de patologías inmunológicas y auto-inmunidad (3). Además de presentar en su superficie altos niveles de CD25 (cadena- $\alpha$  del receptor de IL-2), las células Tregs son reconocidas a través la expresión del factor de

transcripción *Foxp3* (*Forkhead Box protein 3*), esencial para su desarrollo y su función (4-6). Si bien se han descrito células T con función supresora que no expresan *Foxp3*, como el caso de las células T reguladoras tipo 1 (Tr1) (7), el presente trabajo se enfocó en las células Tregs CD4+*Foxp3*+.

Las Tregs constituyen alrededor del 5-10% de las células T CD4+ presentes en la sangre y tejidos periféricos del organismo (8, 9), y se originan en el timo como una subpoblación de células T funcionalmente maduras, a partir de timocitos inmaduros en respuesta a estimulación con auto-antígenos (10). También pueden inducirse a partir de células T CD4+ en tejidos periféricos después de la exposición antigénica en condiciones específicas, como la mucosa intestinal en respuesta a microbiota y antígenos alimentarios (11, 12). Por otro lado, la expresión de *Foxp3* puede ser inducida en células T CD4+ activadas *in vitro* en presencia de citoquinas como IL-2, el factor de crecimiento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y metabolitos como el ácido retinoico (13). Por el contrario, las células T CD4+ maduras que no expresan *Foxp3* se consideran células T convencionales (Tconv, células T CD4+*Foxp3*-).

Para poder identificar certeramente estas células supresoras, fue clave el descubrimiento de *Foxp3* (14). Su importancia en células Tregs es evidente considerando que animales de la cepa “*scurfy*”, con una mutación de pérdida de función en *Foxp3*, carece completamente de células Tregs y desarrolla una enfermedad linfoproliferativa letal a las 3-5 semanas de edad (15, 16). De forma similar, pacientes que poseen mutaciones del gen ortólogo *FOXP3* presentan un amplio rango de manifestaciones autoinmunes consistentes con la carencia de células Tregs, que en su conjunto se denominan IPEX (síndrome de desregulación inmune, poliendrocrinopatía, enteropatía, ligado a cromosoma X) (17, 18).

Neuropilina-1 (Nrp1) es un receptor de superficie celular considerado como un marcador de células Tregs (19). Este marcador permitiría identificar entre las células Tregs *Foxp3*+ que provienen del timo (tTregs), que expresan altos niveles de Nrp1, y las células Tregs *Foxp3*+ inducidas desde células T CD4+ vírgenes, originadas en tejidos periféricos (pTregs) del organismo como la mucosa intestinal, que presentan bajos niveles de este receptor (20-22). Si bien los marcadores intracelulares no contribuyen a la identificación de estas células (viables) para usos posteriores, éstos han permitido identificar de forma más exhaustiva a los factores determinantes en la mantención del fenotipo inmunosupresor de

células Tregs. Entre ellos, el factor de transcripción Helios (codificado por el gen *Ikzf2*) está expresado de forma preferencial en células Tregs Foxp3+ (23), y esta expresión se confina principalmente a Tregs derivados del timo en humanos y en ratón (24, 25). La evidencia sugiere que este factor de transcripción se une a la región promotora de gen *Foxp3* y estabiliza su expresión (25). El factor de transcripción Eos se expresa preferencialmente en células Tregs, y el silenciamiento de *Ikzf4* (gen que codifica para Eos) resulta en pérdida de función supresora y un incremento en la producción de citoquinas inflamatorias (26). Eos forma un complejo proteico con Foxp3, requerido para el silenciamiento de genes pro-inflamatorios (26, 27). Se ha observado que en las células Tregs que pierden la expresión de Eos (Tregs “Eos-lábiles”) ocurre una re-programación celular a un fenotipo “pro-inflamatorio” caracterizado por secretar IL-2 e IL-17, y promoviendo la activación de DCs, todo esto sin alterar su expresión de Foxp3 (28). Esto sugiere que los niveles de expresión de Eos en células Tregs Foxp3+ sirven como un indicador de la “estabilidad” de su fenotipo supresor.

#### 6.1.1. Secreción de citoquinas anti-inflamatorias

Las células Tregs producen la citoquina IL-10, que es capaz de disminuir la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias por parte de APCs, tales como IL-12 e interferón(IFN)- $\gamma$  (29). Aunque distintos tipos celulares secretan esta citoquina, la delección específica de IL-10 en células Tregs Foxp3+ es suficiente para inducir patologías autoinmunes como colitis en animales (30, 31). Las Tregs Foxp3+ también secretan IL-10 *in vitro*, y esta secreción es mayor en presencia de células T CD4+ efectoras (30).

Las células Tregs también producen la citoquina TGF- $\beta$  (32). En tejidos periféricos, TGF- $\beta$  promueve la expresión de Foxp3 en células T vírgenes, lo que ha sido replicado durante la inducción de células Treg *in vitro* (33). Las células Tregs maduras producen TGF- $\beta$  para inhibir la activación y la proliferación de células T, modulando la respuesta inmunológica en trasplante de órganos y colitis, entre otras (34-40). IL-35 es otra potente citoquina inmunosupresora secretada por células Tregs, que es requerida por estas células para ejercer su actividad supresora tanto *in vitro* como *in vivo* (41, 42). IL-35 es capaz de inhibir la producción de IL-17 en células T efectoras y disminuir los síntomas de artritis en modelos murinos, además de incrementar los niveles de IL-10 producidos por células Tregs en el sitio de inflamación (43).

### 6.1.2. Producción de vesículas extracelulares (EVs)

Se ha establecido que la mayoría de las células secretan vesículas tanto en homeostasis como en condiciones patológicas (44), que participan en funciones biológicas importantes, actuando como medio de comunicación intercelular a través de mediadores presentes en la superficie o el lumen vesicular (45, 46). Estas vesículas pueden encontrarse en fluidos biológicos como leche materna, orina, sangre, líquido amniótico, fluido ascítico, fluido cerebroespinal o saliva, entre otros (47, 48), aunque también pueden encontrarse y obtenerse a partir del medio condicionado de células cultivadas *in vitro* (49).

Los exosomas son un tipo de vesícula de origen endosomal, de forma y diámetro regular (30-150 nm) que se forman por invaginación de la membrana de endosomas formando cuerpos multivesiculares (MVB), y los exosomas son liberados por la fusión de estos MVB con la membrana celular (50). En su formación participan los complejos de clasificación endosomal necesarios para el transporte (en inglés ESCRT), donde sucesivos complejos proteicos (ESCRT-0, -I, -II y -III) y varias proteínas accesorias son requeridas para deformar la membrana endosomal, reconocer las moléculas “para cargar” a la vesícula intraluminal, y efectuar la escisión vesicular (47). Otro tipo de vesículas son las microvesículas (100-1000 nm) que se forman por evaginación directa de la membrana celular (46), donde también se ha visto la participación de algunas proteínas de la familia ESCRT (Alix y TSG-101) regulando la formación de microvesículas hacia el exterior de la célula (47). Dado que estas vesículas son muy heterogéneas, donde tanto exosomas como microvesículas comparten características y composición de proteínas, se determinó que en su conjunto se denominen como vesículas extracelulares (EVs) (51).

La composición de EVs refleja en gran medida el de la célula parental, pero se ha descrito además que están enriquecidas en ciertas proteínas, como moléculas de adhesión (integrinas), de tráfico intracelular, de citoesqueleto ( $\beta$ -actina), de transducción de señales, citoquinas y quimoquinas (45). También se han encontrado diversos ácidos nucleicos como RNA mensajero (mRNA), RNAs de interferencia (microRNA) y otros tipos de RNA no codificantes (ncRNA) (52). Según las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), en cada fracción purificada de vesículas se sugiere confirmar la presencia de proteínas que definen a las EVs y su función (53). Entre ellas se encuentran

proteínas de transmembrana, como por ejemplo tetraspaninas, moléculas de adhesión celular e integrinas. También verificar proteínas citosólicas que también están enriquecidas en EVs, como por ejemplo proteínas que participan en la formación de MVB (Tsg-101, Alix, proteínas Rab). Además, se sugiere confirmar la presencia de proteínas asociadas con compartimentos distintos a la membrana plasmática o endosomas, que están subrepresentadas o ausentes en EVs, como proteínas de retículo endoplásmico (calnexina), componentes del Golgi (GM130), algunas proteínas citosólicas ( $\alpha$ -tubulina) y proteínas mitocondriales (citocromo C) (47, 49, 54). Las EVs también contienen componentes específicos que dependen de la naturaleza de la célula productora (55). Por ejemplo, EVs de células tumorales contienen antígenos tumorales; EVs derivadas de plaquetas contienen factores de coagulación; y EVs de DCs contienen complejos MHC-péptido (56).

Las células Tregs producen mayor cantidad de EVs en comparación a otros tipos de células T, y esta producción es modulada por cambios en calcio intracelular, hipoxia y por la presencia de IL-2 (52, 57). Las EVs contribuyen a su función reguladora, puesto que células Tregs deficientes en Rab27a y Rab27b (proteínas necesarias para la fusión entre MVB y membrana plasmática) son incapaces de secretar EVs e inhibir la proliferación *in vitro* de células T (57). Entre los efectos ejercidos por las EVs de células Tregs sobre células T convencionales, se encuentran la inhibición de la proliferación (57-59), la inhibición de producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  (57, 59, 60) y la conversión *in vitro* en células T CD4+ productoras de IL-10 (61). Además, las EVs de células Tregs inducen la conversión *in vitro* de DCs a un fenotipo tolerogénico productor de IL-10 (62). Por lo tanto, las EVs derivadas de Tregs son capaces de modular a células inmunitarias alterando su expresión génica, su producción de citoquinas y su función efectora.

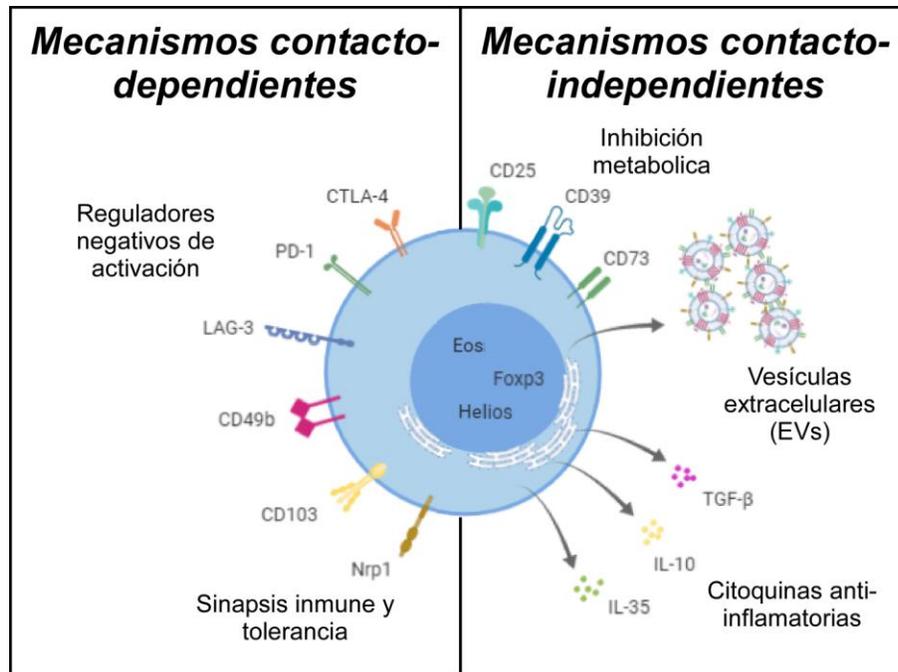
### 6.1.3. Receptores de superficie con función supresora

Células Tregs tanto humanas y de ratón expresan los receptores CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) y PD-1 (*Programmed cell Death-1*) de forma constitutiva (14, 63-65). Mientras que CTLA-4 inhibe la activación de células T durante la presentación antigénica (66), PD-1 interacciona con sus ligandos en la membrana de leucocitos y desencadena vías de señalización que culminan en la inducción de apoptosis de células inflamatorias (67, 68). La deficiencia de CTLA-4 en ratones resulta en letalidad temprana (tres a cuatro semanas de

edad) debido a una severa desregulación inmune, similar a la deficiencia en Foxp3 (69), por lo que la expresión de CTLA-4 en células Tregs juega un rol crucial en mantener la auto-tolerancia y homeostasis inmune (70). CD49b (integrina  $\alpha 2$ ) es una proteína que participa en la interacción célula-matriz extracelular (71). Si bien es un marcador descrito para células NK (72), CD49b se expresa en altos niveles en células Tregs activados presentes en piel, vasculatura y tejidos linfoides periféricos (73). Otra integrina asociada a células Treg es CD103 (integrina  $\alpha E$ ), expresada por ~30% de Tregs, donde está involucrada en la acumulación y retención de células Tregs en intestino (74-76), y las células Tregs CD103+ promueven la mejoría en modelos murinos de Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH) (77). Nrp1 en células Tregs Foxp3+ prolonga la interacción con DCs durante la presentación antigénica, favoreciendo la activación de células Tregs para mantener la tolerancia inmune, impidiendo la activación de células Tconv que expresan bajos niveles de Nrp1 (78).

Existen moléculas de membrana que median el proceso de supresión inmune produciendo factores solubles inhibitorios. Tal es el caso de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, proteínas de superficie que en su conjunto convierten el mediador pro-inflamatorio ATP (en su forma extracelular) en el mediador anti-inflamatorio adenosina (79). Si bien ambos marcadores se presentan en varios tipos de células leucocitarias y no-leucocitarias, CD39 y CD73 son altamente expresadas en células Tregs (80, 81) contribuyendo a su función, puesto que células Tregs deficientes en CD39 o en CD73 tienen una capacidad inmunosupresora disminuida (81, 82).

La participación de moléculas de membrana en la función supresora de EVs derivadas de células Tregs aun no se han descrito por completo. Se han encontrado diversas proteínas inmunomoduladoras, tales como CD73, CD25 y CTLA-4 (83). CD73 participa en la función supresora de las EVs de células Tregs a través de la producción de adenosina, inhibiendo la producción de citoquinas en células Tconv (60). CD25 y CTLA-4 también están presentes en EVs de células Tregs, pero el bloqueo con anticuerpos monoclonales anti-CD25 y anti-CTLA4 no altera la función supresora de estas EVs (60). Aún es necesario determinar la presencia de otras moléculas altamente expresadas por células Tregs (Nrp1, CD103, PD-1, entre otras) en EVs de células Tregs, así como no hay reportes que describan la participación de estos marcadores en la función de estas vesículas inmunosupresoras.



**Figura A. Mecanismos de supresión inmune de células Tregs Foxp3<sup>+</sup>.** Entre los que dependen del contacto célula-célula se encuentran la inhibición mediante reguladores negativos de la activación (CTLA-4, PD-1) y proteínas que participan en la sinapsis inmune (CD103, Nrp1). Entre los que no dependen del contacto celular, se encuentran la inhibición metabólica (CD25, CD39, CD73), la secreción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF-β, IL-35) y la secreción de vesículas extracelulares (EVs).

## 6.2. Neuropilina-1 y la respuesta inmune

Nrp1 es una glicoproteína de membrana que posee cinco dominios: tres dominios extracelulares (denominados a1/a2, b1/b2 y c) necesarios para la unión con ligandos y dimerización, un dominio transmembrana y un corto dominio intracelular conteniendo una secuencia motivo de unión PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) (84). Nrp1 fue inicialmente descrita como una proteína enriquecida en el mesencéfalo de ranas africanas (*Xenopus laevis*), donde formaba parte de capas de procesos gliales, dendritas y axones de neuronas retinales, mejor conocidos como “neuropilos” (85, 86). Tanto la delección del gen codificante para Nrp1 como la sobre-expresión sistémica de *Nrp1* en ratón bajo el control del promotor de β-actina resultaba en la muerte embrional debido a severas anomalías morfológicas, no sólo nerviosas sino también cardiovasculares, lo que sugiere un importante rol de Nrp1 en el desarrollo embrional (87).

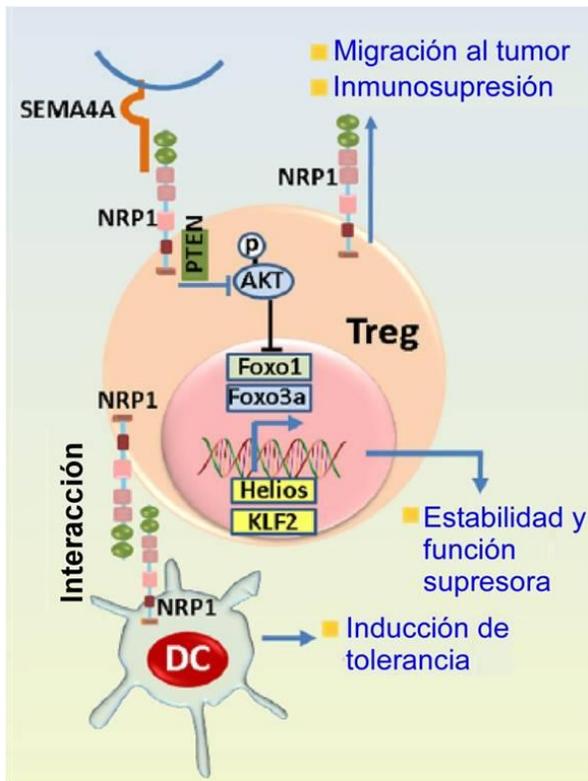
Nrp1 es un co-receptor de plexin-A1 para unir al ligando Semaforina 3A (Sema3A) en el desarrollo de axones sensoriales (88, 89), y que además posee afinidad por el factor de crecimiento vascular y endotelial (VEGF) funcionando como un co-receptor junto al receptor de VEGF (VEGF-R) (90, 91). Nrp1 también es capaz de unir al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), a algunos miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), a Galectina-1 (Gal-1) e incluso a otras moléculas de Nrp1 (92-98). Dado que Nrp1 es capaz de unir distintos ligandos y asociarse con sus receptores, no es sorprendente que se encuentre expresada en muchos tipos celulares y afecte a diversos procesos biológicos.

Nrp1 se expresa en células epiteliales de diferentes tejidos como el tracto gastrointestinal y páncreas, en neuronas, en melanocitos y keratinocitos, tanto de humanos como ratón (99, 100). También se expresa en células de varios tipos de tumores, como cáncer de mama, carcinoma de próstata, en melanoma y astrocitoma (101-104). Nrp1 también se encuentra presente en EVs derivadas de células de hepatocarcinoma, de melanoma, de cáncer de próstata y de colon (105-108), aunque su participación en mecanismos de progresión tumoral, metástasis y escape a la respuesta inmune aún no ha sido reportada.

En el sistema inmune, la función biológica de Nrp1 está caracterizada principalmente en células T, particularmente en células Tregs Foxp3+. Durante la presentación antigénica, Nrp1 en células Tregs prolonga la interacción con DCs y favorece la activación de células Tregs por sobre la activación de células Tconv, que expresan bajos niveles de Nrp1 (78). Análisis de transcriptómica mostraron que la expresión del gen *Nrp1* es controlada por Foxp3, junto con otras moléculas relacionadas a células Tregs como CD25 y CTLA-4 (19, 109). En animales con encefalitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino para estudiar esclerosis múltiple, la delección específica de *Nrp1* en células T CD4+ incrementa la severidad de la enfermedad, ocurriendo un aumento en la frecuencia de células T inflamatorias con perfil Th17 y disminuyendo la frecuencia de células Tregs Foxp3+ (110). Así mismo, en un modelo de tumor de melanoma, la deficiencia de *Nrp1* en células T CD4+ en ratones resulta en un retardo en la formación y progresión tumoral, asociado a una menor infiltración de células Tregs Foxp3+ y una mayor infiltración de linfocitos T CD8+ citotóxicos, lo que favorece la sobrevida de los animales al desafío tumoral (111).

Nrp1 también participa en la mantención del fenotipo de células Tregs (112). Esta proteína es un receptor para otra semaforina, Sema4A, expresada en células inmunes, y la interacción Nrp1:Sema4A recluta a la fosfatasa PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) e induce la localización nuclear del factor de transcripción Foxo3a, esencial para la correcta expresión de Foxp3 en células Tregs (113). En otro estudio, se encontró que células Tregs deficientes en Nrp1 producen mayores niveles de IFN- $\gamma$ , facilitando la respuesta inmune antitumoral (114). La deficiencia específica de Nrp1 en células Treg Foxp3+ no afecta su función en condiciones normales de homeostasis, pero altera de forma crítica su capacidad de prevenir colitis experimental y de disminuir la respuesta inmune antitumoral en ratones (113, 114).

La función supresora *in vitro* de células Tregs Nrp1-deficientes disminuye significativamente cuando las células Tregs y las células T respondedoras activadas están separadas por una membrana semi-porosa (“*transwell*”), que impide el contacto célula-célula, pero permite el paso de factores solubles de tamaño menor como metabolitos, citoquinas o EVs (113). Sin embargo, en ese reporte no se realizaron experimentos adicionales para esclarecer de qué forma Nrp1 podría estar involucrado con un cambio en la producción o función de estos factores solubles que den cuenta de una menor función supresora. En el sistema inmune, la presencia de Nrp1 sólo ha sido reportada en EVs derivadas de macrófagos en ratón (115), por lo que la presencia de Nrp1 en EVs derivadas de Tregs Foxp3+ (que expresan altos niveles de este marcador) aún está pendiente de elucidación.



**Figura B. Funciones conocidas de Nrp1 en células Tregs Foxp3<sup>+</sup>.** Nrp1 participa en la interacción entre DCs y células Tregs, promoviendo tolerancia inmunológica en homeostasis. Nrp1 también favorece la migración de células Tregs al microambiente tumoral y suprime la respuesta inmune anti-tumoral. Por otro lado, la interacción entre Nrp1 y su ligando Sema4a favorece la traslocación de Foxo3a al núcleo, contribuyendo a la supervivencia y estabilidad del fenotipo regulador de células Tregs (Modificado de Roy S. *et al.* (116)).

### 6.3. Trasplante de órganos y rechazo alógeno

El trasplante de órganos representa una oportunidad efectiva para restaurar la función de un tejido u órgano, luego de sufrir una lesión o falla incapacitante, resultando en una marcada mejora en la morbilidad y menor mortalidad del paciente (117). Si bien la aceptación inmune al trasplante a corto plazo es generalmente efectiva, la aceptación a largo plazo sigue siendo un desafío debido al rechazo inmunológico y a la toxicidad del tratamiento prolongado con fármacos inmunosupresores, que resultan en diversos efectos secundarios indeseados como falla renal, infecciones oportunistas y mayor incidencia de cáncer (118, 119).

Tomando en cuenta los procesos pro-inflamatorios que llevan al rechazo al trasplante alógeno, las propiedades inmunosupresoras de las células Tregs Foxp3<sup>+</sup> las convierten en un candidato terapéutico atractivo para tratar a pacientes con diversas patologías inflamatorias. A la fecha, más de 50 ensayos clínicos basados en terapia celular adoptiva de células Tregs

humanas han sido completados o están en curso como tratamiento para enfermedades auto-inmunes e inflamatorias (120). Estas terapias se realizan principalmente utilizando células Treg expandidas *in vitro* (aisladas e incrementadas en número mediante activación policlonal) (121). La meta final del área clínica de trasplantes corresponde a lograr una “tolerancia operacional”, en la que los pacientes logren una función estable del órgano injertado sin inmunosupresión en condiciones inmunocompetentes. Debido a la creciente preocupación respecto a la toxicidad de inmunosupresores y el rechazo crónico, existe un mayor interés en identificar estrategias alternativas a los inmunosupresores.

#### **6.4. Neuropilina-1 y tolerancia inmunológica**

En el caso específico de la respuesta inmune a trasplantes, se reportó que el tratamiento con células T CD4+Nrp1+ (en su mayoría células Tregs) incrementa la sobrevida de trasplante cardíaco alogénico en animales, a través de la inhibición de producción de citoquinas pro-inflamatorias y aumentando la población de células Tregs del animal receptor del trasplante (122). Esto se correlaciona con evidencia clínica, donde la presencia de Nrp1 en células T se propuso como un predictor del rechazo a trasplante. En un trabajo clínico que comparó biopsias de trasplante renal de pacientes tolerantes con pacientes en proceso de rechazo del órgano, se encontró que la expresión de Nrp1 de los leucocitos infiltrantes del trasplante era significativamente menor en los pacientes con rechazo, mientras que esta expresión fue mayor en las biopsias de pacientes con trasplante aceptado (123).

Entre los antecedentes que sugieren que Nrp1 participa en la generación de tolerancia mediada por células Tregs, también se han descrito resultados previos basados en el modelo murino de trasplante de piel. Utilizando animales receptores de injertos alogénicos, la transferencia celular adoptiva de células Tconv CD4+Foxp3-Nrp1- resulta en el rechazo del trasplante de piel; sin embargo, el tratamiento adicional con células Tregs Nrp1+ promueve la tolerancia a largo plazo de estos injertos de piel (124). En los ganglios linfáticos drenantes del injerto de animales tolerantes (tratados con células Tregs Nrp1+), las células Tconv exhibieron mayores niveles de expresión de las moléculas Nrp1 y Eos en comparación a las células Tconv de animales sin tratar, los cuales rechazaron el trasplante de piel (124). Dado que Nrp1 y Eos son marcadores asociados a un perfil regulador, esto sugiere que las células Tconv “moduladas” en los animales tolerantes podrían haber adoptado funciones inmunosupresoras

*in vivo* en presencia de las células Tregs Nrp1+, a través de un mecanismo que podría involucrar la expresión de Nrp1, pero a la fecha estas observaciones no han sido verificadas utilizando células Tregs *Nrp1*-deficientes.

En resumen, la evidencia presentada sugiere que: (1) la expresión de Nrp1 es importante para la función supresora de Tregs; (2) la producción de EVs en Tregs también es relevante para su efecto inmunomodulador; 3) tal como otros marcadores de Tregs descritos, Nrp1 podría estar presente en EVs derivadas de células Tregs; y 4) como marcador de tolerancia, Nrp1 podría participar en la función supresora por células Tregs. En su conjunto, estos antecedentes nos permiten generar la siguiente hipótesis de trabajo:

## 7. HIPÓTESIS

*La deficiencia de Nrp1 altera la función supresora de células T reguladoras, reduciendo su capacidad moduladora sobre células T convencionales y disminuyendo su inducción de tolerancia en un modelo de trasplante alogénico.*

## 8. OBJETIVO GENERAL

**Determinar la participación de Nrp1 en los mecanismos de función supresora de células Tregs y su capacidad para inhibir a células T CD4+ convencionales pro-inflamatorias que median la respuesta de rechazo a alo-injertos.**

## 9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Obtener, identificar y caracterizar marcadores en linfocitos de animales deficientes condicionales para Nrp1.**
  - 1.1. Obtener e identificar animales deficientes en Nrp1 (*Nrp1KO*) específicamente en células Treg Foxp3+.
  - 1.2. Evaluar la expresión de Nrp1, de marcadores inmunoregulatorios y marcadores pro-inflamatorios en células T de animales control (*wt*) o *Nrp1KO*.
- 2. Evaluar la contribución de Nrp1 en la función supresora de células Tregs.**
  - 2.1. Evaluar la función de Nrp1 en células Tregs sobre la proliferación de células Tconv, mediante ensayos de supresión *in vitro* utilizando células Tregs *wt* o Tregs *Nrp1KO*.
  - 2.2. Evaluar el rol de Neuropilina-1 en células Treg sobre la respuesta inmune de rechazo a alo-injertos de piel, utilizando células Tregs *wt* o Tregs *Nrp1KO*.
- 3. Determinar la participación de Nrp1 en la función inmune de EVs derivadas de células Tregs.**
  - 3.1. Obtener y caracterizar a EVs derivadas de células Tregs *wt* o Tregs *Nrp1KO*.
  - 3.2. Evaluar la función de Nrp1 en las EVs derivadas de células Tregs, mediante ensayos de supresión *in vitro* utilizando EVs de células Tregs *wt* o de células Tregs *Nrp1KO*.

3.3. Determinar el rol de Nrp1 en EVs de células Tregs sobre la respuesta inmune de rechazo a alo-injertos de piel, utilizando EV de células Tregs *wt* o células Tregs *Nrp1KO*.

## 10. MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos:** Medio de cultivo RPMI 1640, suero fetal bovino (FBS), azul de tripano 0,4%, L-glutamina 200 mM, penicilina 10.000 U/mL estreptomina 10 mg/mL, HEPES 1M, EDTA 0,5 M y amortiguador fosfato salino (PBS:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,06 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,97 mM, NaCl 155,17 mM, pH 7,4) se obtuvieron de Gibco Life Technologies. Brefeldina-A (5 mg/mL) y amortiguador de lisis de glóbulos rojos (*RBC Lysis Buffer*) se obtuvieron de BioLegend. El trazador de proliferación celular CellTrace<sup>TM</sup> Violet se obtuvo de Invitrogen. 2-Mercaptoetanol ( $\beta$ -mercaptoetanol) se obtuvo de Millipore. Mitomicina-C se obtuvo de Calbiochem. La citoquina recombinante murina IL-10 (rmIL-10) se obtuvo de Preprotech. PMA (del inglés *Phorbol 12-myristate 13-acetate*), Ionomicina (de *Streptomyces conglobatus*) y la albúmina de suero bovino (BSA) se obtuvieron de Sigma Aldrich.  $\text{MgCl}_2$  (25  $\mu\text{M}$ ), el amortiguador TAE (40 mM Tris, 40 mM acetato, 1 mM EDTA, pH 8,3) y agarosa (grado biología molecular) se obtuvieron de Merck. El suero normal de rata (NRS) se obtuvo de Stem Cell. El reactivo para tinción de gel de DNA SYBR<sup>®</sup> Safe se obtuvo de ThermoFisher.

**Ratones:** Se utilizaron animales macho y hembra de entre 6 a 8 semanas. Las cepas de ratón *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> (125), *Nrpl*<sup>flox/flox</sup> (126) y Rag1-KO (127) se obtuvieron desde Laboratorios Jackson (The Jackson Laboratory, EE.UU). Las cepas de ratón C57Bl/6 (haplotipo H-2<sup>b</sup>), Balb/c (haplotipo H-2<sup>d</sup>), F1 (C57Bl/6 x Balb/c, haplotipo H-2<sup>b/d</sup>) y *Foxp3*<sup>GFP</sup> CD45.1+ (128) se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos en las dependencias del bioterio ubicado en la Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. Todos los procedimientos fueron revisados, aprobados y realizados de acuerdo a las recomendaciones del Comité Ético Científico (CEC) de la Universidad de los Andes, con el respaldo del Comité de Bioética sobre investigación en Animales (CBA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

**Genotipificación de los animales *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>, *Nrpl*<sup>flox/flox</sup> y *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrpl*<sup>flox/flox</sup>:** Muestras de tejido (punta de cola) de ratones C57Bl/6 (B6), *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>, *Nrpl*<sup>flox/flox</sup> y de su descendencia, se incubaron en 600  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis alcalino (50 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) a 95°C por 2 horas. Luego a temperatura ambiente, se agitaron por 5-10 segundos y se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del amortiguador estabilizador (1M Tris-HCl, pH 8,0), mezclando invirtiendo el tubo cuidadosamente. Los tubos se centrifugaron a 10.000 x g por 2 min y se dejaron reposar. A partir del sobrenadante con DNA genómico, este DNA templado se utilizó

para amplificar las secuencias específicas utilizando el kit TopTaq™ Master Mix PCR (obtenido de Qiagen), siguiendo las instrucciones de manufacturación. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizó utilizando 2 µL de DNA genómico (100 ng de DNA), 7,5 µL de TopTaq Master Mix 2X (conteniendo DNA Polimerasa, amortiguador de PCR y dNTPs); 1,5 µL de Amortiguador de carga CoralLoad; 0,75 µL partidor Forward (0,5 µM concentración final); 0,75 µL partidor Reverse (0,5 µM concentración final); 0,9 µL de solución MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM concentración final); y 1,6 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, para un volumen final de 15 µL por reacción. El programa configurado en el termociclador convencional fue el siguiente: un ciclo de 95°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 20 s, 56°C por 15 s, 72°C por 10 s, 1 ciclo de 72°C por 2 min, y mantención a 4°C. Las muestras se cargaron en un gel de Agarosa al 2% en amortiguador TAE con tinción de gel de DNA SYBR® Safe previamente solidificado y enfriado. Luego que las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa, las bandas resultantes se visualizaron y registraron en un transiluminador UV.

Las secuencias de los partidores son las siguientes:

Partidor	Secuencia 5' --> 3'	Tipo de partidor
Identificación de <i>Foxp3</i> <sup>WT</sup> o <i>Foxp3</i> <sup>YFP-Cre</sup>		
14125	CCT AGC CCC TAG TTC CAA CC	Wild Type Forward (WT-F)
14126	AAG GTT CCA GTG CTG TTG CT	Wild Type Reverse (WT-R)
16250	AAG ATG TGA GGG ACT ACC TCC TGT A	Mutante Forward ( <i>mut</i> F)
16251	TCC TTC ACT CTG ATT CTG GCA ATT T	Mutante Reverse ( <i>mut</i> R)
Identificación de <i>Nrp1</i> <sup>WT</sup> o <i>Nrp1</i> <sup>flox/flox</sup>		
19849	AAG GAG TGG CAC AGC ATC TT	Forward (Nrp1 F)
19850	TCA CAC CCA AAC TTC CTT CC	Reverse (Nrp1 R)

**Fenotipificación de los animales *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>, *Nrp1*<sup>flox/flox</sup> y *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrp1*<sup>flox/flox</sup>:**  
Muestras de sangre de cola de ratones C57Bl/6 (B6), *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>, *Nrp1*<sup>flox/flox</sup> y de su descendencia, se depositaron en tubos con Heparina y centrifugadas a 400 x g por 5 min, 4°C. Luego de eliminar el sobrenadante, cada muestra se resuspendió en 500 µL de amortiguador de lisis de glóbulos rojos (*RBC Lysis Buffer*) e incubó por 3 min a temperatura ambiente. Las

células se centrifugaron a 400 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 5 mL de PBS para eliminar residuos del amortiguador de lisis. Luego, las células se centrifugaron a 400 x g por 5 min y resuspendieron en amortiguador PBS. Finalmente, las células de cada muestra se analizaron mediante citometría de flujo, utilizando un equipo FACSCanto II (BD Biosciences). Se colectaron por experimento aproximadamente 10.000 células por muestra. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FlowJo versión 10.1.

**Análisis de expresión de marcadores por citometría de flujo:** Se procedió con la eutanasia de ratones de genotipo *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> (*wt*), *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrp1*<sup>+/*flox*</sup> (*het*) y *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrp1*<sup>flox/*flox*</sup> (*Nrp1KO*) y se extrajeron linfonodos periféricos (LNp), bazo y una muestra de sangre periférica colectada en tubos con heparina. Los órganos se disgregaron a través de una malla de filtro de poro de 40 µm (*cell strainer*) utilizando amortiguador PBS 5% FBS. La muestra de sangre y las células de los tejidos se centrifugaron a 400 x g por 5 min, resuspendidas en amortiguador de lisis de glóbulos rojos (*RBC Lysis Buffer*) e incubadas por 3 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron nuevamente a 400 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 25 mL de PBS para eliminar residuos del amortiguador de lisis. Finalmente, las células se centrifugaron a 400 x g por 5 min y resuspendieron en amortiguador PBS 5% FBS. Luego de contar las células por exclusión de células muertas usando azul de tripano 0,4% p/v, se depositaron ~1 x 10<sup>6</sup> células por pocillo en placas de 96 pozos para citometría, se centrifugaron a 400 x g por 2 min y se marcaron con los anticuerpos de superficie respectivos. Este marcaje se realizó por 30 min a 4°C en oscuridad, finalizando con dos lavados con PBS 5% FBS y centrifugando a 400 x g por 2 min, 4°C. Luego, las células se fijaron y permeabilizaron usando el kit *Fixation/Permeabilization Staining Kit* (obtenido de Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de lavar las células con el amortiguador de permeabilización (*Permeabilization Buffer*), las células se incubaron con amortiguador de permeabilización 10% NRS por 15 min a temperatura ambiente antes de ser marcadas con los anticuerpos para moléculas intracelulares. Este marcaje intracelular se realizó por 30 min a 4°C en oscuridad, finalizando con dos lavados con amortiguador de permeabilización y centrifugando a 400 x g por 5 min, 4°C. Para análisis de producción de citoquinas, ~1 x 10<sup>5</sup> células se estimularon previamente con 50 ng/mL PMA y 1 µg/mL ionomicina en medio RPMI 10% FBS y 5 µg/mL Brefeldina-A por 4 h a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% en un incubador. Las células se lavaron con amortiguador PBS 5% FBS, se

marcaron con anticuerpos para moléculas de superficie, se fijaron y permeabilizaron. Luego, las células se marcaron con los anticuerpos para citoquinas, siguiendo el mismo procedimiento de tinción intracelular. Las células se analizaron mediante citometría de flujo, utilizando un equipo FACSCanto II (BD Biosciences). Se colectaron por experimento 100.000 células por muestra. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FlowJo versión 10.1.

Los anticuerpos de citometría utilizados son los siguientes:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Clon</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>	<b>RRID</b>
<b><i>Superficie</i></b>				
CD4	RM4-5	PE-Cy7	Biolegend	AB_312729
CD4	RM4-5	APC-Cy7	Biolegend	AB_312727
CD8	53-6.7	FITC	Biolegend	AB_312744
CD19	6D5	Brilliant Violet™ 510	Biolegend	AB_2562136
CD25	PC61	PerCP	Biolegend	AB_893290
CD25	PC61	APC-Cy7	Biolegend	AB_830744
CD45	30-F11	PE-Cy7	Biolegend	AB_312978
CD45	30-F11	Pacific Blue™	Biolegend	AB_493535
CD45.1	A20	APC	Biolegend	AB_313502
CD45.1	A20	Pacific Blue™	Biolegend	AB_492866
CD45.2	104	FITC	Biolegend	AB_313442
CD45.2	104	Pacific Blue™	Biolegend	AB_492872
I-A/I-E	M5/114.15.2	FITC	Biolegend	AB_313321
I-A/I-E	M5/114.15.2	PE	Biolegend	AB_313323
CD103	2E7	PE	Biolegend	AB_1133989
CD49b	HMa2	PE-Cy7	Biolegend	AB_2561460
Nrp1	3E12	PE	Biolegend	AB_2561927
<b><i>Intracelular</i></b>				
Helios	22F6	FITC	Biolegend	AB_10549181
T-bet	4B10	PE	Biolegend	AB_2028583
GATA-3	16E10A23	PerCP-Cy5.5	Biolegend	AB_2563218
Eos	ESB7C2	eFluor™ 660	ThermoFisher	AB_2574242
RORγT	B2D	APC	ThermoFisher	AB_2573254
Foxp3	FJK-16s	AlexaFluor™ 488	eBioscience	AB_469916
Foxp3	FJK-16s	PE-Cy5.5	eBioscience	AB_11218094
<b><i>Citoquinas</i></b>				
IFN-γ	XMG1.2	FITC	Biolegend	AB_315399
IFN-γ	XMG1.2	PE	Biolegend	AB_315401
IL-17A	TC11-18H10.1	PE	Biolegend	AB_315463
IL-17A	TC11-18H10.1	APC	Biolegend	AB_536017
IL-10	JES5-16E3	PE	Biolegend	AB_315361
IL-10	JES5-16E3	Brilliant Violet™ 421	Biolegend	AB_10900417

Para la visualización de datos de citometría de flujo multiparamétrica, se utilizó el software online Cytobank ([www.cytobank.org](http://www.cytobank.org)) con su herramienta viSNE (del inglés *visualization of t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) que reduce la dimensionalidad de los datos y genera un mapa bidimensional, en el que la distancia entre células representa la distancia entre los parámetros celulares analizados en un espacio de alta dimensionalidad (129). Por lo tanto, las células que son fenotípicamente similares para los marcadores analizados estarán más cercanas en un mapa de viSNE bidimensional (130, 131). Para generar los mapas bidimensionales, las muestras se cargaron en la plataforma online Cytobank, se seleccionaron las células vivas unitarias basada en tamaño y granulosidad. Entonces, entre 150.000 y 160.000 eventos se extrajeron sub-muestras aleatorias y representativas desde los datos cargados. Luego del sub-muestreo, el análisis de viSNE se realizó a parámetros por defecto (1.000 iteraciones, semilla aleatoria, índice de perplejidad = 30, índice theta = 0.5). Los mapas bidimensionales de viSNE se visualizaron usando la interfaz de Cytobank, la que se empleó para generar las figuras en código de color por nivel de expresión de los marcadores analizados (opción por defecto: menor expresión en color azul, mayor expresión en color rojo).

**Preparación de medio de cultivo libre de EVs:** El medio de cultivo libre de EVs se preparó como se ha descrito previamente (49). Brevemente, se preparó medio RPMI con FBS 10% v/v, Penicilina/Streptomycin 1% v/v, HEPES 1% v/v, 2-mercaptoetanol 0,01% v/v (de ahora en adelante, RPMI completo o cRPMI), pero esta vez suplementado con 20% FBS. Este medio se sometió a ultracentrifugación (al menos 16 h) a 100.000 x g en tubos de ultracentrífuga de polialómero de capacidad 11,5 mL (obtenidos en Beckman Coulter) en una ultracentrífuga Sorvall WX+ (Thermo Scientific), seguido de una filtración utilizando filtros de tamaño de poro 0,22 µm (obtenidos en Millipore) bajo condiciones de esterilidad. Luego, el medio depletado de EVs se diluyó con un volumen adicional de medio RPMI puro sin complementar, para alcanzar una concentración final de 10% FBS (desde ahora medio cRPMI libre de EV).

**Preparación y aislamiento de EVs:** A partir de animales Foxp3<sup>Cre/YFP</sup> y utilizando los procedimientos descritos anteriormente, mediante “*cell sorting*” se obtuvieron células Tconv CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> y células Tregs Foxp3<sup>Cre/YFP+</sup> de genotipo *wt*, *het* y *Nrp1KO*. Estas células se cultivaron en medio cRPMI libre de EV a 1 x 10<sup>6</sup>/mL (por pozo) en placas de cultivo de 24

pocillos (fondo plano), previamente sensibilizadas (“*coated*”) con una solución de PBS con anti-CD3 (clon 145.2c11, Biolegend) a 5 µg/mL y con anti-CD28 (clon 37.51, Biolegend) a 2 µg/mL a 37°C por 2 h. Luego de 72 h, se colectaron sobrenadantes de los cultivos y las EVs se obtuvieron como se ha descrito previamente (49). Brevemente, las células, restos celulares y cuerpos apoptóticos se removieron de los sobrenadantes por una serie de centrifugaciones a 300 x g por 5 min, a 2.000 x g por 20 min, y a 10.000 x g por 30 min. Luego de un paso de filtración utilizando un filtro de poro 0,22 µm (obtenido de Millipore), las EVs sedimentaron mediante ultracentrifugación a 100.000 x g por 90 min a 4°C en una ultracentrífuga Sorvall WX+ (Thermo Scientific). El medio de cultivo sobrenadante de la ultracentrifugación (medio condicionado libre de EVs, o med. cond.) se mantuvo a -80°C para análisis posteriores. Las EVs sedimentadas se resuspendieron en amortiguador salino PBS y ultracentrifugadas nuevamente. Las EVs se resuspendieron en ~100 µL de PBS y mantenidas a -80°C hasta su uso y análisis posteriores.

**Ensayo de supresión *in vitro*:** Se extrajo el bazo de animales C57Bl/6, se disgregó y se lisaron los glóbulos rojos. Estos esplenocitos se marcaron con anticuerpos contra I-A/I-E (MHC-II) y CD3, usando el procedimiento mencionado anteriormente. Se extrajeron el bazo y ganglios linfáticos periféricos de animales *Foxp3*<sup>GFP</sup>CD45.1+, se disgregaron y lisaron los glóbulos rojos usando los métodos mencionados anteriormente. Luego, las células T CD4+ se enriquecieron mediante purificación inmuno-magnética utilizando el *Mouse CD4+ T Cell Isolation Kit* (obtenido de Stem Cell), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, estas células T CD4+ enriquecidas se marcaron con anticuerpos contra CD4, CD25 y Nrp1 usando el procedimiento mencionado anteriormente. A partir de animales *Foxp3*<sup>Cre/YFP+</sup>CD45.2+ con genotipo *wt*, *het* o *Nrp1KO* se extrajeron el bazo y ganglios linfáticos periféricos, se disgregaron y lisaron los glóbulos rojos. Las células T CD4+ se enriquecieron mediante purificación inmunomagnética utilizando el mismo método y se marcaron con anticuerpos contra CD4. Entonces, todas las suspensiones celulares se filtraron por una malla de filtro de poro de 40 µm (*cell strainer*) y analizadas usando un equipo *Cell Sorter FACS Aria II Fusion* (BD Biosciences) para purificar mediante “*cell sorting*” específicamente a: (1) la población de esplenocitos MHC-II+CD3-, de ahora en adelante llamadas APC; (2) la población de células T CD4+CD25-Nrp1-Foxp3<sup>GFP-</sup>, de ahora en adelante llamadas células Tconv; (3) la población de células T CD4+Foxp3<sup>Cre/YFP+</sup>, de ahora

en adelante llamadas células Treg *wt* (*Nrp1*<sup>+/+</sup>), *het* (*Nrp1*<sup>+/*flox*</sup>) o *Nrp1KO* (*Nrp1*<sup>*flox/flox*</sup>), respectivamente. Luego de la purificación, las células Tconv se marcaron por 10 min a 37°C con 5 µM CTV, y se lavaron dos veces con RPMI 10% FBS para eliminar exceso de marca bajo condiciones de esterilidad. Las APC se trataron con Mitomicina-C a 50 µg/mL por 20 min a 37°C, para evitar su posterior proliferación, y se lavaron dos veces con RPMI 10% FBS. Finalmente, células Tconv (50.000/pozo) se cultivaron solas (condición Sin Estimular), o activadas con APCs (100.000/pozo) y 5 µg/mL anti-CD3 (clon 145-2c11, Biolegend) (condición Activadas), solas o co-cultivadas con diferentes proporciones de células Treg *wt*, *het* o *Nrp1KO* (proporciones Treg:Tconv desde 1:1 a 1:4), en placas de 96 pozos (fondo redondo) en 200 µL de medio cRPMI a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. En algunos experimentos, se agregó la citoquina rmIL-10 a una concentración final de 10 ng/mL. En otros experimentos, se agregó PBS (vehículo) o EVs derivadas de células Tconv, células Tregs *wt* o Tregs *Nrp1KO* (concentración final 5 µg/mL) al inicio del cultivo. Luego de 72 h, las células se cosecharon, se lavaron con PBS 5% FBS y se marcaron con anticuerpos contra las moléculas de superficie CD4, CD45.1 y Nrp1 utilizando el procedimiento mencionado anteriormente. La proliferación *in vitro* de las células Tconv CD45.1+ se analizó por dilución del marcador CTV por citometría de flujo utilizando el citómetro FACSCanto II (BD Biosciences). El porcentaje de supresión se calculó como se ha descrito previamente (132). Brevemente, se usó la fórmula descrita a continuación, donde  $DI_{Treg}$  representa el índice de división (del inglés *Division Index*) de las células respondedoras incubadas con células Treg, y  $DI_{Tresp}$  representa el índice de división de las células respondedoras activadas sin Tregs.

$$\%Supresión = \left( 1 - \frac{DI_{Treg}}{DI_{Tresp}} \right) * 100\%$$

Para los ensayos de supresión a través de una membrana semiporosa (“*transwell*”), se utilizaron placas HTS Transwell® de 96 pocillos con tamaño de poro de 0.4 µm (Cat. No. CLS3381, Corning). Las células Tconv marcadas con CTV (25.000/pozo) se cultivaron solas, o activadas con APC (50.000/pozo) y 2 µg/mL anti-CD3 en 150 µL de cRPMI en la cámara inferior de la placa receptora, y luego de colocar encima el inserto con la membrana semiporosa, se adicionaron células Treg *wt*, *het* o *Nrp1KO* a diferentes proporciones (Treg:Tconv desde 1:2 a 1:4) activadas con células Tconv (12.500) y APCs (25.000) y anti-CD3 en la

cámara superior en 100 µL de cRPMI por 72 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. La proliferación de las células Tconv CD45.1+ se analizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

**Trasplante de piel:** El procedimiento de trasplante de piel se realizó como se ha descrito previamente (124, 133) y bajo condiciones de esterilidad. Se sometieron a eutanasia animales F1 (C57Bl/6 x Balb/c, haplotipo H-2<sup>b/d</sup>) y la piel de la cola se extrajo cuidadosamente utilizando pinzas y escarpelo. Se cortaron trozos uniformes (~1 cm<sup>2</sup>) y se dispusieron en gasa estéril con amortiguador salino PBS toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se inspeccionaron los animales Rag1-KO receptores, se determinó su peso y se anestesiaron con una solución de amortiguador salino PBS con ketamina 90 mg/kg peso animal (Ketamine, Alfasan Lab) y xilazina 10 mg/kg peso animal (Xylavet, Alfasan Lab) por inyección intraperitoneal (i.p.). Los injertos de piel de cola de ratón F1 se trasplantaron y suturaron en la región dorsal de los animales Rag1-KO utilizando instrumental quirúrgico autoclavado. La sobrevida de los injertos se monitoreó tres veces a la semana, y se consideraron rechazados cuando el 80% del injerto original desapareciera o presentase necrosis.

**Transferencia celular:** A partir de animales *Foxp3*<sup>GFP</sup>CD45.1+ y *Foxp3*<sup>YFP-Cre</sup>CD45.2+ con genotipo *wt*, *het* o *Nrp1KO*, y utilizando los procedimientos mencionados anteriormente de purificación y “*cell sorting*”, se obtuvieron células Tconv y células Tregs. Un día antes de recibir el trasplante de piel, los animales Rag1-KO recibieron una dosis de células Tconv CD45.1+ (150.000/animal), o una dosis de células Tconv CD45.1+ (150.000/animal) junto con Tregs *Foxp3*<sup>YFP-Cre</sup>CD45.2+ (50.000/animal) provenientes de animales *wt*, o *het*, o *Nrp1KO* mediante inyección intravenosa (i.v.). En algunos experimentos, ratones que recibieron células Tconv CD45.1+, recibieron además una dosis subcutánea (s.c.) de 100 µL de PBS (vehículo) o PBS conteniendo 5 µg de EVs derivadas de células Tregs *wt* o células Tregs *Nrp1KO*, en la región dorsal adyacente al sitio donde se injertaría un trasplante de piel al día siguiente. A menos que se mencione expresamente lo contrario, luego de 20 días post-trasplante se procedió con la eutanasia de los ratones y los LN<sub>d</sub> se extrajeron y analizaron por citometría de flujo, mediante los procedimientos mencionados anteriormente.

**Ensayo de supresión *ex vivo*:** Las células Tconv CD45.1+ se purificaron y se administraron vía i.v. a animales Rag1-KO solas [“Grupo (i)”], o se co-transfirieron junto con Tregs CD45.2+ provenientes de animales con genotipo *wt* [“Grupo (ii)”] o genotipo *Nrp1KO*

[“Grupo (iii)”], respectivamente, y al día siguiente recibieron un trasplante de piel. Los LNd de los animales se obtuvieron para procesar y analizar las células por grupo experimental. Utilizando los procedimientos mencionados anteriormente, las células de los LNd se marcaron con anticuerpos para las moléculas CD4, CD45.1, y tinción de viabilidad utilizando el reactivo ZombieDye™ NIR (obtenido de Biolegend) y las células T CD4+CD45.1+ vivas provenientes de los LNd de animales Rag1-KO trasplantados se purificaron mediante “*cell sorting*” (de ahora en adelante, células Tconv CD45.1+ *ex vivo*). Estas células se probaron para analizar una posible capacidad supresora *ex vivo* frente a otras células Tconv CD45.2+ frescas marcadas con CTV (de ahora en adelante, células Tconv CD45.2+ frescas), activadas en presencia de APCs tratadas con Mitomicina-C y anti-CD3, a proporción de Tconv CD45.1+ *ex vivo*: Tconv CD45.2+ frescas de 1:1 en cRPMI en placas de 96 pocillos (fondo redondo) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 72 h, la proliferación de las células Tconv CD45.2+ frescas se analizó por dilución del marcador CTV mediante citometría de flujo, como se ha descrito anteriormente. Se usó la fórmula descrita a continuación, donde  $DI_{frescas+ex-vivo}$  representa el índice de división (del inglés *Division Index*) de las células respondedoras Tconv CD45.2+ frescas activadas con células Treg *wt* control o con Tconv CD45.1+ aisladas *ex vivo* desde los animales Rag1-KO trasplantados, y  $DI_{fres h}$  representa el índice de división de las células respondedoras Tconv CD45.2+ frescas activadas solas.

$$\%Supresión_{ex-vivo} = \left( 1 - \frac{DI_{frescas+ex-vivo}}{DI_{frescas}} \right) * 100\%$$

**Cuantificación y caracterización de EVs:** Se determinó el tamaño de partícula y la concentración de las fracciones obtenidas de EVs, mediante la técnica de Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (en inglés NTA) utilizando el equipo NanoSight NS300 (obtenido de Malvern Instruments), equipado con un láser de longitud de onda de 532 nm, y un filtro de paso largo (LP, “*long pass*”) de 565 nm. Las muestras de EVs se diluyeron usando amortiguador salino PBS hasta alcanzar una concentración dentro del rango de cuantificación del equipo (entre 20 y 100 partículas por campo) y las mediciones se realizaron mediante el registro de 3 videos de 60 segundos cada uno, con una temperatura controlada de 25°C. Para la caracterización de EVs mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), muestras de EVs derivadas de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO* se procesaron según lo descrito previamente

(134). Para la detección de Nrp1 en la superficie de EVs, las EVs derivadas de células Tregs *wt* o *Nrp1KO* se marcaron con anticuerpos anti-IgG2a-PE (control de isotipo) o anti-Nrp1-PE por toda la noche a 4°C, se lavaron con PBS, se ultracentrifugaron a 100.000 x g y se resuspendieron en ~100 µL de PBS antes del análisis por NTA. Los videos registrados se analizaron con el software NTA NanoSight™ para determinar tamaño y concentración de las partículas en suspensión. De manera previa a cada medición, el equipo se calibró utilizando esferas estándar de látex-poliestireno de 100 nm de diámetro (obtenida de Malvern Panalytical).

**Obtención de extractos proteicos totales:** Las células Tregs o Tconv cultivadas, así como las fracciones de EV obtenidas mediante ultracentrifugación, se lisaron para obtener extractos proteicos totales (49, 135). Brevemente, las células y las fracciones de EVs se lavaron en amortiguador PBS frío (4°C), se resuspendieron en una solución de lisis RIPA (10 mM Tris-HCl pH 6,8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% v/v Tritón X-100, 0,1% p/v deoxicolato de sodio, 0,1% p/v SDS) y se incubaron en hielo por 20 min. Las muestras se mezclaron con vortex y luego se centrifugaron a 17.200 x g por 20 min. Los sobrenadantes de los lisados se mantuvieron a -80°C hasta su uso y análisis posteriores. La determinación de proteínas totales se realizó con el kit *BCA Protein Assay Reagent* (Pierce Biotechnology) o el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Immunoblot:** A los lisados proteicos totales se les adicionó una solución tamponada de carga RSB 5X (“*Resolving Sample Buffer*”, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 5% v/v 2-mercaptoetanol, 0,04% p/v Azul de Bromofenol) a la proporción adecuada, y se denaturaron a 95°C por 10 min. Las proteínas (10 µg) de cada muestra se resolvieron por tamaño en geles de poliacrilamida al 10% utilizando un equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) a 450 mA durante 90 min a 4°C. Luego las membranas se lavaron con TBS 0,1% v/v Tween20 (TBS-T) y posteriormente se incubaron con solución de bloqueo (TBS-T con 4% p/v de leche en polvo descremada) a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Se utilizaron anticuerpos primarios dirigidos contra: anti-Alix (clon 1A12, 1:250), anti-Tsg-101

(clon C-2, 1:250), anti-Calnexina (clon AF18, 1:250), anti-Tubulina- $\alpha$  (clon B-7, 1:250, todos de Santa Cruz Biotechnologies), anti- $\beta$ -Actina (clon 8H10D10, 1:10.000, obtenido de Cell Signalling Technologies) y anti-Nrp1 (AF566, 1:2.000, obtenido de R&D Systems). Luego, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T por 10 min a temperatura ambiente, y se incubaron con anticuerpos secundarios específicos conjugados a peroxidasa (obtenidos de Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:8.000 en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. La visualización de la señal quimioluminiscente se realizó utilizando el kit *SuperSignal West Femto Maximun Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific) y la detección se realizó utilizando un equipo fotodocumentador MiniHD9 (Uvitec Ltd., Cambridge, UK). Las proteínas  $\beta$ -Actina y Tubulina- $\alpha$  se usaron como control de carga.

**ELISA:** Los sobrenadantes de los ensayos de co-cultivo, y los medios condicionados derivados del aislamiento de EVs, se colectaron luego de 72 h y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior de cuantificación de citoquinas mediante Ensayo de Inmuno-Absorción Ligado a Enzima (en inglés *ELISA*, *Enzime-linked Immuno-Sorbent Assay*) de tipo “*sándwich*”. Brevemente, placas de 96 pozos (fondo plano) se incubaron con una solución de amortiguador salino PBS con anticuerpos anti-IL-10 (clon JES5-2A5, Biolegend) o anti-CD63 (clon NVG-2, Biolegend) a  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , por toda la noche. Luego de varios lavados con solución de lavado PBS 0.05% v/v Tween20 (PBS-T), y un paso de bloqueo con una solución de bloqueo PBS 2% BSA por 1 h a temperatura ambiente, las muestras se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Luego de varios lavados con PBS-T, se agregó una solución de anticuerpos anti-IL-10 biotilnado (clon JES5-16E3, Biolegend) o anti-CD63 biotilnado (clon NVG-2, Biolegend) a  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ , junto con Streptavidina-HRP (del inglés “*horseradish peroxidase*”) a una dilución 1:1,000 por 1 h temperatura ambiente para detectar las moléculas inmovilizadas. Luego de varios lavados, se agregó la solución sustrato con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, ThermoFisher) para detectar actividad de HRP. La reacción se detuvo añadiendo la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y la absorbancia de cada pozo se midió a una longitud de onda de 450 nm utilizando un lector de absorbancia para microplaca NanoQuant (Tecan).

**Expresión de resultados y análisis estadístico:** Los datos experimentales son presentados como el promedio  $\pm$  error medio estándar (SEM) de un número de experimentos indicados como (n) o como resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los

datos se sometieron a un análisis de varianza y las comparaciones entre los grupos se llevaron a cabo a través de *t*-Student, ANOVA, log-Ranky Chi-cuadrado de N-1 (136) (según corresponda) mediante el uso del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Un valor  $p < 0.05$  se consideró como una diferencia estadísticamente significativa entre los datos comparados.

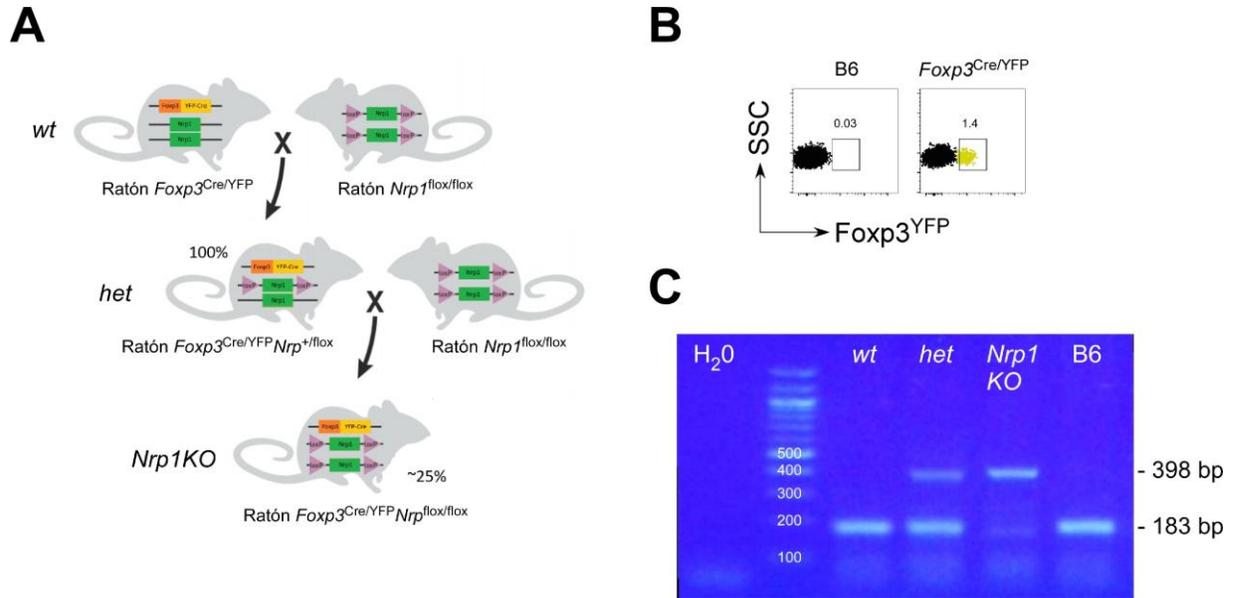
## 11. RESULTADOS

### 11.1. Obtención de animales con células Treg deficientes en Neuropilina-1.

Mediante la cruce de cepas transgénicas de ratones  $Foxp3^{Cre/YFP}$  (*wt*) con ratones  $Nrp1^{flox/flox}$ , se obtuvieron animales con genotipo  $Foxp3^{Cre/YFP}Nrp1^{+/flox}$  (*het*) y genotipo  $Foxp3^{Cre/YFP}Nrp1^{flox/flox}$  (*Nrp1KO*), cuyas células Tregs  $Foxp3^+$  son heterocigotas y homocigotas deficientes para la expresión de *Nrp1*, respectivamente (**Figura 1A**). Las crías resultantes de la primera cruce (100% *het*) se retro-cruzaron con ratones  $Nrp1^{flox/flox}$  para obtener animales con genotipo *Nrp1KO* con una frecuencia aproximada del ~25% con respecto al total de crías (**Figura 1A**).

El fenotipo de estos animales se determinó a la edad de 4 semanas, mediante el muestreo de sangre periférica para evaluar la frecuencia de células positivas para la proteína fluorescente amarilla (YFP) mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la **Figura 1B**, las células de sangre periférica de animales  $Foxp3^{Cre/YFP}$  presentó una frecuencia de alrededor de 1,5% de células YFP+, mientras que las células de sangre de animales C57Bl/6 control (B6) no presentaron esta población.

Además, el genotipo de los animales se determinó mediante la obtención de DNA genómico de una muestra de punta de cola, para evaluar la región genómica del exón 2 del gen *Nrp1* por PCR. Como se puede apreciar en la **Figura 1C**, en las muestras de animales B6 control y animales  $Foxp3^{Cre/YFP}$  la amplificación por PCR resultó en una banda de 183 pb, representando la región genómica de *Nrp1* no alterada. Por otro lado, en las muestras de animales  $Foxp3^{Cre/YFP}$  obtenidos de la primera cruce con animales  $Nrp1^{flox/flox}$  se observaron dos bandas de 183 pb y 398 pb, donde la banda de mayor tamaño representa a una copia de *Nrp1* con la región genómica del exón 2 flanqueada por sitios *loxP* de animales *het* (**Figura 1C**). Finalmente, en una muestra representativa de animales  $Foxp3^{Cre/YFP}$  obtenidos de la retrocruza de animales *het* con animales  $Nrp1^{flox/flox}$  se observó sólo una banda de 398 pb, que representa a ambas copias de *Nrp1* con la región flanqueada por sitios *loxP* de animales *Nrp1KO* (**Figura 1C**).



**Figura 1. Obtención de animales *Nrp1KO* condicionales a células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup>.** **A)** Para obtener animales deficientes en *Nrp1* específicamente en células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup>, animales de genotipo *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> (cuyas células que expresan *Foxp3* además expresan la proteína de fusión reportera YFP/Cre recombinasa) se cruzaron con animales de genotipo *Nrp1*<sup>flox/flox</sup> (cuyas células de todo el organismo poseen ambas copias del gen *Nrp1* flanqueadas con sitios *loxP*). Los animales de la primera progenie poseen el constructo génico *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> pero sólo una copia del gen *Nrp1* con sitio *loxP*, por lo que las células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup> de ese ratón son heterocigotas para este gen (*Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrp1*<sup>+ /flox</sup> o *het*). Luego de un retrocruce de esta progenie inicial, se obtiene en promedio un 25% de progenie con genotipo homocigoto para ambas modificaciones génicas. De esta forma, estos animales poseen el constructo génico *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> y ambas copias del gen *Nrp1* con sitio *loxP*. En estos últimos, las células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup> son deficientes en *Nrp1* (*Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrp1*<sup>flox/flox</sup> o *Nrp1KO*). **B)** *Dot plot* representativo mostrando la frecuencia (%) de células *Foxp3*<sup>YFP+</sup> presentes en células de muestras de sangre de animales C57Bl/6 (B6) control y en animales *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>, analizado por citometría de flujo. **C)** Resultado de amplificación por PCR representativo de muestras de DNA genómico para la región del exón 2 de *Nrp1*, en muestras de animales *wt*, *het*, *Nrp1KO* y B6. La banda de 183 pb representa la región del exón 2 sin alterar; la banda de 398 pb representa la región del exón 2 flanqueada por sitios *loxP*.

## 11.2. La deficiencia de *Nrp1* no altera la expresión de otros marcadores característicos de células Tregs.

La expresión de *Nrp1* en células Tregs es importante tanto para su fenotipo como su función (113). A pesar de que se ha descrito que las células Treg deficientes en este marcador tienen una actividad supresora disminuida en modelos de colitis y de tumor, no se ha reportado que la deficiencia de *Nrp1* altere la expresión de otras moléculas inmunomoduladoras, por lo que evaluamos la expresión de *Nrp1* y de diversos marcadores mediante citometría de flujo (Objetivo 1.2) en las poblaciones de células Tconv (CD4+Foxp3-) y células Tregs CD4+Foxp3+ de bazo, linfonodos periféricos (LNp) y de sangre, provenientes de animales obtenidos e identificados con genotipo *wt*, *het* y *Nrp1KO*.

*Nrp1* no se detectó en células Tregs *Nrp1KO* (<1% vs. ~85% en Tregs *wt*, **Figura 2A**). La frecuencia de células Tregs que expresan el factor de transcripción Eos se mantuvo constante (~70%), independiente de su genotipo (**Figura 2A**). La frecuencia de expresión del receptor CD25 se encontró disminuida en los tres genotipos de células Tregs presentes en bazo y en sangre, en comparación a las células Tregs de linfonodos periféricos (80% vs. 60% en células Tregs de bazo y sangre). Sin embargo, tampoco hubo diferencias en la expresión de este marcador entre células Tregs *wt*, *het* y *Nrp1KO* (**Figura 2A**).

En cuanto a otros marcadores asociados a perfil regulador, como CD49b, Helios, CD103 y CD73, no se encontraron diferencias entre los tres genotipos de células Tregs de los tejidos analizados (**Figura 2A**). Además, al estudiar la expresión a nivel celular por intensidad de fluorescencia media (MFI) de estos marcadores, tampoco se encontraron diferencias en estos marcadores (**Figura 2C**).

Similarmente, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los marcadores asociados a perfil regulador en la población de células Tconv, excepto en el bazo, donde se encontró una disminución parcial de la frecuencia de Tconv *Nrp1+* en animales *Nrp1KO* (~15% versus ~25% en animales *wt*, **Figura 2B**).

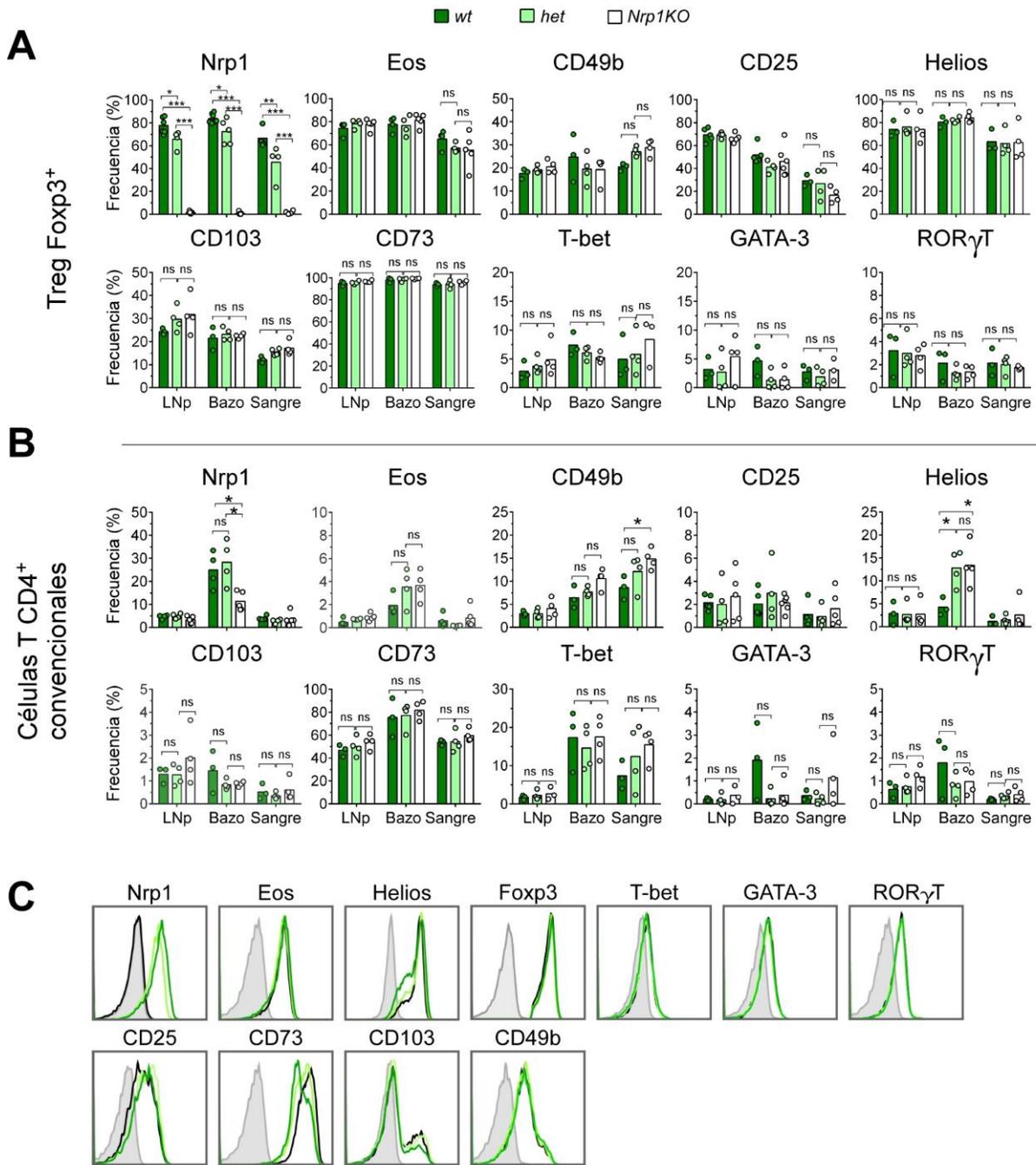
Dado que previamente se ha relacionado la expresión de *Nrp1* en células Tregs con su estabilidad fenotípica (112), se analizó la expresión de Foxp3 y de los factores de transcripción representativos de linaje pro-inflamatorio T-bet, GATA-3 y ROR $\gamma$ T, asociados a

células pro-inflamatorias de perfil tipo T “*helper*” (Th)1, Th2 y Th17, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de expresión de Foxp3 ni de los factores de transcripción T-bet, GATA-3 y ROR $\gamma$ T entre los distintos genotipos de células Tregs estudiados, tanto al analizar su frecuencia como expresión a nivel celular por MFI (**Figura 2A-C**).

Se utilizó la herramienta viSNE, cuyo algoritmo permite aplicar una reducción de dimensionalidad a datos de citometría multiparamétrica, basada en la incrustación estocástica de vecinos con distribución-t (en inglés, “*visualization of t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*”, t-SNE). Ese análisis permite integrar simultáneamente la información de todos los parámetros y representar la similaridad fenotípica celular en un mapa bidimensional. Los ejes (t-SNE1 y t-SNE2) representan variables adimensionales que reflejan diferencias en la expresión de los marcadores estudiados en las poblaciones identificadas. La herramienta viSNE fue capaz de diferenciar distintas poblaciones celulares de forma automática, donde el mapa “Muestras” representa todas las muestras concatenadas, y a la derecha se observan que algunas poblaciones están mayor o menormente representadas en uno u otro de los tejidos analizados (**Figura 3A**). Utilizando la expresión de los marcadores CD4, CD8, CD19 y Foxp3, fue posible determinar la ubicación de las poblaciones de células Tconv (CD4+Foxp3-CD8-CD19-), células Tregs (CD4+Foxp3+CD8-CD19-), células T CD8+ (CD4-Foxp3-CD8+CD19-) y células B (CD4-Foxp3-CD8-CD19+), así como también células no determinadas (Otras, negativas para todos los marcadores, **Figura 3B**).

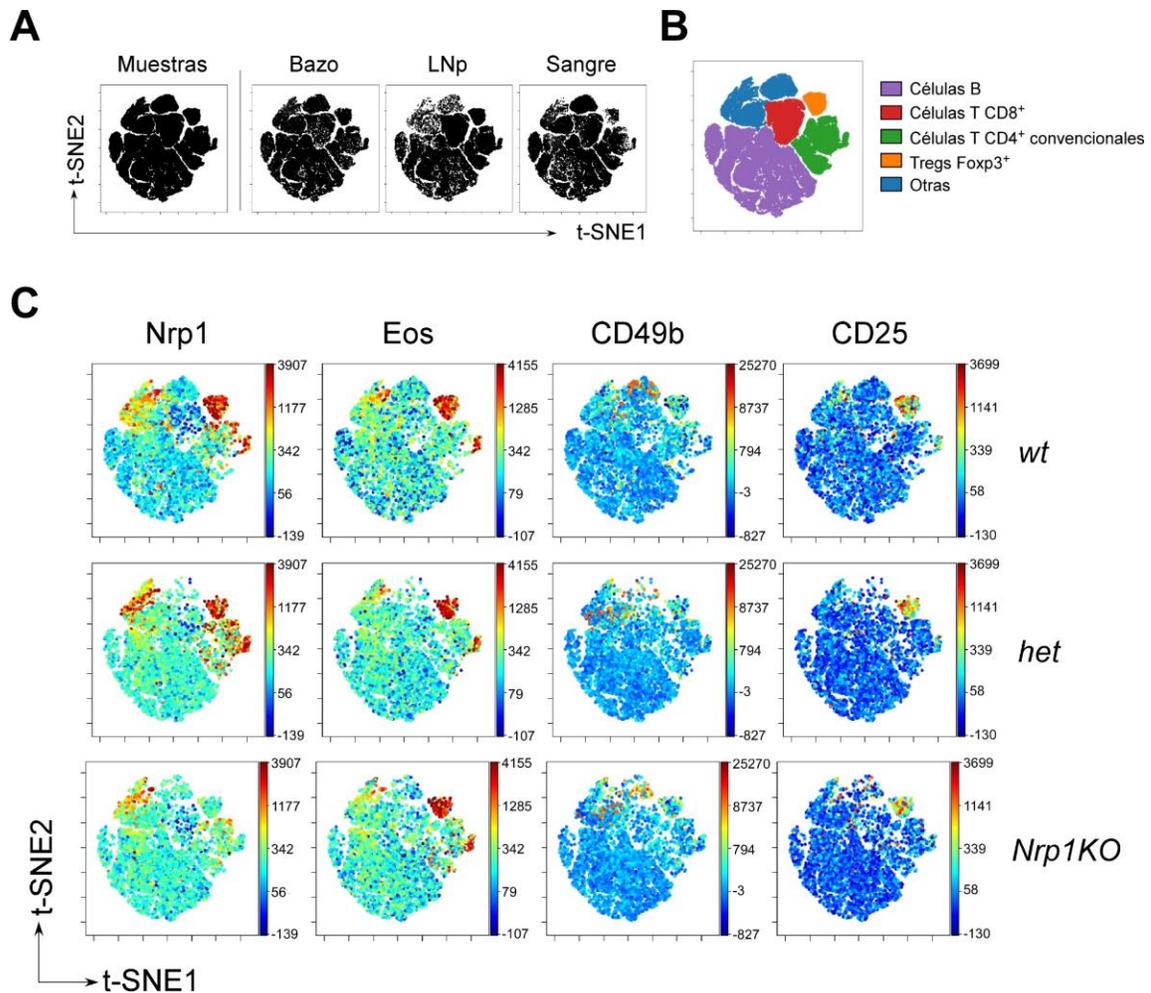
Luego, se analizó mediante viSNE la expresión de los marcadores inmunoregulatorios Nrp1, Eos, CD49b y CD25 en las muestras de bazo de los animales *wt*, *het* y *Nrp1KO*. La expresión en código de calor (*heat-map*), desde azul (bajo) hasta rojo (alto), con la escala a la derecha de cada mapa 2D de viSNE (**Figura 3C**). La principal diferencia se encontró en la población de células Tregs Foxp3+, donde la expresión de Nrp1 disminuyó drásticamente en las células de animales *Nrp1KO*. Además, se confirmó que la expresión de los otros marcadores se mantuvo constante entre los tres genotipos de Tregs Foxp3+, sin observarse cambios adicionales en las otras poblaciones de células B, células T CD8+ y células Tconv (**Figura 3C**).

En su conjunto, estos resultados sugieren que la deficiencia de *Nrp1* en células Tregs *Foxp3+* no altera la expresión de otros marcadores de perfil regulador en condiciones de homeostasis, ni tampoco favorece la co-expresión de marcadores de fenotipo pro-inflamatorio tipo *T-helper* (lo que alteraría la estabilidad del fenotipo regulador).



**Figura 2. La deficiencia de *Nrp1* específica de Tregs *Foxp3*<sup>+</sup> no altera la expresión de moléculas inmunomoduladoras.** Linfonodos periféricos (LNp), bazo y sangre se extrajeron de animales *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> (*wild type* o *wt*), *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrp1*<sup>+/*flox*</sup> (heterocigotos o *het*) y *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup>*Nrp1*<sup>flox/flox</sup> (homocigoto recesivo o *Nrp1*KO), procesados y analizados para la expresión de CD4, CD8, CD19, CD25, CD49b, *Foxp3*, Eos y *Nrp1* mediante citometría de flujo. **A**) Los gráficos muestran la frecuencia obtenida de células *Nrp1*<sup>+</sup>, Eos<sup>+</sup>, CD49b<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> de las poblaciones de células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup> en linfonodos periféricos (LNp), bazo y sangre de animales *wt* (barras verde oscuro), *het* (barras verde claro) o *Nrp1*KO (barras

blancas). **B)** Los gráficos muestran la frecuencia obtenida de células Nrp1+, Eos+, CD49b+ y CD25+ de las poblaciones de células Tconv en bazo, LNp y sangre de animales *wt*, *het* o animales *Nrp1KO*. **C)** Los histogramas muestran la expresión de varios marcadores de superficie e intracelulares analizados en la población de células Tregs CD4+Foxp3+ de animales *wt* (línea verde oscuro), animales *het* (línea verde claro), animales *Nrp1KO* (línea negra) o del control negativo respectivo (línea gris sombreada). Para A y B, barras representan promedio y cada círculo representa un animal. ANOVA de dos vías. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns = no significativo. 3-6 animales por condición, n = 3 experimentos independientes.



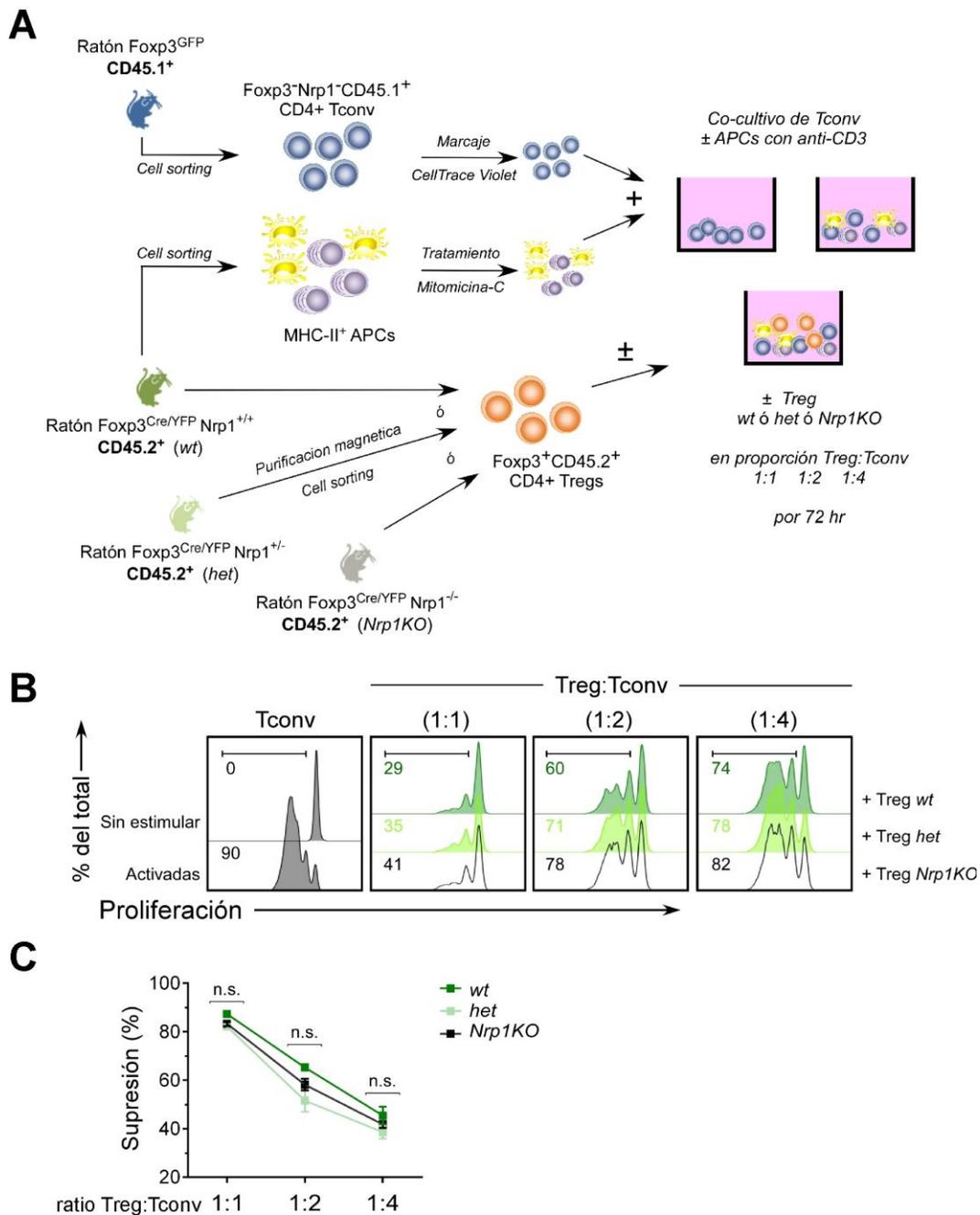
**Figura 3. Análisis de expresión de marcadores inmunoregulatorios en animales *wt*, *het* y *Nrp1KO* mediante viSNE.** Linfonodos periféricos (LNp), bazo y sangre se extrajeron de animales  $Foxp3^{Cre/YFP}$  (*wild type* o *wt*),  $Foxp3^{Cre/YFP}Nrp1^{+/flox}$  (heterocigotos o *het*) y  $Foxp3^{Cre/YFP}Nrp1^{flox/flox}$  (homocigoto recesivo o *Nrp1KO*), procesados y analizados para la expresión de CD4, CD8, CD19, CD25, CD49b, Foxp3, Eos y Nrp1 mediante citometría de flujo. **A)** El gráfico muestra un análisis de reducción de dimensionalidad mediante la herramienta viSNE, representando la similitud fenotípica celular en un mapa 2D. A la izquierda se observan de forma concatenada las poblaciones celulares identificadas por viSNE de todos los tejidos, y a derecha se muestran agrupadas por cada tejido analizado. **B)** El mapa muestra en código de color las poblaciones identificadas como células B (púrpura), células Tregs Foxp3<sup>+</sup> (naranja), células Tconv CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> (verde), células T CD8<sup>+</sup> (rojo) y células sin identificar (Otras, azul) del bazo de animales *wt*, *het* y *Nrp1KO*. **C)** Intensidad de fluorescencia media (MFI) en código *heat-map* de los marcadores inmunoregulatorios Nrp1, Eos, CD49b y CD25 de células de bazo de animales *wt*, *het* y *Nrp1KO* mediante viSNE. Los datos son representativos de n = 4 experimentos independientes.

### 11.3. La delección de *Nrp1* en células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup> no afecta la capacidad inhibitoria en células T *CD4*<sup>+</sup>.

Para determinar la contribución de *Nrp1* en la función supresora de células Tregs (Objetivo 2.1), se realizaron ensayos de supresión *in vitro* convencionales. En resumen, células Tconv *CD4*<sup>+</sup>*Foxp3*<sup>-</sup> expresando el marcador congénico *CD45.1* se purificaron mediante *cell sorting* y se marcaron con el reactivo de seguimiento de proliferación CellTrace™ Violet (CTV). Estas células Tconv se activaron con APCs *MHC-II*<sup>+</sup> en presencia de anti-*CD3* soluble, solas o en contacto directo con células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup>, expresando el marcador congénico *CD45.2*, con genotipo *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> *wt*, *het* o *Nrp1KO*, en distintas proporciones Treg:Tconv (**Figura 4A**).

Luego de 72 h de co-cultivo, se encontró que las células Tregs inhibieron la proliferación de las células Tconv (~35% versus ~90% de proliferación de células Tconv activadas solas), y tal como era esperado, esta supresión disminuyó de forma dosis-dependiente con la proporción de células Tregs en cada condición (**Figura 4B**). No se observó una diferencia significativa entre la supresión ejercida por células Tregs *wt*, Tregs *het* y Tregs *Nrp1KO* en esta configuración experimental (**Figura 4B-C**).

Por lo tanto, al probar la función de Tregs en ensayos de supresión *in vitro*, donde las células se encuentran en contacto entre sí, la deficiencia de *Nrp1* en células Tregs no afecta su capacidad supresora.



**Figura 4. La deficiencia de *Nrp1* en células Tregs no altera su capacidad inhibitoria en ensayos de supresión *in vitro*.** A) Diseño experimental de co-cultivos para ensayos de supresión *in vitro* convencionales, como se detalla en Materiales y Métodos. Brevemente, se aislaron células Tconv a partir de animales  $Foxp3^{GFP} CD45.1^+$  y se marcaron con CTV; se aislaron APCs MHC-II<sup>+</sup> que se trataron con Mitomicina-C; además, se aislaron Treg  $Foxp3^{Cre/YFP}$  a partir de animales wt, het y *Nrp1*KO, respectivamente. Las células Tconv se cultivaron solas (Sin estimular), o activadas con APCs y anti-CD3 soluble (Activadas), con o

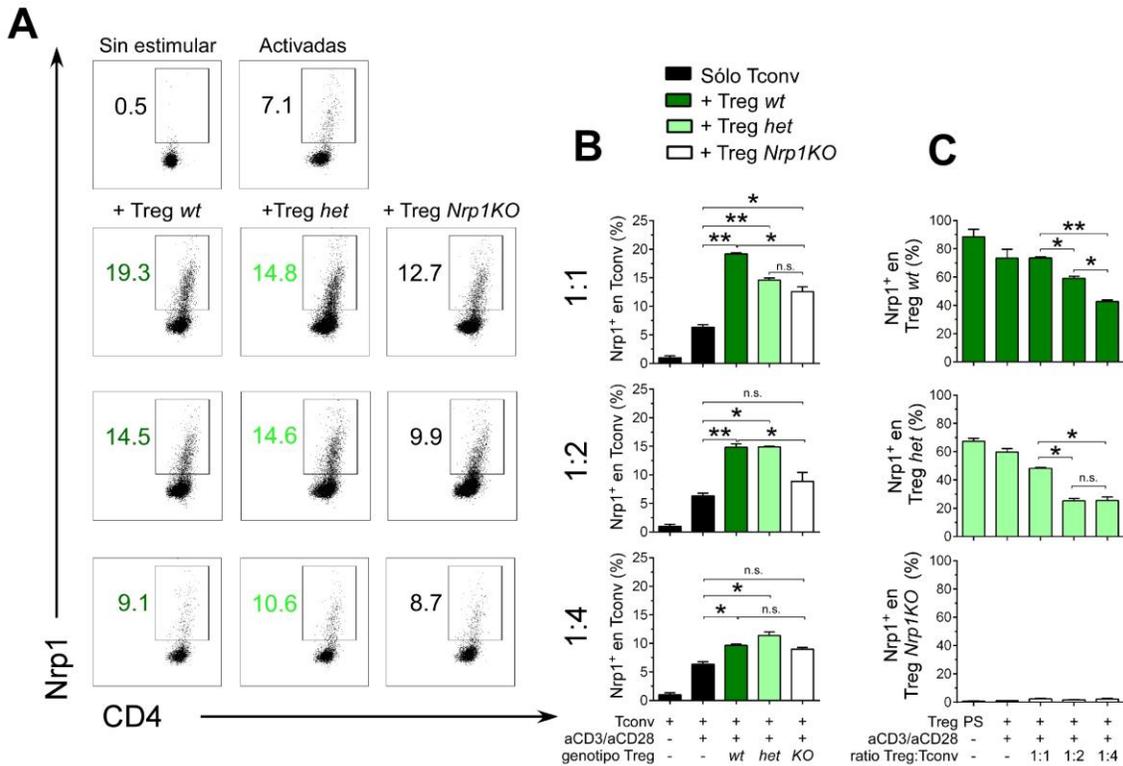
sin células Treg Foxp3<sup>+</sup> en diferentes proporciones Treg:Tconv. Luego de 72 h, las células se analizaron por citometría de flujo para determinar la proliferación de las células Tconv. **B)** Los histogramas muestran la proliferación de células Tconv activadas solas (línea negra achurada), o co-cultivadas con células Tregs Foxp3<sup>YFP/Cre+</sup> provenientes de animales *wt* (línea verde oscuro), *het* (línea verde claro) o *Nrp1KO* (línea negra). El porcentaje de células que proliferaron se indica en el mismo código de color. **C)** Porcentaje de supresión de proliferación ejercido por las células Tregs *wt*, *het* y *Nrp1KO*, utilizando el índice de división (“*division index*” o DI) como se detalla en Materiales y Métodos. Para C, cuadrados representan promedio ± SEM. ANOVA de dos vías; ns = no significativo. n = 3 experimentos independientes.

#### **11.4. Nrp1 en células Tregs Foxp3+ es necesaria para la modulación *in vitro* del fenotipo de células Tconv.**

Resultados previos mostraron que durante la inducción de tolerancia a trasplantes alogénicos mediada por células Tregs Nrp1+, las células Tconv en estos animales incrementan significativamente la presencia de Nrp1 en su superficie, sugiriendo que Nrp1 podría ser transferida *in vivo* desde las células Tregs hasta las células Tconv (124). Para corroborar esta observación en condiciones de activación *in vitro*, se co-cultivaron células Tregs Foxp3+ y células Tconv, y luego de 72 h se evaluó la expresión de Nrp1 en ambas poblaciones de células mediante citometría de flujo.

Se encontró que el co-cultivo con células Tregs *wt* incrementa significativamente la presencia de Nrp1 en células Tconv, lo cual sigue una dosis-dependencia con la proporción de células Tregs en cada condición (**Figura 5A-B**). Sin embargo, la presencia de este receptor fue menor cuando las células Tconv se co-cultivaron con células Tregs *Nrp1KO* (~12%), en comparación a cuando se co-cultivaron con Treg *het* o Tregs *wt* (~15% y ~20%, respectivamente para la proporción 1:1 de Treg:Tconv), como se puede ver en la **Figura 5B**. De forma paralela, se observó que las células Tregs *wt* y *het* disminuyeron de forma gradual y significativa su presencia propia del receptor Nrp1 al ser co-cultivadas con un mayor número de células Tconv (**Figura 5C**).

Estos resultados sugieren que la modulación *in vitro* del fenotipo de las células Tconv (incremento de Nrp1 en su superficie) es dependiente de la expresión de Nrp1 en las células Tregs Foxp3+.



**Figura 5. Nrp1 es requerida para la modulación de fenotipo *in vitro* de células T CD4+ convencionales mediado por Tregs Foxp3+.** Células Tconv, APCs y células Treg Foxp3+ se incubaron en un ensayo de supresión *in vitro* y analizadas por citometría de flujo. **A)** Los *dot plot* muestran la expresión de Nrp1 en las células Tconv CD45.1+ sin estimular, activadas o co-cultivadas con células Tregs wt, het o *Nrp1KO* en distintas proporciones. Los números en código de color dentro del *dot plot* representan el porcentaje (%) de células Tconv Nrp1+. **B)** Los gráficos de barra muestran la frecuencia acumulada de Tconv Nrp1+ cultivadas solas (barras negras), o co-cultivadas con células Tregs wt (barras verde oscuro), Tregs het (barras verde claro) o Tregs *Nrp1KO* (barras blancas). Los gráficos están separados por proporción de Treg:Tconv (1:1; 1:2; 1:4). **C)** Los gráficos de barra muestran la frecuencia acumulada de células Treg Nrp1+ frescas (PS, post-sorting), activados solos o con células Tconv en distintas proporciones. Los gráficos están separados por genotipo de Treg (arriba wt, al medio het, abajo *Nrp1KO*). Para B y C, barras representan promedio ± SEM. t-Test de Student, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, ns = no significativo. Para B, proporción Treg:Tconv (1:1), p = 0,004 Activadas vs wt; p = 0,010 Activadas vs het; p = 0,018 Activadas vs *Nrp1KO*; p = 0,0126 wt vs het; p = 0,036 wt vs *Nrp1KO*; p = 0,360 het vs *Nrp1KO*; proporción Treg:Tconv (1:2), p = 0,002 Activadas vs wt; p = 0,030 Activadas vs het; p = 0,099 Activadas vs *Nrp1KO*; p = 0,749 wt vs het; p = 0,046 wt vs *Nrp1KO*; p = 0,133 het vs *Nrp1KO*; proporción Treg:Tconv (1:4), p = 0,050 Activadas vs wt; p = 0,043 Activadas vs het; p = 0,160 Activadas vs *Nrp1KO*; p = 0,493 wt vs het; p = 0,652 wt vs *Nrp1KO*; p = 0,160 het vs *Nrp1KO*. Para C, para wt, p = 0,014 (1:1) vs (1:2); p = 0,005 (1:1) vs (1:4); p = 0,007 (1:2) vs (1:4); para het, p = 0,028 (1:1) vs (1:2); p = 0,017 (1:1) vs (1:4); p = 0,956 (1:2) vs (1:4). n = 3 experimentos independientes.

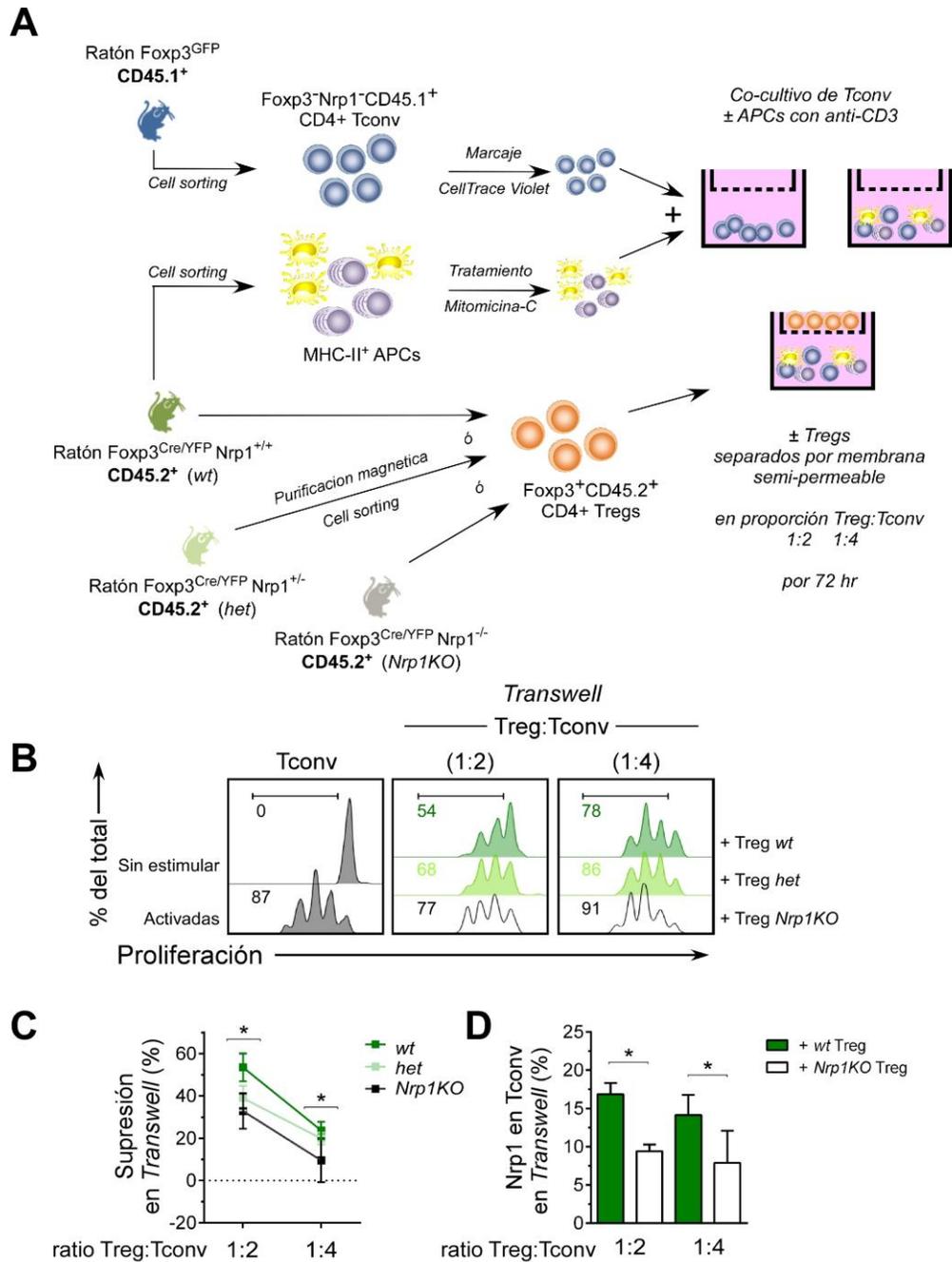
### 11.5. Nrp1 contribuye a la función de células Tregs Foxp3+ contacto-independiente.

Considerando que no se observó una diferencia robusta entre la capacidad supresora de las células Tregs *wt*, *het* y *Nrp1KO* en ensayos de supresión convencionales, se realizó un ensayo de supresión independiente del contacto célula-célula (es decir, de tipo ‘contacto-independiente’), a través del uso del sistema de co-cultivo en “*transwell*” (**Figura 6A**). En este sistema, las células Tconv respondedoras y las células Tregs supresoras se encuentran físicamente separadas por una membrana semi-porosa que impide el paso celular, pero permite el paso de factores solubles (como metabolitos, citoquinas o EVs de tamaño menor).

Usando este diseño experimental, se encontró una diferencia significativa entre la función supresora de células Treg *wt* y Treg *Nrp1KO* (~30% versus ~60% de supresión en “*transwell*”, respectivamente, en la proporción Treg:Tconv de 1:2), como se puede observar en la **Figura 6B** y **Figura 6C**.

De forma análoga a los resultados obtenidos anteriormente, la presencia de Nrp1 en las células Tconv de la cámara inferior se encontró disminuida al ser co-cultivadas en “*transwell*” con células Tregs *Nrp1KO* en la cámara superior (~8% versus 17% utilizando Tregs *wt*, para la proporción 1:2 de Treg:Tconv) como se puede apreciar en la **Figura 6D**.

Por lo tanto, en su conjunto, estos análisis funcionales sugieren que la expresión de Nrp1 en células Tregs Foxp3+ no es necesaria para suprimir la proliferación *in vitro* de células Tconv cuando ocurre contacto directo célula-célula; pero que es esencial para una correcta supresión *in vitro* independiente de contacto (a través de una membrana semi-porosa). Además, los resultados sugieren que el aumento de expresión de superficie del receptor Nrp1 en las células Tconv activadas *in vitro* se ve significativamente favorecido cuando a su vez las células Tregs expresan apropiadamente este marcador, tanto en ensayos de supresión convencionales como en la modalidad “*transwell*” o contacto-independiente.



**Figura 6. Nrp1 es requerida para la modulación de fenotipo *in vitro* y la función supresora en “transwell” de células Tregs sobre células Tconv.** A) Diseño experimental de co-cultivos para ensayos de supresión *in vitro* contacto-independiente. Células Tconv, APC y células Tregs se obtuvieron como se detalla en Materiales y Métodos. Las células Tconv se marcaron con CTV y cultivaron en la cámara inferior solas (Sin estimular), o activadas con APC y anti-CD3 soluble (Activadas), solas o con células Treg Foxp3<sup>+</sup> wt, het o Nrp1KO ubicadas en la cámara superior en diferentes proporciones, separados de las células Tconv por una membrana semi-permeable. Luego de 72 h, se analizó la proliferación y expresión de

superficie de Nrp1 en células Tconv, y la capacidad supresora de células Tregs por citometría de flujo. **B)** Los histogramas muestran la proliferación de las células Tconv activadas solas (línea negra achurada) o co-cultivadas en “*transwell*” con células Tregs Foxp3+ provenientes de animales *wt* (línea verde oscuro), *het* (línea verde claro) o *Nrp1KO* (línea negra). El porcentaje de células que proliferaron se indica en el mismo código de color. **C)** Porcentaje de supresión de proliferación ejercido por las células Tregs *wt*, *het* y *Nrp1KO*, utilizando el índice de división (“*division index*” o DI), detallado en Materiales y Métodos. **D)** Frecuencia acumulada de células Tconv Nrp1+ de la cámara inferior cuando se co-cultivaron en “*transwell*” con células Tregs *wt* (barras verde oscuro) o Tregs *Nrp1KO* (barras blancas). Para C y D, los símbolos y las barras (respectivamente) representan promedio  $\pm$  SEM. En C, T-test pareado, \*  $p < 0,05$ ; ns = no significativo; proporción (1:2) *wt* vs *Nrp1KO*  $p < 0,05$ ; *wt* vs *het*  $p > 0,05$ ; *het* vs *Nrp1KO*  $p > 0,05$ ; proporción (1:4) *wt* vs *Nrp1KO*  $p < 0,05$ ; *wt* vs *het*  $p > 0,05$ ; *het* vs *Nrp1KO*  $p > 0,05$ . En D, t-Test de Student, \*  $p < 0,05$ ; ns = no significativo. Para D, proporción (1:2),  $p = 0,017$  *wt* versus *Nrp1KO*; proporción (1:4),  $p = 0,047$  *wt* versus *Nrp1KO*.  $n = 3$  experimentos independientes.

## 11.6. Células Tregs Foxp3<sup>+</sup> requieren Nrp1 para la inducción de tolerancia a trasplantes.

Para determinar la participación de Nrp1 en la inducción de tolerancia a alo-injertos (Objetivo 2.2), y con el propósito de elucidar más extensivamente la relevancia y contribución de Nrp1 en la actividad supresora de células Tregs, se estudió su función *in vivo* en un modelo de trasplante de piel (**Figura 7A**).

Para ellos, se utilizó la cepa Rag1-KO, cuyos animales son inmunocomprometidos pues carecen de células B y T maduras en su sistema inmune, lo que permite estudiar específicamente la función de células T transferidas al animal. En resumen, células Tconv y células Tregs Foxp3<sup>+</sup> se purificaron e inyectaron por vía intravenosa a ratones Rag1-KO. Al día siguiente, estos animales se trasplantaron con injertos de piel de cola provenientes de un ratón F1 (C57Bl/6 x Balb/c, semi-alogénicos), y la sobrevida de los trasplantes se monitoreó tres veces a la semana (**Figura 7A**).

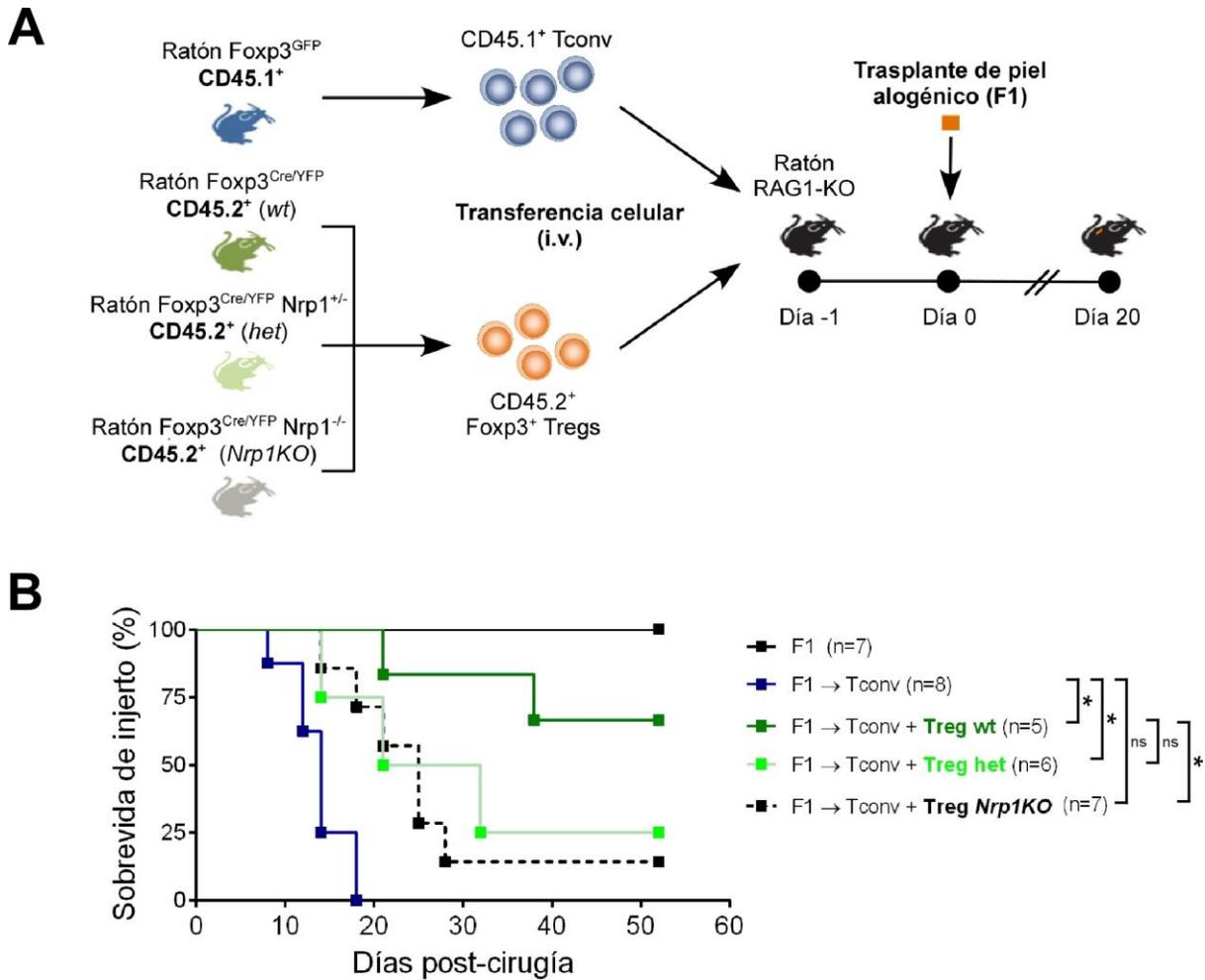
Luego de 20 días post-trasplante, se encontró que la frecuencia de sobrevida de los trasplantes de piel fue menor cuando las células Tconv son co-transferidas con Treg *Nrp1KO* (~17% sobrevida), en comparación con la sobrevida de trasplantes en animales que recibieron Tregs *wt* (~75% sobrevida) o Tregs *het* (~50% sobrevida, **Tabla 1**). Esto se confirmó realizando experimentos de sobrevida a largo plazo, en donde hasta 50 días post-trasplante, el grupo de animales tratado con células Tregs *wt* tiene significativamente mayor sobrevida de aloinjerto (~65%), en comparación al grupo con células Tregs *het* o Tregs *Nrp1KO* (~20% y ~18% respectivamente, **Figura 7B**).

Estos resultados demuestran que la expresión de Nrp1 en células Tregs es esencial para ejercer su función supresora *in vivo*, en el contexto inflamatorio de la respuesta inmune a trasplante de piel alogénico.

Grupo experimental	N° animales	Tratamiento (transferencia celular)	Estado al día 20		Sobrevida del trasplante (%)
			✓	X	
Control de trasplante	4	Sin células	4	0	100
Control de rechazo	4	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv	0	4	0
Control de tolerancia	4	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv + CD45.2 <sup>+</sup> Tregs <i>wt</i>	3	1	75
Grupo experimental	4	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv + CD45.2 <sup>+</sup> Tregs <i>het</i>	2	2	50
Grupo experimental	6	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv + CD45.2 <sup>+</sup> Tregs <i>Nrp1KO</i>	1	5	17

**Tabla 1. Estatus de injertos de piel alogénica en animales Rag1-KO trasplantados.**

La tabla resumen muestra el número de animales, las poblaciones celulares transferidas, el estado del trasplante (aceptado o rechazado) y el porcentaje de sobrevida en los diferentes grupos experimentales mencionados luego de 20 días post-trasplante. Se muestran los resultados de un experimento representativo. n = 4 experimentos independientes.



**Figura 7. Las células Tregs *Nrp1KO* son incapaces de inducir tolerancia a trasplantes de piel alogénica.** **A)** Diseño experimental para inducción de tolerancia a alo-injertos *in vivo*. Se aislaron células Treg  $\text{Foxp3}^+$  y células Tconv como se encuentra descrito en Materiales y Métodos. Células Tconv se transfirieron por vía intravenosa (i.v.) a ratones Rag1-KO, solas o co-transferidas con células Tregs *wt*, *het* o *Nrp1KO*. Al día siguiente, los animales se trasplantaron con piel semi-alogénica, y se monitorearon tres veces por semana. **B)** Gráfico de sobrevivida de los trasplantes en experimentos a largo plazo (> 50 días) en el grupo control sin transferencia celular (negro), trasplante con transferencia sólo Tconv (azul), Tconv co-transferidos con Tregs *wt* (verde oscuro), o con Tregs *het* (verde claro) o Treg *Nrp1KO* (negro con línea punteada). Para B, test de log-Rank, \*  $p < 0,05$ ; ns = no significativo.  $z = 3,76$ ,  $p < 0,05$  para Tconv vs + *wt* Tregs;  $z = 2,39$ ,  $p < 0,05$  para Tconv vs + *het* Tregs;  $z = 1,73$ ,  $p > 0,05$  para Tconv vs + *Nrp1KO* Tregs;  $z = 1,5$ ,  $p > 0,05$  para + *wt* Tregs vs + *het* Tregs;  $z = 2,07$ ,  $p < 0,05$  para + *wt* Tregs vs + *het* Tregs;  $z = 0,47$ ,  $p > 0,05$  para + *het* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs. Se muestran los resultados de un experimento representativo. El número entre paréntesis indica el número de animales estudiados.  $n = 2$  experimentos independientes.

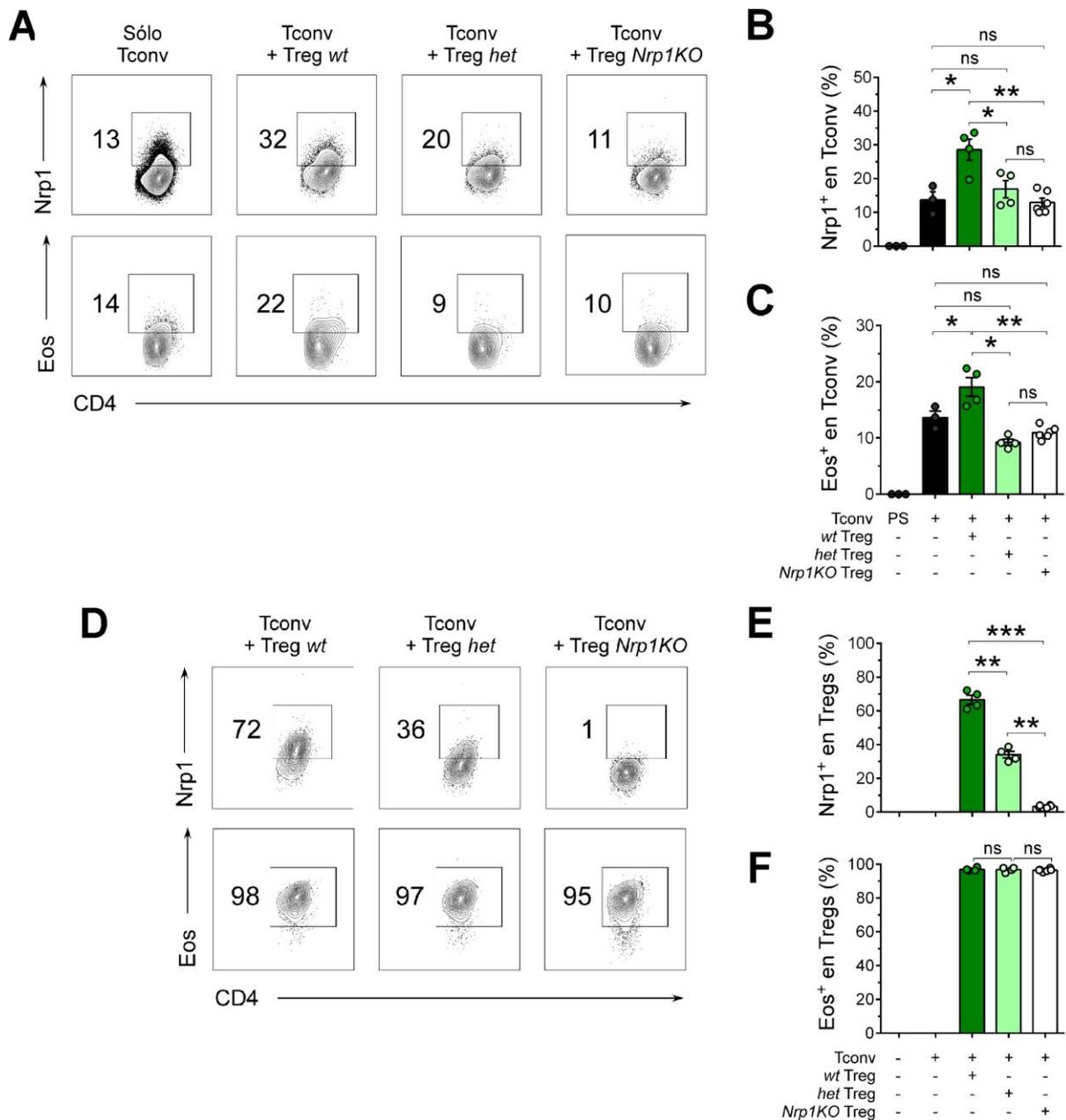
### 11.7. Células Tregs requieren Nrp1 para modular el fenotipo de Tconv *in vivo*.

Debido a que nuestras observaciones anteriores indicarían que Nrp1 participa en la modulación del fenotipo de células Tconv durante ensayos de supresión *in vitro*, se analizó la expresión de los marcadores de perfil regulatorio Nrp1 y Eos en las células Tconv CD45.1+ presentes en LN<sub>d</sub> del injerto.

Al analizar el fenotipo de las células Tconv de los distintos grupos experimentales, se obtuvieron diferencias dependiendo del genotipo de células Tregs utilizado. Siguiendo una tendencia similar a lo observado en los experimentos *in vitro*, se encontró una mayor frecuencia de células Tconv Nrp1+ en los animales que recibieron células Treg *wt* y que aceptaron el alo-injerto (~30% versus ~10% Tconv Nrp1+ en animales control de rechazo que sólo recibieron Tconv, **Figura 8A-B**). Por otro lado, en los animales que recibieron células Tregs *Nrp1KO* y que rechazaron el aloinjerto, la frecuencia de células Tconv Nrp1+ fue similar a la del grupo control de rechazo (~11% versus ~10% de Tconv Nrp1+ del grupo control) como se puede ver en la **Figura 8A-B**. Del mismo modo, al analizar la expresión del factor de transcripción Eos en estas células, sólo el tratamiento con células Tregs *wt* aumentó significativamente la frecuencia de células Tconv Eos+ (~20% versus 14% Tconv Eos+ del grupo control rechazo); no así el tratamiento con células Tregs *het* o *Nrp1KO* (~10% en ambos grupos, **Figura 8A y 8C**).

Cabe mencionar que los niveles de expresión de Nrp1 en los tres tipos de células Tregs utilizadas se mantuvo acorde al genotipo (**Figura 8D**), mientras que la expresión de Eos en las células Tregs de los tres genotipos analizados se mantuvo inalterada (**Figura 8F**).

En su conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de Nrp1 en células Tregs también podría ser relevante para la población de células Tconv, aumentando la expresión de Nrp1 (y Eos) en éstas últimas durante la inducción de tolerancia a trasplante.



**Figura 8. Células Tregs Nrp1<sup>+</sup> son requeridas para el incremento de expresión de Nrp1 y Eos por células Tconv durante la generación de tolerancia a trasplantes de piel.** Células Tconv y Treg Foxp3<sup>+</sup> se transfirieron a ratones Rag1-KO trasplantados con injertos alogénicos, y al finalizar el experimento sus células de LN<sub>d</sub> se analizaron por citometría de flujo. **A)** Gráficos de contorno representativos muestran la expresión de Nrp1 y Eos en células Tconv de los animales trasplantados de los distintos grupos. Los números muestran el porcentaje (%) de células positivas para el marcador respectivo. **B)** El gráfico de barras muestra la frecuencia acumulada de Tconv Nrp1<sup>+</sup> frescas (PS, *post-sorting*) o Tconv Nrp1<sup>+</sup> de los grupos de animales trasplantados que sólo recibieron Tconv (barra negra), o con células Tregs wt (barra verde oscuro), o con Tregs het (barra verde claro) o con Tregs Nrp1KO (barra blanca). **C)** El gráfico de barras muestra la frecuencia acumulada de Tconv Eos<sup>+</sup> frescas (PS,

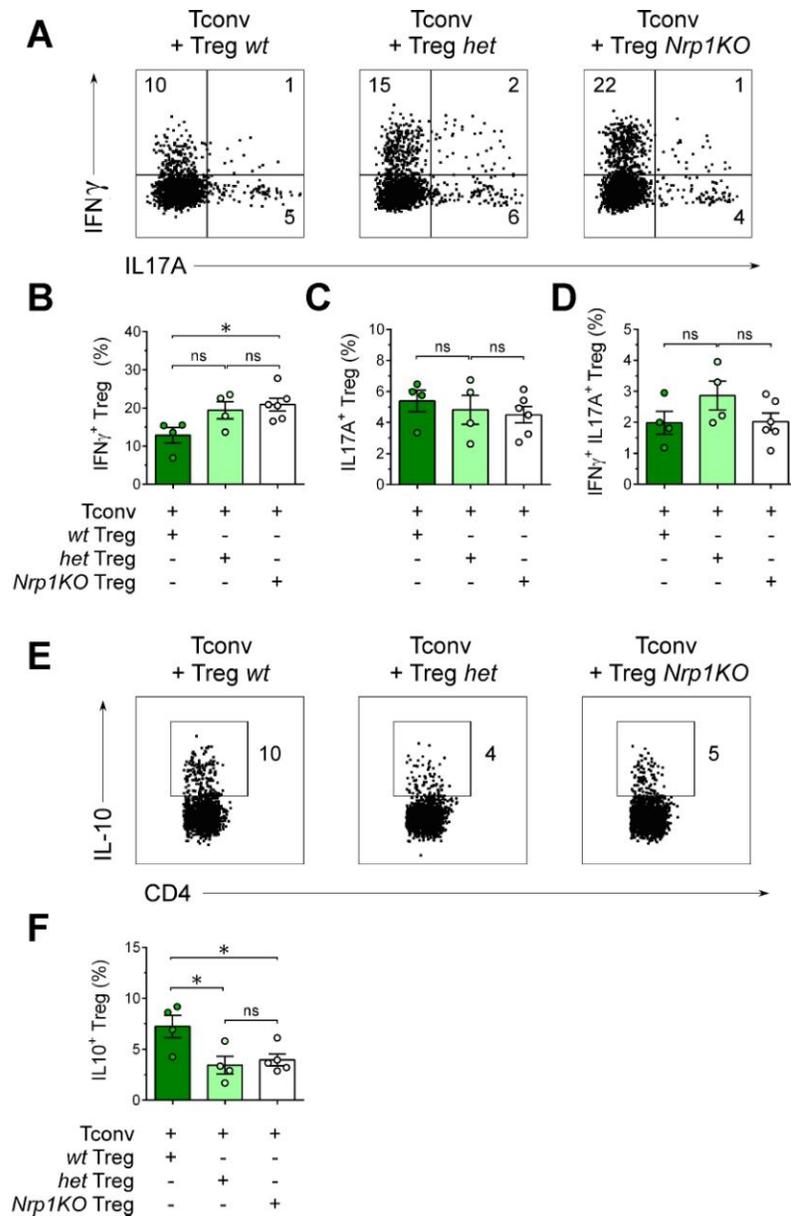
*post-sorting*) o de animales trasplantados de los grupos mencionados. **D)** Gráficos de contorno representativos muestran la expresión de *Nrp1* y *Eos* en células Tregs de los animales trasplantados de los distintos grupos. Los números muestran el porcentaje (%) de células positivas para el marcador respectivo. **E)** El gráfico de barra muestra la frecuencia acumulada de Treg *Nrp1*+frescas (PS, *post-sorting*) o de los grupos de animales trasplantados que recibieron Tconv con Treg *wt* (barra verde oscuro), o con Treg *het* (barra verde claro) o con Treg *Nrp1KO* (barra blanca). **F)** El gráfico de barra muestra la frecuencia acumulada de células Tregs *Eos*+ frescas (PS, *post-sorting*) o de Tregs *Eos*+ de animales trasplantados de los grupos mencionados anteriormente. Para B-C y E-F, barras representan promedio  $\pm$  SEM y cada círculo corresponde a un animal. PS: expresión *post-sorting* (recién aisladas). ANOVA de una vía, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns: no significativo. Para B,  $p = 0,012$  para Tconv vs + *wt* Treg;  $p = 0,028$  para + *wt* Tregs vs + *het* Tregs;  $p = 0,009$  para + *wt* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs. Para C,  $p = 0,044$  para Tconv vs + *wt* Tregs;  $p = 0,039$  para Tconv vs + *het* Tregs;  $p = 0,006$  para + *wt* Tregs vs + *het* Tregs;  $p = 0,013$  para + *wt* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs. Para E,  $p = 0,008$  para + *wt* Tregs vs + *het* Tregs;  $p < 0,0001$  para + *wt* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs;  $p = 0,0005$  para + *het* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs. Se muestran los resultados de un experimento representativo con 4-6 animales por grupo (un punto graficado por ratón).  $n = 3$  experimentos independientes.

## 11.8. La deficiencia de *Nrp1* en células Tregs altera su perfil de expresión de citoquinas.

La secreción de citoquinas anti-inflamatorias (y una baja producción de citoquinas pro-inflamatorias) por parte de las células Tregs es fundamental para la correcta función supresora frente a la respuesta inmune de rechazo a trasplantes (114, 137, 138). Considerando que nuestros resultados muestran que las células Tregs *Nrp1KO* no son capaces de inducir tolerancia a largo plazo a alo-injertos de piel, se evaluó el perfil de expresión de citoquinas en las células Tregs de los distintos grupos experimentales, con el objetivo de comprender mejor el mecanismo involucrado.

Se encontró que el ~20% de las células Tregs *het* y *Nrp1KO* producen la citoquina pro-inflamatoria IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ +) durante la respuesta *in vivo* al alo-injerto, en comparación con el ~10% de células Tregs *wt* (**Figura 9A-B**). No se encontraron diferencias en la frecuencia de células Tregs productoras de la citoquina pro-inflamatoria IL-17A (IL-17A+) o productoras de ambas citoquinas (“doble positivas”; IFN- $\gamma$ +IL-17A+) entre los tres genotipos analizados (**Figura 9A y C-D**). Al analizar la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, se encontró que sólo el ~4% de las células Tregs *het* y *Nrp1KO* la producen (IL-10+), en comparación con el ~10% de células Tregs *wt* IL-10+ (**Figura 9E-F**).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la deficiencia de *Nrp1* en células Tregs no sólo afectaría negativamente la producción de IL-10, sino que además favorece la producción de IFN- $\gamma$  durante la respuesta inmune al trasplante.



**Figura 9. La ausencia de *Nrp1* altera la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-10 de células Tregs *Foxp3*<sup>+</sup>.** Células Tconv y Treg *Foxp3*<sup>+</sup> se transfirieron a ratones Rag1-KO trasplantados con injertos allogénicos, y al finalizar el experimento sus células de LN<sub>d</sub> se analizaron por citometría de flujo. **A)** *Dot plot* representativos muestran la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  e IL-17A en células Tregs CD45.2<sup>+</sup> de los grupos de animales trasplantados que recibieron los distintos tipos de células Tregs. Los números representan la frecuencia de células positivas para cada citoquina. **B)** El gráfico de barras muestra la frecuencia de células Tregs IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> de los grupos de animales trasplantados que recibieron Tconv con Tregs *wt* (barra verde oscuro), o Tregs *het* (barra verde claro), o Tregs *Nrp1KO* (barra blanca). **C)** El gráfico de barras muestra la frecuencia de células Treg IL-17A<sup>+</sup> de los grupos de animales mencionados anteriormente. **D)** El gráfico de barras muestra la frecuencia de células Tregs IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> (doble positivos) de los grupos de animales

mencionados anteriormente. **E)** *Dot plot* representativos muestran la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en células Tregs Foxp3<sup>+</sup> en los distintos grupos. Los números representan la frecuencia de células positivas para IL-10. **F)** El gráfico de barras muestra la frecuencia de células Tregs IL-10<sup>+</sup> de los grupos de animales mencionados anteriormente. Para B-D y F, barras representan promedio  $\pm$  SEM y cada círculo corresponde a un ratón. ANOVA de una vía, \*  $p < 0,05$ ; ns: no significativo. Para B,  $p = 0,020$  para + *wt* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs. Para F,  $p = 0,037$  para + *wt* Tregs vs + *het* Tregs;  $p = 0,035$  para + *wt* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs. Se muestran los resultados de un experimento representativo.  $n = 3$  experimentos independientes.

### 11.9. IL-10 participa en la modulación del fenotipo de células Tconv *in vitro*.

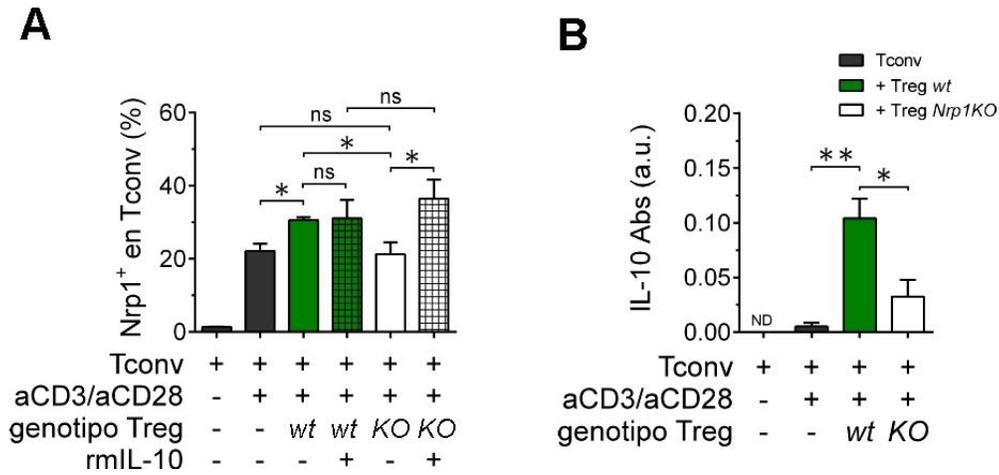
Nuestras observaciones anteriores indican que las células Tregs *Nrp1KO* producen menores niveles de IL-10 durante la respuesta inmune contra trasplantes de piel, lo que podría dar cuenta de una menor función supresora. Se ha descrito que IL-10 es esencial para mantener la tolerancia inmunológica en el organismo (30), y al co-cultivar células Tconv con células Tregs *wt* o *Nrp1KO*, la presencia de Nrp1 en células Tconv resultó ser menor con células Treg *Nrp1KO* (Figura 5). Considerando esto, se evaluó la participación de IL-10 en la modulación del fenotipo *in vitro* de células Tconv, específicamente el incremento de Nrp1 en células Tconv.

Para determinar si IL-10 modula la presencia de Nrp1 en células Tconv, se realizaron co-cultivos *in vitro* adicionales de células Tconv con células Tregs de los distintos tipos, pero esta vez adicionando la citoquina recombinante murina IL-10 (rmIL-10). Luego de 72 h, se evaluó la expresión de Nrp1 en las células Tconv mediante citometría de flujo, como se describe en detalle en Materiales y Métodos. Se encontró que las células Treg *wt* incrementaron significativamente la presencia de Nrp1 en las células Tconv (~30% Tconv Nrp1+), en comparación a cuando se co-cultivaron con células Treg *Nrp1KO* o cultivadas solas (~20% Tconv Nrp1+ en ambos casos, **Figura 10A**). Notablemente, la adición de la citoquina rmIL-10 al co-cultivo de células Tconv con células Tregs *Nrp1KO* incrementó la presencia de Nrp1 en las células Tconv (~30% Tconv Nrp1+), a niveles comparables con el incremento utilizando células Tregs *wt* (**Figura 10A**). Es decir, la adición de rmIL-10 al co-cultivo parece “rescatar” el incremento de Nrp1 (modulación del fenotipo) en células Tconv al co-cultivarlas con células Tregs *Nrp1KO*.

Con el propósito de esclarecer la relevancia de IL-10 en estos ensayos, se volvió a tomar una aproximación *in vitro* y se determinaron los niveles de IL-10 presentes en el sobrenadante de co-cultivos de células Tconv y células Tregs de genotipo *wt* o *Nrp1KO* mediante ELISA. En comparación a los sobrenadantes de células Tconv activadas solas, se detectó un nivel mayor *in vitro* de IL-10 en los sobrenadantes de células Tconv co-cultivadas con células Tregs *wt* (**Figura 10B**). Por otro lado, los sobrenadantes de células Tconv co-cultivadas con células Tregs *Nrp1KO* presentó menor nivel de IL-10 en comparación a los sobrenadantes con células Tregs *wt* (**Figura 10B**). Este resultado indica que en co-cultivos de

células Tregs con células Tconv activadas, en presencia de células Tregs *Nrp1KO* hay menores niveles de IL-10 *in vitro*.

En su conjunto, estos resultados sugieren que IL-10 participa en la modulación del fenotipo de células Tconv *in vitro* en presencia de células Tregs Foxp3+.



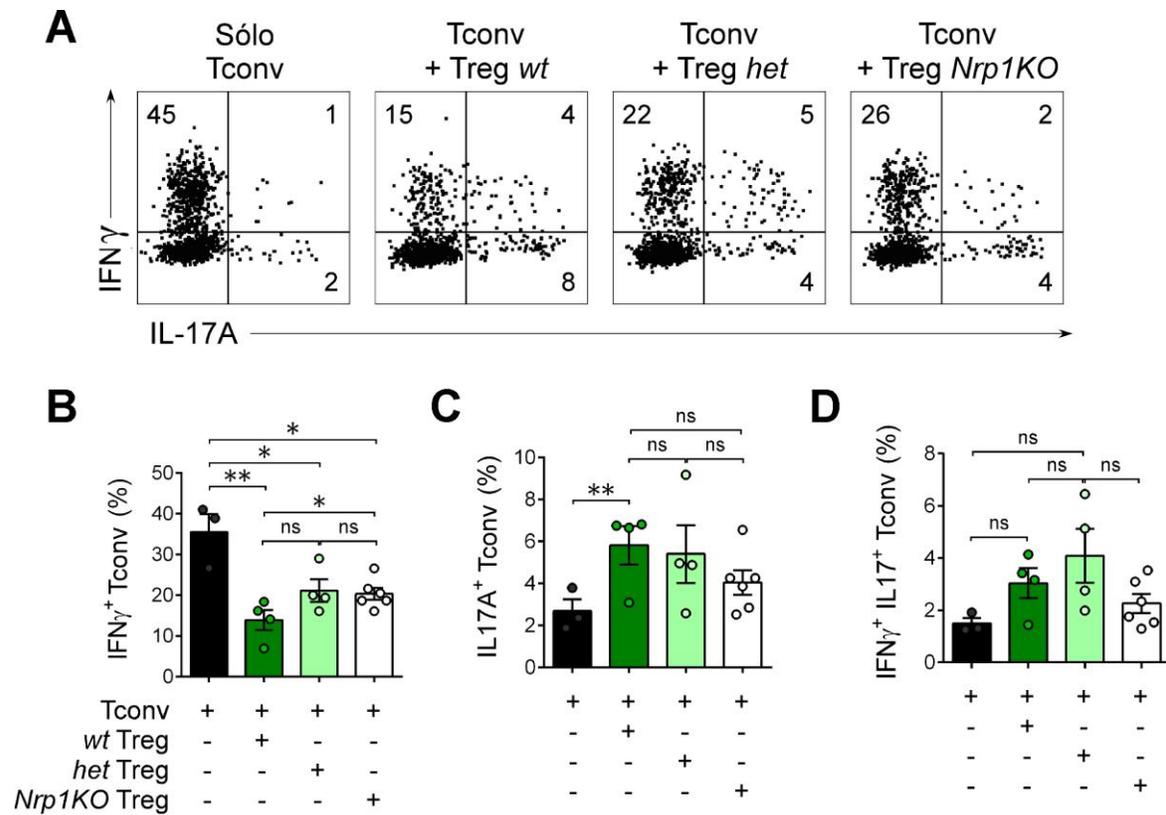
**Figura 10. IL-10 participa en la modulación del fenotipo de células Tconv *in vitro*.** Células Tconv se cultivaron *in vitro* solas o co-cultivadas con células Tregs Foxp3+ *wt* o *Nrp1KO* como se describe en Materiales y Métodos. **A)** Los gráficos de barra muestran la frecuencia acumulada de células Tconv Nrp1<sup>+</sup> activadas solas (barra negra), co-cultivadas con células Tregs *wt* (barra verde oscuro), células Tregs *Nrp1KO* (barra blanca), y co-cultivadas con células Tregs *wt* o *Nrp1KO* con la adición de rmIL-10 (concentración final 10 ng/mL) (barra verde oscuro achurada o barra blanca achurada, respectivamente). **B)** Los sobrenadantes del cultivo se analizaron para cuantificar IL-10 mediante ELISA. El gráfico de barras muestra la absorbancia asociada a los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de células Tconv activadas solas (barra negra), co-cultivadas con células Tregs *wt* (barra verde oscuro) o células Tregs *Nrp1KO* (barra blanca). Para A y B, las barras representan el promedio  $\pm$  SEM. ANOVA de una vía, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ns = no significativo. Para A,  $p = 0,048$  para Tconv vs + *wt* Tregs;  $p = 0,042$  para + *wt* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs;  $p = 0,036$  para + *Nrp1KO* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs más IL-10. Para B,  $p = 0,009$  para Tconv vs + *wt* Tregs;  $p = 0,036$  para + *wt* Tregs vs + *Nrp1KO* Tregs.  $n = 3$  experimentos independientes.

#### 11.10. Células Tregs Nrp1+ disminuyen la frecuencia de células Tconv productoras de IFN- $\gamma$ *in vivo*.

Durante la respuesta inmune contra el trasplante alogénico mediado por células T CD4+, la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-17A son parte de los mecanismos que amplifican la respuesta, culminando con la necrosis del tejido injertado y el rechazo (139, 140). Considerando que la expresión de Nrp1 en células Tregs está involucrada en la modulación de fenotipo (expresión de Nrp1 y Eos) de células Tconv, se analizó el perfil de producción de citoquinas en la población de células Tconv de los LNd de los animales trasplantados, como parte del Objetivo 2.2

Se encontró un ~40% de las células Tconv IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en el grupo de control de rechazo (sólo Tconv). Sin embargo, esta frecuencia disminuyó a ~12% en los animales que recibieron células Tconv con células Tregs *wt* (**Figura 11A-B**). Esta disminución fue significativamente menor en el grupo que recibió células Treg *Nrp1KO* (~25% células Tconv IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, **Figura 11A-B**). No se encontraron diferencias en la frecuencia de células Tconv IL-17<sup>+</sup> o doble positivas IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> entre los grupos que recibieron células Tregs de distinto genotipo (**Figura 11A y C-D**).

Por lo tanto, las células Tregs *Nrp1KO* disminuyen parcialmente la producción de IFN- $\gamma$  en las células Tconv, lo que también contribuiría a esclarecer la incapacidad de Tregs *Nrp1KO* para inducir tolerancia al trasplante.

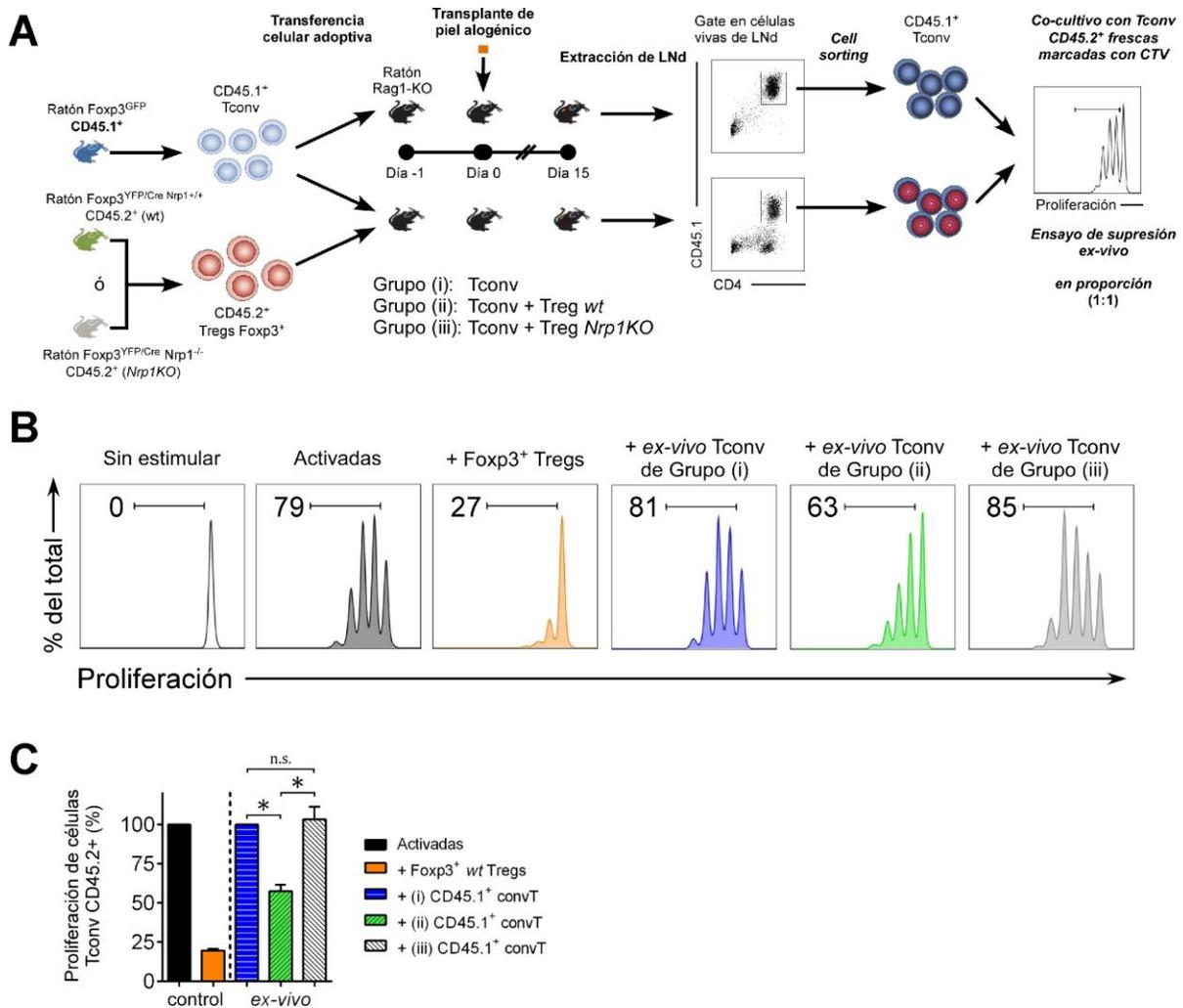


**Figura 11. Células Tregs Nrp1 $^+$  modulan el perfil de secreción de citoquinas de Tconv durante la aceptación de trasplantes *in vivo*.** Células Tconv y células Treg Foxp3 $^+$  se transfirieron a ratones Rag1-KO trasplantados con injertos alogénicos, y al finalizar el experimento las células de los LNd fueron analizadas por citometría de flujo. **A)** *Dot plot* representativos muestran la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  e IL-17A en células Tconv en los distintos grupos de animales trasplantados. Los números representan la frecuencia de células positivas para cada citoquina. **B)** El gráfico de barras muestra la frecuencia de células Tconv IFN- $\gamma^+$  de los grupos de animales trasplantados que recibieron Tconv con células Tregs wt (barra verde oscuro), o con células Tregs het (barra verde claro), o con células Tregs Nrp1KO (barra blanca). **C)** El gráfico de barras muestra la frecuencia de células Tconv IL-17A $^+$  o de células Tconv IFN- $\gamma^+$  IL-17A $^+$  (doble positivos) en **D)**. Para B-D, barras representan promedio  $\pm$  SEM y cada círculo corresponde a un ratón. ANOVA de una vía, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ns: no significativo. Para B,  $p = 0,006$  para Tconv vs + wt Tregs;  $p = 0,036$  para Tconv vs + het Tregs;  $p = 0,041$  para Tconv vs + Nrp1KO Tregs;  $p = 0,042$  para + wt Tregs vs + Nrp1KO Tregs. Para C,  $p = 0,044$  para Tconv vs + wt Tregs. Se muestran los resultados de un experimento representativo.  $n = 3$  experimentos independientes.

### 11.11. Células Tregs Nrp1+ convierten células Tconv a células T supresoras *in vivo* a través de tolerancia infecciosa.

Considerando que las células Tregs *wt* son capaces de inducir la expresión de biomarcadores de regulación (Nrp1 y Eos) y disminuir la producción IFN- $\gamma$  en células Tconv, es posible especular que las células Tconv pudieron adquirir un fenotipo/función inmunomoduladora. Esto podría ocurrir a través del proceso de “tolerancia infecciosa”, en el que una población linfoide supresora puede conferir capacidad supresora a otra, como se ha descrito previamente (141, 142). Para comprobar esto, células Tconv CD45.1+ se purificaron de los LNd de animales trasplantados tratados con células Treg *wt* o *Nrp1KO*, y se analizó su posible función inhibitoria *in vitro* sobre células Tconv frescas CD45.2<sup>+</sup> marcadas con CTV, en lo que se denomina un ensayo de supresión *ex vivo* (**Figura 12A**).

Cuando los animales trasplantados son tratados con Tregs *wt* (tolerantes a alo-injertos de piel), las células Tconv de estos animales también ejercieron función inhibitoria *ex vivo* sobre células Tconv frescas (~55% de proliferación versus 90% de proliferación de Tconv CD45.2+ frescas activadas con células Tconv de animales control de rechazo, **Figura 12B-C**). En línea con esto, las células Tconv de los animales que recibieron Tregs *Nrp1KO* no muestran función supresora *ex vivo* y, por el contrario, no se diferencian de las Tconv del grupo de animales control de rechazo (~105% de proliferación versus 90% de proliferación de Tconv CD45.2+ frescas activadas con células Tconv de animales control de rechazo), como se puede observar en la **Figura 12B-C**. En su conjunto, estos resultados sugieren que las células Tconv “moduladas *in vivo* por células Tregs *Nrp1KO*” también tienen diferencias funcionales con respecto a las células Tconv “moduladas por células Tregs *wt*”. En otras palabras, células Tregs Nrp1+ son capaces de inducir o “infectar” a células Tconv con un fenotipo y función inmunosupresor.



**Figura 12. Células Tregs *Nrp1*<sup>+</sup> modulan la función inmune de Tconv durante la respuesta a trasplante *in vivo*.** Células Tconv y Tregs Foxp3<sup>+</sup> se transfirieron a ratones Rag1-KO trasplantados con injertos allogénicos. **A)** Los animales se sometieron a eutanasia y se extrajeron los LNd. Sus células se marcaron con anticuerpos y las Tconv CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> se purificaron mediante *cell sorting* para estudiar su capacidad supresora *ex vivo* sobre células Tconv CD45.2<sup>+</sup> frescas marcadas con CTV y activadas con APC y anti-CD3 soluble por 72 h. **B)** Los histogramas representativos muestran la proliferación de Tconv CD45.2<sup>+</sup> frescas (Sin estimular, blanca), activadas solas (Activadas, gris oscuro), en presencia de Treg wt frescos (naranja), o células Tconv CD45.1<sup>+</sup> provenientes de animales Rag1-KO trasplantados que recibieron sólo Tconv [Grupo (i), azul], Tconv + Treg wt [Grupo (ii), verde], o Tconv + Treg *Nrp1KO* [Grupo (iii), gris claro], donde el porcentaje de células que proliferaron se indica en el número a la izquierda. **C)** Luego de calcular el índice de división celular (*división index o DI*), se calculó el porcentaje de proliferación de las células Tconv CD45.2<sup>+</sup> frescas como se describe en Materiales y Métodos. Para C, barras representan promedio ± SEM. t-Test de Student, \* *p* < 0,05; ns = no significativo. Para C, *p* = 0,009 para (i) vs (ii); *p* = 0,013 para (ii) vs (iii). *n* = 3 experimentos independientes.

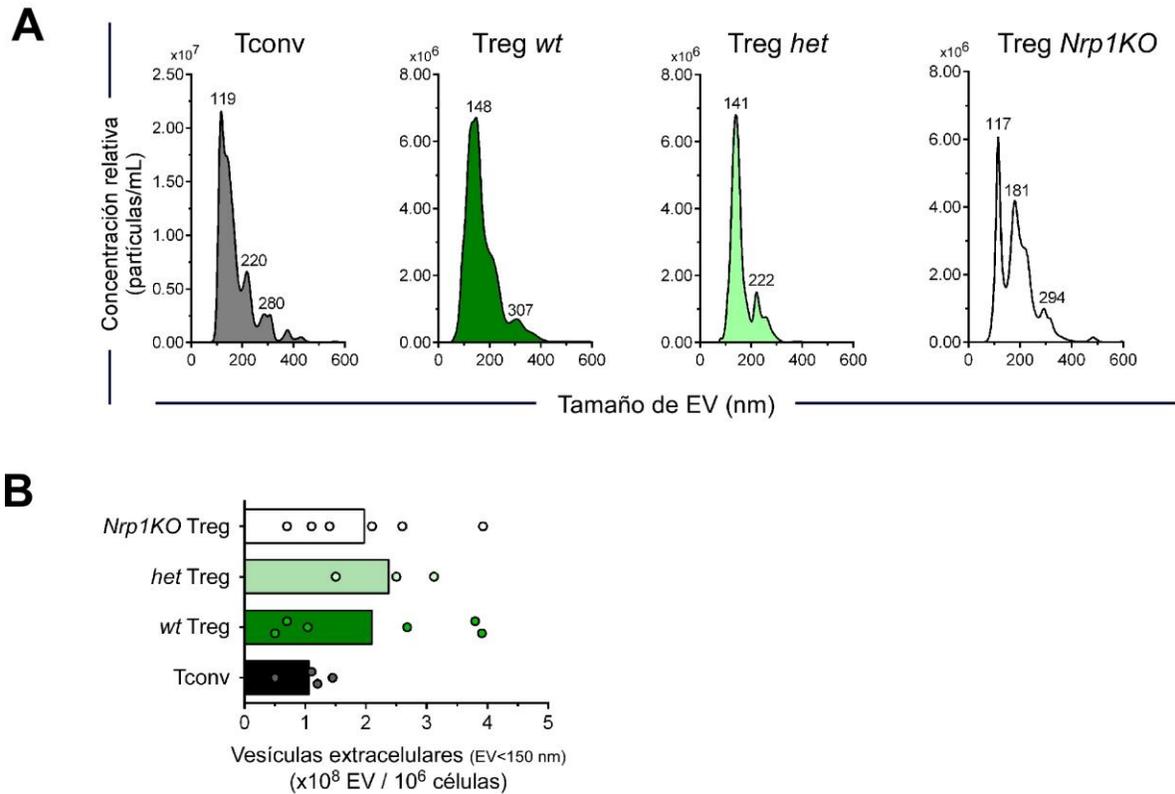
### 11.12. Células Tregs Foxp3+ producen EVs independiente de su expresión de Nrp1.

Considerando que las células Treg *Nrp1KO* ejercen una función supresora *in vitro* deficiente en un contexto contacto-independiente (Fig. 6), podemos especular que Nrp1 participa en la función supresora de células Tregs a través de EVs. Para comprobar esto, y como parte del Objetivo 3.1, se obtuvieron y caracterizaron EVs derivadas de células Tregs.

Para realizar esto, mediante purificación por *cell sorting*, se obtuvieron células Tregs Foxp3+ de genotipo *wt*, *het* y *Nrp1KO*, así como células Tconv, las que se activaron *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en medio de cultivo “libre de EVs”. De esta forma, las EVs recuperadas de los sobrenadantes de estos cultivos provienen en su totalidad de las células incubadas en ese medio de cultivo. Se obtuvieron EVs a partir de los sobrenadantes de los cultivos mediante un protocolo de centrifugación seriada, culminando con un paso de ultracentrifugación que permite separar a las EVs (sedimentadas en el fondo del tubo de ultracentrifugación) del medio de cultivo sobrenadante (medio condicionado o med. cond.).

Para realizar la caracterización de tamaño de las EVs obtenidas, se realizó un Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (ó NTA), donde las muestras de EV de las distintas poblaciones celulares se diluyeron hasta alcanzar una concentración relativa dentro del rango de cuantificación del equipo, y se obtuvo un perfil característico de tamaño (en nanómetros) y concentración relativa (**Figura 13A**). Se encontró que el tamaño aparente se mantuvo relativamente constante entre las EV de Tconv, Treg *wt*, *het* y *Nrp1KO* (**Figura 13A** y **Tabla 2**). Al normalizar los resultados de concentración de partículas, en relación a la dilución utilizada en el equipo y el número celular cultivado, se encontró que los tres genotipos de células Tregs Foxp3+ producen EVs en cantidades similares ( $\sim 2.5 \times 10^8$  EV/ $1 \times 10^6$  células Tregs cultivadas), y se observó una tendencia a producir mayor cantidad de EVs en comparación con células Tconv ( $\sim 1 \times 10^8$  EV/ $1 \times 10^6$  células Tconv cultivadas) (**Figura 13B**).

En su conjunto, estos resultados muestran que las células Tregs Foxp3+ producen mayor cantidad de EVs que otras células T, como células Tconv, lo que apoya reportes previos (57), y que las células Tregs *wt*, *het* y *Nrp1KO* producen cantidades similares de EVs.



**Figura 13. Las células Tregs Foxp3<sup>+</sup> producen EVs independiente de su expresión de Nrp1.** Células Tconv y células Treg provenientes de animales *wt*, *het* o *Nrp1KO* se purificaron y activaron *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en medio de cultivo “libre de EVs”. Luego de 72 h se recuperó el sobrenadante de los cultivos, se sometieron a ciclos de centrifugación seriada y a ultracentrifugación. **A)** Los gráficos representativos de Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (ó NTA) muestran el tamaño (en nanómetros) y la concentración relativa (en partículas por mL) de las EV obtenidas mediante el procedimiento mencionado anteriormente, provenientes de células Tconv (gris oscuro), células Tregs *wt* (verde oscuro), Tregs *het* (verde claro) o Tregs *Nrp1KO* (blanco). Los números sobre los *peaks* indican el tamaño aproximado de la muestra analizada. **B)** El gráfico de barras muestra el número de EVs (con tamaño aparente < 150 nm) normalizado al número de células Tconv (negro), células Tregs *wt* (verde oscuro), células Tregs *het* (verde claro) o células Tregs *Nrp1KO* (blanco). Para B, barras representan promedio y cada círculo corresponde a un cultivo independiente. n = 3-6 experimentos independientes.

Fuente de EVs	Células cultivadas (x10 <sup>6</sup> )	Concentración de EVs (10 <sup>10</sup> partículas/mL)	Tamaño (nm)
Células Tregs <i>wt</i>	1.66 ± 0.54	1.21 ± 0.08	154.2 ± 43.4
Células Tregs <i>het</i>	1.56 ± 0.49	0.96 ± 0.05	159.7 ± 25.7
Células Tregs <i>Nrp1KO</i>	1.59 ± 0.51	0.7 ± 0.06	139.9 ± 67.7
Células Tconv	20.33 ± 5.71	18.1 ± 6.2	117.4 ± 62.3
Resultados expresados como promedio ± desviación estándar. n ≥ 3 experimentos independientes			

**Tabla 2. Número de células cultivadas, concentración relativa y tamaño aparente de las EVs determinado por NTA.**

La tabla indica el número de células Tconv o células Tregs cultivadas, la concentración relativa (dependiente de la dilución empírica al momento de la medición) y el tamaño de las EVs obtenidas informado por el software de análisis de datos NanoSight™.

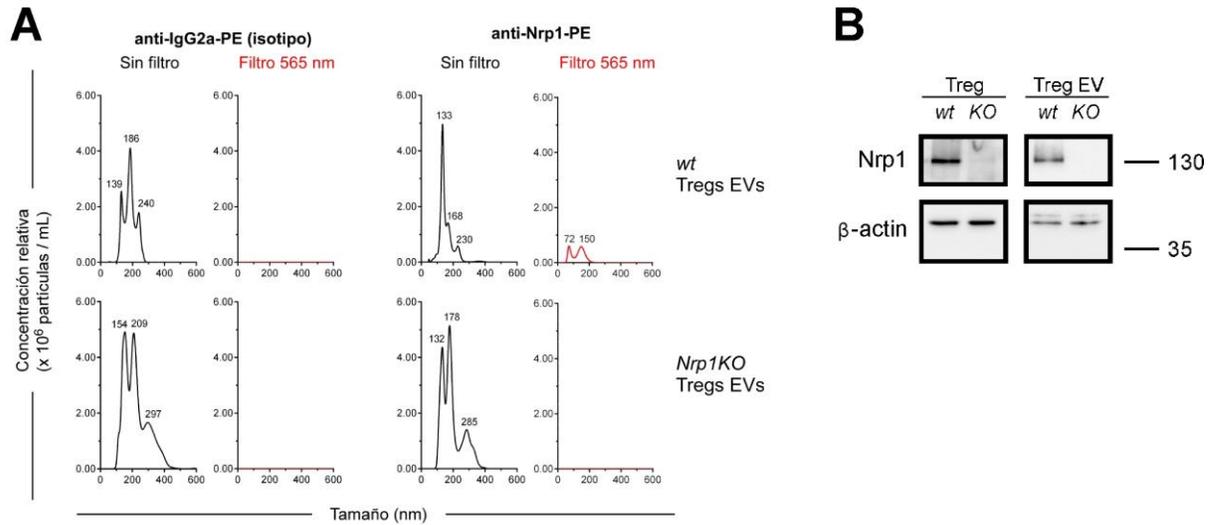
### **11.13. Nrp1 está presente en EVs derivadas de células Treg *wt*.**

Considerando que la presencia de Nrp1 en EVs derivadas de células Tregs Foxp3+ podría ser relevante para la capacidad inmunomoduladora de estas EVs, como parte del Objetivo 3.1, se analizó la presencia de la proteína Nrp1 en EVs derivadas de células Tregs *wt* y Treg *Nrp1KO*.

Muestras de EVs derivadas de células Tregs *wt* o células Tregs *Nrp1KO* se incubaron con ambos anticuerpos, y luego se analizaron por NTA. Se encontró que las EVs derivadas de células Tregs *wt* mostraron EVs de un diámetro entre 70 y 150 nm emitiendo señal fluorescente del fluoróforo PE al ser incubadas con anti-Nrp1, lo que no se observó al utilizar EVs derivadas de células Tregs *Nrp1KO* (**Figura 14A**). Dado que los anticuerpos anti-Nrp1 reconocen el epítipo b1/b2 de la región extracelular de Nrp1, y que los anticuerpos se unen a la superficie de estas nanovesículas, este resultado sugeriría que Nrp1 está presente en la superficie de las EVs derivadas de células Tregs *wt*.

La presencia de Nrp1 en EVs de células Tregs *wt* se confirmó mediante ensayos de Inmunoblot, donde se encontró que está presente en lisados celulares de Tregs *wt* y en lisados de EV de Tregs *wt* (**Figura 14B**), mientras que no se detectó Nrp1 ni en el lisado celular de Tregs *Nrp1KO* ni en lisados de EV derivadas de estas células (**Figura 14B**).

En su conjunto, estos resultados sugieren que las células Tregs secretan EV enriquecidas en Nrp1.



**Figura 14. Nrp1 está presente en EV de células Treg *wt*.** EVs provenientes de Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO* se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos. **A)** EVs derivadas de células Tregs *wt* y células Tregs *Nrp1KO* se incubaron con anticuerpos de isotipo (IgG2a) o anti-Nrp1 acoplados a PE, y analizados mediante NTA usando un filtro de emisión de 565 nm. A la derecha, diagramas describiendo la unión específica de los anticuerpos a la superficie de las EV. **B)** Inmunoblot para la proteína Nrp1. Para A, n = 3 experimentos independientes. Para B, n = 3 experimentos independientes.

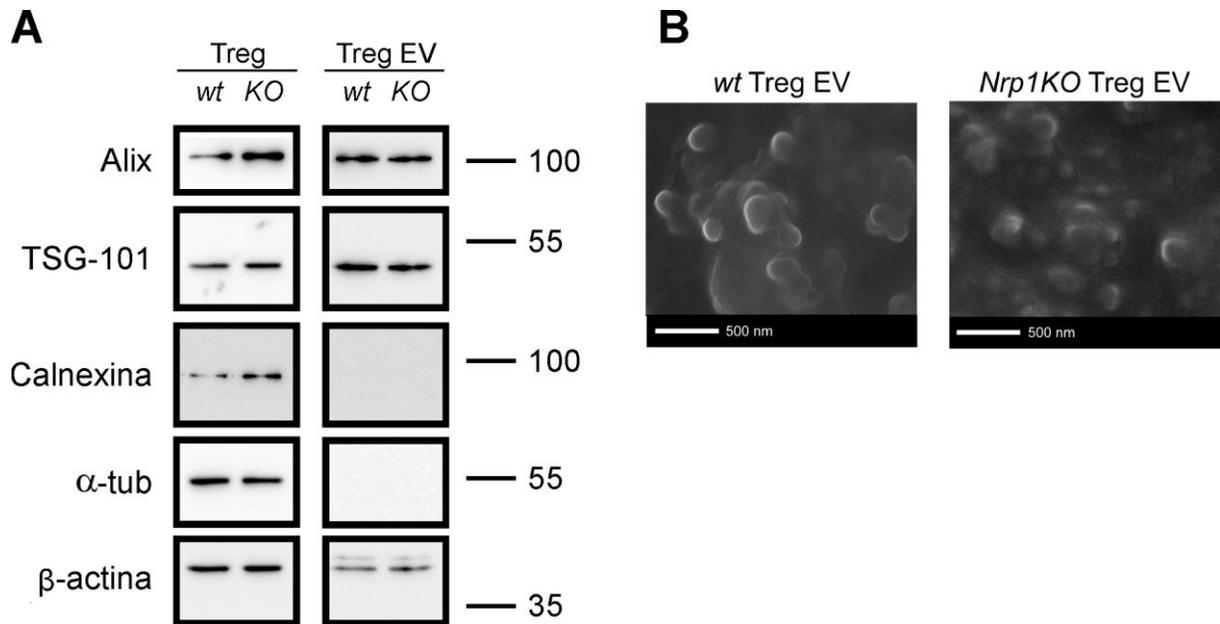
#### **11.14. La deficiencia de *Nrp1* no altera la presencia de marcadores de EVs derivadas de células Tregs Foxp3+.**

A pesar de que no se observaron diferencias en la producción de EVs entre células Tregs *wt* y células Tregs *Nrp1KO* (Fig. 12), se procedió a confirmar que las EVs derivadas de células Tregs *Nrp1KO* no exhiben diferencias en propiedades características, como la presencia de proteínas enriquecidas de EVs, o su forma y tamaño aparente.

En ensayos de Inmunoblot, se estudió la presencia de las proteínas TSG-101 y Alix, descritas como proteínas enriquecidas en EVs de origen endosomal (49) y reportadas previamente como proteínas presentes en EVs derivadas de células Tregs (61). Se encontró que ambas proteínas están presentes tanto en EVs derivadas de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO* como en las mismas células Tregs (**Figura 15A**). Por otro lado, la proteína Calnexina, proteína enriquecida en vesículas derivadas del retículo endoplásmico y marcador negativo de EVs, no se detectó en los extractos de EVs derivadas de ambos tipos de Tregs (**Figura 15A**). La proteína  $\alpha$ -tubulina sólo se encontró presente en ambos tipos de células Tregs, mientras que la proteína  $\beta$ -actina se detectó tanto en las células Tregs como en las EVs derivadas de células Tregs (**Figura 15A**).

Mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) también se analizó la forma y tamaño aparente de EVs provenientes de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO*. Las EVs provenientes de ambos tipos de células Tregs presentaron una forma ovalada y un tamaño aproximado entre 100 y 200 nm de diámetro, por lo que no se encontraron diferencias en estos parámetros entre las EVs de células Tregs de ambos genotipos (**Figura 15B**).

En su conjunto, estos resultados apoyan que las EVs obtenidas de células Tregs cultivados *in vitro* se encuentran enriquecidas en vesículas derivadas de compartimentos endosomales, confirmando sus propiedades de EVs. No se encontraron diferencias en los parámetros estudiados entre las EVs de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1*-deficientes.



**Figura 15. La deficiencia de Nrp1 no altera la presencia de marcadores canónicos de EVs derivadas de células Tregs Foxp3<sup>+</sup>.** EVs provenientes de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO* se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos. **A)** Lisados de EVs derivadas de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO* se analizaron por Inmunoblot para las proteínas Alix, TSG-101, Calnexina,  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -tub) y  $\beta$ -actina, comparando la presencia de estas proteínas en las mismas células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO*. **B)** EVs derivadas de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO* se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para visualizar la forma y el tamaño esperado en estas EVs. La leyenda inferior indica la escala de referencia. Aumento 20.000X. En A, n = 3 experimentos independientes. En B, n = 2 experimentos independientes.

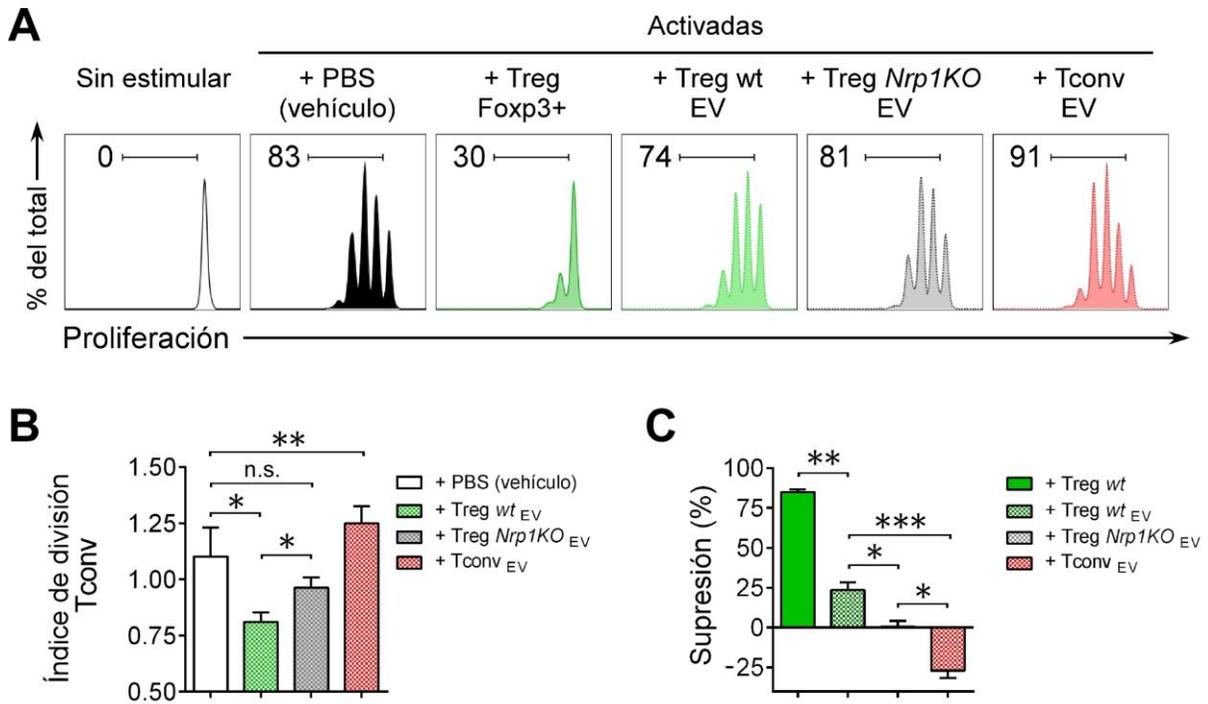
### **11.15. EVs derivadas de Treg *Nrp1KO* poseen función supresora deficiente *in vitro*.**

Considerando que nuestras observaciones anteriores indican que *Nrp1* está presente en las EVs derivadas de células Tregs *Foxp3+*, eso sugiere que *Nrp1* podría ser relevante en la función inmune de estas EVs. Como parte del Objetivo 3.2, se estudió si la presencia de *Nrp1* es necesaria para la función inmuno-moduladora de EVs derivadas de células Tregs *wt* o Tregs *Nrp1KO*.

Por lo tanto, se analizó la función supresora *in vitro* de las EVs provenientes de células Tregs *wt* o de Tregs *Nrp1KO*, evaluando su efecto en la proliferación de células Tconv marcadas con CTV, activadas con APCs y anti-CD3. Se usaron células Treg *wt* frescas como control positivo de supresión, y como control negativo a EVs derivadas de Tconv.

De acuerdo a nuestros resultados anteriores, las células Tregs *wt* frescas inhibieron la proliferación de células Tconv (~30% versus ~83% de proliferación de Tconv activadas tratadas con vehículo [PBS], **Figura 16A**). Por el contrario, las EVs derivadas de células Tconv promovieron la proliferación y la división celular de las células Tconv (~91% versus ~83% de proliferación de Tconv activadas tratadas con vehículo, **Figura 16A-B**). Al agregar EVs derivadas de células Tregs *wt*, se observó una disminución de la proliferación y el índice de división de las células Tconv tratadas (~74% versus ~83% de proliferación de Tconv tratadas con vehículo, **Figura 16A-B**). Al agregar EVs derivadas de células Tregs *Nrp1KO*, no se observaron diferencias significativas en la división celular y la proliferación con respecto a la condición sin tratar (~81% versus ~83% de proliferación de Tconv tratadas con vehículo, **Figura 16A-B**). Finalmente, luego de calcular el porcentaje de supresión, se confirmó que la función supresora de EVs de células Tregs *Nrp1KO* es significativamente menor a la de EVs derivados de células Tregs *wt* (20% de supresión con EVs de Tregs *wt* versus ~3% de supresión con Tregs *Nrp1KO*, **Figura 16C**).

Por lo tanto, esto sugiere que la expresión de *Nrp1* en las células Tregs *Foxp3+* es relevante para la función inmunomoduladora *in vitro* de sus EVs.



**Figura 16. EV derivadas de células Tregs *Nrp1KO* tienen función supresora *in vitro* deficiente.** EVs provenientes de células Tconv, Tregs wt y Tregs *Nrp1KO* se obtuvieron como se describe en la sección Materiales y Métodos. Células Tconv CD45.1+ respondedoras marcadas con CTV se cultivaron *in vitro* solas (Sin estimular), activadas con anti-CD3 y anti-CD28 (Activadas), co-cultivadas con células Tregs Foxp3+ wt (control positivo de supresión), tratadas con PBS (vehículo) o con 5 µg/mL de EVs derivadas de células Tregs wt, o de Tregs *Nrp1KO* o de células Tconv (control negativo). Luego de 72 h, la proliferación de las células Tconv CD45.1+ se analizó mediante citometría de flujo. **A)** Los histogramas representativos muestran la proliferación de Tconv CD45.1+ sin estimular (blanca), activadas y tratadas con PBS (vehículo, negro), co-cultivadas con células Tregs Foxp3+ wt (verde oscuro), o tratadas con EVs derivadas de células Tregs wt (verde punteada), EVs de Tregs *Nrp1KO* (gris punteada) o EVs de Tconv (roja punteada). El porcentaje de células que proliferaron se indica en el número a la izquierda. **B)** El gráfico de barras muestra el índice de división (número promedio de divisiones de una célula de la población inicial) de las células Tconv. **C)** El gráfico de barras muestra el porcentaje de supresión de la proliferación de Tconv CD45.1+ como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Para B y C, las barras representan promedio ± SEM. t-Test de Student, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; ns = no significativo. Para B, p = 0,018 para PBS vs wt Treg EV; p = 0,007 para PBS vs Tconv EV; p = 0,021 para wt Treg EV vs *Nrp1KO* Treg EV. Para C, p = 0,002 para wt Treg vs wt Treg EV, p = 0,048 para wt Treg EV vs *Nrp1KO* Treg EV; p = 0,001 para wt Treg EV vs Tconv EV; p = 0,018 para *Nrp1KO* Treg EV vs Tconv EV. n = 3 experimentos independientes.

### **11.16. Medios condicionados derivados de la ultracentrifugación carecen de EVs y no poseen función supresora.**

Durante la obtención de EVs provenientes de los sobrenadantes de cultivo celular, en el paso final de ultracentrifugación, las EVs quedan depositadas en el fondo del tubo de ultracentrifugación, separadas del sobrenadante de cultivo celular ultracentrifugado, desde ahora denominado “medio condicionado ultracentrifugado”.

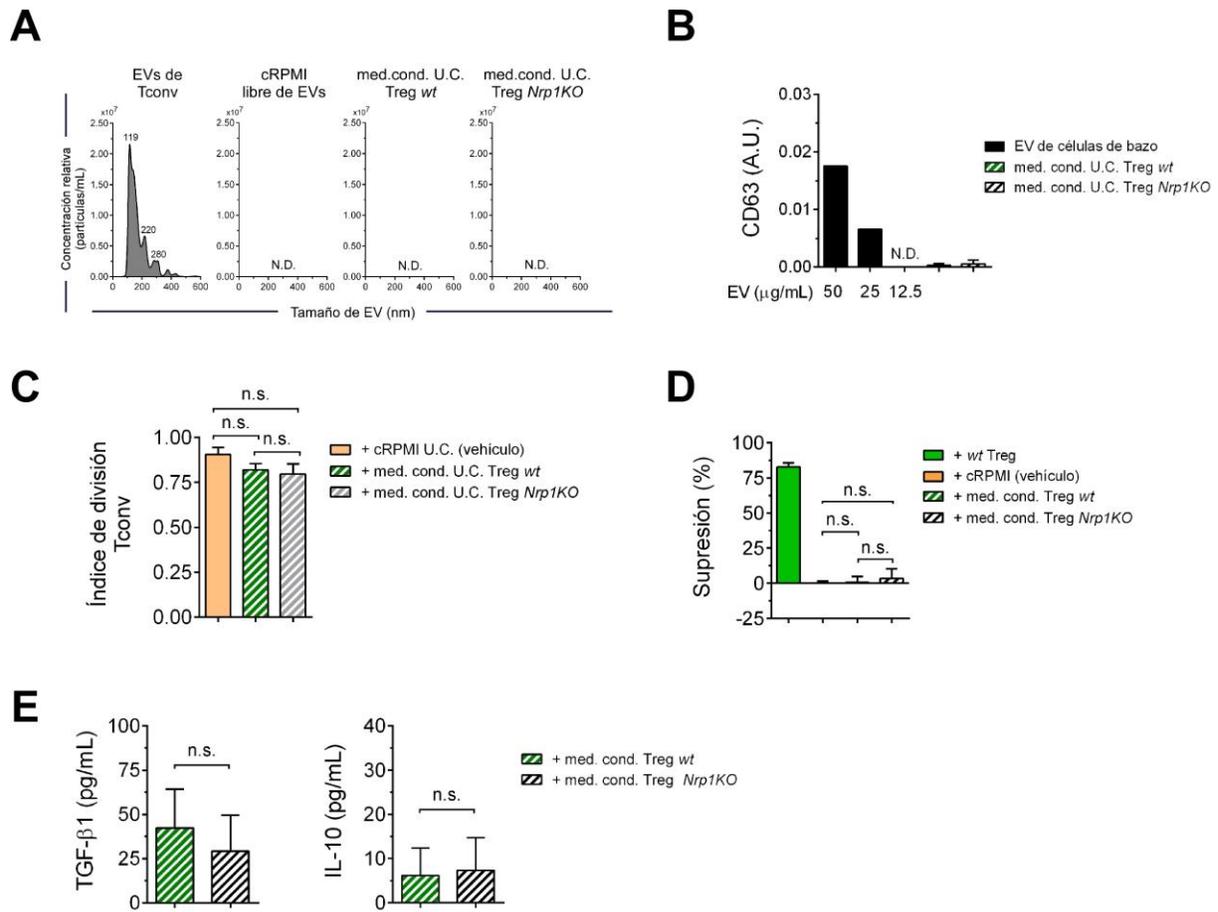
Para descartar la presencia de EVs remanentes en los medios condicionados ultracentrifugados luego de la purificación de EVs, se analizó su presencia mediante NTA. En comparación con una muestra de EVs derivadas de células Tconv, no se encontraron niveles detectables de EVs u otras partículas de tamaño vesicular (50 a 250 nm de diámetro) en el medio de cultivo cRPMI libre de exosomas, el medio condicionado ultracentrifugado de células Tregs *wt* y el medio condicionado ultracentrifugado de células Tregs *Nrp1KO* (**Figura 17A**).

Para corroborar este resultado, se analizó la presencia de EVs en los medios condicionados ultracentrifugados mediante ELISA, utilizando anticuerpos de captura y detección contra CD63, una proteína de membrana enriquecida en EV (*143*), y se utilizó como control distintas cantidades de EVs de células de bazo activadas *in vitro*. Mientras que se detectó CD63 en estas EVs control, para la determinación de CD63 en las muestras de medio condicionado ultracentrifugado de células Tregs *wt* y Tregs *Nrp1KO* se obtuvieron valores indistintos al umbral de detección de la técnica (**Figura 17B**).

De forma complementaria, se estudió si los medios condicionados ultracentrifugados de células Tregs podían ejercer función inmunosupresora *in vitro*, analizando la proliferación de células Tconv activadas *in vitro* por 72 h, tratadas con los medios condicionados ultracentrifugados y utilizando como control al medio cRPMI “libre de exosomas”. No se encontró una alteración significativa de la división celular de las células Tconv tratadas con los medios condicionados ultracentrifugados de ambos genotipos de Tregs (**Figura 17C**). Tampoco se encontraron diferencias de porcentaje de supresión *in vitro* de los medios condicionados ultracentrifugados de células Treg *wt* o *Nrp1KO*, utilizando como control positivo de supresión a células Tregs *wt* frescas (**Figura 17D**).

Finalmente, para caracterizar la presencia de otros factores solubles secretados por células Tregs, se determinó el nivel de las citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$  en los medios condicionados ultracentrifugados derivados del cultivo de células Tregs *wt* y *Nrp1KO*, mediante ELISA. Se encontraron cantidades similares de ambas citoquinas en los medios condicionados ultracentrifugados de ambos tipos de células Tregs Foxp3+ (**Figura 17E**).

En su conjunto, estos resultados demuestran que luego de la ultracentrifugación, los medios obtenidos efectivamente se encuentran libres de EVs.



**Figura 17. Medios condicionados de células Tregs, provenientes de la purificación de EVs, están depletados de EVs.** Células Treg *wt* y Treg *Nrp1KO* se cultivaron y las EVs provenientes de estas células se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos. Los medios condicionados ultracentrifugados obtenidos luego de la purificación de EVs de células Tregs, se analizaron con el objetivo de comprobar la presencia de EVs remanentes. **A**) Los gráficos de tamaño de EV versus concentración relativa muestran el análisis de NTA de una muestra control de EVs de Tconv (gris oscuro), de medio cRPMI libre de EVs, de medios condicionados ultracentrifugados de células Tregs *wt* (verde con rayas, no detectable) o de células Tregs *Nrp1KO* (negro con rayas, no detectable). **B**) El gráfico de barras muestra la absorbancia (medida en unidades arbitrarias, A.U.) para CD63 mediante ELISA, de EVs control de células de bazo (barras negras), medio condicionado ultracentrifugado de células Tregs *wt* (barra verde con rayas) o de células Tregs *Nrp1KO* (barra negra con rayas). **C**) Células Tconv CD45.1+, marcadas con CTV, se activaron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y tratadas con medio cRPMI libre de EVs (barra naranja), o tratadas con medio condicionado ultracentrifugado de células Treg *wt* (barra verde con rayas) o de células Treg *Nrp1KO* (barra negra con rayas). Luego de 72 h, la proliferación de las células se analizó por citometría de flujo. **D**) El gráfico de barras muestra el porcentaje de supresión de la

proliferación de Tconv CD45.1+, tratadas con células Tregs *wt* (control positivo de supresión, barra verde oscuro), con medio cRPMI libre de EVs (barra naranja), o con medio condicionado ultracentrifugado de células Tregs *wt* (barra verde con rayas) o de células Tregs *Nrp1KO* (barra negra con rayas), calculado como se describe en Materiales y Métodos. **E)** Los gráficos de barra muestran la concentración (en pg/mL) de las citoquinas anti-inflamatorias TGF- $\beta$  (izquierda) e IL-10 (derecha) en los medios condicionados ultracentrifugados provenientes de células Tregs *wt* (barras verde con rayas) o células Tregs *Nrp1KO* (barra negra con rayas), mediante ELISA. Para B-E, barras representan promedio  $\pm$  SEM. t-Test de Student; ns = no significativo. n = 3 experimentos independientes.

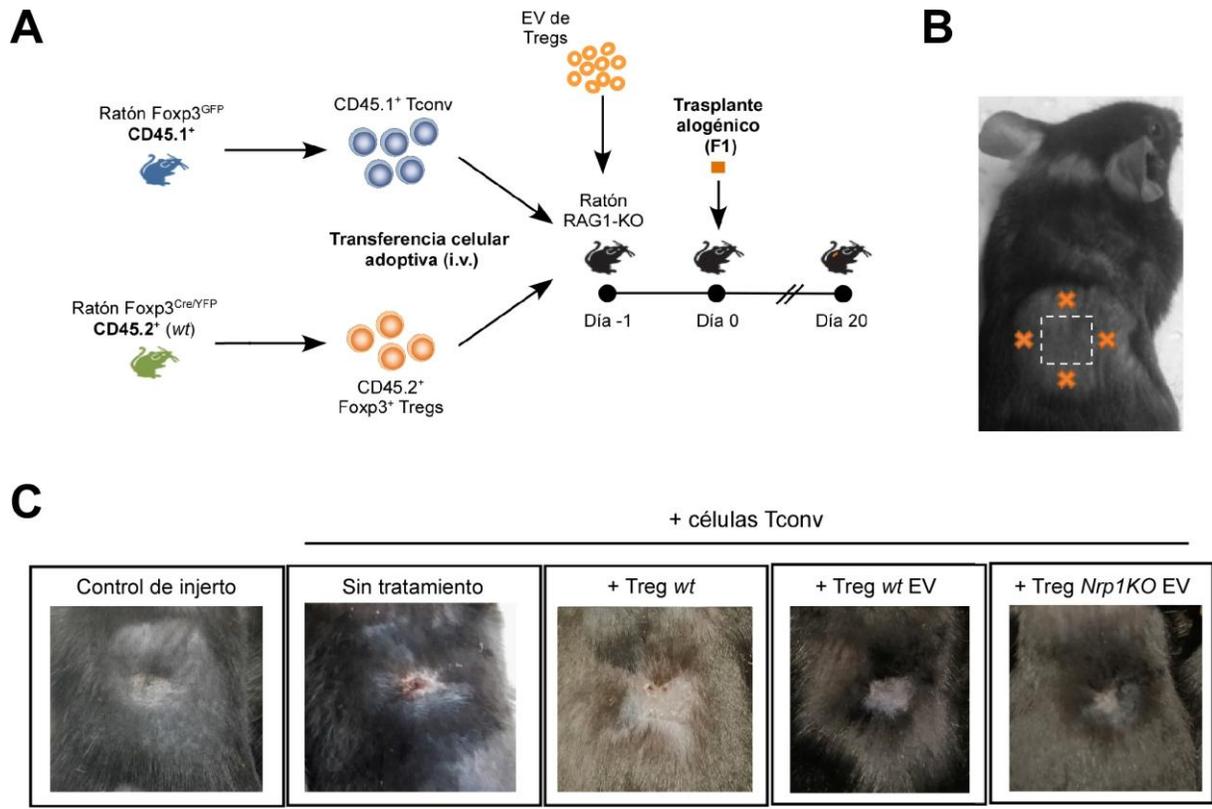
### **11.17. EVs derivadas de células Tregs *wt* inducen tolerancia a injertos de piel *in vivo*.**

Nuestros resultados muestran que Nrp1 está presente en las EVs derivadas de células Tregs *wt*, que su ausencia no afecta la producción de estas EVs, y que estas EVs poseen función supresora *in vitro* sobre células Tconv activadas. Considerando estos antecedentes y enmarcado en el Objetivo específico 3.3, se procedió a evaluar si Nrp1 presente en las EVs derivadas de Tregs Foxp3+ participa en la función supresora *in vivo* sobre la respuesta inmune contra trasplantes de piel alogénica.

De manera análoga a los experimentos *in vivo* descritos anteriormente, animales Rag1-KO recibieron de forma i.v. sólo células Tconv (grupo control rechazo), o Tconv junto con células Treg *wt* (grupo control tolerancia), como se puede apreciar en la **Figura 18A**. Dos grupos de animales que sólo recibieron Tconv, además se trataron con EVs provenientes de Tregs *wt* o de Tregs *Nrp1KO* de forma subcutánea (s.c.) en la zona dorsal (**Figura 18B**). Al día siguiente, estos animales se trasplantaron con injertos de piel alogénicos, y la supervivencia de los trasplantes se monitoreó tres veces a la semana. Como era esperado, la mayoría de los animales del grupo control de rechazo efectivamente perdieron su injerto de piel (10% aceptación), mientras que los animales del grupo control de tolerancia (que recibió células Treg *wt*), 89% de los animales aceptaron los injertos (**Figura 18C y Tabla 3**).

Notablemente, se encontró que el tratamiento s.c. con EVs provenientes de células Tregs *wt* también permitió la aceptación de injerto de piel en 57% de los animales del grupo (**Figura 18C y Tabla 3**). Sin embargo, se encontró que el tratamiento local con EVs derivadas de Tregs *Nrp1KO* sólo indujo la aceptación de injerto en el 28% de los animales del grupo (**Figura 18C y Tabla 3**).

Por lo tanto, este resultado indica que las EVs de Tregs *wt* tienen capacidad inmunomoduladora *in vivo* y que, posiblemente, Nrp1 medie esta función.



**Figura 18. Inducción de tolerancia a aloinjertos mediada por EV derivadas de células Tregs wt.** **A)** Diseño experimental para inducción de tolerancia a alo-injertos *in vivo*. Se aislaron células Treg Fxp3<sup>+</sup> y células Tconv como describe en Materiales y Métodos. Células Tconv se transfirieron i.v. a ratones Rag1-KO, solas o co-transferidas con células Treg wt. Dos grupos que recibieron sólo Tconv, además recibieron una dosis s.c. de 5 µg de EVs derivadas de células Treg wt o de EVs células Treg *Nrp1*KO en la zona dorsal. Al día siguiente, los animales recipientes se trasplantaron. **B)** Esquema representativo ilustrando la zona dorsal de ratón donde recibió la inyección s.c. de EV de Treg wt, en cada punto (cruces naranja) rodeando la zona del trasplante de piel a realizar al día siguiente. **C)** Las fotografías muestran el resultado de la sobrevida del trasplante alógeno de piel en los animales sin transferencia celular (Control injerto), los que recibieron sólo células Tconv y PBS (Sin tratamiento), los tratados con células Treg wt o con EVs derivadas de células Treg wt o células Tregs *Nrp1*KO. Para C, cada condición con 6-10 animales por grupo. n = 3 experimentos independientes.

Grupo experimental	n	Tratamiento (transferencia celular)	Estado al día 20		Sobrevida del trasplante (%)	Nivel de significancia ( $\chi^2$ )
			✓	X		
Control de trasplante	6	Sin células	6	0	100	
Control de rechazo	10	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv	1	9	10	
Control de tolerancia	9	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv + CD45.2 <sup>+</sup> Tregs <i>wt</i>	8	1	89	p<0.01 versus control de rechazo
Grupo tratado	7	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv + s.c. Tregs <i>wt-EVs</i>	4	3	57	p<0.05 versus control de rechazo
Grupo tratado	7	CD45.1 <sup>+</sup> Tconv + s.c. Tregs <i>Nrp1KO-EVs</i>	2	5	28	n.s. versus control de rechazo

**Tabla 3. Estado y sobrevida de trasplantes de piel en animales tratados con células Tregs *wt* o con EVs derivadas de células Tregs *wt* o de Tregs *Nrp1KO*.**

La tabla resumen muestra el número de animales, las poblaciones celulares transferidas, el tratamiento con EVs derivadas de células Tregs, el estatus del trasplante (aceptado o rechazado) y el porcentaje de sobrevida en los diferentes grupos experimentales luego de 20 días post-trasplante. Test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de N-1 (136). n.s. = no significativo.

p = 0,0008 para Control de tolerancia vs Control de rechazo; p = 0,0418 para Grupo tratado con *wt* Treg-EVs vs Control de rechazo; p = 0,3369 para Grupo tratado con *Nrp1KO* Treg-EVs vs Control de rechazo. n = 3 experimentos independientes.

## 12. DISCUSIÓN

Esta tesis se enfocó en determinar la importancia de Nrp1 en los mecanismos de supresión que involucran la función de células Tregs para modular la respuesta inmune.

En este trabajo se demostró, por primera vez en un modelo murino *in vivo*, que la presencia de Nrp1 en células Tregs es necesaria para inhibir células Tconv reactivas a injertos alogénicos, lo cual es clave en la inducción de tolerancia a trasplantes. Al comparar la función de células Tregs en co-cultivos *in vitro* sin contacto celular (“*transwell*”), las células Tregs *Nrp1KO* suprimieron en menor medida la proliferación de células Tconv activadas. En los animales con injertos alogénicos, las Treg *Nrp1KO* produjeron menores niveles de IL-10 y mayores niveles de IFN- $\gamma$ , lo que podría estar contribuyendo a su función supresora *in vivo* deficiente. Por el contrario, las células Tregs *wt* (Nrp1+) incrementaron el porcentaje de supervivencia de los injertos en animales trasplantados, disminuyeron significativamente la producción de IFN- $\gamma$  de células Tconv *in vivo* y promovieron la ganancia de función supresora de células Tconv en ensayos de supresión *ex vivo*. Por otro lado, Nrp1 se encontró presente en EVs producidas por células Tregs *wt*, pero la deficiencia de *Nrp1* en células Tregs no alteró la producción de EVs ni la presencia de proteínas características de EVs. Adicionalmente, se encontró que Nrp1 es relevante para la correcta función supresora de estas EVs, puesto que EVs producidas por células Tregs *Nrp1KO* son incapaces de inhibir la proliferación *in vitro* de células Tconv, y estas EVs fallaron en inducir tolerancia a trasplante.

### **Nrp1 en la expresión de marcadores de células Treg y Tconv**

Previamente, se describió la presencia de Nrp1 en células Tregs Foxp3+ provenientes de distintos tejidos del organismo, la cual es expresada en altos niveles en comparación a otras células inmunitarias (19, 109, 144). Durante la presentación antigénica, la interacción entre DCs y Tregs se prolonga debido a la presencia de Nrp1, lo que otorga una ventaja a las células Tregs para activarse por sobre las células T vírgenes en condiciones de cantidad limitada de antígeno, lo que promueve un estado de supresión de la respuesta inmune en ausencia de señales de inflamación (109). Hace algunos años, se postuló a Nrp1 como un marcador para distinguir entre células Tregs naturales provenientes del timo (tTreg), y células Tregs inducidas desde células T CD4+ vírgenes en tejidos periféricos (pTreg), debido a sus altos y

bajos niveles de expresión de superficie de Nrp1, respectivamente (20, 21). Esto sugiere que la ausencia de esta molécula en animales *Nrp1KO* podría afectar la frecuencia de estas células en el organismo. No obstante, estos estudios no indagaron en cómo Nrp1 participaría en la generación de células tTreg, y estudios posteriores confirmaron que la frecuencia de células Tregs se mantiene constante en animales Nrp1-deficientes en células T (145) y en células T CD4+ (111). Respecto a la función celular, un estudio mostró que la unión de ligando al co-receptor Nrp1 participaría en la expresión génica y la mantención del fenotipo supresor de células Tregs, puesto que células Tregs activadas en presencia de Sema4A modulan la expresión génica asociada a las vías de IL-2 y IL-7, reprimen la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-12), aumentan la expresión génica de Helios y de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (112).

Sin embargo, a la fecha se desconocía si la ausencia de Nrp1 en células Tregs cambia la expresión de otras moléculas involucradas en su función. En este trabajo, se demostró que la deficiencia de Nrp1 no altera la presencia de marcadores asociados a inmunoregulación en células Tregs Foxp3+, ni la expresión de factores de transcripción asociados a perfil pro-inflamatorio. Otros trabajos han descrito una función supresora deficiente en células Tregs *Nrp1KO*, utilizando modelos de colitis experimental (113, 114), pero estos reportes no analizaron la expresión de marcadores específicos de células Tregs que diesen cuenta de una menor supresión.

Aparte de células Tregs Foxp3+, encontramos sólo una disminución parcial de Nrp1 en las células Tconv del bazo de animales *Nrp1KO*. Esto puede atribuirse a la presencia de células T CD4+ “ex-Tregs” (146) entre las células Tconv (seleccionadas en el análisis de citometría como células T CD4+Foxp3-). En otras palabras, son células que alguna vez durante la vida del animal expresaron Foxp3 y, por consiguiente, expresaron la recombinasa Cre que escinde la región correspondiente al exón 2 del gen *Nrp1* (126). Al activarse por presentación antigénica, cierta porción de estas células pudo perder la expresión de Foxp3 y función supresora (ex-Tregs, o ex-Foxp3+) mediante un proceso conocido como plasticidad fenotípica, descrito en diversos contextos inmunológicos (147, 148). Esta observación se reportó con la cepa *Foxp3*<sup>Cre/YFP</sup> (la misma utilizada en el presente trabajo), pero analizando la relevancia funcional de CD28 en células Tregs utilizando animales *Cd28*<sup>flox/flox</sup> (149, 150). Al cruzar ambas cepas de animales, no sólo se encontró delección de CD28 en células Tregs YFP+

sino que además en una fracción menor de células Tconv (149). Cabe mencionar que en esta tesis, en todos los experimentos *in vitro* e *in vivo*, se utilizaron células Tregs purificadas mediante *cell sorting*. Por lo tanto, si la función de células Tregs *Nrp1KO* fuese alterada en presencia de células Tconv con deficiencia parcial de *Nrp1*, esto no se reflejaría en los experimentos realizados, debido a la utilización de células Tregs purificadas. Los resultados obtenidos sugieren, en su conjunto, que en condiciones de homeostasis la deficiencia de *Nrp1* específicamente en células Tregs *Foxp3+* no altera su expresión de marcadores inmunoregulatorios.

En los ensayos de supresión *in vitro* donde células Tregs y Tconv se encuentran en contacto directo entre sí, no se observaron diferencias entre la actividad supresora de células Tregs *wt*, *het* y *Nrp1KO*, lo que concuerda con reportes previos (111, 113) y puede atribuirse a que las células Tregs *Foxp3+* presentan distintas moléculas inmunomoduladoras que ejercen función de forma contacto célula-célula, tales como CTLA-4, CD73 y PD-1, entre otras (151). Esto ya fue observado previamente por otros investigadores, donde utilizaron un modelo murino de artritis para determinar el rol de CTLA-4 en la función de células Tregs (152). En comparación a células Tregs *wt*, ellos encontraron que las células Tregs deficientes en *Ctla4* también suprimieron el desarrollo de artritis en ratones, lo que atribuyeron a los altos niveles de expresión de las moléculas CD73 y PD-1 (152).

Sin embargo, la función supresora de células Tregs *Nrp1KO* resultó ser menor al utilizar el diseño experimental contacto-independiente (“*transwell*”). Dado que estas membranas semi-porosas permiten el paso de factores solubles, esto sugiere que la deficiencia de *Nrp1* afecta la función de células Tregs independiente de contacto celular, como por ejemplo la supresión mediada por EVs (52), tópico que será discutido más adelante.

En ambos tipos de ensayos de supresión se encontró que células Tconv expresan mayores niveles de *Nrp1* cuando están en presencia de células Tregs *Nrp1+*. Este resultado de experimentos *in vitro* recapitula observaciones anteriores de nuestro grupo en el modelo *in vivo* de trasplante de piel, en que células Tconv de animales con trasplante de piel presentan más *Nrp1* en la membrana cuando estos animales son tratados con células Tregs *Nrp1+* (124). En el presente estudio observamos además que, mientras las células Tconv incrementan los niveles de *Nrp1* en su membrana *in vitro*, las células Tregs *wt* y *het* la disminuyeron, lo que también había sido observado previamente utilizando el modelo murino de trasplante (124). Si

consideramos la observación de que Nrp1 está presente en EVs derivadas de células Tregs *wt*, es posible concebir que ocurre un “traspaso” del marcador inmunoregulatorio Nrp1 desde células Tregs hacia células Tconv, a través de la liberación y la captación de EVs Nrp1+, respectivamente. Este proceso de traspaso de proteínas de superficie de una célula a otra a través de EVs ya ha sido reportado previamente: células T activadas pueden secretar EVs conteniendo complejos TCR/CD3, moléculas de FasL, o de Apo2-ligando, los que están implicados en regulación inmune mediante la apoptosis inducida por activación sobre otras células T (153-155). Esta posible transferencia de receptores de superficie (como Nrp1) desde células Tregs hacia células Tconv, mediante EVs secretadas *in vitro* o *in vivo*, podría dar cuenta del incremento de este receptor en células Tconv y de su modulación inmune. Para demostrar esto, se requeriría realizar experimentos cultivando células Tconv activadas *in vitro* y tratarlas con cantidades crecientes de EVs de células Tregs *wt* o Tregs *Nrp1KO*, y luego analizar la presencia de Nrp1 en las células Tconv mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia, utilizando anticuerpos anti-Nrp1 marcados. De esta forma, podría comprobarse si efectivamente ocurre el incremento de Nrp1 en células tratadas con EVs Nrp1+.

### **Nrp1 y la función supresora *in vivo* de células Tregs Foxp3+**

En el modelo murino de trasplante de piel, el rechazo ocurre mediante la activación de células Tconv reactivas al injerto presentes en los LN<sub>d</sub>, migrando al injerto y secretando citoquinas como IFN- $\gamma$  e IL-17A (156). Por otro lado, la inducción de tolerancia inmune puede ser mediada por células Tregs Foxp3+ que suprimen la respuesta inmune alogénica mediante diversos mecanismos, tales como la producción de IL-10 (124, 157, 158). Nuestros resultados mostraron que las células Tregs *Nrp1KO* no promovieron la sobrevida del injerto en los animales injertados, es decir, no fueron capaces de inducir tolerancia a trasplantes. Estos resultados son concordantes a los obtenidos en modelos murinos de tumor, donde células Tregs *Nrp1KO* tampoco fueron capaces de suprimir la respuesta inmune (inducir tolerancia) frente a tumores con alta inmunogenicidad, como adenocarcinoma de colon (MC38), y frente a tumores de baja inmunogenicidad, como melanoma (B16F10) (113). Se ha reportado que Nrp1 contribuye a la migración e infiltración de células Tregs en melanoma, lo que disminuiría la respuesta inmune anti-tumoral y favorecería la progresión del tumor (111).

Aunque estas observaciones no han sido extendidas para células Tregs en el contexto de la inmunidad a trasplantes, sí se ha visto que Nrp1 (en complejo con el receptor plexin-A1) es importante en la migración de DCs en el endotelio linfático y su entrada en ganglios linfáticos drenantes de piel, en un modelo murino de hipersensitividad por contacto (159). En esta tesis, se estudiaron las células Tregs Foxp3+ presentes en los ganglios drenantes del trasplante de animales con alo-injertos de piel. Sin embargo, no se observó diferencia en la frecuencia de estas células en los ganglios drenantes, independiente de si los animales fueron tratados con células Tregs *wt*, *het* o *Nrp1KO*. Esto sugiere que, en nuestro modelo de trasplante, Nrp1 posiblemente no estaría involucrada en la migración de las células Tregs a los ganglios drenantes del trasplante. Por lo tanto, se vuelve necesario analizar en profundidad las células Tregs para determinar cómo Nrp1 estaría involucrada en su función supresora y la aceptación de trasplantes.

El tratamiento con células Tregs humanas ha sido extensivamente estudiado para su aplicación como terapia celular, no solo para limitar la respuesta inmune responsable del rechazo a trasplantes, sino que también para tratar enfermedades auto-inmunes (160). Las células Tregs son un candidato ideal para inducir tolerancia y prevenir el rechazo inmune, pues son una población celular inmunosupresora que puede ser aislada de sangre periférica, ser expandidas *in vitro* y luego re-infundidas a los pacientes. Los datos publicados a la fecha de los ensayos clínicos realizados indican que la administración de células Tregs es bien tolerada por los pacientes. Sin embargo, aún se desconoce el destino de estas células una vez administradas a los pacientes, la mantención del “fenotipo regulador” una vez infundida a pacientes con altos niveles sistémicos de citoquinas pro-inflamatorias, o el mecanismo de función que ejercen en el organismo del paciente (161). La expresión de Nrp1 en células Tregs se relaciona con su estabilidad de fenotipo y función supresora (113, 162), y tanto evidencia de ciencia básica como clínica mostraron que células Tregs Nrp1+ favorecen la aceptación de trasplantes (123, 124). Por lo tanto, elucidar la relevancia de Nrp1 en las células Tregs Foxp3+ transferidas a animales para inducir tolerancia (en un modelo experimental), podría darnos indicios para comprender mejor la función de células Tregs humanas administradas a pacientes (área clínica de trasplantes). En este trabajo se mostró que la deficiencia de *Nrp1* en células Tregs impide aceptación de alo-injertos, lo que sugiere que Nrp1 es importante en la función tolerogénica *in vivo* de las células Tregs Foxp3+.

Si la expresión de factores de transcripción relevantes en la mantención de la función de células Tregs resultase alterada en deficiencia de *Nrp1* (146, 163), eso podría dar cuenta de una menor inducción de tolerancia en animales trasplantados. Esto ha sido descrito para el factor de transcripción Eos, que funciona asociado a Foxp3 como un co-represor de la expresión de genes pro-inflamatorios (26). Se observó que la pérdida de expresión de Eos en células Tregs Foxp3<sup>+</sup> gatilla su “re-programación” un perfil pro-inflamatorio, y células Tregs Eos-deficientes tienen una menor función supresora *in vitro* e *in vivo* (28, 163). Nuestros resultados mostraron que la expresión *in vivo* de Foxp3 y Eos se mantuvo constante en las células Tregs transferidas a los animales trasplantados, independiente del genotipo analizado (*wt*, *het* o *Nrp1KO*) y de la sobrevida del injerto. Esto permitiría descartar la posibilidad de que el rechazo a trasplantes en animales tratados con Tregs *Nrp1KO* se debiese a una pérdida de función supresora por expresión alterada de Foxp3 y Eos (164). Por lo tanto, esto sugiere que *Nrp1* no estaría involucrada en la expresión de estos factores de transcripción en Tregs.

El incremento de producción de IFN- $\gamma$  por las células Tregs *Nrp1KO*, junto con la disminución de producción de IL-10, contribuyen a una función tolerogénica deficiente, dado que este perfil de producción de citoquinas favorece la activación de células Tconv que llevan a cabo el rechazo, de acuerdo con reportes previos (30, 165-167). En ratones con sepsis, las células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>*Nrp1*<sup>low</sup> (expresando bajos niveles de *Nrp1*) producen menores niveles de IL-10 (144); y en animales deficientes en IL-10 (*Il10-KO*) las células Tregs infiltrantes de tumor presentan menores niveles de *Nrp1*, menor infiltración de Tregs intra-tumorales y menor crecimiento tumoral (168). Si bien reportes previos de transcriptómica mostraron una menor expresión de *Il10* en células Tregs *Nrp1KO* (113), en el presente trabajo demostramos por primera vez una menor producción de IL-10 en células Tregs *Nrp1KO*. Si consideramos los reportes previos y nuestros resultados, la expresión de *Nrp1* en células Tregs Foxp3<sup>+</sup> parece contribuir a su producción de IL-10, la cual es necesaria para la aceptación de trasplantes (141); y la ausencia de *Nrp1* favorece la producción IFN- $\gamma$  en células Tregs, lo que exagera la respuesta inmune de rechazo (114). Para poder complementar estas observaciones, sería preciso realizar experimentos *in vivo* adicionales en animales trasplantados y tratados con células Tregs *Nrp1KO*, pero esta vez suplementando este tratamiento con la citoquina recombinante IL-10 (de forma exógena), donde el resultado esperado sería que en estos animales se incremente la sobrevida del trasplante.

## **Nrp1 en células Tregs y la modulación de células Tconv**

Nuestros resultados mostraron que células Tregs *wt* incrementaron la expresión Nrp1 y Eos en células Tconv *in vivo*, lo que se correlacionó con mayor aceptación de trasplantes en estos animales, confirmando estudios anteriores del grupo de laboratorio (124). Si bien esto se observó en comparación a células Tconv de animales sin tratar, debemos considerar que normalmente las células Tconv presentan bajos niveles de Nrp1 (19), y que exhiben un modesto incremento de la expresión de este marcador luego de su activación *in vitro* (20).

Una limitación del diseño experimental utilizado en este trabajo, donde se midió la presencia de Nrp1 en células Tconv mediante citometría de flujo, consistió en la imposibilidad de diferenciar entre las moléculas de Nrp1 provenientes de células Tregs Foxp3+, y moléculas de Nrp1 expresadas *di novo* por la misma célula Tconv, por lo que distintas estrategias podrían distinguir entre ambas posibilidades. Primero, realizar ensayos de co-cultivo *in vitro* de células Tregs Foxp3+ utilizando el mismo diseño experimental, pero esta vez con células Tconv pre-tratadas con inhibidores de síntesis proteica como cicloheximida (CHX), previniendo la expresión *di novo* de Nrp1 en las células Tconv, y analizando si efectivamente ocurren cambios mediante citometría de flujo, tal como se ha descrito anteriormente en literatura (153). Segundo, realizar ensayos de co-cultivo *in vitro* y los experimentos *in vivo* de animales trasplantados tratados con células Tregs Foxp3+, pero utilizando células Tconv provenientes de animales  $Cd4^{Cre}Nrp1^{flox/flox}$ , es decir, utilizando células Tconv *Nrp1*-deficientes tal como se ha reportado anteriormente (111). En ambos casos las células Tconv no expresarían Nrp1 de forma endógena, por lo que en el caso de que se observara Nrp1 en su membrana, esto podría deberse al traspaso de la proteína desde células Tregs Foxp3+, sin la posibilidad de descartar el traspaso desde otros tipos celulares.

Las células Tregs promueven la sobrevida al trasplante e incrementan la expresión de marcadores inmunoregulatorios en células Tconv, lo que es consistente con su función tolerogénica (124); no obstante, se desconocen los mecanismos celulares o moleculares. Mediante distintas aproximaciones experimentales (*in vitro* e *in vivo*) nuestros resultados mostraron que: i) las células Tregs *Nrp1KO* producen menores niveles de IL-10, y ii) las células Tregs *Nrp1KO* son incapaces de incrementar la presencia de Nrp1 en células Tconv. La adición de IL-10 exógena a co-cultivos de células Tregs *Nrp1KO* con células Tconv,

permitió “rescatar” el incremento de *Nrp1* en las células Tconv, apoyando que la modulación del fenotipo de células Tconv es parcialmente dependiente de IL-10. Otros estudios utilizando un modelo de colitis experimental mostraron resultados similares, donde IL-10 producida por células Tregs *Foxp3+* disminuye directamente la producción *in vivo* de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A de células Tconv activadas, inhibiendo la activación y proliferación (125, 169). Por lo tanto, nuestros resultados aportan nueva evidencia relacionando el incremento de *Nrp1* en células Tconv mediado por células Tregs *Foxp3+* productoras de IL-10. Para confirmar esto, también sería preciso recapitular estos resultados obtenidos *in vitro* midiendo la presencia de *Nrp1* en células Tconv en animales trasplantados, tratados con células Treg *Nrp1KO* y con IL-10 exógena; o alternativamente, tratar a estos animales trasplantados con células Tregs *Nrp1+* pero deficientes en IL-10, por ejemplo, con genotipo *Foxp3<sup>Cre/YFP</sup>Nrp1<sup>+/+</sup>IL10<sup>flox/flox</sup>* utilizados en otros trabajos publicados (125).

El incremento de los marcadores inmunoregulatorios *Nrp1* y Eos en células Tconv nos sugiere un cambio en la función inmune de estas células. Reportes previos han mostrado que al sobre-expresar *Nrp1* en células Tconv, utilizando un vector retroviral conteniendo el cDNA del gen *Nrp1*, las células Tconv transducidas inhiben la proliferación de otras células T efectoras activadas *in vitro* (110). Al transferir estas células Tconv transducidas para *Nrp1* a ratones en un modelo de encefalitis autoinmune experimental, los animales exhibieron un *score* clínico menor en comparación a ratones que recibieron células transducidas con el vector vacío (110). Utilizando el mismo modelo de EAE, otro reporte mostró que animales deficientes en Eos (*Eos*<sup>-/-</sup>) mostraron una patología más severa de la enfermedad, y mayor nivel de IL-17 en las células Tconv infiltrantes de médula espinal (170). Esto concuerda con nuestros resultados, donde ocurre tolerancia al trasplante en animales tratados con células Tregs *wt*, precisamente cuando las células Tconv exhiben mayores niveles de *Nrp1* y Eos. Para complementar estos resultados, se analizó el perfil de producción de citoquinas en las células Tconv de los animales trasplantados, y se encontró que células Tconv producen menores niveles de IFN- $\gamma$  en los animales tratados con células Tregs *wt* que aceptan los trasplantes. En síntesis, las células Tregs *wt* tolerogénicas incrementan la expresión de los marcadores inmunoregulatorios *Nrp1* y Eos en células Tconv, y disminuyen su producción de IFN- $\gamma$ , sugiriendo además que las células Tconv “moduladas” podrían adquirir función inmunosupresora *in vivo*.

Se conoce como “tolerancia infecciosa” mediada por células Tregs al proceso fisiológico en el que células Tregs confieren función tolerogénica a otras poblaciones celulares (142). Por ejemplo, se ha reportado que la expresión de Foxp3 se induce en células Tconv estimuladas en la presencia de células Tregs de una forma dependiente de TGF- $\beta$ , y estas nuevas células iTreg presentan función supresora *in vitro* e *in vivo* (171). Del mismo modo, IL-10 producida por células Tregs Foxp3+ ha mostrado inducir una población de células T CD4+ supresoras, generalmente llamadas células T reguladoras tipo 1 (Tr1), que previenen el inicio de enfermedad en modelos de colitis (172, 173). En un modelo de EAE, se encontró que las células Tregs Foxp3+ “convierten” *in vivo* a células T efectoras antígeno-específicas patogénicas en células Tr1 productoras de IL-10: estas células convertidas son capaces de inhibir la severidad de la enfermedad mediante la secreción de IL-10 (174). Por lo tanto, existe evidencia que apoya la modulación de células Tconv por parte de células Tregs Foxp3+ a través del proceso de tolerancia infecciosa. Nuestros resultados mostraron que las células Tconv provenientes de los animales tratados sólo con células Tregs *wt* ejercieron función supresora *ex vivo* sobre otras células T activadas, lo cual no ocurre cuando las Tregs no expresan Nrp1. Entonces, Nrp1 expresada en células Tregs tendría un rol en el proceso de “tolerancia infecciosa” (142). De esta forma, el efecto de las células Tregs no se limita sólo a modular el fenotipo (expresión de marcadores) de las células Tconv, sino que además alteran la función inmune de éstas hacia un perfil anti-inflamatorio (175).

Si bien el proceso biológico de “infundir” tolerancia inmune de manera antígeno-inespecífica se describió hace varias décadas (4, 176), sólo con el “descubrimiento” de las células Tregs CD4+CD25+ fue posible establecer que es un proceso activo, en el que participan poblaciones celulares concretas (5). Como se menciona anteriormente, la inducción de tolerancia a otras poblaciones celulares se ha atribuido a citoquinas como TGF- $\beta$ , IL-35 o IL-10: todas estas citoquinas son producidas por células Tregs (141). Sin embargo, a la fecha no se ha reportado que células Tregs incrementen la expresión de marcadores asociados a perfil regulador (como Nrp1 y Eos) en células Tconv y que, a su vez, estas células Tconv Nrp1+Eos+ sean capaces de ejercer función supresora *ex-vivo*. En su conjunto, estos resultados sustentan nuestra proposición de que Nrp1 es un marcador de Tregs con la capacidad de “infectar” tolerancia a otras poblaciones celulares.

## **Nrp1 y EVs derivadas de células Tregs Foxp3+**

Las células Tregs Foxp3+ secretan EVs como parte de sus mecanismos de supresión de la respuesta inmune (52, 57, 60), y algunas proteínas altamente expresadas en células Tregs (CD73, CD25, CTLA-4) están presentes en EVs derivadas de células Tregs (83). Entre ellos, se comprobó que sólo CD73 contribuye a la función inmunomoduladora de estas EVs (60). Sin embargo, aún no se ha descrito si otros marcadores expresados en células Tregs (como PD-1, GITR, o Nrp1) están presentes en EVs de células Tregs. La proteína Nrp1 ha sido encontrada en EVs derivadas de macrófagos y de células tumorales, tanto de humano como ratón (106, 107, 115, 177). Por lo tanto, *esta tesis es el primer trabajo que reporta la presencia de la proteína Nrp1 en EVs derivadas de células Tregs*, sugiriendo que esta proteína podría participar en la función inmunomoduladora de estas vesículas.

A la fecha, no hay reportes que relacionen directamente a Nrp1 en la biogénesis o secreción de EVs de algún tipo celular, por lo que se abordó la posibilidad de que la producción de EVs en Tregs fuese alterada por la deficiencia de *Nrp1*. Por el contrario, se observó que las células Tregs *wt* activadas *in vitro* producen EVs en cantidades similares a las Tregs *Nrp1KO*, y no se encontraron cambios en proteínas enriquecidas en EVs que forman parte de los complejos ESCRT, como Alix y TSG-101 (178). Por lo tanto, estos resultados nos permiten sugerir que Nrp1 no participa en la producción de las EVs en células Tregs activadas *in vitro*. Para comprobar esto de forma más extensiva, podría resultar esclarecedor analizar el perfil proteómico de EVs derivadas de Tregs *wt* y *Nrp1KO* mediante espectrometría de masa. Esta técnica provee alta sensibilidad y resolución, permitiendo la detección, identificación y caracterización de miles de proteínas en muestras de EVs (179). Entre diversos parámetros, esta información permitiría distinguir a las proteínas que se mantienen inalteradas, enriquecidas o ausentes en vesículas derivadas de células Tregs *Nrp1KO* (es decir, vesículas deficientes en Nrp1), en comparación a EVs de Tregs *wt*.

Una segunda posibilidad, es que Nrp1 participe en la función supresora de las EVs derivadas de Tregs Foxp3+. Nuestros resultados mostraron que sólo las EVs derivadas de células Tregs *wt* ejercieron una función supresora *in vitro*, inhibiendo la proliferación y la división celular de células Tconv. En promedio, el tratamiento con EVs derivadas de células

Tregs *Nrp1KO* no inhibió la proliferación de células Tconv, lo que sugiere que Nrp1 presente en las EVs derivadas de Tregs Foxp3+ participa en la función supresora de EVs.

En base a estos resultados, debemos considerar al menos dos posibles maneras en las que Nrp1 podría estar contribuyendo en la función de EVs de células Tregs. La primera, es que moléculas de Nrp1 presentes en la membrana vesicular participen en la unión de ligandos solubles del medio extracelular con función inmunoreguladora, y/o en la unión de receptores expresados por las células blanco. Nrp1 funciona como co-receptor de los ligandos PDGF y TGF- $\beta$  (junto a los receptores canónicos PDGF-R y TGFB-R respectivamente) (95, 180), por lo que ligandos inmunoreguladores solubles podrían unirse a EVs secretadas por células Tregs Nrp1+. De este modo, al ser captadas por células blanco, podrían ejercer supresión inmune de forma aditiva mediante los ligandos inmunosupresores unidos a las EVs. Una forma de comprobar esta posibilidad sería realizando los ensayos de supresión de células Tconv tratadas con EVs derivadas de células Tregs Nrp1+, pero en presencia de anticuerpos bloqueantes contra estos ligandos (anti-PDGF, anti-TGF- $\beta$ ) o contra los receptores de estos ligandos (anti-PDGF-R, anti-TGFB-R) y estudiar la función inhibitoria de estas EVs.

La segunda manera en la que Nrp1 podría contribuir a la función de EVs de células Tregs podría ser más bien intrínseca a las mismas células Tregs, debido al rol de Nrp1 en mantener la estabilidad fenotípica de células Tregs Foxp3+ (112). Se han encontrado niveles significativos de microRNA contenidos en EVs derivadas de células Tregs, tales como Let-7d, miRNA-155, miR-142-3p y miR-150-5p (entre otros), los que participarían en la supresión mediada por EVs de células Tregs (57, 62). No existen reportes describiendo una relación directa entre la expresión de *Nrp1* en células Tregs Foxp3+ y la presencia de estos miRNA, pero considerando la relevancia de Nrp1 en la estabilidad del fenotipo regulador, es posible que las células Tregs *Nrp1KO* tengan alterada la expresión de miRNAs con función supresora, lo que podría modificar la composición de miRNAs en sus EVs y alterar su función. Una forma de comprobar esta segunda posibilidad sería realizar análisis de secuenciación de RNA de EVs derivadas de células Tregs, comparando los genotipos *wt* y *Nrp1KO*, buscando diferencias en los niveles de estos miRNA. Si bien nuestros resultados (ensayos de co-cultivo *in vitro*) contribuyen con nueva evidencia acerca de Nrp1 participando en la función supresora de Tregs a través de EVs, el mecanismo molecular se mantiene desconocido.

Por otro lado, existen pocos reportes describiendo que el tratamiento con EVs de células Tregs Foxp3+ extienda la sobrevida de trasplantes. Un trabajo utilizando un modelo de trasplante renal en ratas, encontró que el tratamiento i.v. con EVs derivadas de células Tregs podría retrasar el rechazo al trasplante e inhibir la proliferación de células T alo-reactivas (58). Utilizando el mismo modelo, otro estudio demostró que las EVs derivadas de Tregs administradas vía i.v. promueven mayor sobrevida de trasplantes disminuyendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el suero de los animales tratados (61). De manera análoga, nos propusimos analizar la participación de Nrp1 en la función tolerogénica de EVs derivadas de Tregs Foxp3+, utilizando el modelo murino de trasplante de piel. Sólo las EVs de células Tregs *wt* fueron capaces de promover la sobrevida del alo-injerto, mientras que las EVs derivadas de células Tregs *Nrp1KO* fueron incapaces de evitar el rechazo, lo que comprueba que la expresión de Nrp1 también podría ser relevante para la función *in vivo* de las EVs derivadas de células Tregs Foxp3+. En reportes anteriores, los animales trasplantados recibieron al menos tres dosis de al menos 20 µg de EVs derivadas de células Tregs mediante inyección i.v. (58, 61). Por el contrario, en nuestro modelo el tratamiento con estas EVs derivadas de Tregs consistió en una única dosis de 5µg mediante administración subcutánea (s.c.) en la región dorsal de los animales, flanqueando la zona de la piel donde al día siguiente se realizaría el trasplante. Transferidas de esta forma, las EVs derivadas de células Tregs *wt* efectivamente prolongaron la sobrevida del trasplante. Estas EVs probablemente son captadas por las células Tconv transferidas, por las células del mismo injerto de piel, y por las células de la inmunidad innata presentes en los animales Rag1-KO. Estos ratones inmunodeficientes no poseen ni linfocitos T ni B maduros, pero la frecuencia y función de células NK, macrófagos/monocitos y DCs se mantiene intacta en esta cepa (127). Por lo tanto, la inducción de tolerancia mediada por las EVs derivadas de células Tregs *wt* podría no deberse sólo a la modulación *in vivo* de células Tconv, sino que además a un efecto sobre otros tipos celulares presentes en el injerto y/o en células del sistema inmune del organismo receptor.

Se describió anteriormente que las EVs derivadas de células tumorales son capaces de suprimir la respuesta anti-tumoral, promoviendo la apoptosis de células T debido a la presencia de moléculas como el ligando de Fas (Fas-L) o galectina-9 en EVs tumorales (181-183), o bloqueando la función de ligandos citotóxicos de células NK como NKG-2D (184). Del mismo modo, se reportó que células Tregs Foxp3+ secretan EVs que son capaces de

inducir un fenotipo tolerogénico en DCs (62), por lo que la modulación de la respuesta inmune mediada por EVs podría dar cuenta de la inducción de tolerancia en los animales tratados en el presente trabajo. Para complementar estas observaciones, sería necesario realizar un análisis multiparamétrico de las células inmunitarias infiltrantes de los injertos de piel, tanto de animales sin tratar como en animales tratados con EVs de células Tregs, analizando la expresión de marcadores de activación e inhibitorios, así como el perfil de producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, a fin de dilucidar el efecto funcional de las EVs derivadas de células Tregs.

El contenido de las EVs derivadas de células Tregs podría tener un rol clave en la inducción de tolerancia a trasplantes. En este contexto, reportes previos mostraron que DCs transducidas para expresar las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- $\beta$  son capaces de secretar EVs conteniendo estas citoquinas, y estas EVs son capaces de inhibir la inflamación en modelos de artritis reumatoide y de colitis experimental (185, 186). Un reporte reciente mostró por primera vez que las EVs producidas por células Tregs murinas poseen IL-35 en su superficie, que estas EVs promueven anergia en células T y células B, y además promueven tolerancia a trasplantes cardiacos a través de tolerancia infecciosa (187). Si bien esta tesis no tenía como objetivo determinar la presencia de citoquinas en EVs derivadas de células Tregs, sí se encontró que las células Tregs *Nrp1KO* producen menores niveles *in vivo* de IL-10 durante el rechazo al trasplante. Si citoquinas como IL-10 estuviesen contenidas en EVs de células Tregs, es posible que la función supresora disminuida de EVs derivadas de células Tregs *Nrp1KO* también pueda atribuirse parcialmente a un menor contenido de IL-10. De este modo, la expresión de *Nrp1* podría participar en la función supresora de EVs derivadas de Tregs de forma indirecta, a través de la producción de IL-10.

Finalmente, estos resultados sugieren que la presencia de *Nrp1* en las células Tregs *Foxp3+*, así como en las EVs derivadas de células Tregs, podría ser de utilidad en el área clínica del trasplante (83). Las células Tregs humanas expresan *Nrp1* en su superficie (114), por lo que las EVs de células Tregs humanas también podrían contener esta proteína en su superficie. En trabajos anteriores se describió que las EVs provenientes de células T pueden ser usadas como biomarcadores temprano del desarrollo de patologías (188); por ejemplo, en pacientes con hepatitis B crónica, se encontraron altas concentraciones de EVs derivadas de

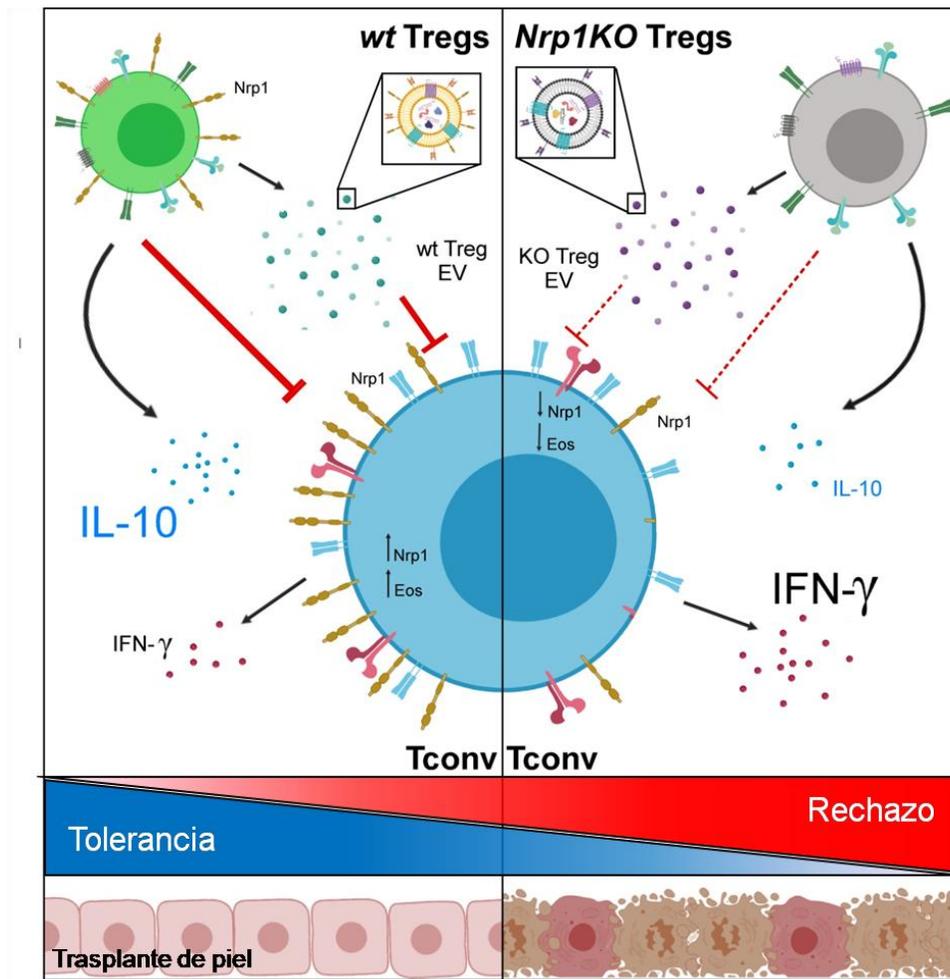
células T CD4+ y T CD8+ en suero de sangre periférica (189). En este sentido, es posible que el nivel de Nrp1 en EVs derivadas de células Tregs pudiese usarse como un indicativo de la integridad de función supresora de células Tregs, asociada a la mantención del fenotipo regulador de estas células. Si bien resulta desafiante obtener la cantidad necesaria de EVs derivadas de células Treg para considerar realizable un tratamiento clínico, la evidencia obtenida en modelos pre-clínicos (ratón y ratas) muestra que la administración de estas vesículas extiende la supervivencia de aloinjertos (83). Una razón para considerar seriamente a estas EVs como una terapia, radica fundamentalmente en estudios mostrando que bajo ambientes pro-inflamatorios (como el organismo de pacientes con enfermedades autoinmunes o rechazando un trasplante), las células Treg Foxp3+ transferidas a pacientes pueden convertirse *in vivo* en células T efectoras, empeorando la enfermedad (190, 191). Sin embargo, a diferencia de las células Tregs, es poco probable que las EVs derivadas de células Tregs humanas transferidas a pacientes se modifiquen o alteren significativamente durante condiciones inflamatorias *in vivo* (83, 192).

En definitiva, el trabajo aquí expuesto entrega nuevos antecedentes acerca del rol de Nrp1 en la función supresora de células Tregs Foxp3+. Entender la participación de este receptor en los mecanismos de supresión de células Tregs abre nuevas interpretaciones sobre los procesos celulares y fisiológicos que modulan la respuesta inmune a trasplantes.

### 13. CONCLUSIONES

- Las células Tregs Foxp3<sup>+</sup> requieren de Nrp1 para ejercer función supresora *in vitro* e inducir tolerancia a trasplantes de piel *in vivo*.
- Nrp1 es necesaria para la correcta producción de IL-10 por células Tregs Foxp3<sup>+</sup>.
- Nrp1 participa en la modulación del fenotipo de células Tconv.
- Durante la inducción de tolerancia a trasplantes, las células Tconv adquieren función inmunosupresora a través de un mecanismo dependiente de células Tregs Nrp1<sup>+</sup>.
- Nrp1 está presente en EVs derivadas de células Tregs Foxp3<sup>+</sup>.
- Nrp1 es requerida para la función supresora *in vitro* e *in vivo* de EVs derivadas de células Tregs Foxp3<sup>+</sup>.

## 14. MODELO PROPUESTO



**Figura 19.** *Nrp1* es requerida para la inducción de tolerancia a trasplantes mediada por células Tregs *Foxp3+*. En el contexto del trasplante, las células Tregs ejercen función supresora mediante la producción de EVs conteniendo *Nrp1*, la secreción de IL-10 y el incremento de marcadores inmunoregulatorios (*Nrp1* y *Eos*) en células Tconv. Esto disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  por células Tconv, lo que se correlaciona con tolerancia inmunológica y la supervivencia del trasplante. Cuando las células Tregs son deficientes en *Nrp1* ocurren los procesos opuestos, lo que se correlaciona con una mayor respuesta inmune alógena y finalmente con el rechazo al trasplante.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. P. Marrack, J. W. Kappler, How the immune system recognizes the body. *Sci Am* **269**, 80-83, 86-89 (1993).
2. H. Waldmann, S. Cobbold, Regulatory T cells: context matters. *Immunity* **30**, 613-615 (2009).
3. S. Sakaguchi *et al.*, Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**, 8-27 (2006).
4. R. K. Gershon, K. Kondo, Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**, 903-914 (1971).
5. S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).
6. J. D. Fontenot, M. A. Gavin, A. Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-336 (2003).
7. H. Zeng, R. Zhang, B. Jin, L. Chen, in *Cell Mol Immunol*. (2015), vol. 12, pp. 566-571.
8. Q. Tang *et al.*, In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* **199**, 1455-1465 (2004).
9. J. Y. Tsang *et al.*, Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. *Transpl Immunol* **21**, 203-209 (2009).
10. S. Sakaguchi, Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**, 345-352 (2005).
11. C. M. Sun *et al.*, Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* **204**, 1775-1785 (2007).
12. J. L. Coombes *et al.*, A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**, 1757-1764 (2007).
13. M. J. Benson, K. Pino-Lagos, M. Roseblatt, R. J. Noelle, All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* **204**, 1765-1774 (2007).
14. S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
15. M. E. Brunkow *et al.*, Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **27**, 68-73 (2001).
16. R. Khattry, T. Cox, S. A. Yasayko, F. Ramsdell, An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* **4**, 337-342 (2003).
17. C. L. Bennett *et al.*, The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* **27**, 20-21 (2001).
18. T. A. Chatila *et al.*, JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* **106**, R75-81 (2000).
19. D. Bruder *et al.*, Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* **34**, 623-630 (2004).
20. M. Yadav *et al.*, Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* **209**, 1713-1722, s1711-1719 (2012).
21. J. M. Weiss *et al.*, Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* **209**, 1723-1742, s1721 (2012).
22. K. Singh, M. Hjort, L. Thorvaldson, S. Sandler, Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naive mice. *Sci Rep* **5**, 7767 (2015).

23. N. Sugimoto *et al.*, Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* **18**, 1197-1209 (2006).
24. A. M. Thornton *et al.*, Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* **184**, 3433-3441 (2010).
25. D. Getnet *et al.*, A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* **47**, 1595-1600 (2010).
26. F. Pan *et al.*, Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* **325**, 1142-1146 (2009).
27. N. Ohkura *et al.*, T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* **37**, 785-799 (2012).
28. M. D. Sharma *et al.*, An inherently bifunctional subset of Foxp3+ T helper cells is controlled by the transcription factor eos. *Immunity* **38**, 998-1012 (2013).
29. C. Buelens *et al.*, Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* **27**, 756-762 (1997).
30. L. W. Collison, M. R. Pillai, V. Chaturvedi, D. A. Vignali, Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* **182**, 6121-6128 (2009).
31. X. Wei *et al.*, Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance. *Cell Rep* **21**, 1853-1869 (2017).
32. M. Liu, S. Li, M. O. Li, TGF-beta Control of Adaptive Immune Tolerance: A Break From Treg Cells. *Bioessays* **40**, e1800063 (2018).
33. I. Apostolou *et al.*, Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. *J Clin Immunol* **28**, 619-624 (2008).
34. Y. Ke, G. Jiang, D. Sun, H. J. Kaplan, H. Shao, Anti-CD3 antibody ameliorates experimental autoimmune uveitis by inducing both IL-10 and TGF-beta dependent regulatory T cells. *Clin Immunol* **138**, 311-320 (2011).
35. A. El Beidaq *et al.*, In Vivo Expansion of Endogenous Regulatory T Cell Populations Induces Long-Term Suppression of Contact Hypersensitivity. *J Immunol* **197**, 1567-1576 (2016).
36. L. Fahlen *et al.*, T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* **201**, 737-746 (2005).
37. M. L. Chen *et al.*, Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 419-424 (2005).
38. E. A. Green, L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran, R. A. Flavell, CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10878-10883 (2003).
39. H. Fan, J. Wang, X. Zhou, Z. Liu, S. G. Zheng, Induction of antigen-specific immune tolerance by TGF-beta-induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells. *Int J Clin Exp Med* **2**, 212-220 (2009).
40. S. Bhowmick *et al.*, The sympathetic nervous system modulates CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells via a TGF-beta-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* **86**, 1275-1283 (2009).
41. L. W. Collison *et al.*, The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-569 (2007).
42. L. W. Collison *et al.*, IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* **11**, 1093-1101 (2010).
43. I. Kochetkova, S. Golden, K. Holderness, G. Callis, D. W. Pascual, IL-35 Stimulation of CD39+ Regulatory T Cells Confers Protection against Collagen II-Induced Arthritis via the Production of IL-10. *J Immunol* **184**, 7144-7153 (2010).

44. P. J. Quesenberry *et al.*, Cellular phenotype and extracellular vesicles: basic and clinical considerations. *Stem Cells Dev* **23**, 1429-1436 (2014).
45. P. D. Robbins, A. E. Morelli, Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* **14**, 195-208 (2014).
46. C. Wen *et al.*, Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **6**, 1400370 (2017).
47. M. Colombo, G. Raposo, C. Thery, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 255-289 (2014).
48. A. Bobrie, M. Colombo, G. Raposo, C. Thery, Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* **12**, 1659-1668 (2011).
49. C. Thery, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**, Unit 3.22 (2006).
50. H. Valadi *et al.*, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654-659 (2007).
51. S. J. Gould, G. Raposo, As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **2**, (2013).
52. P. Li, C. Liu, Z. Yu, M. Wu, New Insights into Regulatory T Cells: Exosome- and Non-Coding RNA-Mediated Regulation of Homeostasis and Resident Treg Cells. *Front Immunol* **7**, 574 (2016).
53. J. Lotvall *et al.*, Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* **3**, 26913 (2014).
54. A. Sinha, V. Ignatchenko, A. Ignatchenko, S. Mejia-Guerrero, T. Kislinger, In-depth proteomic analyses of ovarian cancer cell line exosomes reveals differential enrichment of functional categories compared to the NCI 60 proteome. *Biochem Biophys Res Commun* **445**, 694-701 (2014).
55. J. Carriere, N. Barnich, H. T. Nguyen, Exosomes: From Functions in Host-Pathogen Interactions and Immunity to Diagnostic and Therapeutic Opportunities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **172**, 39-75 (2016).
56. D. S. Choi, D. K. Kim, Y. K. Kim, Y. S. Gho, Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* **13**, 1554-1571 (2013).
57. I. S. Okoye *et al.*, MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* **41**, 89-103 (2014).
58. X. Yu *et al.*, CD4+CD25+ regulatory T cells-derived exosomes prolonged kidney allograft survival in a rat model. *Cell Immunol* **285**, 62-68 (2013).
59. M. Azimi, M. Ghabaee, A. N. Moghadasi, F. Noorbakhsh, M. Izad, Immunomodulatory function of Treg-derived exosomes is impaired in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Immunol Res* **66**, 513-520 (2018).
60. L. A. Smyth *et al.*, CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *Eur J Immunol* **43**, 2430-2440 (2013).
61. S. Aiello *et al.*, Extracellular vesicles derived from T regulatory cells suppress T cell proliferation and prolong allograft survival. *Sci Rep* **7**, 11518 (2017).
62. S. L. Tung *et al.*, Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Sci Rep* **8**, 6065 (2018).
63. T. Takahashi *et al.*, Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**, 303-310 (2000).
64. G. Raimondi, W. J. Shufesky, D. Tokita, A. E. Morelli, A. W. Thomson, Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol* **176**, 2808-2816 (2006).

65. L. M. Francisco, P. T. Sage, A. H. Sharpe, The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* **236**, 219-242 (2010).
66. Y. Onishi, Z. Fehervari, T. Yamaguchi, S. Sakaguchi, Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10113-10118 (2008).
67. S. Y. Tseng *et al.*, B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* **193**, 839-846 (2001).
68. F. Shi *et al.*, PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* **128**, 887-896 (2011).
69. P. Waterhouse *et al.*, Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science* **270**, 985-988 (1995).
70. K. Wing *et al.*, CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271-275 (2008).
71. A. Madamanchi, S. A. Santoro, M. M. Zutter, alpha2beta1 Integrin. *Adv Exp Med Biol* **819**, 41-60 (2014).
72. H. Peng *et al.*, Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest* **123**, 1444-1456 (2013).
73. X. Fan *et al.*, CD49b defines functionally mature Treg cells that survey skin and vascular tissues. *J Exp Med*, (2018).
74. I. Suffia, S. K. Reckling, G. Salay, Y. Belkaid, A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. *J Immunol* **174**, 5444-5455 (2005).
75. A. Braun *et al.*, Integrin alphaE(CD103) Is Involved in Regulatory T-Cell Function in Allergic Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol* **135**, 2982-2991 (2015).
76. X. Yuan, M. J. Dee, N. H. Altman, T. R. Malek, IL-2Rbeta-dependent signaling and CD103 functionally cooperate to maintain tolerance in the gut mucosa. *J Immunol* **194**, 1334-1346 (2015).
77. D. Zhao *et al.*, In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* **112**, 2129-2138 (2008).
78. R. Tordjman *et al.*, A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* **3**, 477-482 (2002).
79. B. Allard, M. S. Longhi, S. C. Robson, J. Stagg, The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* **276**, 121-144 (2017).
80. G. Borsellino *et al.*, Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225-1232 (2007).
81. S. Deaglio *et al.*, Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**, 1257-1265 (2007).
82. C. M. Rueda, C. M. Jackson, C. A. Chougnet, Regulatory T-Cell-Mediated Suppression of Conventional T-Cells and Dendritic Cells by Different cAMP Intracellular Pathways. *Front Immunol* **7**, 216 (2016).
83. A. Agarwal *et al.*, Regulatory T cell-derived exosomes: possible therapeutic and diagnostic tools in transplantation. *Front Immunol* **5**, 555 (2014).
84. M. W. Parker, H. F. Guo, X. Li, A. D. Linkugel, C. W. Vander Kooi, Function of members of the neuropilin family as essential pleiotropic cell surface receptors. *Biochemistry* **51**, 9437-9446 (2012).
85. S. Takagi, T. Tsuji, T. Amagai, T. Takamatsu, H. Fujisawa, Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol* **122**, 90-100 (1987).
86. S. Takagi *et al.*, The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* **7**, 295-307 (1991).

87. T. Kitsukawa, A. Shimono, A. Kawakami, H. Kondoh, H. Fujisawa, Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* **121**, 4309-4318 (1995).
88. Z. He, M. Tessier-Lavigne, Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* **90**, 739-751 (1997).
89. A. L. Kolodkin *et al.*, Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**, 753-762 (1997).
90. S. Soker, S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld, M. Klagsbrun, Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**, 735-745 (1998).
91. T. Kawasaki *et al.*, A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* **126**, 4895-4902 (1999).
92. D. C. West *et al.*, Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* **280**, 13457-13464 (2005).
93. A. Matsushita, T. Gotze, M. Korc, Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Res* **67**, 10309-10316 (2007).
94. S. G. Ball, C. Bayley, C. A. Shuttleworth, C. M. Kielty, Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem J* **427**, 29-40 (2010).
95. C. Pellet-Many *et al.*, Neuropilin-1 mediates PDGF stimulation of vascular smooth muscle cell migration and signalling via p130Cas. *Biochem J* **435**, 609-618 (2011).
96. S. H. Hsieh *et al.*, Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* **27**, 3746-3753 (2008).
97. M. Fukasawa, A. Matsushita, M. Korc, Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol Ther* **6**, 1173-1180 (2007).
98. S. D. Robinson *et al.*, Alpha v beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *J Biol Chem* **284**, 33966-33981 (2009).
99. G. J. Prud'homme, Y. Glinka, Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* **3**, 921-939 (2012).
100. J. R. Wild, C. A. Staton, K. Chapple, B. M. Corfe, Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int J Exp Pathol* **93**, 81-103 (2012).
101. P. M. Lacal *et al.*, Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* **115**, 1000-1007 (2000).
102. H. Ding *et al.*, Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int J Cancer* **88**, 584-592 (2000).
103. A. Latil *et al.*, VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer* **89**, 167-171 (2000).
104. M. Klagsbrun, S. Takashima, R. Mamluk, The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol* **515**, 33-48 (2002).
105. M. He *et al.*, Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis* **36**, 1008-1018 (2015).
106. I. Lazar *et al.*, Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**, 464-475 (2015).
107. M. Demory Beckler *et al.*, in *Mol Cell Proteomics*. (2013), vol. 12, pp. 343-355.
108. P. Kharaziha *et al.*, Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. *Oncotarget* **6**, 21740-21754 (2015).
109. M. Sarris, K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, A. G. Betz, Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* **28**, 402-413 (2008).

110. B. D. Solomon, C. Mueller, W. J. Chae, L. M. Alabanza, M. S. Bynoe, Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2040-2045 (2011).
111. W. Hansen *et al.*, Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* **209**, 2001-2016 (2012).
112. A. E. Overacre, D. A. Vignali, T(reg) stability: to be or not to be. *Curr Opin Immunol* **39**, 39-43 (2016).
113. G. M. Delgoffe *et al.*, Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* **501**, 252-256 (2013).
114. A. E. Overacre-Delgoffe *et al.*, Interferon-gamma Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* **169**, 1130-1141.e1111 (2017).
115. K. Hassani, M. Olivier, Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2185 (2013).
116. S. Roy *et al.*, Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy. *Front Immunol* **8**, 1228 (2017).
117. C. J. Watson, J. H. Dark, Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth* **108 Suppl 1**, i29-42 (2012).
118. J. Bamoulid *et al.*, The need for minimization strategies: current problems of immunosuppression. *Transpl Int* **28**, 891-900 (2015).
119. M. Moini, M. L. Schilsky, E. M. Tichy, Review on immunosuppression in liver transplantation. *World J Hepatol* **7**, 1355-1368 (2015).
120. M. Gliwinski, D. Iwaszkiewicz-Grzes, P. Trzonkowski, Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells. *BioDrugs* **31**, 335-347 (2017).
121. A. L. Putnam *et al.*, Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. *Am J Transplant* **13**, 3010-3020 (2013).
122. Q. Yuan *et al.*, CD4(+)CD25(-)Nrp1(+) T cells synergize with rapamycin to prevent murine cardiac allograft rejection in immunocompetent recipients. *PLoS One* **8**, e61151 (2013).
123. H. Zhou *et al.*, Expression of neuropilin-1 in kidney graft biopsies: what is the significance? *Transplant Proc* **39**, 81-83 (2007).
124. M. Campos-Mora *et al.*, Neuropilin-1 regulatory T cells promote skin allograft survival and modulate effector CD4 T cells phenotypic signature. *Immunol Cell Biol*, (2014).
125. Y. P. Rubtsov *et al.*, Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546-558 (2008).
126. C. Gu *et al.*, Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* **5**, 45-57 (2003).
127. P. Mombaerts *et al.*, RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877 (1992).
128. D. Haribhai *et al.*, Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* **178**, 2961-2972 (2007).
129. A. D. Amir el *et al.*, viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* **31**, 545-552 (2013).
130. B. Becher *et al.*, High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat Immunol* **15**, 1181-1189 (2014).
131. N. Leelatian, K. E. Diggins, J. M. Irish, Characterizing Phenotypes and Signaling Networks of Single Human Cells by Mass Cytometry. *Methods Mol Biol* **1346**, 99-113 (2015).
132. A. N. McMurchy, M. K. Levings, Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide. *Eur J Immunol* **42**, 27-34 (2012).
133. S. A. Quezada *et al.*, Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J Immunol* **175**, 771-779 (2005).

134. Y. Wu, W. Deng, D. J. Klinke, Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst* **140**, 6631-6642 (2015).
135. R. J. Lobb *et al.*, in *J Extracell Vesicles*. (2015), vol. 4.
136. I. Campbell, Chi-squared and Fisher-Irwin tests of two-by-two tables with small sample recommendations. *Stat Med* **26**, 3661-3675 (2007).
137. D. K. Sojka, D. J. Fowell, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2011), vol. 108, pp. 18336-18341.
138. A. E. Overacre-Delgoffe, D. A. A. Vignali, Treg Fragility: A Prerequisite for Effective Antitumor Immunity? *Cancer Immunol Res* **6**, 882-887 (2018).
139. L. E. Becker, C. Morath, C. Suesal, Immune mechanisms of acute and chronic rejection. *Clin Biochem* **49**, 320-323 (2016).
140. S. Itoh *et al.*, Interleukin-17 Accelerates Allograft Rejection by Suppressing Regulatory T Cell Expansion. (2011).
141. D. M. Gravano, D. A. Vignali, The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1997-2008 (2012).
142. H. Waldmann, E. Adams, P. Fairchild, S. Cobbold, Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol Rev* **212**, 301-313 (2006).
143. J. Kowal, M. Tkach, C. Thery, Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* **29**, 116-125 (2014).
144. Y. L. Gao *et al.*, Neuropilin-1<sup>high</sup>CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> Regulatory T Cells Exhibit Primary Negative Immunoregulation in Sepsis. *Mediators Inflamm* **2016**, 7132158 (2016).
145. C. Corbel *et al.*, Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol* **31**, 1082-1094 (2007).
146. D. V. Sawant, D. A. Vignali, Once a Treg, always a Treg? *Immunol Rev* **259**, 173-191 (2014).
147. C. Addey *et al.*, Functional plasticity of antigen-specific regulatory T cells in context of tumor. *J Immunol* **186**, 4557-4564 (2011).
148. S. Bhela *et al.*, The Plasticity and Stability of Regulatory T Cells during Viral-Induced Inflammatory Lesions. *J Immunol* **199**, 1342-1352 (2017).
149. D. Franckaert *et al.*, Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3<sup>(+)</sup> and Foxp3<sup>(-)</sup> T cells. *Immunol Cell Biol* **93**, 417-423 (2015).
150. M. A. Linterman *et al.*, CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *Elife* **3**, (2014).
151. S. Z. Josefowicz, L. F. Lu, A. Y. Rudensky, Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* **30**, 531-564 (2012).
152. M. Yang *et al.*, Regulatory T cells control epitope spreading in autoimmune arthritis independent of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *Immunology* **155**, 446-457 (2018).
153. N. Blanchard *et al.*, TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* **168**, 3235-3241 (2002).
154. M. J. Martinez-Lorenzo *et al.*, Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* **163**, 1274-1281 (1999).
155. I. Monleon *et al.*, Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* **167**, 6736-6744 (2001).
156. J. M. Ali, E. M. Bolton, J. A. Bradley, G. J. Pettigrew, Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation* **96**, 681-688 (2013).
157. M. W. Shelton, L. A. Walp, J. T. Basler, K. Uchiyama, D. W. Hanto, Mediation of skin allograft rejection in scid mice by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Transplantation* **54**, 278-286 (1992).
158. S. Celli, M. L. Albert, P. Bousso, Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med* **17**, 744-749 (2011).
159. H. Takamatsu *et al.*, Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol* **11**, 594-600 (2010).

160. M. Romano, S. L. Tung, L. A. Smyth, G. Lombardi, Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl Int* **30**, 745-753 (2017).
161. N. Safinia, C. Scotta, T. Vaikunthanathan, R. I. Lechler, G. Lombardi, Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation. *Front Immunol* **6**, 438 (2015).
162. M. Campos-Mora, R. A. Morales, T. Gajardo, D. Catalan, K. Pino-Lagos, Neuropilin-1 in Transplantation Tolerance. *Front Immunol* **4**, 405 (2013).
163. S. A. Rieder, E. M. Shevach, Eos, goddess of treg cell reprogramming. *Immunity* **38**, 849-850 (2013).
164. M. da Silva Martins, C. A. Piccirillo, Functional stability of Foxp3+ regulatory T cells. *Trends Mol Med* **18**, 454-462 (2012).
165. B. J. Laidlaw *et al.*, Production of IL-10 by CD4(+) regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol* **16**, 871-879 (2015).
166. K. Cunnusamy, J. Y. Niederkorn, IFN-gamma blocks CD4+CD25+ Tregs and abolishes immune privilege of minor histocompatibility mismatched corneal allografts. *Am J Transplant* **13**, 3076-3084 (2013).
167. D. Yang, X. Zhao, X. Lin, Bcl10 is required for the development and suppressive function of Foxp3 + regulatory T cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 1-13 (2019).
168. S. Wang *et al.*, Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Sci Rep* **6**, 24249 (2016).
169. S. Huber *et al.*, Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* **34**, 554-565 (2011).
170. S. A. Rieder *et al.*, Eos is redundant for T regulatory cell function, but plays an important role in IL-2 and Th17 production by CD4+ T conventional cells. *J Immunol* **195**, 553-563 (2015).
171. J. Andersson *et al.*, CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med* **205**, 1975-1981 (2008).
172. H. Groux *et al.*, A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742 (1997).
173. M. G. Roncarolo *et al.*, Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* **212**, 28-50 (2006).
174. D. J. Mekala, R. S. Alli, T. L. Geiger, IL-10-dependent infectious tolerance after the treatment of experimental allergic encephalomyelitis with redirected CD4+CD25+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11817-11822 (2005).
175. A. R. Kendal *et al.*, Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. *J Exp Med* **208**, 2043-2053 (2011).
176. R. Scully, S. Qin, S. Cobbold, H. Waldmann, Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur J Immunol* **24**, 2383-2392 (1994).
177. W. D. Stamer, E. A. Hoffman, J. M. Luther, D. L. Hachey, K. L. Schey, Protein profile of exosomes from trabecular meshwork cells. *J Proteomics* **74**, 796-804 (2011).
178. A. Latifkar, Y. H. Hur, J. C. Sanchez, R. A. Cerione, M. A. Antonyak, New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *J Cell Sci* **132**, (2019).
179. R. Bandu, J. W. Oh, K. P. Kim, Mass spectrometry-based proteome profiling of extracellular vesicles and their roles in cancer biology. *Exp Mol Med* **51**, 30 (2019).
180. Y. Glinka, G. J. Prud'homme, Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* **84**, 302-310 (2008).
181. G. Andreola *et al.*, Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* **195**, 1303-1316 (2002).

182. V. Huber *et al.*, Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* **128**, 1796-1804 (2005).
183. J. Klibi *et al.*, Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* **113**, 1957-1966 (2009).
184. D. D. Taylor, C. Gercel-Taylor, K. S. Lyons, J. Stanson, T. L. Whiteside, T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res* **9**, 5113-5119 (2003).
185. S. H. Kim *et al.*, Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *J Immunol* **174**, 6440-6448 (2005).
186. Z. Cai *et al.*, in *Cell Res.* (England, 2012), vol. 22, pp. 607-610.
187. J. A. Sullivan *et al.*, Treg-Cell-Derived IL-35-Coated Extracellular Vesicles Promote Infectious Tolerance. *Cell Rep* **30**, 1039-1051.e1035 (2020).
188. J. Lu, J. Wu, J. Tian, S. Wang, Role of T cell-derived exosomes in immunoregulation. *Immunol Res* **66**, 313-322 (2018).
189. M. Kornek *et al.*, Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **143**, 448-458 (2012).
190. X. Zhou *et al.*, Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* **10**, 1000-1007 (2009).
191. H. Waldmann, R. Hilbrands, D. Howie, S. Cobbold, Harnessing FOXP3+ regulatory T cells for transplantation tolerance. *J Clin Invest* **124**, 1439-1445 (2014).
192. C. Thery, L. Zitvogel, S. Amigorena, in *Nat Rev Immunol.* (England, 2002), vol. 2, pp. 569-579.