

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE NEUROPILINA-1 EN LINFOCITOS T CD4+
DURANTE EL RECHAZO DE ALOINJERTO”**

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

Mauricio Alejandro Campos Mora

Director de Seminario de Título:

Dra. Karina Pino Lagos

Facultad de Medicina – Universidad de Chile

Director Patrocinante:

Dr. Miguel Allende Connelly

Facultad de Ciencias – Universidad de Chile

Diciembre 2014

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

MAURICIO ALEJANDRO CAMPOS MORA

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE NEUROPILINA-1 EN LINFOCITOS T CD4+ DURANTE EL RECHAZO DE ALOINJERTO”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Karina Pino Lagos
Directora Seminario de Título

Dr. Miguel Allende Connelly
Profesor Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Evaluador

Santiago, Diciembre de 2014

A mis padres, Ana Luisa y René.
Muchas gracias por todo su esfuerzo y sacrificio.
Los quiero mucho, viejos feos.

BIOGRAFÍA

Nací a fines de Abril de 1991, segundo hijo de una joven pareja de padres, ambos provenientes del sur de Chile. De pequeño, tuve una curiosidad innata por conocer cómo funcionaban las cosas y una pasión por la lectura que mis padres, sabiamente, siempre incentivaron. De una infancia normal, me crié bajo el alero de una cariñosa madre y un esforzado padre, de



los que aprendí los sólidos valores que basan mi filosofía de vida. En el colegio, conocí al grupo de amigos con los que pasé una linda etapa, siempre dispuesto a enseñar al menos aventajado, donde se abrieron nuevas experiencias y realidades. En lo académico, junto con la astronomía, la biología siempre tuvo un foco especial de atención para mí, por lo que elegí vivir una carrera científica entrando a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. En la universidad, conocí a nuevas y maravillosas personas, con quienes compartí notables momentos de mi vida. Durante mi estadía en la universidad, mi pasión por la ciencia se consolidó, lo que me facilitó tomar la decisión de dedicar mi vida al quehacer científico y al descubrir lo desconocido, siempre apuntando a mejorar la calidad de vida de las personas. Por lo tanto, tengo la convicción de que esta opción de vida me dará muchas alegrías y enseñanzas, dándole un sentido más profundo a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Para empezar, le agradezco a Karina por aceptarme en su grupo de trabajo, por darme su confianza y esta oportunidad única de probarme a mí mismo, y ser una tutora presente y dedicada en todo el proceso del desarrollo de este trabajo. También le agradezco al Dr. Juan Carlos Aguillón y al Dr. Diego Catalán por brindarnos los espacios físicos de trabajo y las instancias de discusión necesarias.

Le agradezco al grupo del Laboratorio de Inmunología de Trasplantes, especialmente a Francisco, Tania y Javier, por todas las experiencias compartidas, la buena convivencia y confianza que hemos formado. A Rodrigo y Edgar por los invaluable consejos, enseñanzas y asistencia al inicio de mi trabajo. También le agradezco al IRTGroup, a Verónica por su buena disposición y alegría diaria, y a la Sra. Nancy por su disposición y ayuda. Además a Pía, Darío, Carolina, Jaxaira, Elianet, Jorge, Paulina, Ashley, Katina, Alex por su simpatía y hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

Además quiero agradecer a la gente del Programa de Inmunología. A Roberto, Matías y especialmente a Lorenzo, por la buena onda y las conversaciones científico-filosóficas de la vida. A Carolina Ribeiro por su cordialidad y gran ayuda. A la Sra. Juani, Valentina, Agnes, Karina Kramm, Marcela y a Macarena y Caro Hernández por su ayuda, consejos y notable simpatía. Agradezco especialmente a la Sra. Ruth y a Bastián por su gran ayuda y buena disposición durante todo este tiempo, principalmente en momentos difíciles, hicieron la diferencia en momentos claves de mi aprendizaje.

Me siento agradecido de mis compañeros de universidad, tanto los biólogos ambientales como los biotecnólogos, por todo el tiempo compartido, tanto en clases, realizando trabajos y principalmente fuera de clases y de la universidad. Con ellos pasé un importante periodo de mi vida y cada uno me enseñó algo importante que forma parte de quien ahora soy. Le agradezco a los ambientales Matí Muñoz, Nico, Conty, Mati "Copiapó", Josy, Clau, Marcos, Favi, Jocelyn, Lidia, Allison, Mati "Tarzán", Jorge, Michael, Vane, Felipe, Dani, Noe, Hugo y a los biotecs Diego, Gisse, Viole, Timmy, Susana, Cami, Vale, Sergio, Erick, Luisfe, Yuly, Carolina, Ignacio, Scarlett, Amanda Donoso, Arturo, Marco, Andrea, Cata y Juan Carlos por todos los buenos momentos vividos. Fue un gusto tenerlos de compañeros, gracias por toda su buena onda y compañerismo, e inconscientemente cada uno me enseñó algo importante para mi vida.

Le agradezco a mis amigos Wachi, Gac, Jessa, Amanda, Silvia, Sebastián y Francisco, por su valiosa amistad y por todas las locuras vividas que siempre atesoraré. A mis amigos Fabián y Rodrigo, por todos los años de amistad desde hace tanto tiempo. Gracias a la Sra. Ema, mi profesora de Ciencias Naturales en el colegio, y a Claudia, mi profesora de Biología Diferencial en el liceo, porque la excelente formación que me brindaron fue fundamental para orientar mi vida en la biología y la investigación científica.

Y para terminar, quisiera agradecer a toda mi familia, especialmente a mi abuela Chanita y a mi tía Cristina, a mis tías, tíos, primas y primos que siempre me dieron ánimos para seguir adelante. A mis queridos hermanos Carlos, Claudio y su novia Nicole (más bien otra hermana), y a los más importantes: a Ana Luisa y René, mis padres, por su infinito amor y paciencia, y su crianza ejemplar. Todo lo que soy y lo que he logrado se los debo a ellos, por lo que les dedico este trabajo.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoregulación y Tolerancia (IRT Group) del Programa Disciplinario de Inmunología, parte del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El trabajo contó con el financiamiento de los proyectos CONICYT 791100001 y FONDECYT 11121309.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------------|
| BIOGRAFÍA | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| FINANCIAMIENTO | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 3 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 3.1. Trasplante y rechazo | 5 |
| 3.2. Linfocitos T reguladores (Tregs) | 6 |
| 3.2.1. nTregs..... | 9 |
| 3.3 Marcadores actuales para la identificación de Tregs | 10 |
| 3.3.1. CD25 (IL-2R α): | 10 |
| 3.3.2. CTLA-4 (CD152) | 11 |
| 3.3.3. GITR (TNFRSF18)..... | 12 |
| 3.3.4 PD-1 (CD279)..... | 12 |
| 3.3.5 CD39/CD73..... | 12 |
| 3.3.6. Foxp3..... | 13 |
| 3.3.7. Helios..... | 13 |
| 3.4. Neuropilina-1 | 14 |
| 3.5. Reprogramación o plasticidad de células Tregs..... | 19 |
| 4. HIPÓTESIS | 21 |
| 5. OBJETIVOS | 21 |
| 5.1 Objetivo General | 21 |
| 5.2 Objetivos Específicos..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 6. MATERIALES Y METODOS..... | 22 |
| 6.1. <i>Ratones</i> | 22 |
| 6.2. <i>Medios de incubación y reactivos</i> | 22 |
| 6.3. <i>Obtención de suspensiones celulares</i> | 22 |
| 6.4. <i>Citometría de flujo y 'sorting' celular</i> | 23 |
| 6.5. <i>Trasplante de piel</i> | 24 |
| 6.6. <i>Experimentos de transferencia adoptiva</i> | 24 |
| 6.7. <i>Análisis estadístico</i> | 25 |
| 7. RESULTADOS | 26 |
| 7.1. <i>Estudio de la expresión de Nrp-1 en células T</i> | 26 |
| 7.2. <i>Expresión de Nrp1 en células Tregs durante el rechazo a aloinjertos de piel</i> | 29 |
| 7.3. <i>Las células Tregs Nrp1+ promueven la supervivencia del trasplante de piel y son necesarios para una mayor expresión de Nrp1 y Eos en las células T CD4+ efectoras</i> | 32 |
| 8. DISCUSION | 38 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 45 |
| 10. REFERENCIAS | 46 |
| 11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS | 53 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------------------|--|----|
| Figura 1 | Estructura, ligandos y función de Nrp1. | 15 |
| Figura 2 | Nrp1 se expresa preferencialmente en células T CD4+ de órganos linfoides secundarios. | 26 |
| Figura 3 | Nrp1 se expresa principalmente en células Tregs | 27 |
| Figura 4 | Enriquecimiento de células T CD4+ Nrp1+ en los GLD de ratones trasplantados con injerto alogénico. | 29 |
| Figura 5 | Tregs pierden expresión de Nrp1 durante rechazo a trasplante. | 30 |
| Figura 6 | Tregs pierden expresión de Eos durante el rechazo a aloinjerto. | 30 |
| Figura 7 | Estrategia de sorting y diseño experimental de transferencia celular adoptiva. | 31 |
| Figura 8 | Células Tregs Nrp1+ prolongan la sobrevivencia de alo-injerto. | 32 |
| Figura 9 | Tregs Nrp1+ Ly5.1+ mantienen altos niveles de Nrp1 durante inflamación gatillada por el reconocimiento de alo-antígenos. | 33 |
| Figura 10 | Células T CD4+ Nrp1- efectoras ganan expresión de Nrp1, lo que es dependiente de la co-transferencia con células Tregs Nrp1+. | 34 |
| Figura 11 | Células T CD4+ efectoras incrementan su ganancia de expresión de Eos al co-transferirse con células Tregs Nrp1+. | 35 |
| Figura Supl. 1 | Expresión de Foxp3 en células Treg Ly5.1+ <i>post-sorting</i> . | 50 |
| Figura Supl. 2 | Generación de células Tregs Foxp3 ^{GFP+} provenientes de células T CD4+ efectoras transferidas a ratones trasplantados. | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------------|---|---|
| Tabla 1 | Moléculas y mecanismos de supresión de células T reguladoras. | 7 |
|----------------|---|---|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|---|
| AMP | Adenosin monofosfato |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| APC | Célula presentadora de antígenos |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| CD | Cluster de diferenciación |
| cRPMI | RPMI complementado |
| CTLA-4 | Antígeno asociado a células T citotóxicas 4 |
| DC | Célula dendrítica |
| EAE | Encefalomiелitis autoinmune experimental |
| EICH | Enfermedad del Injerto-Contra-Huésped |
| F1 | Ratón descendiente de cruce de cepas C57Bl/6 x Balb/c |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| Foxp3 | Forkhead box P3 |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| GITR | Gen relacionado con la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides |
| GLD | Ganglios linfáticos drenantes |
| GVHD | <i>Graft Versus Host Disease</i> |
| IL | Interleuquina |
| IL-2Rα | Cadena alfa del receptor de IL-2 |
| IPEX | Síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado a X |
| iTregs | Células T reguladoras inducidas |
| LAG-3 | Gen de activación linfocitaria 3 |
| MBP | Proteína básica de mielina |
| MHC-II | Complejo principal de histocompatibilidad - clase II |
| mRNA | RNA mensajero |
| Nrp1 | Neuropilina-1 |
| nTregs | Células T reguladoras naturales |
| OVA | Ovoalbúmina |

1. RESUMEN

Durante el rechazo a trasplantes alogénicos, varios tipos de células inmunes, incluyendo células dendríticas, células T CD4+ y CD8+, entre otras, recirculan entre el injerto y el ganglio linfático drenante más cercano, resultando en que la inmunidad contra el tejido “extraño” o “foráneo” toma lugar. Las células T reguladoras CD4+ son críticas controlando la magnitud de las respuestas inmune, y pueden actuar para promover o mantener la tolerancia. Estas células se han caracterizado por expresar los marcadores CD25, Foxp3 y, más recientemente descrito, Neuropilina-1 (Nrp1). El rol de estas células supresoras durante el rechazo a aloinjertos aún no está claro. Usando un modelo murino de rechazo a trasplante alogénico de piel, se analizó la expresión de Nrp1 y Eos en las células T CD4+ presentes en los ganglios drenantes de los injertos, el bazo y los injertos de piel de ratones trasplantados tanto con injertos singénicos como alogénicos. Los resultados en este trabajo indican que, durante el rechazo a trasplantes alogénicos, hay un incremento en la frecuencia total de células T CD4+ que expresan Nrp1, pero que la expresión de esta molécula sufre una disminución en la subpoblación de células T CD4+ reguladoras. Notablemente, la expresión del factor de transcripción Eos, que provee estabilidad funcional celular, también se encuentra reducida. En experimentos de transferencia adoptiva, se observó que durante el rechazo a alo-injertos: i) las células T reguladoras naturales mantienen altos niveles de expresión de Nrp1, ii) las células T efectoras (Nrp1-) adquieren un fenotipo Nrp1+Eos+, iii) la transferencia de células T reguladoras Nrp1+ puede promover la sobrevivencia de injertos alogénicos, y además potencian la ganancia de Nrp1 y Eos en las células T efectoras. En conjunto, estos datos describen una nueva dinámica de expresión de Nrp1 y Eos en células T CD4+, durante el rechazo a alo-injertos, lo que

apoya reportes previos que sugieren el uso de Nrp1 en el campo de tolerancia a trasplantes y sentando las bases de futuras investigaciones.

2. ABSTRACT

During allograft rejection, several immune cell types, including dendritic cells, CD4+ and CD8+ T cells, among others, recirculate between the graft and the nearest draining lymph node, where immunity against the “foreign” tissue takes place. Regulatory CD4+ T cells (Tregs) are critical for controlling the magnitude of the immune response and may act to promote or maintain tolerance. Phenotypically, Tregs are characterized a high expression of CD25 and Foxp3, and more recently, Neuropilin-1 (Nrp1) has been linked to this cell population. Beside the extensive work on Tregs biology during the last decades, the role of these suppressor cells during allograft rejection is still not well understood. In the present study, we used a murine model of skin allograft rejection, to analyze the expression of Nrp1 and Eos on CD4+ T cells residing in graft draining lymph nodes, spleen and skin grafts from both syngeneic- and allogeneic-grafted mice. The results shows that during graft rejection, there is an increase in the frequency of total CD4+ T cells expressing Nrp1, but the expression of this molecule is down-regulated in the regulatory CD4+ T cell compartment. Interestingly, the expression of the transcription factor Eos, which renders Treg cell function stability, is also reduced, suggesting that in the event of graft rejection Tregs may be losing their function. In an alternative approach, we performed adoptive transfer experiments and observed that during allograft rejection: i) natural regulatory CD4+ T cells maintain high levels of Nrp1 expression, ii) effector CD4+ T cells (Nrp1-) become Nrp1+Eos+, iii) the transfer of regulatory CD4+ T cells (Nrp1+) can promote allograft survival, and also enhance the gain of Nrp1 and Eos on T effectors cells. Summarizing, our data describes an unknown dynamic for Nrp1 expression on CD4+ T cells during allograft rejection, which may be associated to Tregs function. In addition, our observations support previous

reports suggesting a useful role for Nrp1 in transplantation tolerance. Future work describing in detail Nrp1 expression on Tregs is necessary to translate the application of Nrp1 (as a marker) in the clinic.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Trasplante y rechazo

El trasplante de órganos representa una oportunidad única para restaurar la función de un tejido en particular luego de sufrir una lesión o falla incapacitante. Sin embargo, el rechazo al trasplante sigue siendo un importante problema clínico, a pesar del uso de tratamientos con drogas inmunosupresoras que tiene como fin alcanzar la “tolerancia a largo plazo”.

Evidencia reciente ha esclarecido los procesos celulares “orquestados” que rigen el rechazo a injertos alogénicos (ó alo-injertos). En un modelo murino de rechazo a trasplantes de piel no-compatibles, el uso de microscopía intravital por *imaging* ha permitido el análisis temporal de las interacciones de diferentes tipos de células inmunes durante el rechazo al alo-injerto (Cahalan, 2011). Luego del flujo inicial de monocitos del donante que penetran al injerto y su posterior migración a los ganglios linfáticos drenantes, la activación de linfocitos T del receptor permite su proliferación y subsecuente migración al tejido foráneo. Ésta es seguida por una infiltración masiva de monocitos al injerto, junto con la acumulación de linfocitos T CD4+ y CD8+ efectores en la interface entre la dermis y la epidermis de la región trasplantada. En este modelo, alrededor de los diez días post-trasplante las células T CD8+ citotóxicas se han diseminado a largo del alo-injerto, destruyendo la mayor parte de las células “extrañas”, llevando a la necrosis y al total rechazo del alo-injerto (Celli, et al., 2011). Aunque éste y otros estudios clásicos se centran en el rechazo de alo-injerto mediado por células T CD8+ citotóxicas, la evidencia obtenida de modelos de rechazo restringidos a presentación por MHC-II indica que las células T CD4+ efectoras alo-reactivas, por sí

solas, son capaces de mediar el rechazo agudo ó crónico a trasplantes alogénicos (Vokaer, et al., 2013, Csencsits, et al., 2005, Booth, et al., 2011)

3.2. Linfocitos T reguladores (Tregs)

La regulación inmune mediada por células fue inicialmente vislumbrada por Gershon *et al.* a comienzos de los años 70', en base a experimentos *in vivo* de transferencia de timocitos, donde se sugirió que un subconjunto de células T podría ejercer actividad supresora, las que se denominaron en su momento "células supresoras" (Gershon, et al., 1972). Sin embargo, en ese momento ni las células ni los posibles factores solubles liberados por estas células podían ser convincentemente caracterizados. Por lo tanto, todo el concepto fue ampliamente criticado durante años.

Sólo a mediados de los años 90' los términos de "supresión" y "células supresoras" retomaron interés debido al pionero trabajo de Sakaguchi *et al.* quienes fueron los primeros en demostrar que una pequeña población de células T CD4+ que co-expresan CD25 (la cadena alfa del receptor de IL-2, ó IL2R α) funcionaban como células T supresoras en ratones adultos (Sakaguchi, et al., 1995). La importancia de estas células T CD4+CD25+ resultó evidente cuando, al eliminar esta sub-población (alrededor del 10%) del total de células T CD4+ de un ratón adulto normal, y transferir el resto de las células T CD4+CD25- a ratones inmuno-deficientes, resulta en el desarrollo de una variedad de síntomas autoinmunes en los ratones recipientes. Más aún, el curso de la enfermedad era revertido sólo re-adicionando las células T CD4+CD25+ (Sakaguchi, et al., 1995). La subsecuente demostración de que estas células también exhiben actividad reguladora *in vitro* (Thornton and Shevach, 1998, Piccirillo and Shevach, 2001) hicieron resurgir el interés en la inmuno-regulación

mediada por células T. Poco después, múltiples grupos de investigación identificaron células T CD4+CD25+ humanas con propiedades funcionales bastante similares (Dieckmann, et al., 2001, Jonuleit, et al., 2001, Groux, et al., 1997). Actualmente ésta y otras poblaciones celulares descritas se conocen en su conjunto como linfocitos T reguladores (o Tregs).

Además de todo lo anterior, se observó que el factor de transcripción Foxp3 (del inglés *Forkhead box protein 3*) se expresa selectivamente en las células T CD4+CD25+, y que una mutación en el gen codificante para Foxp3 es el responsable de un letal síndrome auto-inmune que se desarrolla en ratones (mutante *scurfy*), así como el síndrome IPEX (del inglés *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*) en humanos, ambos resultantes por una deficiencia de células Tregs (Hori, et al., 2003). El desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-Foxp3, para su detección intracelularmente por citometría de flujo, y la generación de cepas de ratones *knock-in* (Fontenot, et al., 2005, Haribhai, et al., 2007) donde Foxp3 es co-expresado con un gen reportero fluorescente (proteína GFP), han sido esenciales para caracterizar las células Tregs Foxp3+ *in vivo* (Shevach, 2006).

Las células Tregs son una población heterogénea con la capacidad de modular el sistema inmune mediante varios mecanismos descritos, los que se detallan en la

Tabla I.

Tabla I. Moléculas y mecanismos de supresión de células T reguladoras. En la tabla se detallan las proteínas de membrana o solubles involucradas en los distintos mecanismos de supresión descritos para las células Tregs, si se han encontrado en células T reguladoras naturales (nTregs) o células T reguladoras inducidas (iTregs), como se describe más adelante.

| Mecanismo | Efecto en células | nTregs | iTregs | Referencias |
|--|--|--------|--------|--|
| Contacto-dependiente | | | | |
| CTLA-4 | Se une a las moléculas CD80 y CD86 expresadas en APC y Tefs, bloqueándolas e inhibiendo su expresión génica; además bloquea la señal co-estimuladora a las Tefs. | ✓ | ✓ | Dejean <i>et al.</i> (2009); Onishi <i>et al.</i> (2008); Paust <i>et al.</i> (2004). |
| LAG-3 (CD223) | Se une a las moléculas de MHC-II expresadas en APC y Tefs. | ✓ | ✓ | Okamura <i>et al.</i> (2012); Liang <i>et al.</i> (2008). |
| Galectin-1 | Se une a las células efectoras induciendo detención del ciclo celular y apoptosis. | ✓ | ✓ | Wu <i>et al.</i> (2014); Lv <i>et al.</i> (2013); Garin <i>et al.</i> (2007). |
| Neuropilin-1 | Prolonga las interacciones entre Tregs y DC, restringiendo el acceso de células Tefs a las APC | ✓ | No | Sarris <i>et al.</i> (2008). |
| Perforinas/Granzimas A y B | Produce perforaciones en la membrana de APC y Tefs, induciendo apoptosis. | ✓ | No | Grossman <i>et al.</i> (2004); Gondek <i>et al.</i> (2005); Zhao <i>et al.</i> (2006). |
| Contacto-independiente | | | | |
| TGF- β | Induce la conversión de células Tefs en células Tregs | ✓ | ✓ | Liu <i>et al.</i> (2008); Andersson <i>et al.</i> (2008); Li <i>et al.</i> (2006). |
| IL-10 | Disminuye la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en Tefs y la expresión de MHC-II en APCs. | ✓ | ✓ | Belkaid <i>et al.</i> (2007); McGeachy <i>et al.</i> (2005); Dieckmann <i>et al.</i> (2001). |
| IL-35 | Suprime la proliferación de células Tefs. | ✓ | No | Collison <i>et al.</i> (2007); Niedbala <i>et al.</i> (2007). |
| Deprivación de IL-2 | Mediante CD25, los Tregs compiten con las células Tefs por IL-2, llevándolas a apoptosis. | ✓ | No | Pandiyan <i>et al.</i> (2007). |
| Hidrólisis de ATP | Mediante las ectonucleotidasas CD39 y CD73, convierten ATP en adenosina que suprime la proliferación de células Tefs. | ✓ | No | Bopp <i>et al.</i> (2007); Ohta <i>et al.</i> (2006). |
| APC, célula presentadora de antígenos; ATP, adenosina tri-fosfato; CTLA, antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos; IL, interleuquina; iTregs, células T reguladoras inducidas; LAG, gen de activación de linfocitos; nTregs, células T reguladoras naturales; Tefs, células T efectoras; TGF- β , factor transformante de crecimiento beta; Tefs, células T efectoras; Tregs, células T reguladoras. | | | | |

3.2.1. nTregs

En el timo, continuamente se producen células Tregs CD4+CD25+Foxp3+ como una sub-población madura y funcionalmente distintiva (Sakaguchi, 2005), y muchos investigadores las han denominado como células Tregs “naturales” (ó nTregs) para diferenciarlas de las células Tregs que se generan en tejidos linfoides periféricos, denominadas células Tregs “adaptativas” o “inducidas (iTregs). Aunque se han descrito variados criterios, las características para diferenciar células nTregs de células iTregs no son universalmente aceptadas.

Las células nTregs se generan a través de selección por afinidad del receptor de células T (TCR) a antígenos de péptidos propios, en un rango entre la selección positiva de células T CD4+ convencionales y la selección negativa de células T auto-reactivas con elevada afinidad por auto-antígenos (Josefowicz and Rudensky, 2009). Las células nTregs mantienen su expresión de Foxp3 y actividad supresora bajo re-estimulación *in vitro* (Floess, et al., 2007). Se ha visto que modificaciones epigenéticas en la TSDR (del inglés *Treg-specific demethylated region*) del locus Foxp3 están relacionadas con la estabilidad de la expresión de Foxp3 (Polansky, et al., 2010), dado que en las células nTregs esta región está en general desmetilada (Lal, et al., 2009).

3.2.2. iTregs

Las células T vírgenes en tejidos periféricos también pueden adquirir expresión de Foxp3 y función supresora como células iTregs, las que pueden diferenciarse bajo condiciones más diversas (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009), como en los ganglios linfáticos mesentéricos durante inducción de tolerancia oral (Coombes, et al., 2007), en la lamina propia del intestino en respuesta a microbiota y antígenos alimentarios (Sun,

et al., 2007), en tejidos crónicamente inflamados (Curotto de Lafaille, et al., 2008), y en tejidos trasplantados (Cobbold, et al., 2004). Las células iTregs también pueden ser inducidas *in vitro* a partir de células T CD4+CD25-Foxp3- cuando se cultivan en presencia de IL-2, TGF- β y ácido retinoico (Lu, et al., 2010, Horwitz, et al., 2008, Benson, et al., 2007).

Las células iTregs inducidas por TGF- β son inestables y pueden perder su expresión de Foxp3 y actividad supresora *in vitro* cuando se re-estimulan en ausencia de TGF- β (Floess, et al., 2007), lo que se correlaciona con la observación que estas células Tregs poseen la TSDR altamente metilada (Lal, et al., 2009).

3.3 Marcadores actuales para la identificación de Tregs

Con el fin de aprovechar el enorme potencial terapéutico de las células Tregs, es necesario contar con marcadores confiables para poder identificarlos o aislarlos. Se han propuesto muchos marcadores para distinguir poblaciones de Tregs bajo diferentes condiciones fisiológicas.

3.3.1. CD25 (IL-2R α): La cadena alfa del receptor de IL-2 posee un rol funcional en las células Tregs: dado que no poseen la capacidad para generar IL-2, y que además dependen de la IL-2 secretada por las células T efectoras (Tefs), las células Tregs que expresan altos niveles de CD25 pueden privar a las células Tefs de IL-2 y debilitar su proliferación y sobrevivencia (Papiernik and Banz, 2001, Scheffold, et al., 2007). Asimismo, ratones mutantes deficientes tanto en CD25 e IL-2 son deficientes en células Tregs (Almeida, et al., 2002). En ratones, existe una excelente correlación entre la expresión de CD25 y Foxp3; sin embargo, una población menor de células Foxp3+ es CD25-. Por el contrario, alrededor del 10% de las células CD25+ son células Tefs

Foxp3- (Shevach, 2006), por lo que no es un marcador ideal al entregar tanto falsos positivos como falsos negativos.

En humanos, la situación es más complicada, pues CD25 también es expresada por células Tefs luego de la activación. Por lo tanto, la población CD4+CD25+ no representa una población pura de Tregs, sino que también contiene células T activadas. En células T CD4+ de sangre periférica, la población CD25+ contiene células expresando el marcador a diferentes niveles, desde bajo (*low*) a alto (*high*), y entre ellos las células CD25^{high} representan la población de Tregs más confiable (Schmetterer, et al., 2012).

3.3.2. CTLA-4 (CD152): el antígeno asociado a células T citotóxicas (o CTLA-4, por sus siglas en inglés) disminuye la activación de células T, compitiendo con su homólogo estructural CD28, por interactuar con las moléculas B7 (moléculas co-estimuladoras CD80/CD86). CTLA-4 es constitutivamente expresado por aproximadamente el 40% de las células Tregs murinas (Read, et al., 2000, Takahashi, et al., 2000). Esta molécula es crítica para la función supresora de células Tregs *in vivo* (Wing, et al., 2008), aunque las células Tregs de ratones deficientes en CTLA-4 son relativamente funcionales (Read, et al., 2006). En células Tregs se ha visto una correlación positiva entre los niveles de expresión de CTLA-4 y su capacidad supresora. Del mismo modo, las células Tregs humanas de sangre periférica también expresan CTLA-4 y se ve la misma correlación mencionada (Chen, et al., 2010). Sin embargo, la detección de esta molécula por citometría de flujo requiere tinción intracelular, impidiendo su uso como un marcador de superficie de Tregs (Schmetterer, et al., 2012).

3.3.3. GITR (TNFRSF18): la evidencia indica que la proteína de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) inducida por glucocorticoides (ó GITR, por sus siglas en inglés) funcionaría como un regulador negativo de la función de células Tregs (McHugh, et al., 2002). Se ha visto que al ligar a GITR en células Tregs disminuye su capacidad supresora en ratones (Shimizu, et al., 2002). Aunque fue inicialmente reconocido como un marcador de células Tregs (Arch, 2005), las células Tefs también expresan esta molécula como molécula co-estimuladora, incluso sin activación.

3.3.4 PD-1 (CD279): este homólogo de CD28 se expresa en células T luego de la activación mediada por TCR, y su expresión es particularmente alta en células T "exhaustas" no-funcionales (Freeman, et al., 2006). Se ha descrito que células nTreg murinas no-estimuladas retienen PD-1 en compartimentos intracelulares (Raimondi, et al., 2006), por lo que la ausencia de expresión superficial de PD-1 puede ser usado para discriminar entre células nTregs CD4+CD25+ y células Tefs recientemente activadas, que también pueden exhibir un fenotipo CD4+CD25+ (Raimondi, et al., 2006). Aún falta determinar si resultados similares se obtienen usando células Tregs humanas, por lo que su uso como marcador de células Tregs se mantiene incierto (Schmetterer, et al., 2012).

3.3.5 CD39/CD73: la actividad enzimática de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (proteínas asociadas a membrana) juegan un rol estratégico calibrando la duración y magnitud de las señales purinérgicas (mediadas por moléculas derivadas de ATP), alterando el ambiente de un estado inflamatorio a anti-inflamatorio durante la respuesta inmune. Tanto CD39 como CD73 están altamente expresadas en la superficie de células Tregs Foxp3+ y se han utilizado como marcadores de células Tregs

(Mandapathil, et al., 2009, Deaglio, et al., 2007, Alam, et al., 2009). Aunque se ha reportado que el 90% de las células Tregs Foxp3+ humanas son CD39+ (Dwyer, et al., 2010), la expresión de CD73 en la membrana es mínima; esto se debe a que CD73 es abundante en el citoplasma de estas células (Mandapathil, et al., 2010). Esto sugiere que las células Tregs humanas secretan CD73, lo que contribuye a la degradación de AMP a adenosina provocando la modulación de células inmunes a nivel metabólico (Antonioli, et al., 2013).

3.3.6. Foxp3: este factor de transcripción se considera un regulador maestro de los procesos biológicos de las células Tregs, siendo esencial en su compromiso con el linaje supresor y la diferenciación de estas células (Fontenot, et al., 2003). Por lo tanto, en ratones Foxp3^{GFP} se usa rutinariamente como un marcador para definir a células nTregs. Pero al igual que CD25, en humanos Foxp3 no sólo se expresa constitutivamente en células nTregs, sino que también se expresa transientemente en células Tefs activadas (Walker, et al., 2003). Por lo tanto, la expresión de Foxp3 es menos confiable para definir células Tregs humanas que para células Tregs murinas (Chen and Oppenheim, 2011). Es más, debido a su localización intracelular, la expresión de Foxp3 sólo puede ser detectada luego de un paso de "fijación/permeabilización" de membrana celular, lo que impide su uso para separar células nTregs viables para estudios funcionales.

3.3.7. Helios: este factor de transcripción expresado en células Tregs puede unirse al promotor de Foxp3 y se expresa en altos niveles en las células nTregs humanas (Getnet, et al., 2010). El uso de la expresión de Helios como marcador de células nTregs posee tanto evidencia a favor como en contra (Lin, et al., 2013). Por un lado, se ha descrito que casi el 100% de las células nTregs en el timo expresan Helios,

mientras que en tejidos periféricos sólo el 70% de las células Tregs Foxp3+ expresan Helios, lo que sugiere que ese 70% corresponden a las células nTregs (Thornton, et al., 2010). En modelos murinos *in vivo* las células iTregs antígeno-específicas no expresan Helios (Thornton, et al., 2010), y en humanos al analizar el estado de metilación de la TSDR en células Tregs Foxp3+, se observó que la subpoblación Helios+ poseía la TSDR completamente desmetilada, mientras que la subpoblación Helios- poseía alrededor del 45% de metilación de TSDR (Kim, et al., 2012). Por el otro lado, se ha descrito que la expresión de Helios puede ser inducida durante la activación y proliferación de células T *in vitro* (Akimova, et al., 2011, Zabransky, et al., 2012) e incluso que puede expresarse en células iTreg Foxp3+ generadas tanto *in vitro* como *in vivo* (Gottschalk, et al., 2012). Por lo tanto, la evidencia acumulada no permite definir si Helios podría ser un marcador específico apropiado para células nTregs.

3.4. Neuropilina-1

Nrp1 es un co-receptor multifuncional de membrana, inicialmente descrito por estar involucrado en la migración y en la guía axonal en el sistema nervioso central (Fujisawa, 2004, Fujisawa, et al., 1997). La estructura de esta glicoproteína se divide principalmente en una considerable región extracelular (con múltiples dominios proteicos), una sección de hélice simple de transmembrana, y una pequeña región citoplasmática (Parker, et al., 2012). La región extracelular consiste en dos dominios denominados "a1/a2", dos dominios denominados "b1/b2" y un dominio denominado "c", los cuales son todos necesarios (en mayor o menos medida) para la unión de Nrp1 con sus ligandos (Gu, et al., 2002, Geretti, et al., 2008). Además, los dominios "c" y de transmembrana participan en la oligomerización de Nrp1 en la membrana celular (Roth, et al., 2008). El dominio intracelular de Nrp1 no posee función por sí solo, pero se ha

comprobado que interactúa con proteínas de dominios PDZ (Cai and Reed, 1999), sugiriendo que Nrp1 además modula la señalización intracelular a través de interacciones proteína-proteína (ver **Figura 1**).

Una característica relevante de Nrp1 es su habilidad para unir, con relativamente alta afinidad, moléculas de varias familias, lo que la involucra en una variedad de procesos fisiológicos de una forma que aún no se comprende del todo (Wild, et al., 2012). Entre estas moléculas, Semaforina-III (Sema3) (Kitsukawa, et al., 1997, Kolodkin, et al., 1997) y el factor de crecimiento vascular y endotelial (ó VEGF, por sus siglas en inglés) (Soker, et al., 1998, Kawasaki, et al., 1999) se han descrito detalladamente y confirman el rol esencial que posee Nrp1 en el normal desarrollo embrionario tanto del sistema nervioso como del sistema vascular (Parker, et al., 2012). Además, se ha descrito que Nrp1 se une a una variedad de otras moléculas involucradas en procesos celulares y tisulares (Campos-Mora, et al., 2013), las que se muestran en la **Figura 1**.

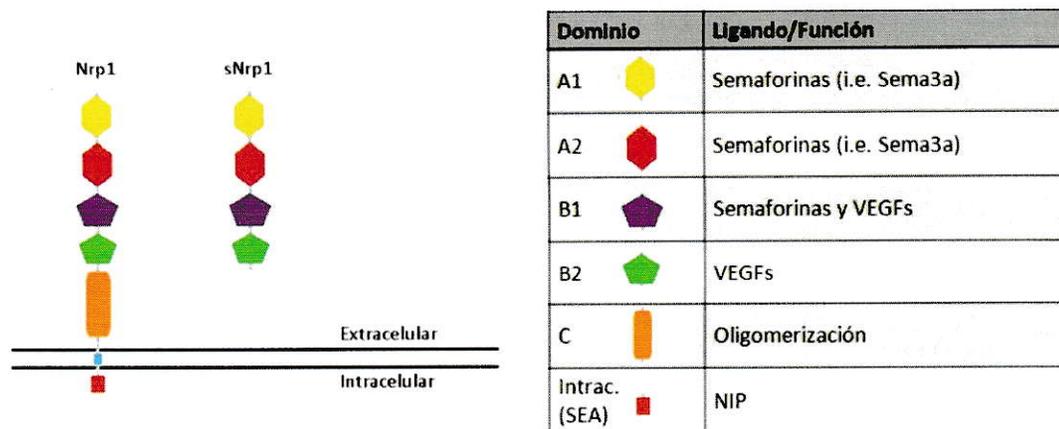


Figura 1. Estructura, ligandos y función de Nrp1. *Izquierda:* Nrp1 comprende cinco dominios extracelulares (a1/a2, b1/b2 y c), un dominio transmembrana, y un corto dominio citoplasmático. Los dominios a1/a2 y b1/b2 están involucrados en la unión de distintos ligandos, mientras que el dominio c y el transmembrana participan en la oligomerización con receptores. El dominio intracelular de Nrp1 interactúa con proteínas de dominio PDZ (como la sinectina) vía la secuencia de reconocimiento S-E-A en la región C-terminal. Además, se muestra una forma soluble de Nrp1 (sNrp1), que carece de los dominios c y transmembrana. *Derecha:* se muestran las propiedades funcionales y de unión de ligandos de cada dominio de Nrp1.

A comienzos del 2000, Nrp1 mostró ser un componente esencial de la sinapsis inmunológica en humanos, dada su expresión en DC y en células T, pues en presencia de anticuerpos anti-Nrp1 ocurría una inhibición parcial de la proliferación celular de cocultivos alogénicos (Tordjman, et al., 2002). En la última década, Nrp1 ha sido repetidamente propuesta como un marcador de células Tregs, dado que se ha encontrado preferencialmente expresada en células Tregs CD4+CD25+ sin cambios aparentes bajo activación, en contraste con las células T convencionales, las que pierden expresión de Nrp1 bajo estas condiciones (Bruder, et al., 2004). Mediante ensayos de proliferación *in vitro* de células T CD4+ respondedoras junto con células T CD4+Nrp1+ ó CD4+Nrp1-, se observó que sólo las células Nrp1+ suprimen la proliferación de las células T respondedoras; y al infectar a células T naïve CD4+CD25- con retrovirus codificantes para Foxp3, se observó una ganancia de capacidad supresora y un considerable aumento en la expresión de Nrp1, lo que en su conjunto

indica que la expresión de Nrp1 en Tregs de ratón se correlaciona con la expresión de Foxp3 y su capacidad supresora (Bruder, et al., 2004).

Estudios en humanos sugieren que una de las contribuciones de esta molécula podría consistir en prolongar la comunicación entre DC Nrp1+ y células Tregs Nrp1+ durante la presentación antigénica, mediante interacciones homotípicas (Sarris, et al., 2008). Las células Tregs CD4+CD25^{high}Nrp1+ humanas no proliferan bajo activación *in vitro*, suprimen la proliferación de células T respondedoras *in vitro* de manera contacto-dependiente e inhiben su producción de citoquinas pro-inflamatorias (Battaglia, et al., 2008). Además, mediante separación inmunomagnética, se observó que las células Tregs Nrp1+ eran más potentes al suprimir la proliferación de células T respondedoras que sus contrapartes Nrp1- (Battaglia, et al., 2008). Por otra parte, se observó el mismo fenómeno en un modelo murino de encefalitis autoinmune experimental (EAE), donde la transferencia adoptiva de células Tregs CD4+CD25+Nrp1+ disminuía en mayor medida la severidad de la enfermedad en comparación con células Treg CD4+CD25+Nrp1-; y por el otro lado, los ratones que recibían células Tregs CD4+CD25+ provenientes de ratones *Nrp1-knock-out* condicionales para células T CD4+ exhibían un "EAE-score" significativamente más alto (Solomon, et al., 2011). Por lo tanto, la evidencia obtenida tanto en estudios murinos como en células humanas muestran que la expresión de Nrp1 en las células T CD4+ juega un importante rol en la mantención de la homeostasis inmunológica (Campos-Mora, et al., 2013).

Recientemente, se ha propuesto que, bajo ciertas condiciones fisiológicas, Nrp1 puede ser usado para distinguir entre nTregs e iTregs (Yadav, et al., 2012, Weiss, et al., 2012). Usando un modelo de ratón tanto TCR-transgénico (1B3, específico para reconocer un antígeno de MBP ó *myelin basic protein*) como *RAG-knock-out* (*RAG-/-*

deficiente en el Gen de Activación de la Recombinación), cuya totalidad de células T maduras son MBP-específicas, Yadav y colaboradores demostraron que este ratón carecía de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ en el timo, pero que entre las 4-6 semanas de edad estas células Tregs aparecían en tejidos periféricos, incluso en ratones timectomizados al nacer, por lo que estas células Tregs Foxp3⁺ fueron definidas como puramente iTregs (Yadav, et al., 2012). En estos ratones 1B3.RAG^{-/-}, estas células iTregs generadas *in vivo* expresan bajos niveles de Helios (~25%) y Nrp1 (~6%), en comparación con células Tregs control de ratones WT (~60% Helios⁺, ~57% Nrp1⁺). Tanto las células iTregs generadas *in vitro* con TGF- β , como las células iTregs generadas *in vivo* por conversión homeostática de células T naïve transferidas a ratones RAG^{-/-}, y las células iTregs generadas *in vivo* por exposición a antígeno mostraron muy bajos niveles de expresión de Nrp1 (Yadav, et al., 2012). Aunque en co-cultivos *in vitro* no había diferencia entre la actividad supresora y la expresión de Foxp3 de células Tregs Nrp1^{low} versus Tregs Nrp1^{high}, las células Tregs Nrp1^{low} fueron menos efectivas al controlar la EAE de ratones RAG^{-/-} transferidos con células MBP-específicas en comparación con las células Tregs Nrp1^{high}; es más, ocurre un descenso significativo en la expresión de Foxp3 en las células Tregs Nrp1^{low} en este modelo de inflamación (Yadav, et al., 2012).

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por el grupo de Weiss y colaboradores, donde usaron un modelo análogo de ratón TCR-transgénico (D011.10 con especificidad por ovoalbúmina ó OVA) RAG^{-/-} cuyas células T maduras son todas específicas para OVA. Utilizando este ratón D011.10 y adicionando OVA en su dieta observaron la inducción de células iTregs en la mucosa intestinal, las que resultaron ser Nrp1^{low} (Weiss, et al., 2012). Notablemente, los autores encontraron que en células

Tregs Nrp1- cultivadas *in vitro* con la citoquina TGF- β se induce un incremento significativo en la expresión de Nrp1, además de aumentar los niveles de Nrp1 en células Tregs Nrp1+, mientras que la citoquina IL-6 previene este efecto inductor de TGF- β (Weiss, et al., 2012).

3.5. Reprogramación o plasticidad de células Tregs

Los Tregs Foxp3+ son conocidos por suprimir respuestas inflamatorias (Shevach, 2009). Sin embargo, bajo ciertas condiciones fisiológicas las células Tregs pueden cambiar (o ser “reprogramadas”) hacia un fenotipo pro-inflamatorio (da Silva Martins and Piccirillo, 2012). Actualmente no está claro hasta qué punto la reprogramación de células Tregs ocurre bajo condiciones fisiológicas (da Silva Martins and Piccirillo, 2012, Sakaguchi, et al., 2013). Recientemente, se ha descrito que la pérdida en la expresión de Eos (un factor de transcripción expresado en Tregs Foxp3+) juega un rol crítico mediando la transición en cierta subpoblación de Tregs, desde células supresoras a células pro-inflamatorias, través de un mecanismo dependiente de IL-6 (Sharma, et al., 2013). Estas nuevas células Tregs “tipo-*helper*” gatillarían la respuesta inmune, sin perder su expresión de Foxp3 (Sharma, et al., 2013). Por otro lado, un estudio observó menores niveles de expresión de mRNA de Eos en células Tregs CD4+CD25^{high}CD127^{low/-} de sangre periférica de pacientes con tratamiento de trasplante de células madre afectados de manera aguda o crónica con el síndrome inflamatorio sistémico Enfermedad de Injerto-Contra-Huésped (EICH, o GVHD por sus siglas en inglés), que se caracteriza por mediar el rechazo de células, tejido u órganos trasplantados (Ukena, et al., 2012). Esta disminución en la expresión de mRNA de Eos durante el rechazo se correlaciona con reportes previos que sugieren una función supresora reducida en Tregs de pacientes con EICH (Ukena, et al., 2011).

Dado que Foxp3 es una proteína intracelular, actualmente el campo del trasplante clínico carece de un marcador confiable para identificar y rastrear células Tregs viables. Similarmente, el diagnóstico de rechazo agudo y el daño al trasplante alogénico necesita de biopsias para detectar cambios patológicos a estadios avanzados y frecuentemente irreversibles. Por lo tanto, hay una necesidad apremiante por identificar marcadores específicos para la detección temprana de eventos que lleven al rechazo; del mismo modo, éstos también ayudarían a entender los mecanismos que subyacen al decaimiento de la función del injerto, lo que aún es pobremente entendido (Olbricht, 2012).

Existe poca información respecto a la expresión de Nrp1 en Tregs en el contexto de una respuesta inmune a trasplantes, en particular con respecto a qué sucede con la identidad y estabilidad fenotípica de Tregs. Por lo tanto, este trabajo de tesis se concentra en el estudio de esta población celular durante el rechazo a trasplante *in vivo*, proponiendo y usando a Nrp1 como un marcador de superficie y analizando su biología en la respuesta inmune. Además, se pretende estudiar la estabilidad fenotípica de estas células a diferentes niveles (expresión génica, expresión de factores de transcripción claves y análisis de supresión).

4. HIPÓTESIS

La expresión de Nrp1 en las células T CD4+ presenta una dinámica que se relaciona con la respuesta inmune que media el rechazo a alo-injertos, y esta expresión participa en la inducción de tolerancia a trasplantes alogénicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar la población de células Tregs Foxp3+ durante el rechazo a trasplante *in vivo*, proponiendo y usando a Nrp1 como un marcador de superficie y analizando su biología en la respuesta inmune.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1. Estudio de la expresión de Nrp1 en linfocitos T de distintos órganos y tejidos en condiciones normales y también durante la respuesta a trasplante de piel.

5.2.2. Asociación de la expresión de Nrp1 y Eos durante la respuesta inmune a trasplante de piel.

5.2.3. Efecto de células Tregs Nrp1+ y células T CD4+ Nrp1- efectoras en la supervivencia de trasplante de piel.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Ratones

Se usaron ratones de 6-8 semanas de edad de las cepas C57Bl/6 (WT, CD45.2+ ó Ly5.1+), BALB/c, ratones RAG-/- (obtenidos desde Jackson Laboratories, Maine, EEUU) y reporteros Foxp3^{eGFP} (con background C57Bl/6, CD45.1+ ó Ly5.2+). Los ratones reporteros Foxp3^{eGFP} (Haribhai, et al., 2007) fueron donados por el Dr. J. Rodrigo Mora (Harvard Medical School, Cambridge, MA, USA). Los ratones F1 (H2^{b/d}) se obtuvieron mediante la cruce de ratones C57Bl/6 (H2^b) con ratones BALB/c (H2^d). Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Bioterio Central ó del Bioterio de Alta Seguridad (Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile) bajo los protocolos aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

6.2. Medios de incubación y reactivos

Como medio de incubación se utilizó RPMI-1640 (Gibco BRL, EEUU) suplementado con 10mM HEPES, 100 IU/mL de penicilina/streptomicina, 10% suero fetal bovino inactivado por calor (SFB, Gibco BRL, EEUU) y 50 μ M de 2- β -mercaptoetanol. Este medio RPMI complementado será identificado como cRPMI en esta tesis.

6.3. Obtención de suspensiones celulares

Utilizando instrumental quirúrgico, se extrajeron órganos linfoides (bazo, timo y ganglios linfáticos) a partir de ratones C57Bl/6 WT ó RAG-/-, los que se maceraron y disgregaron a través de *cell strainers* (BD Biosciences, EEUU) hasta obtener

suspensiones celulares. De ser necesario, los eritrocitos presentes se lisaron incubando las células en buffer ACT (NH₄Cl 0.16 M + Tris 0.1 M; pH 7.2) por 5 min, luego se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min y el *pellet* celular fue resuspendido en buffer PBS 1x para utilizaciones posteriores.

6.4. Citometría de flujo y 'sorting' celular

Los datos de citometría de flujo se obtuvieron marcando las células con los anticuerpos anti-CD4 (clon RM4-5), anti-CD8 (clon 53-6.7), anti-CD25 (clon PC61.5), anti-Foxp3 (clon FJK-16S), anti-Eos (clon ESB7C2), anti-CD45.1 (Ly5.2; clon A20), todos de eBioscience (EEUU) y anti-Nrp1 (R&D Systems, EEUU), los cuales se encuentran conjugados con los fluorocromos FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5 y APC. Los datos fueron obtenidos utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson, EEUU) mediante el software CellQuest (BD Biosciences, EEUU). El análisis de los datos se realizó usando el software FlowJo (Tree Star, EEUU).

Para la realización de 'sorting' celular, células T CD4⁺ fueron enriquecidas a partir de suspensiones de células de ganglios linfáticos periféricos (pLN) de ratones C57Bl/6 ó de reporteros Foxp3^{eGFP}, utilizando el *EasySepTM Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit* (StemCell, EEUU), siguiendo las recomendaciones de fábrica. Luego, las células se resuspendieron en buffer de tinción (PBS 1x complementado con 10% SFB) y se marcaron con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD45.1 y anti-Nrp1. Las poblaciones de células T CD4⁺CD25^{high}Nrp1^{high} (ó células Tregs) y células T CD4⁺Nrp1-Foxp3^{eGFP}- CD45.1⁺ (células T efectoras ó Tefs), provenientes de ratones C57Bl/6 y reporteros Foxp3^{eGFP} respectivamente, fueron separadas mediante *sorting*

celular usando un equipo BD FACS Aria III (BD, EEUU). Las células fueron separadas con una pureza $\geq 96\%$.

6.5. Trasplante de piel

Los trasplantes de piel fueron realizados como se ha descrito previamente (Quezada, et al., 2005). Ratones C57Bl/6 o RAG $-/-$ fueron anestesiados con una solución de 27% ketamina (Ketamina) y 3% xilazina (Xylavet, ambos de Alfasan Lab, Woerden, Holanda) usando 100 μL por 20 g de peso corporal mediante inyección intraperitoneal. Piel de cola ($\sim 1 \text{ cm}^2$) de ratones donantes C57B/6 (singénicos) ó F1 (alogénicos) fue quirúrgicamente trasplantada sobre el área dorsal de los ratones receptores. La supervivencia de los injertos fue monitoreada tres veces a la semana y se consideraron rechazados cuando el 80% del injerto original desapareciera o presentase necrosis. Al momento indicado, los injertos de piel fueron colectados, picados en pequeños fragmentos e incubados en cRPMI (a 500 mg de tejido/mL) a 37°C. Luego de 1 hr los sobrenadantes fueron colectados y guardados a -80°C para una posterior cuantificación de citoquinas (ELISA).

6.6. Experimentos de transferencia adoptiva

Ratones RAG $-/-$ recibieron 1.5×10^5 células Tefs CD4+Nrp1-Foxp3^{GFP}-CD45.1+ y/ó 5×10^4 células Tregs CD4+CD25^{high}Nrp1^{high} vía intravenosa (vena lateral de cola) el día anterior al trasplante de piel (día -1). Los ratones fueron eutanizados 20 días post-cirugía y se extrajeron los ganglios linfáticos drenantes (GLD) para preparar suspensiones celulares, para posterior análisis por citometría de flujo.

6.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando un t-test de Student no pareado (o test de Mann-Whitney) de 'dos colas'. La tasa de supervivencia fue analizada por el método de Kaplan-Meier, y las comparaciones fueron realizadas por análisis 'long-rank'. En todos los casos, se consideró $P < 0,05$ como la significancia estadística. Para los análisis de los datos se utilizó el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism Inc, CA, EEUU).

7. RESULTADOS

7.1. Estudio de la expresión de Nrp-1 en células T

Como se mencionara anteriormente, la expresión de Nrp1 fue detectada inicialmente en neuronas, pero más tarde también se comprobó su expresión en células dendríticas, células B y células T (Campos-Mora, et al., 2013). Con el fin de estudiar la dinámica de la expresión de Nrp1 en células T, en primera instancia se analizó la expresión de Nrp1 en células T CD4+ y CD8+ de bazo, de ganglios linfáticos y de timo (distinguiendo timocitos CD4+CD8- de los CD4-CD8+) extraídos de ratones C57Bl/6 WT. Mediante citometría de flujo, se encontró a Nrp1 preferencialmente expresada en células T CD4+ por sobre células T CD8+, puesto que alrededor de un 15-20% de los linfocitos T CD4+ de bazo y ganglios linfáticos periféricos son Nrp1+, mientras que la frecuencia de células T CD8+ Nrp1+ se mantuvo en aproximadamente 2% (**Figura 2**). En el timo, tanto las células T CD4+CD8- como las CD8+CD4- expresaron Nrp1 a niveles similares, con una frecuencia promedio de un 10%.

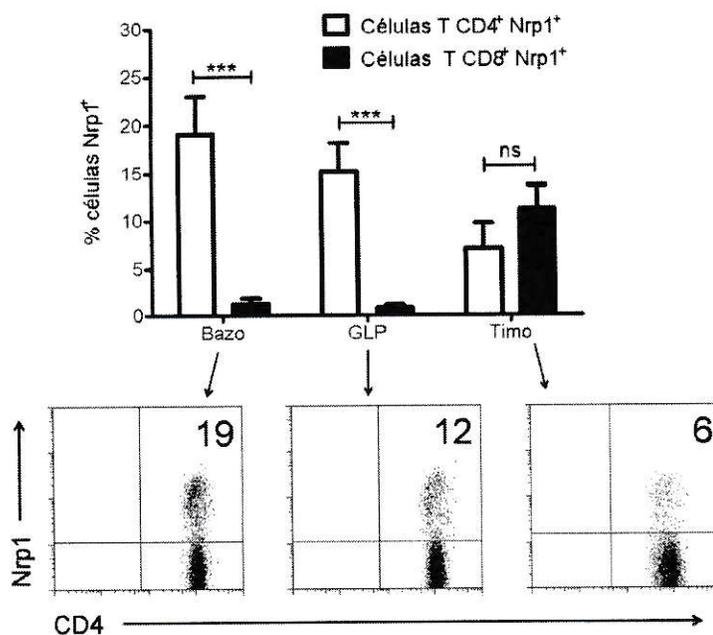


Figura 2. Nrp1 se expresa preferencialmente en células T CD4⁺ de órganos linfoides secundarios. Para analizar la expresión de Nrp1 en células T CD4⁺ y CD8⁺, se prepararon suspensiones celulares de timo, bazo y ganglios linfáticos periféricos (GLP) de ratones C57Bl/6 WT, se marcaron con anticuerpos específicos para reconocer las moléculas mencionadas y se analizaron por citometría de flujo. **(Arriba)** Gráfico de barras del porcentaje (%) de células T Nrp1⁺ presentes en los órganos linfoides analizados. **(Abajo)** Gráficos de "dot-plot" representativos de la expresión de Nrp1 de las células T CD4⁺ totales presentes en los tejidos mencionados anteriormente (en el caso del timo, se seleccionaron las células T CD4⁺CD8⁻). Las barras indican la desviación estándar (SD) y la significancia estadística fue analizada por análisis de varianza (ANOVA). *** P < 0,001. ns = no significativo. n = 6 experimentos independientes.

Debido al interés en identificar la población de nTregs utilizando este marcador, se decidió examinar la expresión de Nrp1 en las células nTregs. Para ello, se analizó la población de células T CD4⁺ que expresan altos niveles de CD25 (denominadas CD4⁺CD25^{high}, **Figura 3-panel izquierdo**), en los tejidos mencionados anteriormente, donde alrededor de un 90% de ellas corresponden a células Nrp1⁺, y mediante tinción intracelular se comprobó que en promedio >70% de estas células resultaron ser Foxp3⁺ (**Figura 3-panel central**). Las células T CD4⁺CD25^{high}Nrp1^{high} corresponden a células Tregs, y para corroborar esto se realizó la misma tinción y estrategia de análisis

en células provenientes de ratones C57Bl/6 $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$, donde se obtuvo que en los tejidos linfoides secundarios, $>95\%$ de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{Nrp1}^{\text{high}}$ corresponden a células $\text{Foxp3}^{\text{GFP}+}$, es decir, células Tregs (Figura 3-panel derecho).

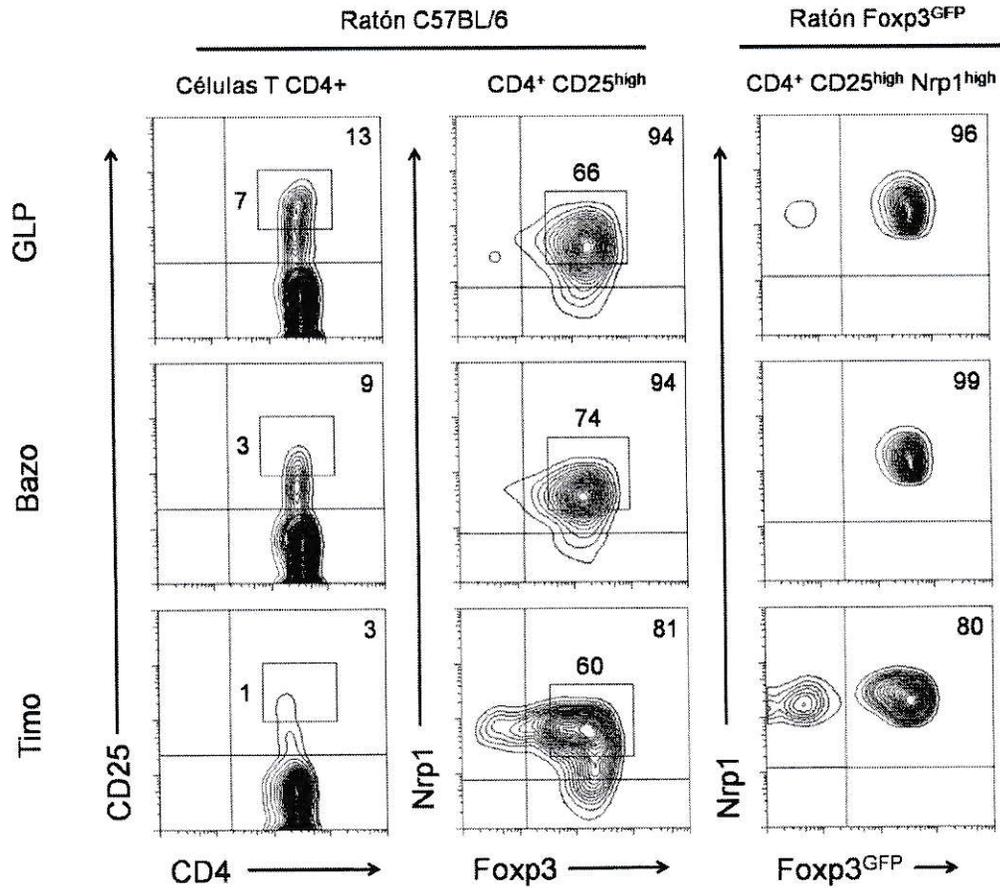


Figura 3. Nrp1 se expresa principalmente en células Tregs. Se prepararon suspensiones celulares de timo, bazo y ganglios linfáticos periféricos (GLP) de ratones C57Bl/6 WT y reporteros $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$, y luego las células fueron marcadas para CD4, Nrp1, CD25 y Foxp3 (en el caso de WT) para identificar y asociar la expresión de Nrp1 en células T reguladoras (Tregs) Foxp3^+ . El panel muestra gráficos de contorno representativos de la expresión de los marcadores mencionados. **(Panel izquierdo)** Expresión de CD4 y CD25 en células T CD4^+ de tejidos linfoides de ratones WT. **(Panel central)** Expresión de Nrp1 y Foxp3 (examinada por tinción intracelular) en células Tregs $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$; **(Panel derecho)** Expresión de Nrp1 y $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$ (por fluorescencia de GFP) en células Tregs $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{Nrp1}^{\text{high}}$ de tejidos linfoides de ratones reporteros $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$.

7.2. Expresión de Nrp1 en células Tregs durante el rechazo a aloinjertos de piel

En nuestro laboratorio se ha establecido un modelo murino de trasplante de piel, el cual permite estudiar la dinámica del rechazo a trasplantes alogénicos, usando como controles a animales receptores de trasplantes singénicos. En ratones C57Bl/6 WT trasplantados con injertos alogénicos, el rechazo (o necrosis del tejido dérmico) ocurre en promedio alrededor de 10 días post-cirugía, mientras que los injertos singénicos trasplantados son aceptados completamente de forma indefinida.

Utilizando este modelo se procedió a verificar si el ambiente inflamatorio producido por el reconocimiento y el rechazo a alo-antígenos afecta la frecuencia de células Tregs y su expresión de Nrp1. Ratones recipientes C57Bl/6 recibieron injertos de piel tanto singénicos (C57Bl/6) como alogénicos (C57Bl/6 x Balb/c, F1) como se ha descrito anteriormente (Quezada, et al., 2005), y al día 10 post-cirugía, se extrajeron los ganglios linfáticos drenantes (GLD) del injerto de piel para analizar la expresión de Nrp1 en los linfocitos T CD4⁺ residentes en los GLD. Se encontró un incremento significativo en la frecuencia de células T CD4⁺Nrp1⁺ activadas durante el rechazo a aloinjerto (~26% versus ~19% en condiciones singénicas, **Figura 4**). Sin embargo, al restringir el análisis a la población de Tregs CD4⁺CD25^{high}, los niveles de expresión de Nrp1 se encontraron significativamente reducidos (~50% Tregs Nrp1^{high} versus ~70% en condiciones singénicas, **Figura 5**). Dado que la función de las células Tregs es suprimir la respuesta inmune permitiendo la aceptación del aloinjerto, se podría presumir que, durante el rechazo, las células Tregs no son supresivas debido a una pérdida de estabilidad. Para probar esto, en las células Tregs CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ se estudió la expresión de Eos, un factor de transcripción recientemente asociado a la estabilidad funcional de células Tregs (Sharma, et al., 2013). Interesantemente, y

acorde con los cambios observados para Nrp1, se encontró una menor expresión de Eos durante la inflamación gatillada en respuesta al trasplante, donde ~50% de los Tregs expresaron Eos en la condición alogénica, comparado con el ~60% de Tregs Eos+ en condiciones singénicas y el ~80% de células Tregs expresando Eos en ratones sin trasplante (**Figura 6**), lo que sugiere que bajo condiciones inflamatorias gatilladas por una respuesta inmune alogénica, las células Tregs podrían perder estabilidad funcional llevando al rechazo del injerto.

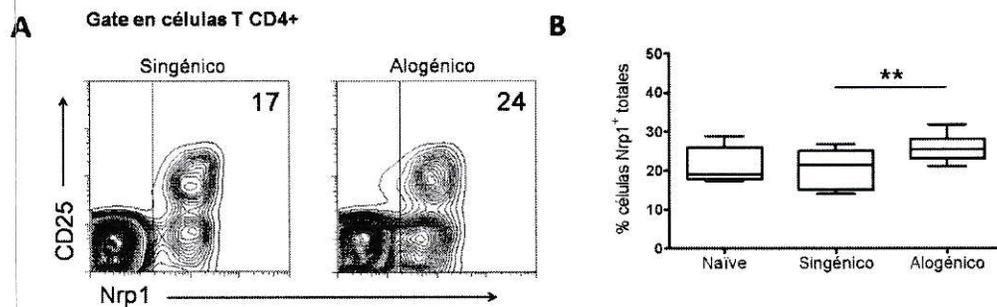


Figura 4. Enriquecimiento de células T CD4+ Nrp1+ en los GLD de ratones trasplantados con injerto alogénico. Ratones C57Bl/6 fueron trasplantados con injertos de piel singénicos (C57Bl/6) ó alogénicos (F1, C57Bl/6 x BALB/c). Diez días después de las cirugías se removieron los ganglios linfáticos drenantes (GLD) de los trasplantes de piel, y se prepararon suspensiones celulares para estudiar la expresión de Nrp1 en células T CD4+. **(A)** Gráficos de contorno representativos muestran la expresión de CD25 y Nrp1 en células T CD4+ totales residentes en los GDLN de ratones receptores de injertos singénicos ó alogénicos. **(B)** Frecuencia (%) de células T CD4+ Nrp1+ se representan en el gráfico de cajas. Las barras corresponden a desviación estándar (SD) y la significancia estadística se analizó usando un t-test de Student no pareado (test de Mann-Whitney). ** P < 0,01. n = al menos 2 experimentos independientes.

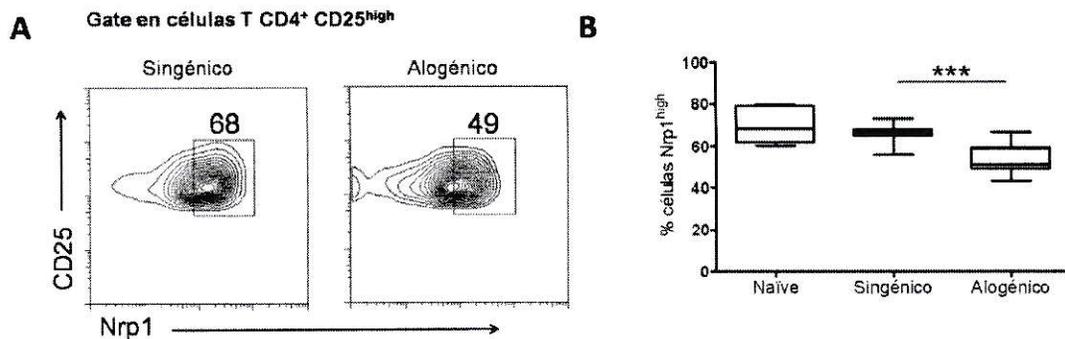


Figura 5. Tregs pierden expresión de Nrp1 durante rechazo a trasplante. Ratones C57Bl/6 fueron trasplantados con injertos de piel singénicos (C57Bl/6) ó alogénicos (F1, C57Bl/6 x BALB/c). Diez días después de la cirugía se removieron los ganglios linfáticos drenantes (GLD) de los trasplantes de piel, y se prepararon suspensiones celulares para estudiar la expresión de Nrp1 en células Tregs CD4⁺CD25^{high}. **(A)** Gráficos de contorno representativos muestran la expresión de CD25 y Nrp1 en Tregs residentes en los GLDN de ratones receptores de injertos singénicos ó alogénicos. **(B)** Frecuencia (%) de Tregs que expresan altos niveles de Nrp1 (Nrp1^{high}) se representa en el gráfico de cajas. Las barras corresponden a desviación estándar (SD) y la significancia estadística se analizó usando un t-test de Student no pareado (test de Mann-Whitney). *** P < 0,001. n = al menos 2 experimentos independientes.

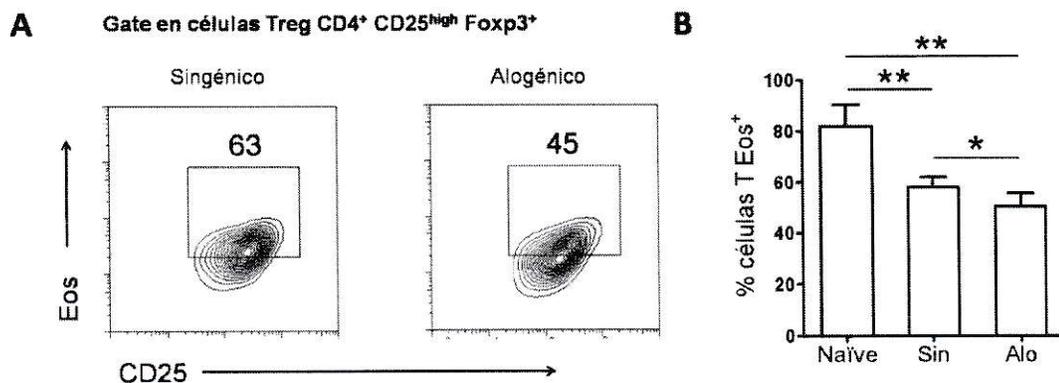


Figura 6. Tregs pierden expresión de Eos durante el rechazo a aloinjerto. Ratones C57Bl/6 fueron trasplantados con injertos de piel singénicos (C57Bl/6) ó alogénicos (F1, C57Bl/6 x BALB/c). Diez días luego de las cirugías se removieron los GLD y se prepararon suspensiones celulares para estudiar la expresión de CD4, CD25, Foxp3 y Eos por citometría de flujo. **(A)** Los gráficos de contorno representativos muestran la expresión de Eos y Foxp3 en los Tregs CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ residentes en los GLDN de ratones receptores de injertos singénicos ó alogénicos. **(B)** Frecuencia (%) de estas células se representa en el gráfico de cajas. Las barras corresponden a desviación estándar (SD) y la significancia estadística se analizó usando un t-test de Student no pareado (test de Mann-Whitney). * P < 0,05. n = 2 experimentos independientes.

7.3 Las células Tregs Nrp1+ promueven la sobrevida del trasplante de piel y son necesarios para una mayor expresión de Nrp1 y Eos en las células T CD4+ efectoras.

Se ha reportado que la transferencia de células T CD4+Nrp1+ en ratones con trasplantes de corazón permite la aceptación del injerto (Yuan, et al., 2013). Basado en esta información, se propuso repetir este experimento pero utilizando nuestro modelo. Adicionalmente, nos propusimos comprender el mecanismo por el cual esta aceptación toma lugar. Para ello, se diseñó una aproximación *in vivo* en la que células Tregs CD4+CD25^{high}Nrp1+ (>90% expresando Foxp3, confirmado por tinción intracelular en **Figura Suplementaria 1**) se purificaron por *sorting* a partir de células de bazo y ganglios linfáticos periféricos de ratones C57Bl/6 WT y además se purificaron células T CD4+CD25-Nrp1-Foxp3^{GFP}- efectoras aisladas de ratones C57Bl/6 reporteros Foxp3^{GFP} congénicos (CD45.1+ ó Ly5.2+). Estas poblaciones de células T efectoras Ly5.2+ (CD45.1) y/o células Tregs Ly5.1+ (CD45.2) fueron adoptivamente transferidas a ratones RAG-/- recipientes (que son incapaces de generar células T y B maduras) vía intravenosa (vena lateral de cola). Un día post-transferencia celular, todos los ratones recipientes recibieron un injerto alógeno (piel de ratones F1) y la sobrevida de los trasplantes fue monitoreada en el tiempo (**Figura 7**).

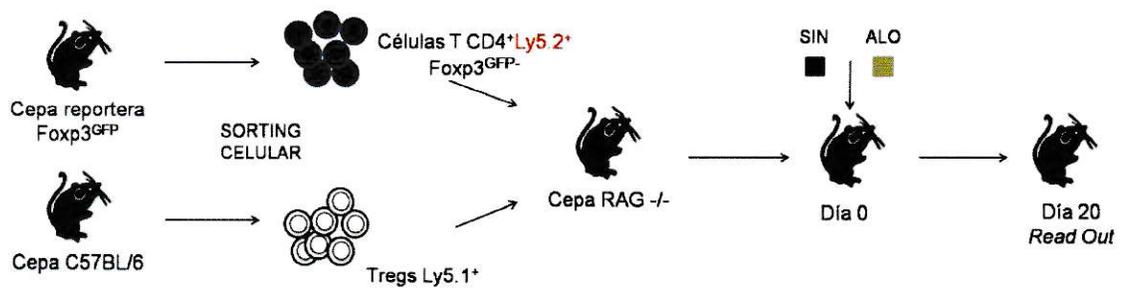


Figura 7. Estrategia de *sorting* y diseño experimental de transferencia celular adoptiva. Tregs Ly5.1+ y células T Ly5.2+CD4+Nrp1-Foxp3^{GFP}- (Tefs) fueron sorteadas desde ratones C57Bl/6 y ratones reporteros Foxp3^{GFP}, respectivamente, y transferidas a ratones RAG^{-/-} (día -1). Al día siguiente, los ratones fueron trasplantados con injertos de piel singénicos o alogénicos (día 0) y la sobrevida del injerto fue monitoreada dos veces por semana. Al día +20, los GLD fueron removidos y se prepararon suspensiones celulares para estudiar la expresión de Foxp3, Nrp1 y Eos en las células T CD4+ tanto Ly5.2+ como Ly5.1+ a través de citometría de flujo.

La co-transferencia de células Tregs Nrp1+ con las células T efectoras CD4+CD25-Nrp1-Foxp3^{GFP}- promovieron la aceptación de los injertos de piel en ~60% de los receptores, en comparación con el grupo control de rechazo (que reciben sólo células T efectoras), en el que todos los ratones rechazaron sus trasplantes (**Figura 8**).

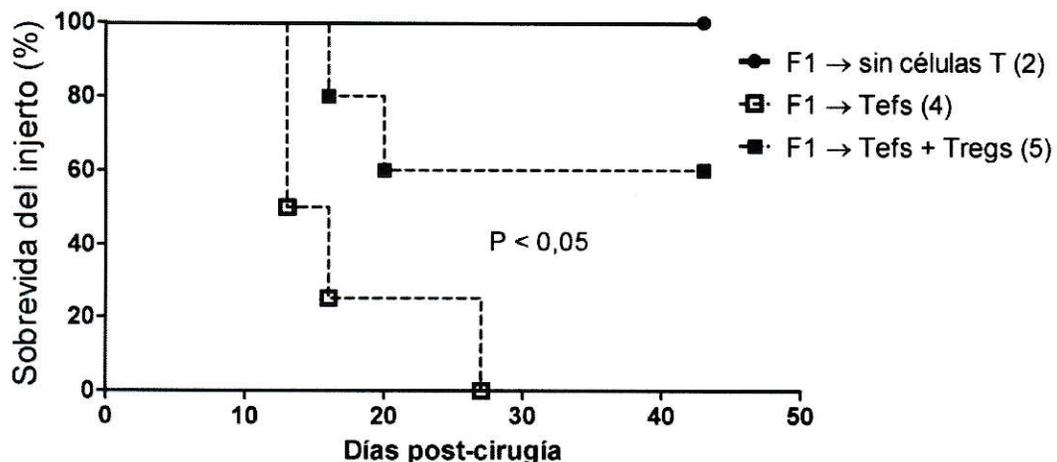


Figura 8. Células Treg Nrp1+ prolongan la sobrevida de alo-injerto. El gráfico muestra la sobrevida de los injertos de piel de ratones RAG^{-/-} trasplantados que no recibieron células (círculo lleno, línea continua), ratones que recibieron sólo células T CD4+ efectoras (cuadrado vacío, línea segmentada) ó células T CD4+ efectoras más Tregs (cuadrado lleno, línea segmentada). P = 0.0475 en F1→Tefs + Tregs (vs) F1→Tefs.

Posteriormente, se estudio el fenotipo de las células transferidas en los distintos grupos trasplantados al finalizar los 20 días post-trasplante. Para ello, se removieron los GLD de los ratones trasplantados, se prepararon suspensiones celulares y las células se marcaron para analizar los distintos subconjuntos de células T CD4+ residentes en los GLD. Al restringir el análisis en las células T CD4+Ly5.2-, las que corresponden a las células Tregs Ly5.1+, se encontró que su expresión de Nrp1 se mantiene alta, reduciéndose en promedio sólo un ~10% en los Tregs presentes tanto en las condiciones inflamatorias singénicas y alogénicas, en comparación con las células Tregs recién sorteadas (>99% Nrp1+, **Figura 9A**), sin presentarse diferencias significativas entre ambas condiciones (**Figura 9B**).

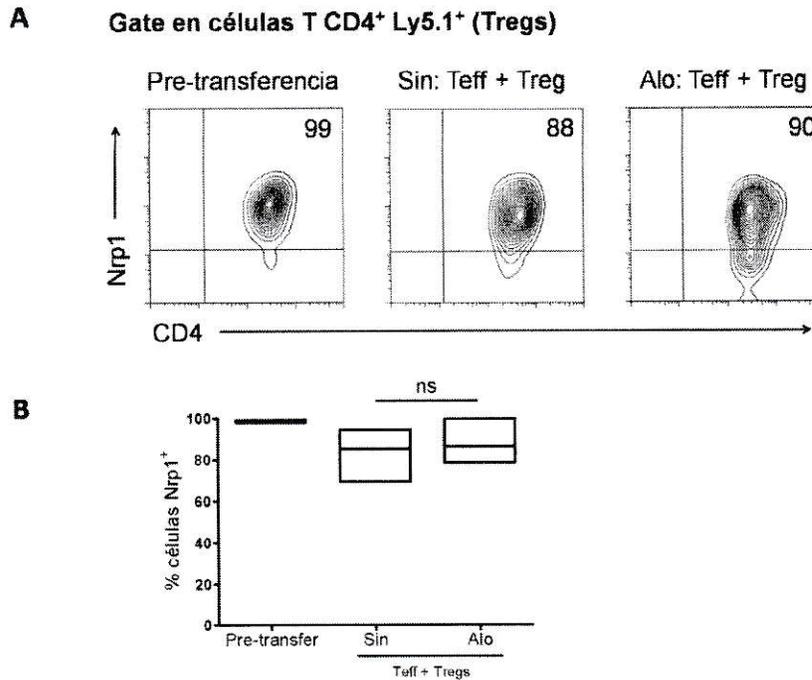


Figura 9. Tregs Nrp1⁺ Ly5.1⁺ mantienen altos niveles de Nrp1 durante inflamación gatillada por el reconocimiento de alo-antígenos. Tal como muestra la estrategia experimental de la Figura 7, se obtuvieron suspensiones celulares de los GLD de ratones RAG^{-/-} trasplantados que además recibieron células Tregs Ly5.1⁺ y células T efectoras Ly5.2⁺. Las células fueron teñidas para CD4, CD25, CD45.1 y Nrp1, y fueron analizadas mediante citometría de flujo. **(A)** Los gráficos de contorno muestran la expresión de Nrp1 de las células Tregs Ly5.1⁺ recién sorteadas y en las condiciones singénica y alógena. **(B)** Frecuencia (%) de células Tregs Ly5.1⁺ Nrp1⁺ en las condiciones anteriores. Las cajas verticales corresponden a valores máximo y mínimo, las líneas al promedio. La significancia estadística fue evaluada por un t-test de Student no-pareado (test de Mann-Whitney). ns, no significativo. n = 2 experimentos independientes.

Cuando analizamos el fenotipo de las células T CD4⁺ Ly5.2⁺ efectoras, que inicialmente se purificaron como células T CD4⁺Nrp1-Foxp3^{GFP-}, se observó que una considerable proporción de las células ganaron expresión de Nrp1. Interesantemente, en condiciones alógenas, el incremento en la expresión de Nrp1 por las células T CD4⁺Ly5.2⁺ efectoras fue significativamente mayor cuando fueron co-transferidas con células Tregs Nrp1⁺ (~65% de células T CD4⁺Ly5.2⁺Nrp1⁺), comparando su expresión cuando las células T efectoras fueron transferidas solas (~40% de células CD4⁺Ly5.2⁺Nrp1⁺), como se muestra en la **Figura 10**.

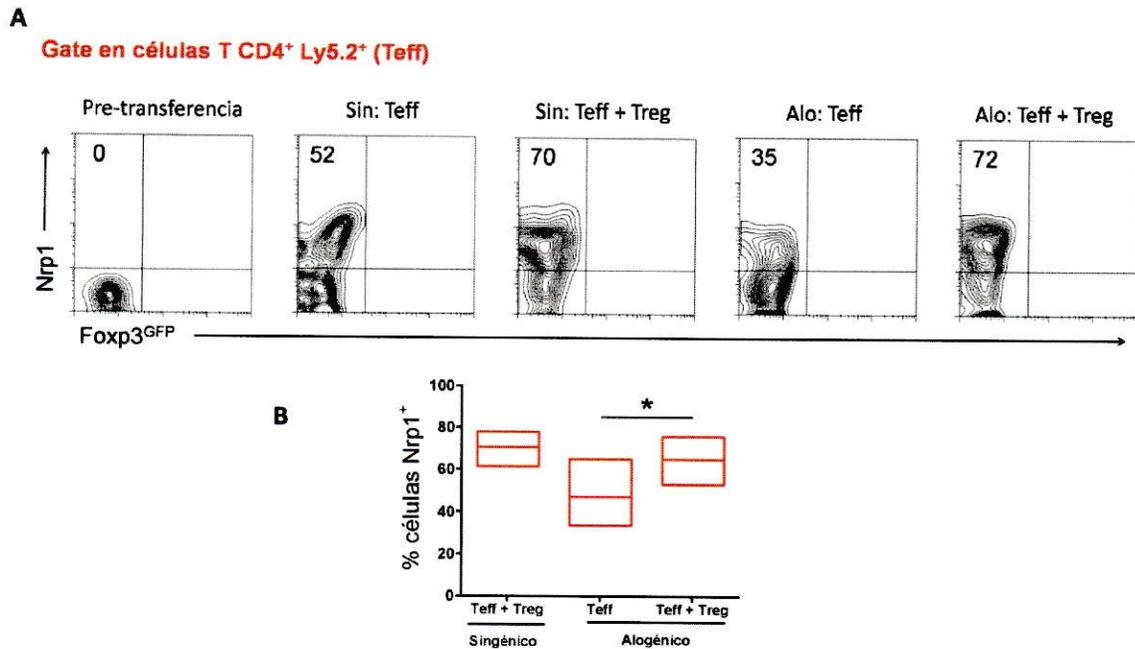


Figura 10. Células T CD4⁺ Nrp1⁻ efectoras ganan expresión de Nrp1, lo que es dependiente de la co-transferencia con células Tregs Nrp1⁺. Tal como muestra la estrategia experimental de la Figura 7, se obtuvieron suspensiones celulares de los GLD de ratones RAG^{-/-} trasplantados que además recibieron células Tregs Ly5.1⁺ y células T efectoras Ly5.2⁺. Las células fueron teñidas para CD4, CD45.1 y Nrp1, y fueron analizadas mediante citometría de flujo. **(A)** Los gráficos de contorno muestran la expresión de Nrp1 y Foxp3^{GFP} en las células T CD4⁺ Ly5.2⁺ efectoras en las condiciones mencionadas anteriormente. **(B)** El gráfico muestra la frecuencia (%) de células Nrp1⁺ en el subconjunto celular analizado. Las cajas verticales corresponden a valores máximo y mínimo y las líneas corresponden al promedio. La significancia estadística fue evaluada por un t-test de Student no-pareado (test de Mann-Whitney). * P < 0,05. n = 2 experimentos independientes.

Debido a que la co-transferencia de células Tregs Nrp1⁺ permite la aceptación del alo-injerto, uno podría inferir que estas Tregs Nrp1⁺ podrían inducir la expresión de Foxp3 en las células T efectoras (convirtiéndolas en células iTregs), fenómeno conocido como “tolerancia infecciosa” (Waldmann, et al., 2006). Al analizar la fracción de células T CD4⁺Ly5.2⁺, estas células T efectoras no ganaron ni incrementaron, de manera apreciable, su expresión de Foxp3, lo que sugiere que no se generaron células iTregs (**Figura Suplementaria 2**). Sin embargo, al analizar las mismas células T CD4⁺Ly5.2⁺ efectoras que ganaron Nrp1, se observó que ~50% incrementaron su expresión de Eos cuando se co-transferieron con células Tregs Nrp1⁺, versus ~25% de

las células T efectoras transferidas solas (**Figura 11**), confirmando los resultados obtenidos previamente utilizando ratones WT como recipientes de trasplantes.

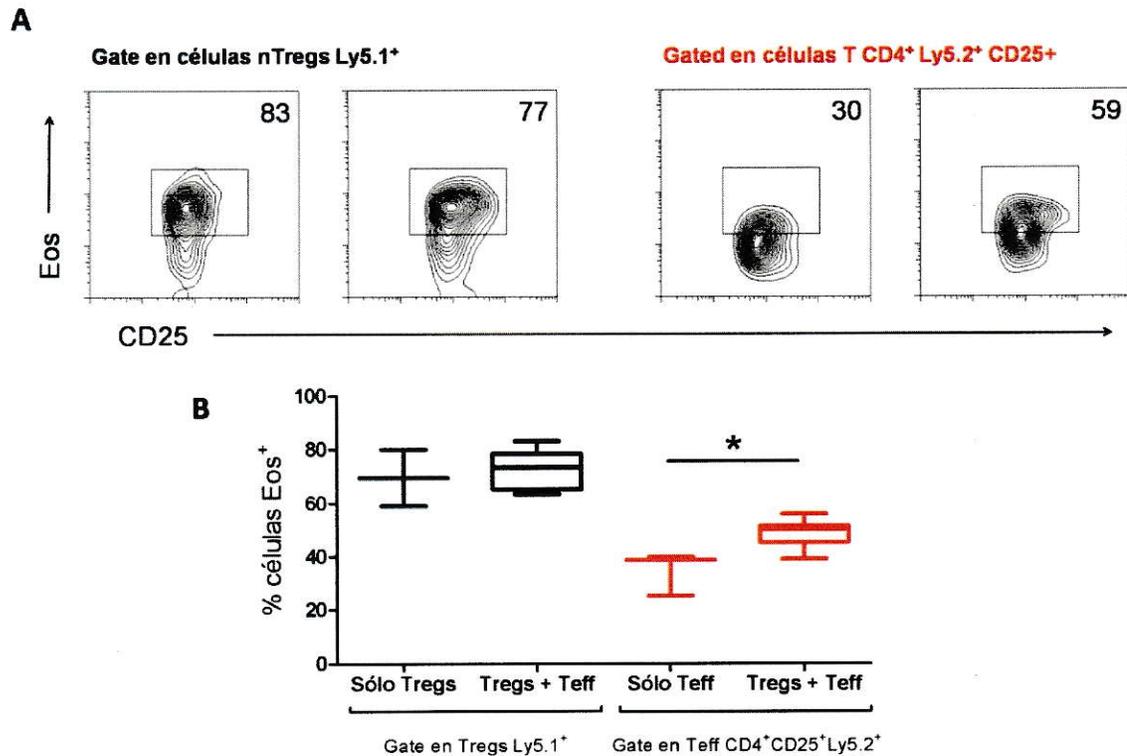


Figura 11. Células T CD4⁺ efectoras incrementan su ganancia de expresión de Eos al co-transferirse con células Tregs Nrp1⁺. La transferencia celular y los trasplantes de piel fueron realizados como se detalla en la Figura 7. **A.** Los gráficos de contorno muestran la expresión de Eos y CD25 en los Tregs Ly5.1⁺ cuando se transfieren solos o con células T CD4⁺ efectoras (Teff) en condiciones alogénicas. Similarmente, el mismo análisis es representado al hacer el gate esta vez en las células Teff CD4⁺CD25^{high}Ly5.2⁺ (2 gráficos en derecha). **B.** Gráfico mostrando la frecuencia (%) de células Eos⁺ en los Tregs Ly5.1⁺ o en las células T CD4⁺Ly5.2⁺ efectoras, cuando se transfieren solas o en conjunto en condiciones alogénicas. Las barras corresponden a desviación estándar (SD), y la significancia estadística fue evaluada por un t-test de Student. * P < 0,05. n = 2 experimentos independientes.

8. DISCUSION

La evidencia provenientes de modelos murinos y de estudios clínicos sugieren que la expresión de Nrp1 en las células T CD4+ podría jugar un rol importante en el contexto del rechazo a trasplante alogénico (Campos-Mora, et al., 2013). Se ha reportado que en ratones ectópicamente injertados con trasplantes alogénicos de corazón, la transferencia de células T CD4+Nrp1+ extienden la sobrevivencia del injerto, principalmente inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, enriqueciendo la población de células Tregs Foxp3+ endógena e induciendo la anergia de sus células T efectoras (Yuan, et al., 2013).

En este trabajo, se estudió la dinámica de la expresión de Nrp1 en las poblaciones de células T CD4+ durante el rechazo a injerto alogénico. Las observaciones realizadas indicaron que Nrp1 se expresa principalmente en células T CD4+ periféricas, y que su expresión está estrechamente relacionada con la subpoblación de células T CD4+CD25^{high}Foxp3+, lo que confirma trabajos anteriores que proponen a Nrp1 como un marcador de células nTregs (Bruder, et al., 2004).

Los datos obtenidos muestran claramente que existen diferencias en la expresión de Nrp1 en las células T CD4+ cuando se encuentran en un ambiente inflamatorio ligado al rechazo de trasplantes alogénicos, las que son notorias al comparar la expresión de esta molécula en condiciones de aceptación (singénicas) o normales (naïve sin trasplante). El aumento de expresión de Nrp1 en las células T CD4+ efectoras durante el rechazo, junto con una disminución de expresión esta molécula en las células Tregs se observaron utilizando tanto animales WT como RAG^{-/-}, siendo más evidentes en éstos últimos. Esto se debe probablemente a que en los

primeros, en el rechazo al alo-injerto participan todos los componentes del sistema inmune de un ratón WT, mientras que en los ratones RAG-deficientes el rechazo ocurre mediado sólo por células T CD4+Ly5.2+ efectoras transferidas (restringido a presentación antigénica por MHC-II), y en este sistema más “limpio”, gracias a los marcadores congénicos utilizados, fue posible examinar en mayor detalle los cambios celulares analizados.

De manera importante, durante los experimentos de trasplante *in vivo* se observó que las células Tregs disminuyen su expresión de Nrp1 sólo cuando se genera una respuesta inmune efectora contra el injerto allogénico (comparando la respuesta allogénica versus singénica), indicando que el componente inflamatorio compuesto, por ejemplo, por citoquinas como la IL-6 jugarían un papel importante en la biología de las células Tregs (Sharma, et al., 2013). De hecho, en modelos murinos ya se ha descrito que el bloqueo con anticuerpos anti-IL-6 reduce significativamente el daño patológico *in vivo* asociado al EICH, mediando el incremento de células Tregs Foxp3+ y la reducción pronunciada de células Th1 y Th17, aumentando la razón Tregs/Tefs (Chen, et al., 2009). Con respecto a este punto, datos preliminares en los que se analizó el contenido de IL-6 producida dentro del injerto de ratones RAG-/- trasplantados indican que los niveles de esta citoquina (que son altos en condiciones de rechazo mediado por células T CD4+ efectoras) disminuyen considerablemente cuando las células efectoras se co-transfieren con células Tregs Nrp1+ (datos no mostrados), lo que sugiere que existe un antagonismo entre los efectos pro-inflamatorios de IL-6 y el efecto inmunosupresor derivado de la actividad de las células Tregs durante el rechazo a alo-injerto, aunque es necesario una profundización posterior de estos análisis, que escapen a los objetivos de esta tesis.

Dado que la presencia de Nrp1 está asociada con la capacidad supresora de las células Tregs para realizar su función reguladora o inhibitoria (Bruder, et al., 2004), se podría presumir que la disminución de la expresión de Nrp1 en las células Tregs durante la respuesta alogénica es uno de los mecanismos por los cuales el rechazo toma lugar.

En estos mismos experimentos *in vivo*, la pérdida de Nrp1 en las células Tregs se encontró asociada a una reducción de expresión de Eos, un marcador molecular de estabilidad de células Tregs (Sharma, et al., 2013). Actualmente se acepta la idea de que las células T, incluidas las células Tregs, pueden ser re-programadas bajo condiciones supresivas o inflamatorias, perdiendo sus perfiles, fenotipos y funciones iniciales (Lindau, et al., 2013, Zhu and Paul, 2010). En el caso particular de las células Tregs, se ha reportado que pueden perder su expresión de Foxp3 en condiciones linfopénicas o en contextos autoinmunes (como diabetes o EAE), o que estas células pueden adquirir características de tipo célula *T-helper* mientras aún mantienen su expresión de Foxp3 (Sharma, et al., 2013) En concordancia con lo anterior, se ha propuesto que existe una heterogeneidad entre las células Foxp3+, en la que no todas las células Foxp3+ son células Tregs *bona-fide*, o en cierto sentido “auténticos” (Hori, 2010). Recientemente, se ha propuesto que la expresión estable de Eos define una subpoblación de células Tregs que se mantiene supresiva bajo condiciones inflamatorias, en comparación con células Tregs que pierden su expresión de Eos, quienes pierden su capacidad supresora y a pesar de mantener su expresión de Foxp3 incrementan su expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de activación (Sharma, et al., 2013). Por lo tanto, la pérdida de Eos junto con la de Nrp1 observada

en nuestros experimentos podrían contribuir en una deficiente funcionalidad de las células Tregs, lo que llevaría al rechazo al alo-trasplante.

Como se mencionó anteriormente, las células T CD4+Nrp1+ han mostrado permitir la tolerancia a trasplante alogénico (Yuan, et al., 2013). En el presente trabajo se recapituló esta observación en un modelo murino de trasplante de piel. Los resultados obtenidos confirman las propiedades reguladoras de las células T Nrp1+ dado que la transferencia de células T CD4+CD25^{high}Nrp1+ a ratones RAG-/- trasplantados se correlaciona con la aceptación de alo-injertos. Interesante es el hecho que la co-transferencia de células Tregs Nrp1+ con células T CD4+Nrp1- efectoras permite una mayor ganancia de Nrp1 y Eos por la contraparte efectora, lo que sugiere que las células Tregs Nrp1+ podrían estar permitiendo que cierta fracción de las células T efectoras adquiriera capacidad supresora, lo que mediaría además la aceptación de los alo-injertos observada en los experimentos *in vivo*, aunque esta suposición necesita ser abordada en detalle en investigaciones posteriores.

Durante la aproximación experimental abordada para estudiar la expresión de Nrp1 en las células Tregs durante el rechazo a alo-injertos, la bibliografía pertinente y los resultados obtenidos sugieren implícitamente que Nrp1 podría estar contribuyendo en la función supresora llevada a cabo por las células Tregs Nrp1+. Para comprobar esto, el siguiente paso lógico a seguir consiste en examinar el rol de esta molécula mediante estrategias que limiten o disminuyan la contribución funcional de Nrp1. Por lo tanto, se diseñó un modelo experimental utilizando anticuerpos bloqueantes anti-Nrp1 (utilizando el control de isotipo correspondiente), apuntando a estudiar el efecto del bloqueo de Nrp1 en los fenómenos descritos anteriormente en los resultados obtenidos. De manera contraria a lo esperado, la administración de anticuerpos

bloqueantes anti-Nrp1 no afectó de forma significativa la ganancia de expresión de Nrp1 y Eos en las células T CD4+ efectoras, ni alteró la aceptación de alo-injertos mediada por las células Tregs Nrp1+ (Campos-Mora, *et al.*, 2014; datos no publicados). Nrp1 es una proteína que se encuentra expresada tanto en membrana como en forma soluble, y que es requerida por las células Tregs para una normal actividad supresora (Campos-Mora, *et al.*, 2013). Tomando esto en cuenta, el bloqueo de Nrp1 (que podría alterar la actividad supresora de las células Tregs) se correlacionó con un mayor número de células T CD4+ efectoras, mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias producidas dentro del injerto, y mayores niveles de expresión de Eos en las células T CD4+ efectoras activadas (Campos-Mora, *et al.*, 2014; datos no publicados), lo que se correlaciona con resultados de otros grupos de investigación que describen un aumento en la expresión de Eos en células T CD4+ activadas *in vitro* (Rieder and Shevach, 2013). Sin embargo, se encontró que la estrategia utilizada no fue la óptima, considerando que la cantidad de anticuerpo inyectado pudo no ser suficiente para un bloqueo total efectivo de Nrp1 (tanto de membrana como soluble). Una alternativa mucho más eficiente corresponde al uso de ratones deficientes en Nrp1 (Nrp1-*knock-out* ó Nrp1-/-) condicionales para las células T CD4+ o para las células Tregs Foxp3+ los cuales, desafortunadamente, aun no se encuentran comercialmente disponibles. De todas formas, estos resultados preliminares no desacreditan los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, sino que más bien abren nuevas perspectivas relacionadas con la expresión y funcionalidad de Nrp1 y Eos que es necesario estudiar para una mejor comprensión de los mecanismos que involucran estas moléculas.

Utilizando el modelo de rechazo en los ratones C57Bl/6 trasplantados, los resultados indicaron una menor expresión de Nrp1 en las células nTregs de ratones en

proceso de rechazo a alo-injertos, en comparación con los trasplantes singénicos completamente aceptados. Asimismo, con el modelo de rechazo en los ratones RAG-/- trasplantados, se observó un considerable incremento en la expresión de Nrp1 de las células T CD4+ efectoras en las condiciones tolerogénicas de alo-injertos mediada por la co-transferencia de células nTregs Nrp1+, en comparación con los menores niveles de expresión de esta molécula en las células T efectoras en condiciones de rechazo de alo-injertos, cuando estas células se transfirieron solas. De cierto modo, estos resultados apoyan una posible relación positiva entre la expresión de Nrp1 en la subpoblación de células T CD4+ y un estado de tolerancia inmunológica que ha sido sugerida recientemente en repetidas ocasiones en modelos de trasplante alogénico (Yuan, et al., 2013), autoinmunidad (Solomon, et al., 2011, Delgoffe, et al., 2013) e incluso cáncer (Battaglia, et al., 2008, Hansen, et al., 2012), en los cuales la presencia o ausencia de expresión de Nrp1 se relaciona directamente con una menor o mayor reactividad respondedora, respectivamente. Esta similitud entre el comportamiento de la expresión de Nrp1 entre los estudios clínicos y los modelos murinos es bastante prometedora, debido al posible alcance y uso que puede darse a Nrp1 como un posible marcador de rechazo a trasplantes alogénicos. La expresión de Nrp1 en las células T ya se ha propuesto como un predictor putativo del rechazo a trasplante, dado que en un estudio clínico se observó una menor frecuencia de linfocitos Nrp1+ infiltrantes en biopsias de trasplantes de riñón de pacientes en proceso de rechazo agudo, en comparación con biopsias de trasplantes tolerizados (Zhou, et al., 2007). Basados en esto, los autores sugirieron que la reducción de células Tregs (células Nrp1+) en los trasplantes podía estar relacionada con el desarrollo del proceso de rechazo. Por lo tanto, los resultados de esta tesis van en concordancia con reportes anteriores.

Cabe recordar que, actualmente en el campo clínico de trasplantes, el diagnóstico de rechazo agudo y de daño crónico de trasplantes alogénicos requieren de biopsias para detectar cambios patológicos a etapas avanzadas y, usualmente, irreversibles del rechazo. (Schlickeiser and Sawitzki, 2012). La identificación de marcadores sensibles y específicos permitiría la detección temprana “a nivel molecular” de eventos patológicos. De esta manera, el rechazo y el daño crónico del alo-trasplante, así como la sobre-inmunosupresión podrían ser abordados adecuadamente mucho antes de que se ocurran sucesos perjudiciales al injerto (Olbricht, 2012). En este sentido, es posible sugerir que el análisis de expresión de Nrp1 en células T CD4+ de pacientes trasplantados y bajo tratamiento podría ser un buen indicador del “status inmunológico” ó “el status neto de inmunosupresión” del paciente con respecto al injerto alogénico: una disminución muy pronunciada con respecto a los niveles normales de expresión de Nrp1 podría indicar un incipiente proceso de rechazo y respuesta inmune contra el injerto, a lo que podría responderse adaptando y personalizando las terapias inmunosupresoras. Como consecuencia, se podría mejorar la sobrevida a largo plazo del trasplante, junto con la sobrevida del paciente.

En conjunto, estos resultados describen una dinámica de expresión de Nrp1 hasta ahora desconocida en las células T CD4+ durante rechazo a alo-injertos, y un nuevo posible mecanismo por el que células T CD4+ efectoras podrían mediar la aceptación de injertos alogénicos, donde la adquisición de expresión de Eos y Nrp1 podría jugar un rol relevante.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Durante el rechazo a trasplante alogénico, ocurre un incremento en la frecuencia de células T CD4+ que expresan Nrp1 mientras que, por el contrario, la expresión de Nrp1 y el factor de transcripción Eos disminuyen en las células Tregs de los ganglios drenantes del injerto.
- 9.2 Las células Tregs Nrp1+ son necesarias para la aceptación de trasplantes alogénicos, impidiendo el rechazo mediado por células T CD4+ efectoras alo-reativas.
- 9.3 Las células Tregs mantienen una alta expresión de Nrp1 durante la inflamación del rechazo, mientras que las células T efectoras son capaces de ganar expresión de Nrp1 y Eos. Esta ganancia de expresión se ve potenciada al ser co-transferidas con células Tregs Nrp1+.

10. REFERENCIAS

- Cahalan, M.D. 2011. Imaging transplant rejection: a new view. *Nat Med* 17, 662.
- Celli, S., Albert, M.L., Bousso, P. 2011. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med* 17, 744.
- Vokaer, B., Charbonnier, L.M., Lemaître, P.H., Spilleboudt, C., Le Moine, A. 2013. IL-17A and IL-2-expanded regulatory T cells cooperate to inhibit Th1-mediated rejection of MHC II disparate skin grafts. *PLoS One* 8, e76040.
- Csencsits, K., Wood, S.C., Lu, G., Magee, J.C., Eichwald, E.J., Chang, C.H., Bishop, D.K. 2005. Graft rejection mediated by CD4+ T cells via indirect recognition of alloantigen is associated with a dominant Th2 response. *Eur J Immunol* 35, 843.
- Booth, A.J., Grabauskienė, S., Wood, S.C., Lu, G., Burrell, B.E., Bishop, D.K. 2011. IL-6 promotes cardiac graft rejection mediated by CD4+ cells. *J Immunol* 187, 5764.
- Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., Liebhaver, S.A. 1972. Suppressor T cells. *J Immunol* 108, 586.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151.
- Thornton, A.M., Shevach, E.M. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287.
- Piccirillo, C.A., Shevach, E.M. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193, 1303.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., Enk, A.H. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193, 1285.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., Rudensky, A.Y. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329.
- Haribhai, D., Lin, W., Relland, L.M., Truong, N., Williams, C.B., Chatila, T.A. 2007. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* 178, 2961.
- Shevach, E.M. 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345.

- Josefowicz, S.Z., Rudensky, A. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30, 616.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A., Huehn, J. 2007. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5, e38.
- Polansky, J.K., Schreiber, L., Thelemann, C., Ludwig, L., Krüger, M., Baumgrass, R., Cording, S., Floess, S., Hamann, A., Huehn, J. 2010. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated *Foxp3* gene contributes to the stabilization of *Foxp3* expression in regulatory T cells. *J Mol Med (Berl)* 88, 1029.
- Lal, G., Zhang, N., van der Touw, W., Ding, Y., Ju, W., Bottinger, E.P., Reid, S.P., Levy, D.E., Bromberg, J.S. 2009. Epigenetic regulation of *Foxp3* expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol* 182, 259.
- Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J. 2009. Natural and adaptive *foxp3*⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30, 626.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., Powrie, F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces *Foxp3*⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757.
- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., Belkaid, Y. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of *Foxp3* T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775.
- Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., Lafaille, J.J. 2008. Adaptive *Foxp3*⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29, 114.
- Cobbold, S.P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., Waldmann, H. 2004. Induction of *foxP3*⁺ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 172, 6003.
- Lu, L., Zhou, X., Wang, J., Zheng, S.G., Horwitz, D.A. 2010. Characterization of protective human CD4⁺CD25⁺ FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF-β and retinoic acid. *PLoS One* 5, e15150.
- Horwitz, D.A., Zheng, S.G., Wang, J., Gray, J.D. 2008. Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of *Foxp3*⁺CD4⁺ Treg. *Eur J Immunol* 38, 912.
- Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., Noelle, R.J. 2007. 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.
- Papiernik, M., Banz, A. 2001. Natural regulatory CD4 T cells expressing CD25. *Microbes Infect* 3, 937.
- Scheffold, A., Murphy, K.M., Höfer, T. 2007. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat Immunol* 8, 1285.
- Almeida, A.R., Legrand, N., Papiernik, M., Freitas, A.A. 2002. Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J Immunol* 169, 4850.
- Schmetterer, K.G., Neunkirchner, A., Pickl, W.F. 2012. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J* 26, 2253.
- Read, S., Malmström, V., Powrie, F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295.

- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., Sakaguchi, S. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271.
- Read, S., Greenwald, R., Izcue, A., Robinson, N., Mandelbrot, D., Francisco, L., Sharpe, A.H., Powrie, F. 2006. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* 177, 4376.
- Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M., Wiltrot, R.H., Oppenheim, J.J. 2010. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol* 40, 1099.
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., Byrne, M.C. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., Sakaguchi, S. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135.
- Arch, R.H. 2005. Function of tumor necrosis factor receptor family members on regulatory T-cells. *Immunol Res* 32, 15.
- Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R., Sharpe, A.H. 2006. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 203, 2223.
- Raimondi, G., Shufesky, W.J., Tokita, D., Morelli, A.E., Thomson, A.W. 2006. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol* 176, 2808.
- Mandapathil, M., Lang, S., Gorelik, E., Whiteside, T.L. 2009. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* 346, 55.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B., Robson, S.C. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204, 1257.
- Alam, M.S., Kurtz, C.C., Rowlett, R.M., Reuter, B.K., Wiznerowicz, E., Das, S., Linden, J., Crowe, S.E., Ernst, P.B. 2009. CD73 is expressed by human regulatory T helper cells and suppresses proinflammatory cytokine production and *Helicobacter felis*-induced gastritis in mice. *J Infect Dis* 199, 494.
- Dwyer, K.M., Hanidziar, D., Putheti, P., Hill, P.A., Pommey, S., McRae, J.L., Winterhalter, A., Doherty, G., Deaglio, S., Koulmanda, M., Gao, W., Robson, S.C., Strom, T.B. 2010. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant* 10, 2410.
- Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, E.K., Gorelik, E., Whiteside, T.L. 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem* 285, 7176.

- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G. 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19, 355.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330.
- Walker, M.R., Kasprowicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., Ziegler, S.F. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112, 1437.
- Chen, X., Oppenheim, J.J. 2011. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 11, 1489.
- Getnet, D., Grosso, J.F., Goldberg, M.V., Harris, T.J., Yen, H.R., Bruno, T.C., Durham, N.M., Hipkiss, E.L., Pyle, K.J., Wada, S., Pan, F., Pardoll, D.M., Drake, C.G. 2010. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* 47, 1595.
- Lin, X., Chen, M., Liu, Y., Guo, Z., He, X., Brand, D., Zheng, S.G. 2013. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 116.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., Shevach, E.M. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 184, 3433.
- Kim, Y.C., Bhairavabhotla, R., Yoon, J., Golding, A., Thornton, A.M., Tran, D.Q., Shevach, E.M. 2012. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood* 119, 2810.
- Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., Hancock, W.W. 2011. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 6, e24226.
- Zabransky, D.J., Nirschl, C.J., Durham, N.M., Park, B.V., Ceccato, C.M., Bruno, T.C., Tam, A.J., Getnet, D., Drake, C.G. 2012. Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One* 7, e34547.
- Gottschalk, R.A., Corse, E., Allison, J.P. 2012. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 188, 976.
- Fujisawa, H. 2004. Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* 59, 24.
- Fujisawa, H., Kitsukawa, T., Kawakami, A., Takagi, S., Shimizu, M., Hirata, T. 1997. Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res* 290, 465.
- Parker, M.W., Guo, H.F., Li, X., Linkugel, A.D., Vander Kooi, C.W. 2012. Function of members of the neuropilin family as essential pleiotropic cell surface receptors. *Biochemistry* 51, 9437.
- Gu, C., Limberg, B.J., Whitaker, G.B., Perman, B., Leahy, D.J., Rosenbaum, J.S., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L. 2002. Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 277, 18069.
- Geretti, E., Shimizu, A., Klagsbrun, M. 2008. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* 11, 31.
- Roth, L., Nasarre, C., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Cremel, G., Hubert, P., Bagnard, D. 2008. Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol Biol Cell* 19, 646.

- Cai, H., Reed, R.R. 1999. Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci* 19, 6519.
- Wild, J.R., Staton, C.A., Chapple, K., Corfe, B.M. 2012. Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int J Exp Pathol* 93, 81.
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., Fujisawa, H. 1997. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995.
- Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., Ginty, D.D. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Fujisawa, H. 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895.
- Campos-Mora, M., Morales, R.A., Gajardo, T., Catalan, D., Pino-Lagos, K. 2013. Neuropilin-1 in Transplantation Tolerance. *Front Immunol* 4, 405.
- Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., Romeo, P.H. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3, 477.
- Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A.M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J., Hansen, W. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34, 623.
- Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., Betz, A.G. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28, 402.
- Battaglia, A., Buzzonetti, A., Monego, G., Peri, L., Ferrandina, G., Fanfani, F., Scambia, G., Fattorossi, A. 2008. Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunology* 123, 129.
- Solomon, B.D., Mueller, C., Chae, W.J., Alabanza, L.M., Bynoe, M.S. 2011. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2040.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., Ruminski, P., Weiss, D., Von Schack, D., Bluestone, J.A. 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 209, 1713.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M.O., Niec, R.E., Rudensky, A.Y., Dustin, M.L., Littman, D.R., Lafaille, J.J. 2012. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 209, 1723.
- Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636.
- da Silva Martins, M., Piccirillo, C.A. 2012. Functional stability of Foxp3+ regulatory T cells. *Trends Mol Med* 18, 454.

Schlickeiser, S., Sawitzki, B. 2012. Peripheral biomarkers for individualizing immunosuppression in transplantation--regulatory T cells. Clin Chim Acta 413, 1406.

11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

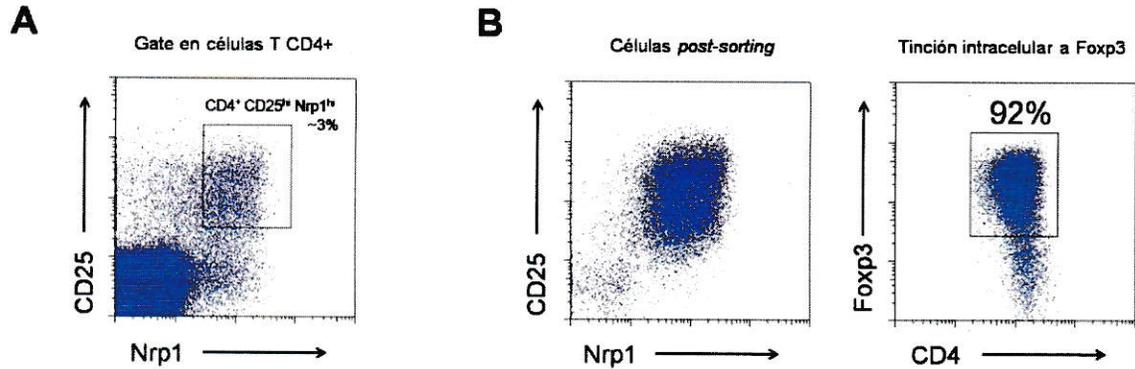


Figura Suplementaria 1 – Expresión de Foxp3 en células Treg Ly5.1⁺ post-sorting. Suspensiones celulares de ganglios linfáticos fueron obtenidas de ratones WT C57Bl/6 Ly5.1+ y las células T CD4+ fueron enriquecidas usando separación inmunomagnética. Luego las células fueron teñidas para los marcadores CD4, CD25 y Nrp1 previo al *sorting* de células Tregs CD4+CD25^{high}Nrp1^{high} con una pureza > 96%. **(A)** Se muestra la población de células Tregs CD4+ CD25^{high}Nrp1^{high} (correspondiente a ~3%) de la suspensión enriquecida de células Tregs CD4+. **(B)** Los gráficos de "dot-plot" muestran a las células Tregs CD4+ CD25^{high} Nrp1^{high} recién sorteadas. Estas células fueron fijadas y marcadas para verificar la expresión intracelular de Foxp3 en las células Tregs.

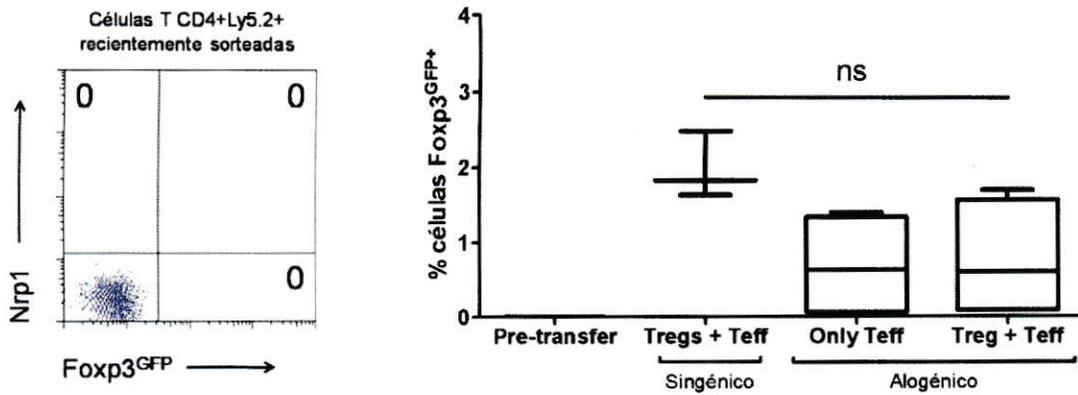


Figura Suplementaria 2 – Generación de células Tregs Fxp3^{GFP+} provenientes de células T CD4+ efectoras transferidas a ratones trasplantados. El procedimiento fue realizado como se describe en la Figura 6. A la izquierda, el gráfico de “dot-plot” muestra la expresión de los marcadores Nrp1 y Fxp3^{GFP} en las células T CD4+CD25-Nrp1-Fxp3^{GFP-} recién sorteadas, de manera previa a su transferencia a los ratones RAG^{-/-} trasplantados con injertos singénicos ó alogénicos. A la derecha el gráfico de barras muestra la frecuencia (%) de células Fxp3^{GFP+} presente entre las células T CD4+ Ly5.2+ efectoras residentes en los GLD de ratones trasplantados. Las barras corresponden a SD. ns, no significativo. n = 2 experimentos independientes.