

UCH-FC
Biotecnología
G 145
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



“Estudio de los efectos de la IL-33 sobre poblaciones celulares supresoras y patrón de citoquinas en un modelo murino de trasplante de piel”

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

Tania Fernanda Gajardo Carrasco

Director de Seminario de Título:

Dra. Karina Pino Lagos

Facultad de Medicina – Universidad de Chile

Facultad de Medicina – Universidad de los Andes

Director Patrocinante:

Dr. Marco Tulio Núñez González

Facultad de Ciencias – Universidad de Chile

Julio 2015

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Tania Fernanda Gajardo Carrasco**:

“Estudio de los efectos de la IL-33 sobre poblaciones celulares supresoras y patrón de citoquinas en un modelo murino de trasplante de piel”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Karina de las Mercedes Pino Lagos

Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Karina de las Mercedes Pino Lagos, sobre una línea horizontal.

Dr. Marco Tulio Núñez González

Patrocinante Seminario de Título

Una línea horizontal para la firma de Marco Tulio Núñez González.

Comisión de Evaluación

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Alejandro Roth Metcalfe, sobre una línea horizontal.

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Evaluador

Firma manuscrita en azul de Daniela Sauma Mahaluf, sobre una línea horizontal.

Santiago, Julio 2015.



*Para mis abuelos,
Eliana y Teodoro, Alicia y Ernesto;
Sé que esto los hace tan felices como a mí,
Gracias por estar siempre conmigo.*

BIOGRAFIA

Soy la hija mayor de una pareja de profesores de Temuco, quienes desde muy pequeña me enseñaron la importancia de la responsabilidad y que puedo hacer lo que desee siempre que sea constante y perseverante. Realicé mis estudios en dos colegios de la ciudad, donde además de aprender los contenidos básicos, pude conocer muchas otras cosas, como lo relajante de bailar y la emoción de ser parte de grandes montajes, el trabajo en equipo y lo bueno de poder compartir esas experiencias con amigos. Fue gracias a mis



maestros y al estimulante ambiente familiar que desde pequeña me interesaron las ciencias naturales, especialmente la biología y a principio de enseñanza media ya sabía hacia donde me dirigía. Fue en busca de lograr ese objetivo que al salir del colegio entre al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile con la única idea de entrar a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. Aunque los primeros años en Santiago fueron difíciles, siempre conté con el apoyo de mi familia y los amigos que conocí estando acá y que hasta el día de hoy son imprescindibles. A medida que avanzaba en la carrera me di cuenta que hacer ciencia no es fácil y sin embargo, la sensación de haber obtenido un buen resultado, vale todo lo que se pueda pasar en el proceso. Creo que en una sociedad como la actual, donde el conocimiento y la continua creación del saber son fundamentales, carreras como la nuestra tienen mucho que aportar, no solo desde el punto de vista del conocimiento sino que además tienen la posibilidad de mejorar la vida de las personas. Sé que en ese camino aún hay mucho por hacer y espero poder aportar a él.

AGRADECIMIENTOS

Para partir, quiero agradecer a mi tutora, Karina quien me recibió en su grupo cuando no sabía nada y me enseñó lo necesario para avanzar, por ser una profe preocupada y motivada que me proporciono las herramientas para valerme por mi misma durante el desarrollo de este trabajo.

Además quiero agradecer a quienes me facilitaron el manejo de los animales en experimentación. En la Universidad de Chile, al Dr. Arturo Ferreira por las instalaciones y a Ruth Mora por la asistencia técnica y todo lo que me enseñó a la hora de saber manejar apropiadamente a los animales. Y en la Universidad de los Andes, a Macarena Ocana y Claudia Rubí, por la ayuda proporcionada.

Quiero agradecerle al Grupo de *Inmunología del Trasplante*, especialmente a quienes formaban parte mientras realizaba este trabajo: Mauro, Pancho y Javier, muchas gracias por toda la ayuda, paciencia y todos los buenos momentos y risas que compartimos en el lab; a los miembros más nuevos: Claudia y Luz gracias por la buena onda y la ayuda con la última parte de este proceso; y a quienes pasaron por el grupo, que de alguna u otra forma me apoyaron, Rodrigo, Edgar y Dario.

A los integrantes del PDI en la Universidad de Chile, gracias por la buena onda y las risas en los pasillos, que siempre son bienvenidos, sobre todo a los miembros del IRT con quienes era más cercana. En especial quiero agradecerle a Verónica, por su buena disposición para ayudarme y enseñarme cosas nuevas, por su amistad, buena onda y las conversaciones eternas, sobretodo el último tiempo.

Quiero agradecer también a mis compañeros de U. A los bachis, por los buenos tiempos pasados durante los dos primeros años, de los que quedan muchos recuerdos. Y a los bachitec, con quienes pase la mayor parte del tiempo durante la carrera, Mención especial al *Helicóptero Tanguero*, gracias por todo lo aprendido con ustedes, los tangos, presentaciones y celebraciones, en especial a Paolo, Juan Carlos y mis amores, Pauly y Belén.

Desde que decidí venirme a Santiago, han sido muchos los que amablemente me han ayudado y a los que quiero agradecer por todo el apoyo y porque sin su presencia probablemente todo habría sido mucho más difícil: tío Jaime, Karla, (tía) Paqui, tía Eliana y tío Lucho, tía Valky, tía Ivonne, tía Paty y muchos otros que se quedan en el tintero.

Hubo un grupo grande de personas que deje atrás, en Temuco cuando decidí venirme, mis tías y primos, mis amigas y todos aquellos con los que compartí diariamente por tanto tiempo. Son personas que en su momento eche de menos por su cercanía y apoyo incondicional. Entre ellas mis amigas desde siempre, Kim, Pauly y Emilia, que han estado ahí a pesar de hablar poco y vernos menos, pero que están presentes cuando las he necesitado. Gracias por acompañarme en esto y por apoyarme a la distancia, las adoro.

A quienes fueron mi principal apoyo estos últimos años, estuvieron siempre conmigo y me acompañaron en todo momento, Jechu y Negro, gracias por la ayuda, las tardes perdiendo el tiempo y conversaciones eternas. Y también a Cristian, por su apoyo, cariño y por hacerme reír con sus tonteras cuando lo necesitaba.

Por supuesto, mis abuelos se merecen una mención especial, mi Nani, mi More y mi Tata, siempre estuvieron preocupados y atentos de como estaba, como me estaba yendo, si el lugar donde estaba viviendo era peligroso, si comía bien, entre muchas otras cosas, pero ver sus caras de felicidad cuando los iba a ver me daba ánimos para seguir adelante y lograr que estuvieran orgullosos de lo que iba alcanzando, por eso este trabajo es para ustedes.

Por último, pero no menos importante, quiero darle las gracias a mi familia, Pepo, Soraya y Enano, por acompañarme y apoyarme siempre en el sueño de venirme a estudiar a Santiago y todo lo que eso implicó. Muchas gracias por todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera estar acá, por los viajes de emergencia cuando me sentía mal, por las palabras de apoyo cuando todo estaba cuesta arriba y por entregarme todo lo necesario para yo poder llegar donde estoy ahora. Espero que esto los haga tan felices y orgullosos como a mí.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Trasplante, del Programa Disciplinario de Inmunología, parte del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y en las dependencias del Centro de Investigación Biomédica (CIB), Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes. El trabajo contó con el financiamiento de los proyectos CONICYT 791100001, FONDECYT 11121309 y PMI UAN1301.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
FINANCIAMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIACIONES	xi
1 RESUMEN.....	1
2 ABSTRACT	2
3 INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 Trasplante y rechazo.....	3
3.1.1 Vía Directa.....	4
3.1.2 Vía Indirecta	4
3.2 IL-33	5
3.3 Células Mieloides Supresoras	8
3.3.1 Arginasa.....	10
3.3.2 iNOS	10
3.3.3 Heme-oxygenasa 1	10
3.3.4 Producción de citoquinas anti-inflamatorias.....	11
3.3.5 Inducción de linfocitos Tregs.....	11
3.3.6 ADAM17.....	11
3.4 Linfocitos T reguladores (Tregs).....	13
3.4.1 T reguladores naturales	14
3.4.2 T reguladores inducidos.....	14
3.4.3 Citólisis.....	16
3.4.4 Disrupción metabólica.....	15
3.4.5 Secreción de citoquinas inhibitorias.....	16
3.4.6 Tolerancia infecciosa:	16
4 HIPÓTESIS	17

5	OBJETIVOS	17
5.1	Objetivo General.....	17
5.2	Objetivos Específicos.....	17
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1	Ratones.....	18
6.2	Medios de cultivo y reactivos	18
6.3	Obtención de suspensiones celulares	18
6.4	Citometría de flujo	19
6.5	Trasplante de piel y tratamiento	19
6.6	<i>Sorting</i> celular y experimentos de transferencia adoptiva	20
6.7	Experimentos de re-estimulación <i>ex vivo</i>	20
6.8	Test de ELISA.....	20
6.9	qRT-PCR	21
6.10	Análisis estadístico.....	21
7	RESULTADOS.....	22
7.1	Efecto de IL-33 en Células Mieloides Supresoras.	22
7.2	Impacto de IL-33 en la proliferación y diferenciación de Tregs <i>in vivo</i>	25
7.3	Patrón de secreción de citoquinas bajo tratamiento con IL-33	30
8	DISCUSION	32
9	CONCLUSIONES.....	37
10	REFERENCIAS	38
11	FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones IL-33	7
Figura 2. IL-33 favorece la acumulación de CMS	23
Figura 3. IL-33 aumenta la expresión relativa de Arg1 e iNOS	24
Figura 4. IL-33 expande la población de Tregs Foxp3+ en ratones con trasplante de piel	25
Figura 5. Efecto neto de la IL-33 en los injertos	27
Figura 6 Estrategia de <i>sorting</i> y diseño experimental del experimento de transferencia adoptiva	28
Figura 7. IL-33 promueve la inducción de Tregs Foxp3+ en la periferia	29
Figura 8. IL-33 modula las células T, inhibiendo la diferenciación Th1/Th17 y potenciando la producción de IL-10	31
Figura Suplementaria 1. Estrategia de gating usada para encontrar las CMS CD11b+ Gr1low	44
Figura Suplementaria 2. Expresión de ST2 en Tregs	45
Figura Suplementaria 3. Expresión de Foxp3 en células recién aisladas y sorteadas	45
Figura Suplementaria 4. IL-33 aumenta la frecuencia y número total de células CD4+ en GLd	45
Figura Suplementaria 5. Expresión de T-bet y ROR- γ t en GLd al día 10 post-trasplante	45

LISTA DE ABREVIACIONES

ADAM17	Dominio 17 de la metaloproteasa ADAM
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Aloficocianina
AR	Artritis reumatoide
ARG-1	Arginasa 1
CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CDK4	Quinasa dependiente de ciclina 4
CLI	Células linfoides innatas
CMA	Células mieloides supresoras
CO	Monóxido de carbono
CPA	Células presentadoras de antígeno
EAE	Encefalomiелitis aguda experimental
ELISA	<i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GLd	Ganglio linfático drenante
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
IL	Interleuquina
IFN- γ	Interferón- gamma
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
iTregs	Linfocitos T reguladores inducidos

JAK3	Quinasa Janus 3
MCH-II	<i>Major complex of histocompatibility II</i> (Complejo principal de histocompatibilidad II)
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
nTregs	Linfocitos T reguladores naturales
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinin-clorofila
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa, cuantitativa
ROR-gt	Factor de transcripción linfocitos Th17
ST2	Receptor IL-33
STAT4	Señal de Transducción y activador de transcripción 4
T-bet	Factor de Transcripción linfocitos Th1
TGF- β	Tumor growth factor-b
Th1	Linfocitos T colaboradores tipo 1
Th17	Linfocitos T colaboradores tipo 17
Th2	Linfocitos T colaboradores tipo 2
Tregs	Linfocitos T reguladores
WT	<i>Wild type</i> (tipo silvestre)

1 RESUMEN

Recientemente, la citoquina miembro de la familia de la IL-1, IL-33, ha sido ampliamente estudiada debido a su variedad de funciones relacionadas a la biología de las células T CD4+. En este trabajo, quisimos evaluar el efecto modulador de IL-33 en células supresoras en un modelo de trasplante *in vivo*. Primero, ratones CD57BL/6 *wild type (wt)* fueron trasplantados con injertos singénicos o alogénicos y tratados diariamente con IL-33 exógena. Luego de 10 días de tratamiento, las células presentes en los ganglios linfáticos drenantes del injerto (GLd) fueron analizadas. Se encontró un incremento en el número de células CD11b+Gr1^{low} en el grupo alogénico, las cuales además co-expresan MHC-II y se encuentran enriquecidas bajo el tratamiento con IL-33. Conjuntamente, la administración de IL-33 aumenta el número de células T reguladoras (Tregs) Foxp3+ en el grupo alogénico, lo cual se traduce a una mejor integridad de los injertos al día 10. Más aún, a través de la realización de un experimento de transferencia adoptiva pudimos demostrar que IL-33 promueve la expansión de células Tregs y la conversión de células T CD4+FoxP3- a células T CD4+FoxP3+ en la periferia. Por último, el patrón de citoquinas de células de GLd estimuladas *ex vivo* indica que el tratamiento con IL-33 disminuye la producción de IFN- γ e IL-17, y además estimula la producción de IL-10. Con esta información se corroboran estudios previos sobre la actividad inmuno-moduladora de IL-33, demostrando por primera vez que la IL-33 permite la conversión *in vivo* de linfocitos T hacia Tregs FoxP3+ y además favorece un estado anti-inflamatorio o tolerogénico a través del cambio del patrón de secreción de citoquinas. Por lo tanto, nuestros datos sugieren un potencial uso para la IL-33 en la prevención del rechazo a aloinjertos como una nueva herramienta terapéutica en el campo de la trasplantología.

2 ABSTRACT

Recently, the IL-1 family member IL-33 has been focus of study due to its variety of functions shaping CD4+ T cell biology. In the present work, we wanted to evaluate the modulatory effect of IL-33 on suppressor cells in an *in vivo* transplantation model. First, C57BL/6 wild type (wt) mice were grafted with syngeneic or allogeneic skin transplants and treated with exogenous IL-33 daily. After 10 days of treatment, we analyzed draining lymph nodes (dLNs) cellularity and found an increment in CD11b+Gr1^{low} cells in the allogeneic group, which co-express MHC-II, and it is enriched upon IL-33 treatment. In addition, IL-33 administration up-regulated the number of Foxp3+ Tregs in the allogeneic group, complementing the healthier integrity of the allografts. Furthermore, by performing an adoptive transfer experiment, we could demonstrate that IL-33 promotes CD4+ T cell expansion and conversion of CD4+Foxp3- T cells into CD4+Foxp3+ Tregs in the periphery. Lastly, the cytokine pattern of *ex vivo*-stimulated dLNs indicates that IL-33 dampens IFN- γ and IL-17 production, and stimulates the secretion of IL-10. Altogether, our work corroborates previous studies on the immune-modulatory activity of IL-33, demonstrating for the first time that IL-33 allows for *in vivo* Foxp3+ Tregs conversion and favors an anti-inflammatory or tolerogenic state by skewing cytokine production. Therefore, our data suggest a potential use of IL-33 to prevent allograft rejection bringing new therapeutics in the transplantation field.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Trasplante y rechazo

Una vez que un tejido u órgano resultan gravemente dañados, al punto de sufrir la pérdida de su función, la única opción para poder reinstaurar estas funciones perdidas, y por ende la homeostasis del organismo, es el trasplante de órganos. Sin embargo, hasta el día de hoy, el principal problema en esta área corresponde al rechazo del injerto. La trasplantología es el área de las ciencias biomédica que se encarga de estudiar estos procedimientos, así como también los inconvenientes posteriores, como lo es la respuesta inflamatoria iniciada contra el injerto. Estas reacciones no solo afectan al injerto en sí, sino que también al organismo en su totalidad, causando serios efectos secundarios como la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD, por sus siglas en inglés), infecciones y tumores (causadas por inmunosupresión), y patologías cardiovasculares (Chinen and Buckley, 2010), entre otras, lo que dificulta incluso más el deseado éxito del trasplante. Entender las bases de la respuesta inflamatoria durante el rechazo al trasplante es crucial en el diseño de terapias celulares con el fin de lograr la aceptación total del injerto.

La respuesta inmune que genera el rechazo del trasplante es altamente compleja e involucra tanto al receptor como al injerto mismo, además de una gran variedad de células, donde las principales son las células presentadoras de antígenos (CPA) y las células pertenecientes a la inmunidad adaptativa como los linfocitos T y B. Teniendo esto en cuenta, existen dos vías principales a través de las cuales se presenta el antígeno y se inicia el rechazo del trasplante, la vía directa y la indirecta (Abbas et al., 2012).

3.1.1 Vía Directa: En este proceso actúan las CPA presentes en el injerto, es decir del donante, las cuales salen del órgano trasplantado y migran hacia los ganglios linfáticos. Es aquí donde estas células se encuentran con los linfocitos T del receptor, que al reconocer como extraño las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), sufren un proceso de proliferación clonal y migran del ganglio en dirección al injerto, donde son capaces de reconocer antígenos foráneos y atacarlos. Esta vía se encuentra principalmente involucrada en el rechazo agudo y se extiende por un periodo breve, hasta que las CPA del donante se agoten (Ingulli, 2010; Kimber and Cumberbatch, 1992; Schuler and Steinman, 1985).

3.1.2 Vía Indirecta: En este caso, son las CPA del receptor las que producen la activación de los linfocitos. En estado de equilibrio estas células se encuentran rondando la periferia del organismo en busca de antígenos foráneos, los que son endocitados para luego ser procesados y presentados en sus MHC, lo que posteriormente activará a los linfocitos T en los ganglios linfáticos. En este caso, los antígenos del injerto pueden ser incorporados por las CPA del receptor desde la sangre o bien desde proteínas del mismo injerto, adquiridos, por ejemplo, al fagocitar células muertas (Ingulli, 2010).

Una vez las células T son activadas, por cualquiera de las dos vías, estas migran hacia el injerto, iniciando la respuesta inmune, produciendo lisis de las células del injerto (entre otros eventos), lo que termina en el rechazo de este. Estas respuestas en contra del trasplante pueden ser de tipo citotóxico, produciendo la lisis directa de las células, o bien puede ser mediante citoquinas, las que activan otras células o desencadenan vías de señalización en las células del injerto produciendo muerte celular.

En este contexto, dos citoquinas de gran importancia en este son el interferón-gamma (IFN- γ) y la interleuquina 17 (IL-17). Ambas han sido descritas como moléculas que median el rechazo al trasplante (Atalar et al., 2009). IFN- γ es producida principalmente por células de tipo T *helper* 1 (Th1) y se ha visto que es necesaria para el inicio del rechazo agudo ya que favorece la expresión de las moléculas de MHC en células del tejido del órgano trasplantado y del receptor (Halloran et al., 2001). Además, se ha observado que el IFN- γ es necesario para el rechazo de injerto de piel con MHC dispares (Ring et al., 1999). Por otro lado, IL-17, una citoquina con múltiples funciones proinflamatorias y secretada principalmente por células Th17, es capaz de promover el rechazo al aloinjerto a través del incremento en la inflamación temprana del injerto y el reclutamiento de poblaciones inflamatorias como neutrófilos y células Th1 patogénicas (Gorbacheva et al., 2010). Adicionalmente, se ha reportado una acción antagónica contra los linfocitos T reguladores (Tregs, de los que se hablará más adelante), donde la secreción de IL-17 bloquea la expansión de Tregs, acelerando el proceso de rechazo (Itoh et al., 2011).

El conocimiento a nivel molecular de lo que sucede durante el rechazo del trasplante es fundamental para poder encontrar una terapia efectiva que ayude a disminuir la tasa de rechazos, que en Chile asciende a aproximadamente un 50% a diez años post-trasplante en el caso de riñón, y donde es frecuente la necesidad de un segundo trasplante (www.sociedaddetrasplante.cl).

3.2 IL-33

En el último tiempo, varios artículos se han publicado sobre la IL-33. Descrita como miembro de la super-familia de la citoquina IL-1, la primera función que se le asoció fue la de *alarmina*. Esto, ya que se encuentra en grandes cantidades en las

células endoteliales y epiteliales; de manera que bajo daño celular es liberada al medio extracelular, activando células tanto de la inmunidad innata como adaptativa (Moussion et al., 2008). Ya que se ha reportado la presencia de IL-33 en el núcleo, distintas aproximaciones experimentales se han desarrollado para dilucidar su función a nivel de expresión génica. En base a esto, se encontró que IL-33 tiene la capacidad de unirse a la heterocromatina y también al factor de transcripción NF- κ B, actuando por lo tanto como un represor de la expresión de génica y de la actividad de NF- κ B (Carriere et al., 2007). Adicionalmente, se ha descrito que ejerce una labor beneficiosa en la cicatrización de heridas, ya que favorece la acumulación de colágeno, permitiendo la re-epitelización del tejido dañado (Yin et al., 2013).

Por otro lado, varios estudios han mostrado que IL-33 puede influir en la biología de los linfocitos T CD4+, obteniendo resultados muchas veces contradictorios. Originalmente IL-33 se describió como un promotor de la respuesta celular de tipo T *helper* 2 (Th2) (Rank et al., 2009; Schmitz et al., 2005) y su receptor de membrana (ST2) se encontró altamente expresado en células Th2 activadas, mastocitos (Xu et al., 2008) y células linfoides innatas (CLI) (Spits and Cupedo, 2012). Contrastando estas observaciones, se ha reportado que IL-33 también tendría un rol en la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 y Th17, lo que se observó en modelos animales de encefalomiелitis aguda experimental (EAE) (Jiang et al., 2012), artritis reumatoide (AR) (Leung et al., 2004; Xu et al., 2008), y de infección viral (Bonilla et al., 2012). Lo expuesto aquí clasifica a IL-33 como una *citoquina pleiotrópica* con un gran rango de funciones, las que son dependientes del modelo usado, la dosis y el momento del tratamiento.



Figura 1. Funciones de IL-33. Se muestran algunas de las áreas de estudio en donde la IL-33 ejerce alguna función: Alarmina, cicatrización de heridas, factor de transcripción, promotor Th2, potenciador Th1/Th17 e inductor de tolerancia, entre otras. (Modificado de Gajardo y cols. 2015)

Sin embargo, estudios recientes han propuesto que IL-33 puede también promover tolerancia a través de la expansión de células CD11c+CD11b+ (Células mieloides supresoras, CMS) y de linfocitos Tregs Foxp3+ (Brunner et al., 2011; Turnquist et al., 2011). Varios grupos han observado los efectos tolerogénicos del tratamiento con IL-33 en estudios *in vivo*, utilizando modelos animales de inflamación intestinal (Matta et al., 2014; Schiering et al., 2014) y trasplante (Brunner et al., 2011; Turnquist et al., 2011) en que, luego de la administración de IL-33, se encontró un aumento en el número de ambas poblaciones, pudiendo también observar sus efectos en la inducción de tolerancia.

Específicamente en el área de trasplante, los grupos de Brunner y Turnquist han mostrado que el tratamiento con IL-33 mejora la supervivencia del trasplante alogénico de corazón, respuestas que se encuentran ligadas a la expansión de CMS y Tregs. En un modelo de colitis experimental en ratones, se mostró que IL-33 reduce la inflamación intestinal de manera indirecta a través de la expansión de células dendríticas CD103+ productoras de ácido retinoico (Schiering et al., 2014).

La combinación de los efectos tolerogénicos de esta citoquina con su capacidad para mejorar la cicatrización de heridas, la hacen un blanco interesante para el estudio del rechazo al trasplante, donde se necesita que el organismo acepte de mejor forma el injerto, a la vez que cicatriza correctamente las heridas ocasionadas por la cirugía.

3.3 Células Mieloides Supresoras

Las células mieloides supresoras (CMS, de aquí en adelante), se definen como un grupo heterogéneo de células, con un origen y actividad biológica común. Como su nombre lo dice, estas células poseen un origen mieloides y tienen las características de encontrarse en un estado inmaduro y poseer una gran habilidad supresora sobre la respuesta de linfocitos T (Dilek et al., 2012a; Dilek et al., 2012b; Gábrilovich and Nagaraj, 2009; Youn and Gábrilovich, 2010). En general, las CMS no se encuentran en individuos sanos, sino que constituyen un estado *pasajero* de células mieloides inmaduras que surgen en la médula ósea y posteriormente se diferencian a granulocitos, monocitos o células dendríticas. Sin embargo, cuando existe alguna patología, se producen alteraciones en el proceso de diferenciación celular, impidiendo la maduración de las células, resultando en células en un estado inmaduro (o en la aparición de esta población supresora). Este proceso va de la mano con la adquisición de características propias de células supresoras, como lo son la expresión de arginasa-

1 (*ARG-1*), y la expresión de una versión inducible de la sintasa de óxido nítrico (*iNOS*) las que, entre otras funciones, ejercen supresión sobre los linfocitos T (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

Hasta la fecha, se ha detectado la presencia de CMS en diferentes patologías, sin embargo, se considera que estas aparecen principalmente durante el desarrollo de inflamación, gatillando su expansión y/o acumulación (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009). Por ejemplo, una vez que las CMS se acumulan, en algunos cánceres, éstas generarían un ambiente inmunosuprimido favoreciendo el crecimiento del tumor (Wesolowski et al., 2013). En condiciones de estrés traumático y trasplante se ha visto que las CMS son capaces de inhibir la respuesta efectora de linfocitos T (Brunner et al., 2011; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Turnquist et al., 2011). En el caso de sepsis se han observado dos fenómenos: una sepsis temprana en las que CMS tienen un efecto pro-inflamatorio, secretando mediadores inflamatorios; y una sepsis tardía en donde las CMS son capaces de disminuir la inflamación, secretando moléculas inmunosupresoras (Brudecki et al., 2012).

En ratón, las CMS se caracterizan por la expresión de las moléculas de superficie CD11b y Gr-1, encontrándose diferentes fenotipos que dependen del nivel de expresión de estas moléculas. Aquellas con un fenotipo CD11b^{high}Gr-1^{low} se definen como CMS-Monocíticas, mientras que las células CD11b^{low}Gr-1^{high} corresponden a CMS-Granulocíticas (Greifenberg et al., 2009).

De un tiempo a esta parte, el estudio de esta población celular ha cobrado gran relevancia, ya que se ha visto que juegan importantes roles en enfermedades como el cáncer. Dentro de las características más estudiadas están las relacionadas a su capacidad supresora y a cómo ejercen esta función sobre otros tipos celulares,

principalmente en linfocitos T efectores. Entre los mecanismos y/o moléculas más comúnmente descritas se encuentran:

3.3.1 Arginasa: Enzima encargada del catabolismo de la L-arginina. Al aumentar la expresión del gen *Arg1*, y por consecuencia la transcripción de la proteína, se produce la privación del aminoácido arginina en el medio donde se encuentran las células. Este efecto tiene por resultado la inhibición de la proliferación de linfocitos T, a través de la disminución de la expresión de la cadena CD3 ξ , la prevención de la expresión de la ciclina D3, y el bloqueo de la quinasa dependiente de ciclina CDK4 (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

3.3.2 iNOS: La enzima inducible óxido nítrico sintasa es otra molécula que juega un rol importante en cuanto a la capacidad supresora de las CMS. Esta enzima cataliza la síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina, lo que produce la inhibición de la expresión de los factores de transcripción JAK3 y STAT5, lo que a su vez evitaría la expresión de MHC-II, además de la inducción de apoptosis en linfocitos T (Bingisser et al., 1998).

3.3.3 Heme-oxygenasa 1 (HO-1): enzima que participa en la inhibición de la proliferación de linfocitos T a través de la producción de CO (Dilek et al., 2012a).

3.3.4 Producción de citoquinas anti-inflamatorias: Entre otras capacidades asociadas a las CMS está la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β . Estas citoquinas pueden actuar tanto en la inducción de otras poblaciones supresoras, así como también en la prevención de citotoxicidad por parte de linfocitos T (Dilek et al., 2012a; Terabe et al., 2003).

3.3.5 Inducción de linfocitos Tregs: Varios trabajos han descrito la inducción de linfocitos Tregs FoxP3+ por parte de CMS. El grupo de Huang, describió que las CMS promueven la inducción de linfocitos Tregs, lo cual es dependiente de la secreción de IL-10 y TGF- β (Huang et al., 2006). Por otra parte, el grupo de Serafini asoció la expansión de Tregs naturales a la actividad de la Arginasa de las CMS, sugiriendo que varios factores derivados de estas células podrían actuar sinérgicamente en la promoción de un estado tolerogénico (Serafini et al., 2008).

3.3.6 ADAM17: el dominio 17 de la metaloproteasa ADAM tiene la capacidad de clivar el ectodominio de la selectina-L (CD62L), lo cual impide que linfocitos T CD4+ y CD8+ puedan migrar hacia los ganglios linfáticos o sitios de inflamación donde deberían ser activados (Dilek et al., 2012a).

En el área de trasplante existe evidencia de que las CMS ejercen una actividad protectora sobre el sistema inmune del organismo receptor, permitiendo una mayor sobrevivencia del injerto. En el año 2008, Dugast y su grupo describieron que la tolerancia a trasplante renal en ratas es ejercida por CMS. La tolerancia al trasplante lograda en este trabajo se originó, en parte, al bloqueo de la co-estimulación en linfocitos T y a la

inducción de apoptosis de linfocitos T efectores, lo que es dependiente de la actividad de iNOS. Este último resultado quedó demostrado cuando, al inyectar animales tolerantes al injerto con un inhibidor de iNOS, se indujo el rechazo del trasplante (Dugast et al., 2008). Además de esto, experimentos de transferencia adoptiva de CMS diferenciadas *in vitro* a partir de células madres embrionarias, demostraron que este tipo celular juega un papel importante en la prevención de la enfermedad injerto contra huésped (o GvHD), a través de la secreción de IL-10, la actividad de iNOS y la inducción de linfocitos Tregs CD4+CD25+Foxp3+ (Zhou et al., 2010). Por otro lado, en un modelo de trasplante de piel se mostró que CMS CD11b+Gr-1+, desarrolladas *in vitro* y posteriormente transferidas al animal, permiten la inducción de Tregs que prolongan la supervivencia del injerto, demostrando que existiría una cooperación entre estos dos tipos celulares (Adeegbe et al., 2011). La interacción entre CMS y linfocitos T es un punto interesante ya que, por ejemplo, el grupo de Dugast demostró que la interacción entre CMS y linfocitos T efectores (CD4+ y CD8+) produce un aumento en la expresión de iNOS y en la activación de la función supresora de las CMS. Esto no se observó si los linfocitos T eran Tregs, ya que no se obtuvo mayor cambio en la expresión de iNOS en las CMS. Con esto se muestra que existe una actividad supresora selectiva hacia linfocitos T efectores, pero no hacia Tregs (Dugast et al., 2008). En trasplante de corazón se demostró que, poco después de efectuada la cirugía, células CD11b+Gr-1+ eran capaces de migrar al sitio del injerto, inducir la expansión de Tregs y prevenir el inicio de la respuesta inmune adaptativa contra el trasplante (García et al., 2010).

Esta evidencia demuestra cómo las CMS son capaces de actuar de forma supresora sobre los linfocitos T efectores, favoreciendo un estado de tolerancia frente a

antígenos extraños. Si bien esta capacidad no es la deseada en casos como el cáncer, puede ser bien utilizada en modelos de enfermedades donde la tolerancia es una característica deseada, como por ejemplo en la aceptación de trasplante o enfermedades autoinmunes.

3.4 Linfocitos T reguladores (Tregs)

Los linfocitos Tregs corresponden a un subtipo de linfocitos T CD4+, que se caracteriza por su capacidad para suprimir las respuestas inmunitarias y mantener la autotolerancia en el organismo. En el ratón, estas células se caracterizan por la expresión de la glucoproteína CD4, niveles altos de la cadena α del receptor de la IL-2 (o CD25) y por el factor de transcripción maestro *Forkhead Box P3 (Foxp3)* (Abbas et al., 2012).

Se ha observado que los Tregs Foxp3+ son de vital importancia en la mantención de la tolerancia a lo propio (por lo tanto, a un funcionamiento normal del organismo), ya que en casos de mutaciones de Foxp3 en humanos, o delección del factor de transcripción en ratones, se producen fallas autoinmunes de carácter sistémico, en las que se observa una respuesta exagerada por parte de los linfocitos T CD4+ efectores (Kobayashi et al., 2001).

Los Tregs se pueden dividir en dos grupos principales dependiendo de su origen: los generados en el Timo o naturales (nTregs) y los generados en la periferia o inducidos (iTregs).



3.4.1 T reguladores naturales (nTregs): Estos linfocitos se originan en la médula ósea para luego migrar al órgano linfóide primario Timo, donde maduran al igual que las otras poblaciones de linfocitos T CD4+. La diferenciación de los nTregs ocurre cuando algunos linfocitos T autorreactivos, en lugar de ser eliminados, sufren un cambio en sus capacidades funcionales y adquieren propiedades supresoras. Una vez en la periferia, mantienen en control las respuestas frente a antígenos propios. Son parte de lo que se conoce como *Tolerancia Central* (Abbas et al., 2012).

3.4.2 T reguladores inducidos (iTregs): A diferencia de los anteriores, estas células surgen a partir de linfocitos T CD4+ vírgenes en la periferia del organismo, donde adquieren los marcadores específicos como CD25 y Foxp3, así como también habilidades regulatorias. Su origen está enmarcado en la presentación antigénica por parte de las CPAs sin que exista una adecuada co-estimulación o señales de tipo altamente inflamatorias (Schmitt et al., 2013), lo que en su totalidad llevaría a la célula por la vía de diferenciación hacia Tregs (Yamazaki et al., 2013). Se ha demostrado que tanto IL-2 como TGF- β son citoquinas necesarias para este proceso (Chen et al., 2003; Zheng et al., 2007). Algunos trabajos han demostrado la generación de estas células en distintos órganos periféricos, por ejemplo, en los tejidos linfoides del intestino, donde se ha observado que la estimulación y presentación antigénica con células dendríticas en presencia de TGF- β y ácido retinoico induce la generación de Tregs Foxp3+ (Benson et al., 2007; Mucida et al., 2007; Vignali et al., 2008).

Los Tregs son capaces de emplear diversos mecanismos para ejercer su función tolerogénica, los que pueden ser contacto dependiente o independiente, produciendo distintos resultados en la célula efectora, incluyendo la apoptosis de las mismas, como también la inducción de estados no-respondedores (anergia), entre otros.

3.4.3 Disrupción metabólica: IL-2 es una citoquina que promueve la mantención y proliferación de diversos tipos celulares, entre ellos los linfocitos T. Se ha demostrado que Tregs que se encuentren en cercanías de células T efectoras pueden *sobreconsumir* IL-2, de forma que las células efectoras no tengan una señal de supervivencia y se induzca su apoptosis (Tran et al., 2009).

3.4.4 Tolerancia infecciosa: este concepto es usado para describir el proceso que ocurre cuando las capacidades tolerogénicas (supresión de células efectoras) son transferidas de una célula a otra. En este proceso ocurriría la conversión de células T Foxp3⁻ a Tregs Foxp3⁺ mediante el contacto de un Treg con un linfocito T efector. Se ha observado que este proceso es dependiente de la presencia de TGF- β unido a la membrana (Andersson et al., 2008; Shevach, 2009), además de ser un mecanismo necesario para la inducción de tolerancia a trasplante, como lo describiera Cobbold y colaboradores, utilizando un modelo de trasplante de piel (Cobbold et al., 2004).

3.4.5 Secreción de citoquinas inhibitorias: Las citoquinas característicamente secretadas por Tregs incluyen IL-10, IL-35 y TGF- β , las cuales se identifican por tener un carácter (principalmente) antiinflamatorio. Por ejemplo, se ha descrito que IL-10 es importante para la supresión de la inflamación en el intestino y también es necesaria para controlar la producción de IFN- γ por parte de las células T (Sojka and Fowell, 2011). También se ha demostrado que IL-35 tiene la capacidad de suprimir la proliferación de células T, así como sus funciones efectoras (Olson and McNeel, 2013), acción que no estaría limitada a linfocitos T CD4+, sino que también abarca linfocitos T CD8+ (Olson et al., 2012). Además, se ha demostrado que IL-35 evita la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia el fenotipo Th17 (Liu et al., 2012). Por otra parte, la citoquina TGF- β se puede encontrar unida a la membrana o soluble, y se ha visto que tanto en ratón como en humano estaría involucrada en el bloqueo de la proliferación de células T. Apoyando lo anterior, se ha reportado que animales deficientes en TGF- β muestran respuestas Th1 y Th2 aumentadas (Schmidt et al., 2012).

3.4.6 Citólisis: Diferentes estudios han mostrado que los Tregs tanto murinos como humanos son capaces de secretar moléculas como Granzymas y perforinas (Grossman et al., 2004), con las cuales se produce la lisis de las células T CD4+ a través de la activación de las caspasas. Este tipo de mecanismo es considerado importante para la mantención de la tolerancia (Gondek et al., 2008).

4 HIPÓTESIS

IL-33 induce poblaciones celulares supresoras y favorece el establecimiento de un microambiente tolerogénico en animales trasplantados.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de IL-33 en poblaciones supresoras involucradas en la aceptación de un trasplante.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1. Estudiar el efecto de IL-33 en la frecuencia, número y fenotipo de Células Mieloides Supresoras en animales trasplantados.

5.2.2. Analizar el efecto de IL-33 en la frecuencia, número, fenotipo y origen de los linfocitos T reguladores, además de evaluar la sobrevida del trasplante

5.2.3. Determinar el efecto de IL-33 en el microambiente de citoquinas característico de la respuesta de rechazo a trasplante.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ratones

Ratones de 6-8 semanas de edad, de las cepas C57BL/6 (WT), BALB/c y ratones reporteros FoxP3^{GFP} (background C57BL/6, con los marcadores congénicos CD45.1 (Ly5.2) o CD45.2 (Ly5.1) fueron usados en este estudio. 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^{bxd}) se generaron mediante la cruce de ratones C57BL/6 (H2^b) con ratones BALB/c (H2^d). Los animales se mantuvieron en el bioterio central bajo los protocolos aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

6.2 Medios de cultivo y reactivos

El medio de cultivo utilizado fue RPMI completo (RPMIc), el cual está compuesto por: RPMI-1640 (Gibco, BRL, EEUU), suplementado con 10mM de HEPES, 100 IU/mL de penicilina/estreptomicina, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB, Gibco, BRL, EEUU) y 50 μ M de 2- β -mercaptoetanol.

6.3 Obtención de suspensiones celulares

Usando instrumental quirúrgico apropiado, se extrajeron los ganglios linfáticos desde ratones C57BL/6 o Foxp3^{GFP} reporteros, los cuales fueron macerados y disgregados en *cell strainers* (BD biosciences, EEUU) con el fin de obtener suspensiones celulares.

6.4 Citometría de flujo

Los análisis por citometría de flujo fueron realizados marcando las células con los anticuerpos anti-ratón CD4 (clon RM4-5), CD25 (clon PC61.5), Gr1 (clon RB6-8C5), CD11c (clon N418), CD11b (clon m1/70), CD45.1/Ly5.2 (clon A20), T-bet (clon 4B10) todos obtenidos desde Biolegend (San Diego, CA, EEUU), anti- ROR- γ t (clon B2D) desde eBioscience (San Diego, CA, EEUU) y anti-ST2 (clon 245707), se obtuvo desde R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU). Los anticuerpos se encontraban conjugados con los fluorocromos FITC, PE, PerCP o APC. La adquisición de los datos se realizó en el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson, EEUU), usando el software CellQuest (BD Biosciences, EEUU). Finalmente, el análisis de los datos se realizó con el software FlowJo (TreeStar, Canton, OH, EEUU).

6.5 Trasplante de piel y tratamiento

Piel de cola (aproximadamente 1 cm²) de ratones donantes C57BL/6 (singénico) o F1 (allogénico) fue trasplantada en el área dorsal de ratones reporteros C57BL/6 FoxP3^{GFP}, los cuales se encontraban anestesiados con una solución de 27% ketamina (Ketamina) y 3% xilazina (Xylavet, ambos de Alfasan Lab, Woerden, Holanda) usando 100 μ L por 20 g de peso corporal mediante inyección intraperitoneal (día 0). La sobrevida de los injertos fue evaluada 3 veces a la semana y se consideraron rechazados cuando un 80% del injerto se encuentra necrosado o se ha eliminado. Al día 10 se colectaron los ganglios linfáticos drenantes del injerto (GLd) para preparar las suspensiones celulares a utilizar en citometría de flujo y otras técnicas descritas. Para medir la sobrevida del injerto, los ratones trasplantados fueron mantenidos por 30 días, examinándolos cada 2 días para comprobar el estado de los trasplantes. Los ratones



fueron tratados diariamente con 500 ng de IL-33 recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EEUU) o PBS como control, a través de inyecciones intraperitoneales diarias.

6.6 *Sorting* celular y experimentos de transferencia adoptiva

Células obtenidas de ganglios linfáticos axilares, braquiales e inguinales de un ratón C57BL/6 FoxP3^{GFP} CD45.2 (Ly5.1), fueron teñidas con anti-CD4 y anti-CD25 en PBS 1X + 5% FBS. Los linfocitos T CD4 efectores fueron "sorteados" basados en el criterio CD4+CD25-FoxP3^{GFP}-, con una pureza del ~98%, usando el *Cell sorter* BD FACSAria III (BD bioscience, Franklin lakes, NJ, EEUU). Posteriormente, ratones C57BL/6 Ly5.2+ recibieron 1×10^6 de estas células "sorteadas" mediante inyección intravenosa (día -1) para luego ser trasplantados al día siguiente.

6.7 Experimentos de re-estimulación *ex vivo*

Células de ganglios linfáticos periféricos de todos los animales trasplantados fueron obtenidas al día 10, las que fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 /mL en medio cRPMI y sembradas en placas de 24 pozos (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) en presencia de activación policlonal (5 µg/ml de anti-CD3, clon 2c11, Biolegend, EEUU) por 3 días. Al término del cultivo, los sobrenadantes fueron colectados y almacenados para posterior análisis.

6.8 Test de ELISA

Sobrenadantes fueron analizados mediante el ensayo de ELISA para la cuantificación de las citoquinas IFN- γ , IL-17, e IL-10. Para ello, utilizamos pares de anticuerpos puros y biotinilados para cada una de ellas (eBioscience, San Diego, CA, EEUU) y citoquinas recombinantes para la elaboración de las curvas estándar

(Biolegend, San Diego, CA, EEUU). La medición de la absorbancia se realizó a 450 nm en el equipo Sunrise Basic y el software Magellan (Tecan, Männedorf, Suiza).

6.9 qRT-PCR

Se extrajo RNA a partir de los GLd del injerto usando el kit E.Z.N.A. Total RNA kit y siguiendo las instrucciones del proveedor (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EEUU). El cDNA fue preparado usando el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). El nivel de expresión de los genes iNOS, Arg1 y GAPDH (gen *housekeeping*) fue medido usando el sistema Mx3000P qPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), utilizando el kit 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) como detector fluorescente. Los partidores para iNOS F:CCT TGG TGA AGG GAC TGA GC y R: CAA CGT TCT CCG TTC TCT TGC; Arg1 F: TTT TAG GGT TAC GGC CGG TG y R: CCT CGA GGC TGT CCT TTT GA; y GAPDH F: CCA GGT TGT CTC CTG CGA CTT y R: CCT GTT GCT GTA GCC GTA TTC A fueron obtenidos desde IDT DNA (Coralville, Iowa, EEUU). El análisis fue realizado utilizando el método del *Delta CT-Delta CT*.

6.10 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 Efecto de IL-33 sobre Células Mieloides Supresoras.

Hasta la fecha, varios trabajos han relacionado la actividad de la IL-33 sobre poblaciones de leucocitos, entre las que se encuentran los Tregs y las CMS. Para analizar el efecto de IL-33 sobre estas poblaciones durante la respuesta inflamatoria gatillada durante el rechazo a alotrasplante, se utilizó el modelo de trasplante semi-alogénico de piel ya estandarizado en nuestro laboratorio. Este modelo permite el estudio de los mecanismos y dinámica celular durante el rechazo a aloinjerto y, en este caso, analizar el efecto que posee la IL-33 durante el rechazo a trasplante de piel. Para ello, ratones de la cepa C57BL/6 fueron trasplantados con injertos de piel singenicos o alogenicos y tratados diariamente con una dosis de IL-33 recombinante via inyeccion intraperitoneal, **Figura 2A**.

Al día 10 post-trasplante, cuando los signos de rechazo son evidentes, las células provenientes de los GLd fueron analizadas por citometría de flujo. En aquellos ratones con trasplante alogénico, que se encontraban bajo tratamiento con IL-33, se observó una acumulación de CMS (**Figura 2B**) caracterizadas por la expresión de CD11b+Gr-1^{low} (**Figura Suplementaria 1**), a diferencia de las muestras del grupo alogénico que no recibían tratamiento. Sin embargo, la expresión del receptor de la IL-33, ST2, no cambia bajo ninguna condición, manteniendo un nivel de expresión esencialmente estable, **Figura 2C**. De igual manera, la expresión de MHC-II se mantiene en los distintos grupos, con un nivel alto de CMS MHC-II+ (~97%), **Figura 2D**, sugiriendo que estas células pueden desempeñar una función como CPA, y afectar, por ejemplo, la biología de otros tipos celulares como células T CD4+ y/o

CD8+, lo que estaría en concordancia con reportes que indican que las CMS son capaces de inhibir la respuesta por parte de linfocitos T, acción que es dependiente de una alta expresión de MHC-II (Nagaraj et al., 2012).

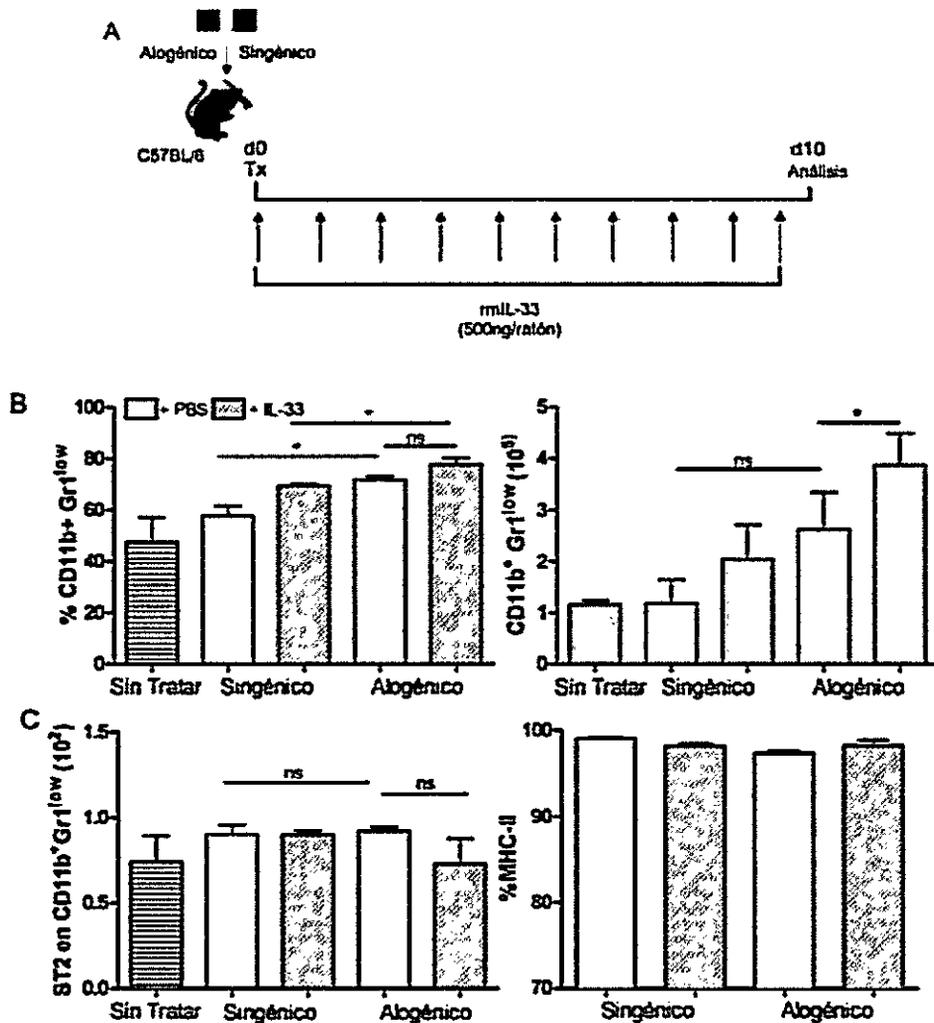


Figura 2. IL-33 favorece la acumulación de CMS en ganglios drenantes de aloinjerto. (A) La figura muestra el modelo de trasplante de piel, donde ratones C57BL/6 reciben injertos provenientes de ratones C57BL/6 (singénico) o F1 (C57BL/6 x BALB/c) alogénico, al día 0. Durante 10 días los ratones reciben tratamientos de 500 ng/ratón de IL-33, luego de los cuales son eutanasiados y sus células analizadas. (B) Se muestra el porcentaje (izquierda) y número (derecha) de células CD11b+Gr1^{low} presentes en GLd. (C) Frecuencia de células CD11b+Gr1^{low} que expresan el receptor de IL-33, ST2. (D) Porcentaje de células CD11b+Gr1^{low} expresando MHC-II. Las barras corresponden a la desviación estándar (DS), y la significancia estadística fue calculada por el análisis Mann-Whitney, ns: no significativa, * = 0,05. n=2 experimentos independientes, con 2 a 4 ratones por grupo en cada experimento

Como se mencionó antes, las CMS se caracterizan por la expresión de distintas moléculas de superficie, así como también de la expresión de genes involucrados en su capacidad de suprimir la respuesta inmune mediada por células T. Entre estos se encuentran los genes de las enzimas Arginasa (*Arg1*) y de la Óxido Nítrico sintasa inducible (*iNOS*). Con el fin de saber si la IL-33 es capaz de modular la expresión relativa de estos genes en los GLd, y por lo tanto inducir una actividad supresora en las células que lo expresan, se realizó un análisis por *qRT-PCR*, utilizando el gen de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como *housekeeping*. Para esto se tomaron muestras de células de GLd de ratones con trasplante alogénico, con y sin tratamiento de IL-33. En la **Figura 3**, se observa que tanto la expresión de *Arg1* e *iNOS* se encuentra aumentada al doble en aquellas muestras provenientes de ratones tratados con IL-33.

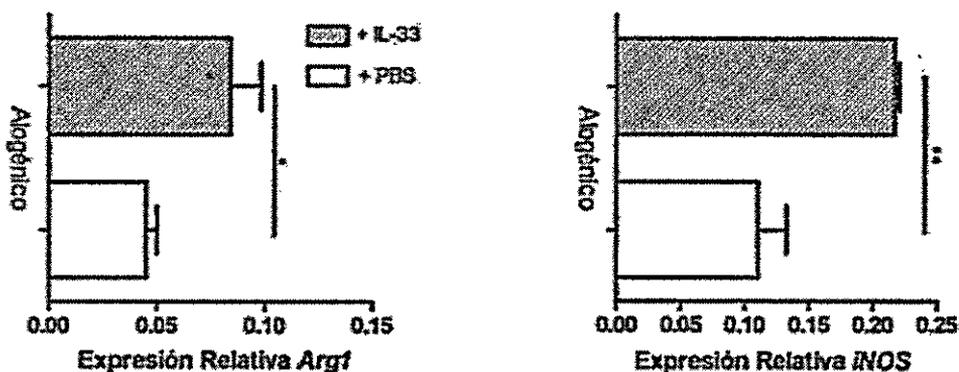


Figura 3. IL-33 aumenta la expresión relativa de *Arg1* e *iNOS*. La figura muestra la expresión relativa de Arginasa 1 e *iNOS*, en GLd de ratones con trasplante alogénico, que recibieron o no tratamiento con IL-33. Las barras corresponden a la desviación estándar (DS), y la significancia estadística fue calculada por el análisis Mann-Whitney, * = 0,05 y **p=0,01. n=1 experimentos independientes, 4 ratones por grupo.

7.2 Impacto de IL-33 en la proliferación y diferenciación de linfocitos Tregs *in vivo*

Como ya se ha mencionado, uno de los blancos de la IL-33 son los Tregs (**Figura Suplementaria 2**). En modelo de trasplante de corazón, se ha observado un importante aumento en el número de células Tregs bajo el tratamiento con esta citoquina (Brunner et al., 2011; Turnquist et al., 2011), lo cual se ha relacionado con un impacto positivo en el estado y sobrevida del trasplante. Es por esto que nuestro análisis también incluyó a estas células.

Con el fin de facilitar la observación de los Tregs se utilizó un ratón transgénico el cual expresa el factor de transcripción característico de Tregs, Foxp3, fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP), permitiendo su identificación a través de citometría de flujo.

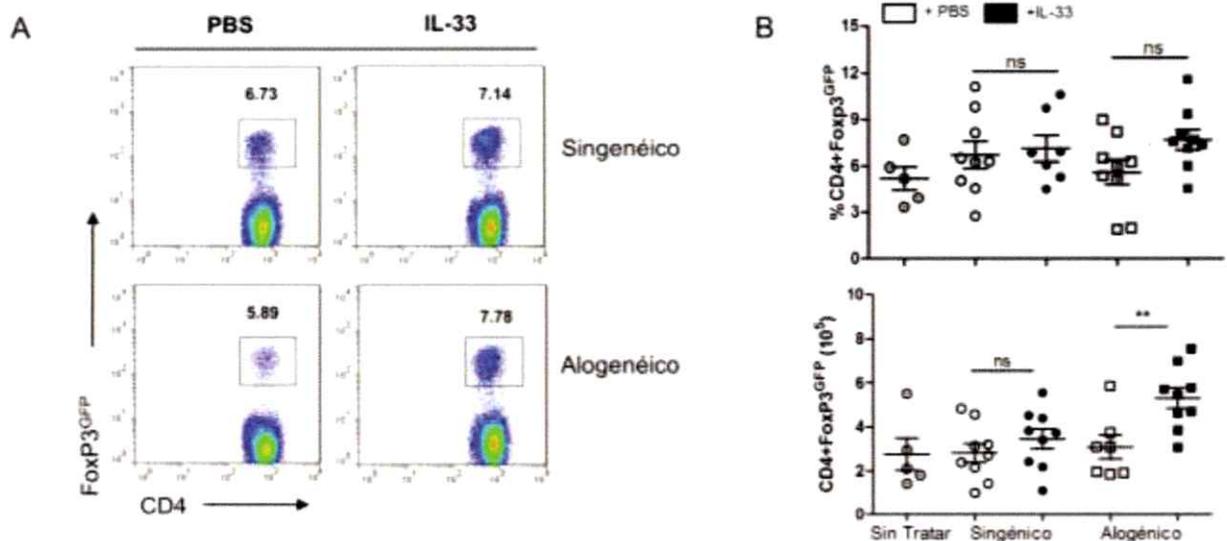
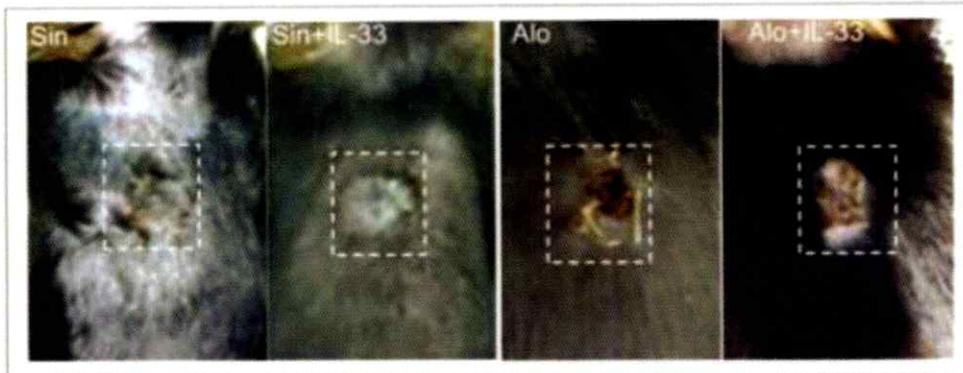


Figura 4. IL-33 expande la población de Tregs Foxp3⁺ en ratones con trasplante de piel. La figura muestra el efecto de la IL-33 en los Tregs. **(A)** Gráficos de puntos característicos, que representan la frecuencia de Tregs CD4⁺Foxp3^{GFP+} presentes en GLd de los animales experimentales. **(B)** Gráficos compilados de la frecuencia (arriba) y número (abajo) de Tregs CD4⁺Foxp3^{GFP+}. Las barras corresponden a la desviación estándar (DS), y la significancia estadística fue calculada por el análisis Mann-Whitney, ns: no significativa, **p=0,01. n=3 experimentos independientes, con 2 a 3 ratones por grupo en cada experimento.

En la figuras **4A y B** se observa el aumento en el número de Tregs CD4+ Foxp3^{GFP+} en aquellos animales con trasplante alogénicos y tratados con IL-33, respecto a su control con PBS. Esta observación se correlaciona con lo observado físicamente en los ratones, donde al día 10 post-trasplante se encuentra que la integridad de aquellos injertos de animales tratados con IL-33 (en cualquiera de las dos condiciones, aceptación o rechazo), presentaban un mejor estado que su contraparte tratada con el vehículo, **Figura 5A**.

Además, se realizó un experimento de sobrevida, en el cual se mantuvieron los animales trasplantados bajo tratamiento (PBS o IL-33) durante 30 días, observando que ambas condiciones de animales con trasplante singénico (PBS o IL-33) presentan una sobrevida del 100%, mientras que todos los ratones con trasplante alogénico y tratados con PBS han rechazado el trasplante al día 12. Finalmente, encontramos que aquellos ratones trasplantados con injertos alogénicos, y tratados con IL-33, lograron una tasa de sobrevida del trasplante de un 80% (día 30), **Figura 5B**. Esto indica que el tratamiento con la citoquina efectivamente favorece la aceptación del trasplante lo que estaría asociado a la generación de tolerancia inmunológica.

A



B

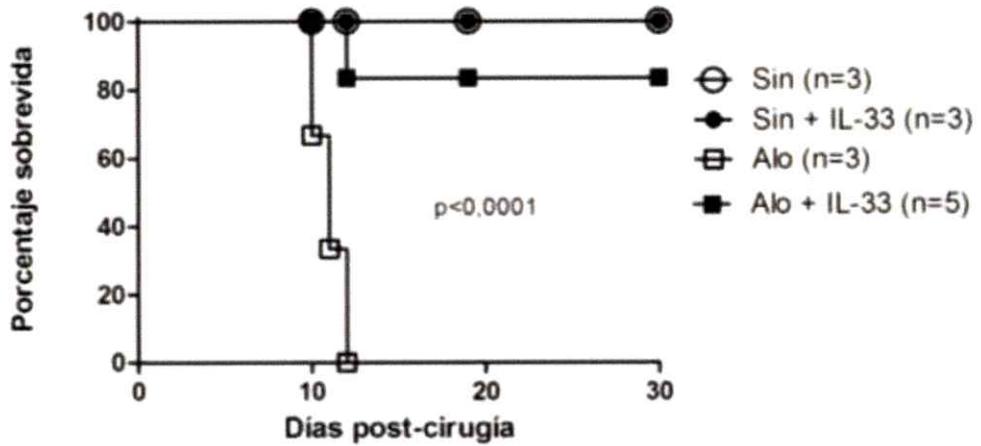


Figura 5. Efecto neto de la IL-33 en los injertos. (A) Fotografías mostrando la integridad de los injertos de piel en todos los grupos experimentales al día 10. (B) Gráfico que representa la supervivencia de los injertos, medido por 30 días. La significancia estadística fue calculada por el análisis Mantel-Cox, $***p=0,0001$. $n=1$ experimento independientes, con 3 a 5 ratones por grupo.

Ya que los Tregs evaluados en los ganglios pueden corresponder a la población originada en el timo (nTreg) o a aquellos diferenciados en la periferia (iTreg), diseñamos un experimento de transferencia adoptiva para identificar cuál de estas poblaciones de Treg es afectada positivamente por el tratamiento con IL-33. O en otras palabras, ¿permite IL-33 la expansión de nTregs o es capaz de generar iTregs?

Para esto se recurrió a la técnica de *sorting* celular, a través de la cual se separaron o aislaron las células CD4+CD25-Foxp3^{GFP-} (Figura Suplementaria 3), las que fueron transferidas a través de una inyección intravenosa (en la cola) a ratones de genotipo Ly5.2+. Ya que las células transferidas carecían de este marcador (Ly5.2- o Ly5.1+), pudimos diferenciar las células endógenas de las exógenas (Figura 6). Al siguiente día, o día 0, se realizaron los injertos de piel, y luego de 10 días se analizó el fenotipo y número de Tregs.

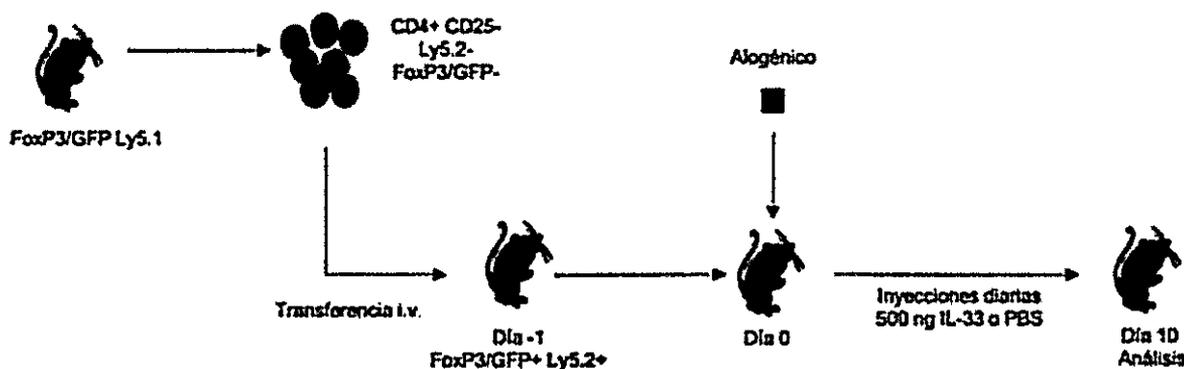


Figura 6 Estrategia de *sorting* y diseño del experimento de transferencia adoptiva. Células CD4+Ly5.2-CD25-Foxp3^{GFP-} fueron sorteadas desde ratones C57BL/6 reporteros para Foxp3. Luego fueron inyectadas vía intravenosa en ratones C57BL/6 Foxp3^{GFP+}Ly5.2+ al día -1. Al día 0 estos ratones recibieron trasplante alógeno e inyecciones diarias de IL-33 o PBS. Al día 10 los ratones fueron eutanasiados y células de GLd analizadas.

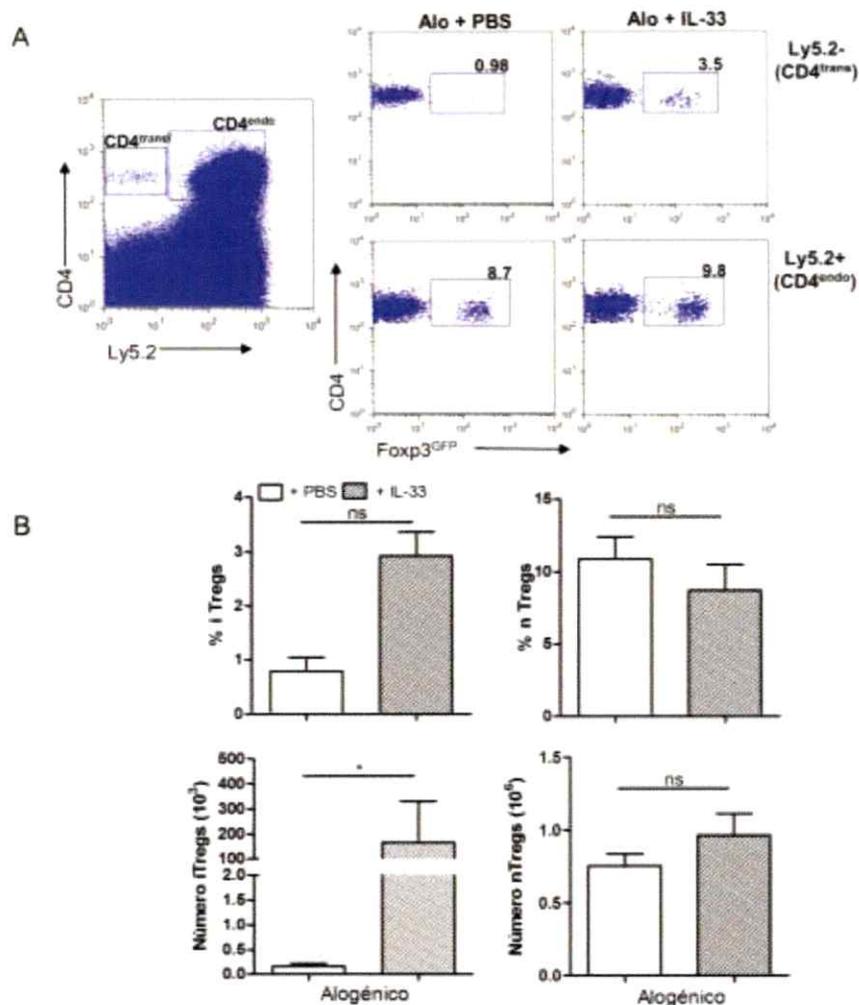


Figura 7. IL-33 promueve la inducción de Tregs Foxp3⁺ en la periferia. (A) Gráficos de puntos característicos que representan la frecuencia de células T CD4⁺ endógenas (abajo) y exógenas o transferidas (arriba), además de la frecuencia de nTregs (abajo) e iTregs (arriba). (B) Gráficos compilados de la frecuencia (arriba) y número (abajo) de Tregs Foxp3^{GFP+} inducidos (izquierda) y nTregs (derecha). Las barras corresponden a la desviación estándar (DS), y la significancia estadística fue calculada por el análisis Mann-Whitney, ns: no significativa, * = 0,05. n=1 experimentos independientes, con 4 ratones por grupo.

Al igual que en los experimentos anteriores, se estudiaron las células de los GLd a través de citometría de flujo y se encontró que tanto las células T CD4⁺ transferidas como las endógenas aumentaron su número en respuesta al tratamiento con la IL-33 (**Suplementaria 4**). Interesantemente, aquellos animales tratados con esta citoquina presentaron además una conversión de células T CD4⁺ Foxp3^{GFP-} a Foxp3^{GFP+},

mientras que las células T CD4+ endógenas no presentaron mayor variación en la expresión de este marcador, **Figura 7**. Al igual que con la frecuencia, el número de nTregs no presenta una variación significativa.

7.3 Patrón de secreción de citoquinas bajo tratamiento con IL-33

Finalmente, y para entender otro posible mecanismo a través del cual la IL-33 ejerce su capacidad protectora sobre el organismo, se analizó el patrón de citoquinas secretado por las células de los GLd. Para esto, las células provenientes de GLd fueron contadas, sembradas a 1 millón/mL y re-estimuladas *ex vivo* con α -CD3 por 72 horas, luego de las cuales los sobrenadantes fueron rescatados y analizados con el test de ELISA.

Las citoquinas estudiadas corresponden a aquellas que han sido descritas como efectoras en el rechazo a trasplante, IFN- γ e IL-17, y además se estudió la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10.

Los resultados muestran que, efectivamente, durante el rechazo a trasplante se genera la producción de IFN- γ e IL-17. Sin embargo, en aquellos animales portadores de aloinjerto y además tratados con la IL-33, la producción de IFN- γ e IL-17 disminuyó considerablemente, **Figura 8A**. Por último, esta reducción en la producción de estas citoquinas inflamatorias se correlacionó con un aumento en la secreción de IL-10, citoquina de carácter anti-inflamatorio que, junto a la presencia y/o función de CMS y de Tregs, podría estar favoreciendo un microambiente regulador beneficioso para la aceptación del aloinjerto. Además, estos resultados se encuentran relacionados con el cambio en los niveles de expresión de los factores de transcripción T-bet y ROR- γ t en células de GLd de animales trasplantados y tratados, donde la expresión de ambos

tienden a disminuir bajo la influencia de IL-33, tanto en condiciones singénicas como alogénicas, **Figura suplementaria 5**.

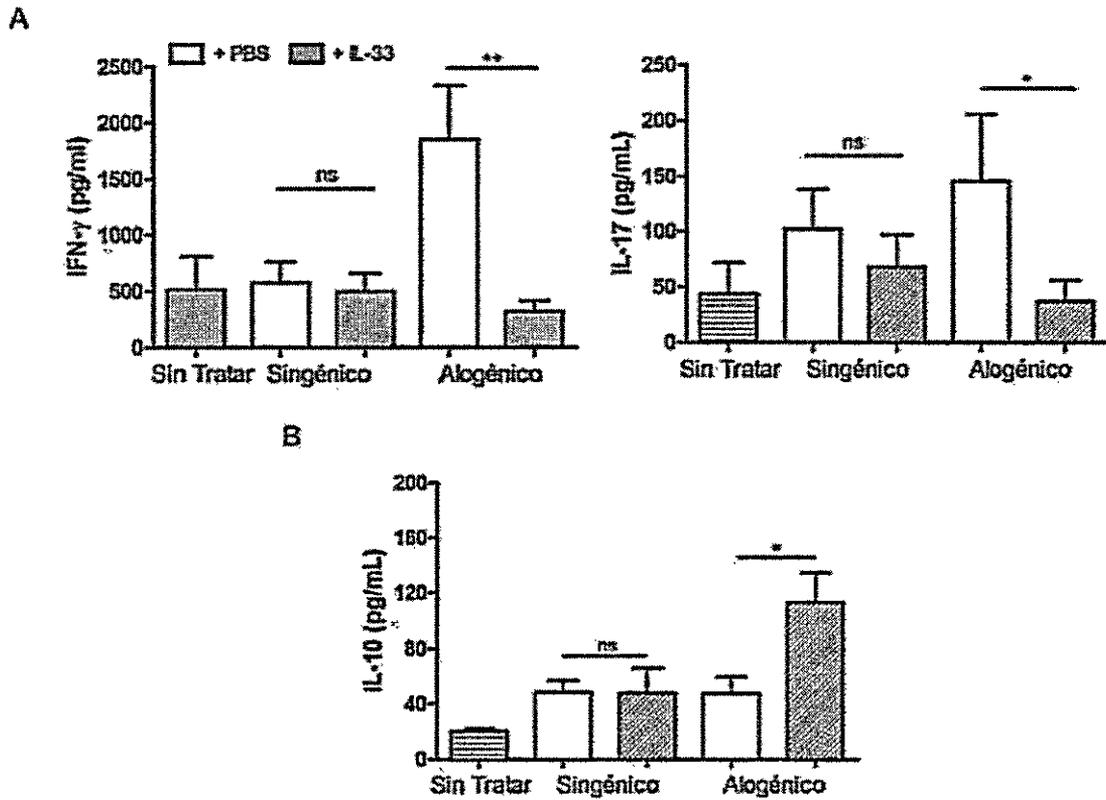


Figura 8 IL-33 inhibe la producción de las citoquinas inflamatorias IFN γ e IL-17, y aumenta la secreción de IL-10. Resultado del análisis realizado por el test de ELISA a los sobrenadantes de las células de GLd re-estimuladas *ex vivo* por 72 horas. **(A)** Gráficos que muestran las cantidades de IFN- γ e IL-17. **(B)** Grafico que representa la cantidad de IL-10 obtenido por ELISA. Las barras corresponden a la desviación estándar (DS), y la significancia estadística fue calculada por el análisis Mann-Whitney, ns: no significativo, * = 0,05 y **p=0,01. n=2 experimentos independientes, con 2 a 4 ratones por grupo en cada experimento.

8 DISCUSION

La IL-33 se ha caracterizado como una citoquina capaz de ejercer una gran variedad de funciones, muchas veces contradictorias, especialmente en lo que respecta a los linfocitos T CD4+, donde dependiendo de las condiciones experimentales (modelo, tiempo de tratamiento, dosis, etc) puede favorecer distintos fenotipos efectores de las mismas.

Recientes estudios respaldan la idea de IL-33 como inductor de tolerancia, afectando diferentes poblaciones celulares regulatorias que expresan el receptor ST2, como las mencionadas en este trabajo, CMS y Tregs. Estudios en diversos modelos animales de enfermedades han mostrado los efectos tolerogénicos asociados a la administración exógena de esta citoquina (Brunner et al., 2011; Duan et al., 2012; Jiang et al., 2012; Miller, 2011; Schiering et al., 2014; Turnquist et al., 2011), y se ha probado que el efecto ejercido es dependiente de la presencia de Tregs en el organismo (Duan et al., 2012). Adicionalmente, modelos de aterosclerosis, EAE y trasplante han analizado los patrones de citoquinas asociados a cada patología y el cambio de éstos bajo la influencia de IL-33, observando que el tratamiento es capaz de disminuir la secreción de citoquinas inflamatorias, como IFN- γ (Th1) e IL-17 (Th17), contribuyendo así a la creación de un ambiente favorable para el retorno a la homeostasis del organismo (Brunner et al., 2011; Jiang et al., 2012; Wasserman et al., 2012). Considerando esta información, es que se propuso a IL-33 como una molécula con la habilidad de modular el rechazo a trasplante mediante su acción sobre células supresoras.

En este trabajo se mostró que la administración de IL-33 no cambia la expresión de ST2 en células de GLd provenientes de ratones con trasplantes de piel, a diferencia

de lo observado en trasplante de corazón (Brunner et al. 2011; Turnquist et al., 2011). Esto se puede deber a una diferencia en el tipo celular que componen estos tejidos/órgano, al microambiente generado post-trasplante, entre otros. Cabe mencionar, que si bien los valores reportado para ST2 no han sido altos, se ha demostrado mediante el uso de ratones *knockout* para esta molécula que los efectos tolerogénicos dados por la IL-33 dependen directamente de la presencia del receptor; por esto, sería interesante probar con este tipo de herramientas o bien con el receptor soluble para bloquear la señalización y comprobar la dependencia del receptor para los efectos de la citoquina en este modelo. Sobre qué pasa con este receptor para que los niveles de expresión detectados sean bajos existen dos posibilidades; la primera, es que exista un fenómeno de *feedback* negativo que produzca una internalización del receptor para evitar una sobre-señalización a través del mismo; por otro lado, es posible que el receptor este siendo clivado y liberado al medio extracelular, actuando como señuelo con un fin similar al anteriormente mencionado.

Respecto a la celularidad de los GLd del injerto, observamos que el tratamiento con IL-33 incrementa la población CD11b+Gr1^{low}, que correspondería a las CMS descritas previamente (Brunner et al., 2011; Turnquist et al., 2011). Por otro lado, las poblaciones CD11b+Gr1^{high} y CD11b+Gr1^{int} no presentan mayores variaciones bajo esta condición. Con el fin de investigar si el efecto de la IL-33 en estas células abarca más que solo el control de su número celular (o si también tendría un impacto en su capacidad supresora), se midieron los niveles de expresión de dos genes característicos en los ganglios de animales con aloinjertos tratados o no con IL-33: *iNOS* y *Arg1* (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Youn and Gabrilovich, 2010). En células de GLd de ratones con trasplante alogénicos y tratados con la citoquina se encontró que la expresión de *iNOS* y *Arg1* aumenta al doble, comparado con su contraparte

tratada con el vehículo. Por otro lado, se encontró una alta expresión de MHC-II en las CMS (~95%), constante en todas las condiciones, lo que implica que estas células tendrían la habilidad de presentar antígenos. Por consiguiente, esta información sugiere que IL-33 expande o favorece la diferenciación de CMS, y podría actuar de manera positiva en sus funciones celulares (o mecanismos de supresión) durante el rechazo al injerto.

Usando el modelo de trasplante de piel, pudimos visualizar el efecto positivo que IL-33 tiene sobre la aceptación del injerto, ya que al día 10 post-trasplante se encontró que aquellos ratones que recibieron tratamientos diarios presentaban un mejor estado de los injertos que los grupos que recibieron solo PBS, (singénicos lucen más saludables y alogénicos, si bien no se encontraban 100% aceptados, sí presentaban un retardo en su cinética de rechazo al día 10). Además de esto, el experimento de sobrevida mostró que los tratamientos con IL-33 efectivamente favorecen la aceptación del injerto, ya que al día 30 el 80% de los injertos se encontraban en buen estado y completamente aceptados, mientras que aquellos ratones inyectados con PBS rechazaron completamente el injerto al día 12 post-trasplante. Todo esto puede ser clasificado como el efecto final de la acción de la citoquina sobre poblaciones supresoras y la consiguiente actividad de éstas en el estado inflamatorio generado por el injerto. Por otro lado, la mejor integridad de aquellos injertos en ratones tratados respecto a los controles se puede relacionar con otra propiedad descrita para la IL-33: la cicatrización de heridas (Yin et al., 2013), permitiendo un efecto neto integral en beneficio del injerto.

Referente al fenotipo de las CMS, una elevada expresión de MHC-II sugiere que la presentación antigénica podría estar tomando lugar en un ambiente regulatorio y afectando otras poblaciones celulares, como los linfocitos T CD4+, específicamente

Tregs. Estas células corresponden a otra población supresora clave en el estudio de la inducción de tolerancia. Si bien en los experimentos realizados no se observó variación en las frecuencias (o porcentajes) de Tregs entre las condiciones singénicas y alogénicas (tratadas o no), al analizar el número celular total se encontró un aumento significativo de Tregs en aquellos ratones que recibieron trasplante alogénico y tratamiento con IL-33. Esta observación deja al menos tres posibilidades abiertas: 1) Tregs periféricos migrando hacia los GLd; 2) Tregs residentes en el GLd en expansión; o 3) células T vírgenes (en la periferia) se diferencien a Tregs (iTregs).

Para poder dilucidar el origen de estas células, se diseñó un experimento de transferencia adoptiva de células T. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con IL-33 privilegia la tercera opción planteada, es decir, la diferenciación y expansión de iTregs en la periferia por sobre un efecto en los nTregs (endógenos en el ratón), ya que esta última población no presenta mayores variaciones en número o porcentaje bajo la influencia de la citoquina. Aunque la inducción de Tregs periféricos ha sido descrita con anterioridad en modelos de trasplante, esta es la primera vez que se asocia a la IL-33 como agente promotor de este evento. Por lo tanto, IL-33 puede promover la tolerancia inmunológica al permitir la diferenciación de iTregs y la expansión de nTregs.

Por último, se quiso evaluar la producción de citoquinas durante el rechazo del injerto y si IL-33 es capaz de alterar este patrón. Se encontró que bajo el tratamiento con la IL-33 la producción de citoquinas inflamatorias características para este proceso, IFN- γ e IL-17, disminuye significativamente durante la re-estimulación *ex vivo* de los GLd de ratones trasplantados, sugiriendo que existe un proceso inflamatorio menor que en los ratones del grupo de rechazo. Por otra parte, la producción de IL-10, citoquina anti-inflamatoria secretada en este caso por los linfocitos T existentes en el

GLd, aumento en aquellos animales con trasplante alogénicos y tratados con IL-33, alcanzando mayores niveles que en las demás condiciones. En conjunto estos datos indican que IL-33 favorece un ambiente de tolerancia, disminuyendo la producción de citoquinas inflamatorias e incrementando la de citoquinas antiinflamatorias, procesos que son posiblemente regulados por las poblaciones supresoras de CMS y Tregs.

Considerando lo anterior, se confirma la acción de IL-33 en la inmunidad del trasplante, donde esta citoquina es capaz de inclinar el balance inmunológico hacia un ambiente anti-inflamatorio y de tolerancia, que beneficia directamente el estado final del injerto e impacta en su aceptación. Estos resultados dan nuevas expectativas respecto al posible uso terapéutico de IL-33 para prevenir el rechazo a trasplantes.

9 CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se puede concluir que:

- IL-33 actúa como inductor de tolerancia durante el rechazo al trasplante, afectando distintas poblaciones supresoras.
- IL-33 aumenta el número de Células Mieloides Supresoras y la expresión de Arg1 e iNOS en células de los GLd.
- IL-33 favorece la expansión e inducción de T reguladores en la periferia del individuo trasplantado.
- El efecto en estas poblaciones celulares favorece el desarrollo de un ambiente tolerogénico, a través del cambio del patrón de citoquinas característicos del rechazo, favoreciendo la aceptación del injerto.

Por último podemos proponer que la IL-33, al tener un efecto positivo en la aceptación y cicatrización del injerto, es un buen blanco de estudio para una posible terapia contra el rechazo a trasplante.

10 REFERENCIAS

Abbas A., (2012). Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 4ta edición. Editorial Saunders.

Adeegbe, D., Serafini, P., Bronte, V., Zoso, A., Ricordi, C., and Inverardi, L. (2011). In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. In *Cell Transplant (United States)*, pp. 941-954.

Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O'Shea, J.J., and Shevach, E.M. (2008). CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. In *J Exp Med (United States)*, pp. 1975-1981.

Atalar, K., Afzali, B., Lord, G., and Lombardi, G. (2009). Relative roles of Th1 and Th17 effector cells in allograft rejection. In *Curr Opin Organ Transplant (United States)*, pp. 23-29.

Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and 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. In *J Exp Med (United States)*, pp. 1765-1774.

Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G., and Kees, U.R. (1998). Macrophage-Derived Nitric Oxide Regulates T Cell Activation via Reversible Disruption of the Jak3/STAT5 Signaling Pathway.

Bonilla, W.V., Frohlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreuzfeldt, M., Hegazy, A.N., Schrick, C., Fallon, P.G., *et al.* (2012). The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8(+) T cell responses. *Science* 335, 984-989.

Brudecki, L., Ferguson, D.A., McCall, C.E., and El Gazzar, M. (2012). Myeloid-Derived Suppressor Cells Evolve during Sepsis and Can Enhance or Attenuate the Systemic Inflammatory Response. In *Infect Immun*, pp. 2026-2034.

Brunner, S.M., Schiechl, G., Falk, W., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Fichtner-Feigl, S. (2011). Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transpl Int* 24, 1027-1039.

Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. In *Proc Natl Acad Sci U S A (United States)*, pp. 282-287.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. In *J Exp Med (United States)*, pp. 1875-1886.

Chinen, J., and Buckley, R.H. (2010). Transplantation immunology: Solid Organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol* 125, S324-335.

Cobbold, S.P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004). Induction of foxP3+ Regulatory T Cells in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to Transplants.

Dilek, N., Vuillefroy de Silly, R., Blancho, G., and Vanhove, B. (2012b). Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol* 3, 208.

Duan, L., Chen, J., Zhang, H., Yang, H., Zhu, P., Xiong, A., Xia, Q., Zheng, F., Tan, Z., Gong, F., and Fang, M. (2012). Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3(+) regulatory T-cell responses in mice. *Mol Med* 18, 753-761.

Dugast, A.S., Haudebourg, T., Coulon, F., Heslan, M., Haspot, F., Poirier, N., Vuillefroy de Silly, R., Usal, C., Smit, H., Martinet, B., *et al.* (2008). Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. In *J Immunol (United States)*, pp. 7898-7906.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.

Garcia, M.R., Ledgerwood, L., Yang, Y., Xu, J., Lal, G., Burrell, B., Ma, G., Hashimoto, D., Li, Y., Boros, P., *et al.* (2010). Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice.

Gondek, D.C., Devries, V., Nowak, E.C., Lu, L.F., Bennett, K.A., Scott, Z.A., and Noelle, R.J. (2008). Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatory T cells. In *J Immunol (United States)*, pp. 4752-4760.

Gorbacheva, V., Fan, R., Li, X., and Valujskikh, A. (2010). Interleukin-17 Promotes Early Allograft Inflammation. *Am J Pathol* 177, 1265-1273.

Greifenberg, V., Ribechini, E., Rossner, S., and Lutz, M.B. (2009). Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *Eur J Immunol* 39, 2865-2876.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. In *Immunity (United States)*, pp. 589-601.

Halloran, P.F., Miller, L.W., Urmson, J., Ramassar, V., Zhu, L.-F., Kneteman, N.M., Solez, K., and Afrouzian, M. (2001). IFN- γ Alters the Pathology of Graft Rejection: Protection from Early Necrosis.

Haribhai, D., Lin, W., Reiland, L.M., Truong, N., Williams, C.B., and Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* 178, 2961-2972.

Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. In *Cancer Res (United States)*, pp. 1123-1131.

Ingulli, E. (2010). Mechanism of cellular rejection in transplantation. In *Pediatr Nephrol*, pp. 61-74.

Itoh, S., Kimura, N., Axtell, R.C., Velotta, J.B., Gong, Y., Wang, X., Kajiwar, N., Nambu, A., Shimura, E., Adachi, H., *et al.* (2011). Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. In *Circulation (United States)*, pp. S187-196.

Jiang, H.R., Milovanovic, M., Allan, D., Niedbala, W., Besnard, A.G., Fukada, S.Y., Alves-Filho, J.C., Togbe, D., Goodyear, C.S., Linington, C., *et al.* (2012). IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN-gamma production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 42, 1804-1814.

Kimber, I., and Cumberbatch, M. (1992). Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *J Invest Dermatol* 99, 48S-50S.

Kobayashi, I., Shiari, R., Yamada, M., Kawamura, N., Okano, M., Yara, A., Iguchi, A., Ishikawa, N., Ariga, T., Sakiyama, Y., *et al.* (2001). Novel mutations of FOXP3 in two Japanese patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome (IPEX). *J Med Genet* 38, 874-876.

Leung, B.P., Xu, D., Culshaw, S., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2004). A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 173, 145-150.

Liu, J.Q., Liu, Z., Zhang, X., Shi, Y., Talebian, F., Carl, J.W., Jr., Yu, C., Shi, F.D., Whitacre, C.C., Trgovcich, J., and Bai, X.F. (2012). Increased Th17 and regulatory T cell responses in EBV-induced gene 3-deficient mice lead to marginally enhanced development of autoimmune encephalomyelitis. In *J Immunol (United States)*, pp. 3099-3106.

Matta, B.M., Lott, J.M., Mathews, L.R., Liu, Q., Rosborough, B.R., Blazar, B.R., and Turnquist, H.R. (2014). IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. In *J Immunol (United States: Inc.)*, pp. 4010-4020.

Miller, A.M. (2011). Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of Inflammation* 8, 22.

Mousson, C., Ortega, N., and Girard, J.P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3, e3331.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. In *Science (United States)*, pp. 256-260.

- Nagaraj, S., Nelson, A., Youn, J., Cheng, P., Quiceno, D., and Gabrilovich, D.I. (2012). Antigen-specific CD4+ T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling. *Cancer Res* 72, 928-938.
- Olson, B.M., Jankowska-Gan, E., Becker, J.T., Vignali, D.A., Burlingham, W.J., and McNeel, D.G. (2012). Human prostate tumor antigen-specific CD8+ regulatory T cells are inhibited by CTLA-4 or IL-35 blockade. In *J Immunol (United States)*, pp. 5590-5601.
- Olson, B.M., and McNeel, D.G. (2013). Monitoring Regulatory Immune Responses in Tumor Immunotherapy Clinical Trials. *Front Oncol* 3.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. In *J Immunol (United States)*, pp. 4499-4506.
- Rank, M.A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K.R., Squillace, D.L., and Kita, H. (2009). IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1047-1054.
- Ring, G.H., Saleem, S., Dai, Z., Hassan, A.T., Konieczny, B.T., Baddoura, F.K., and Lakkis, F.G. (1999). Interferon-gamma is necessary for initiating the acute rejection of major histocompatibility complex class II-disparate skin allografts. *Transplantation* 67, 1362-1365.
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Frohlich, A., Adelman, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., *et al.* (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 513, 564-568.
- Schmidt, A., Oberle, N., and Krammer, P.H. (2012). Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Front Immunol* 3.
- Schmitt, E.G., Williams, C.B. (2013). Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Frontiers in Immunology* 4.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., *et al.* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.
- Schuler, G., and Steinman, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161, 526-546.
- Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. In *Cancer Res (United States)*, pp. 5439-5449.
- Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30, 636-645.

Sojka, D.K., and Fowell, D.J. (2011). Regulatory T cells inhibit acute IFN-gamma synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10. In *Proc Natl Acad Sci U S A (United States)*, pp. 18336-18341.

Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 30, 647-675.

Terabe, M., Matsui, S., Park, J.M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Chen, W., Wahl, S.M., Ledbetter, S., Pratt, B., *et al.* (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. In *J Exp Med (United States)*, pp. 1741-1752.

Tran, D.Q., Glass, D.D., Uzel, G., Darnell, D.A., Spalding, C., Holland, S.M., and Shevach, E.M. (2009). Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. In *J Immunol (United States)*, pp. 2929-2938.

Turnquist, H.R., Zhao, Z., Rosborough, B.R., Liu, Q., Castellaneta, A., Isse, K., Wang, Z., Lang, M., Stolz, D.B., Zheng, X.X., *et al.* (2011). IL-33 expands suppressive CD11b+ Gr-1int and regulatory T cells (Treg), including ST2L+ Foxp3+ cells, and mediates Treg-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol* 187, 4598-4610.

Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. In *Nat Rev Immunol (England)*, pp. 523-532.

Wasserman, A., Ben-Shoshan, J., Entin-Meer, M., Maysel-Auslender, S., Guzner-Gur, H., and Keren, G. (2012). Interleukin-33 augments Treg cell levels: a flaw mechanism in atherosclerosis. *Isr Med Assoc J* 14, 620-623.

Wesolowski, R., Markowitz, J., and Carson, W.E. (2013). Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 1, 10.

Xu, D., Jiang, H.R., Kewin, P., Li, Y., Mu, R., Fraser, A.R., Pitman, N., Kurowska-Stolarska, M., McKenzie, A.N., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2008). IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10913-10918.

Yamazaki, S., Morita, A. (2013). Dendritic Cells in the Periphery Control Antigen-Specific Natural and Induced Regulatory T Cells. *Frontiers in Immunology* 4.

Yin, H., Li, X., Hu, S., Liu, T., Yuan, B., Gu, H., Ni, Q., Zhang, X., and Zheng, F. (2013). IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. *Mol Immunol* 56, 347-353.

Youn, J.I., and Gaborilovich, D.I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 40, 2969-2975.

Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2007). IL-2 Is Essential for TGF- β to Convert Naive CD4+CD25- Cells to CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells.

Zhou, Z., French, D.L., Ma, G., Eisenstein, S., Chen, Y., Divino, C.M., Keller, G., Chen, S.H., and Pan, P.Y. (2010). Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 28, 620-632.

11 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

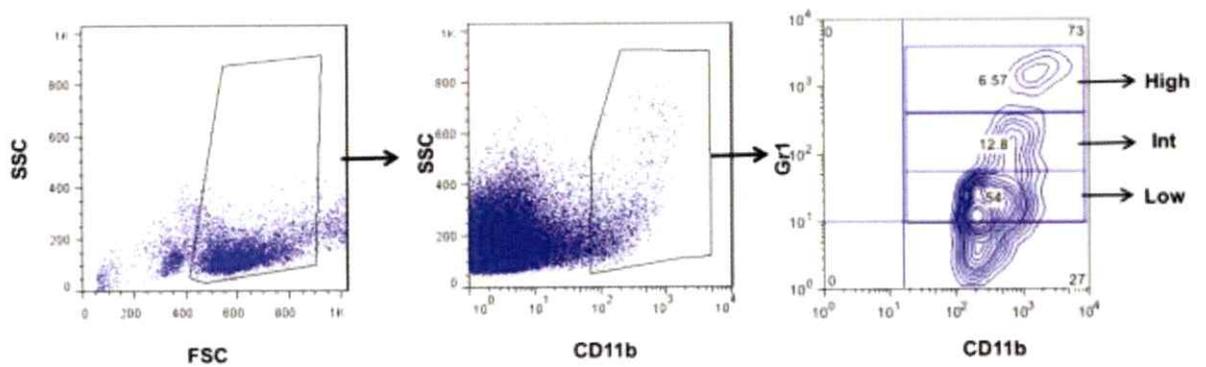


Figura Suplementaria 1. Estrategia de *gating* usada para identificar las CMS CD11b+ Gr1^{low}. A partir de las poblaciones totales se seleccionó la que corresponde a las células de mayor tamaño, luego se seleccionaron las células CD11b+ y dentro de ellas se separaron en 4 grupos dependiendo del nivel de expresión de Gr1.

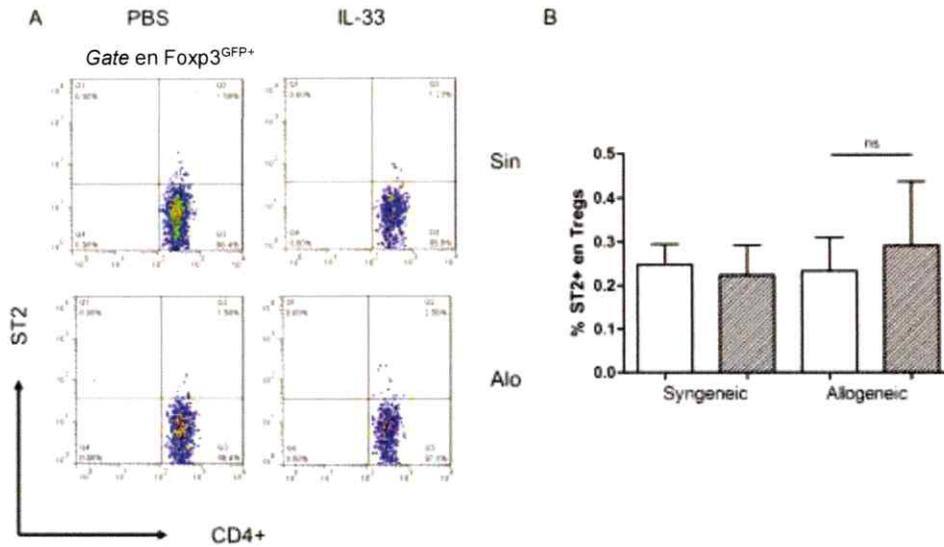


Figura Suplementaria 2. Expresión de ST2 en Tregs. (A) Gráfico de puntos representativo de la expresión de ST2 en células CD4+Foxp3GFP+ Tregs. (B) Gráfico compilado de la frecuencia de ST2 en Tregs de GLd.

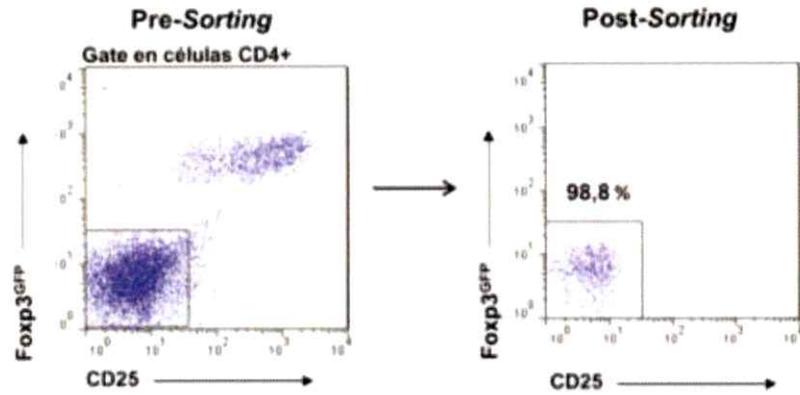


Figura Suplementaria 3. Expresión de Foxp3 en células recién aisladas y sorteadas. Expresión de Foxp3 y CD25 en células recién aisladas (Derecha) y posterior al *sorting* celular (Izquierda), se muestra el porcentaje de pureza obtenido con el proceso.

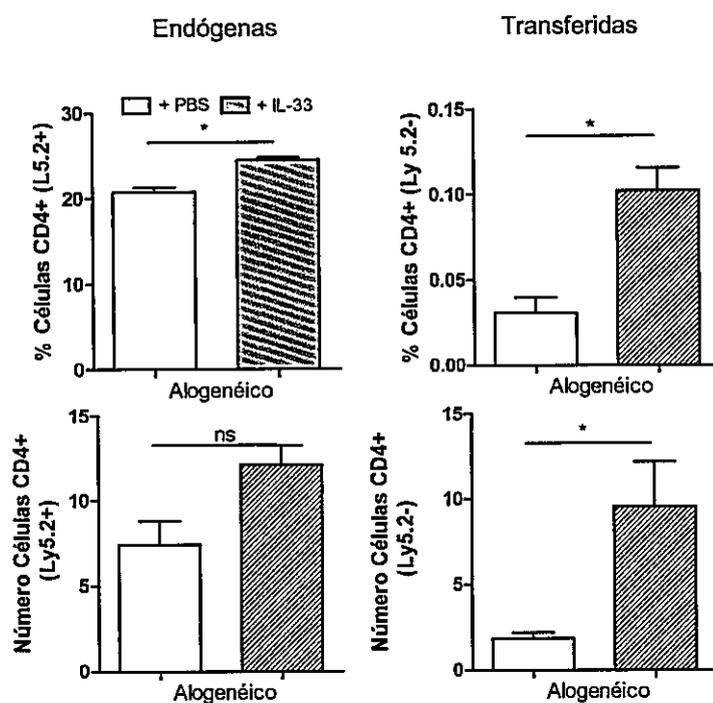


Figura Suplementaria 4. IL-33 aumenta la frecuencia y número total de células CD4+ en GLd. Gráficos de frecuencias (arriba) y número (abajo) del número total de células CD4+ en las poblaciones endógenas (derecha) y transferidas (izquierda).



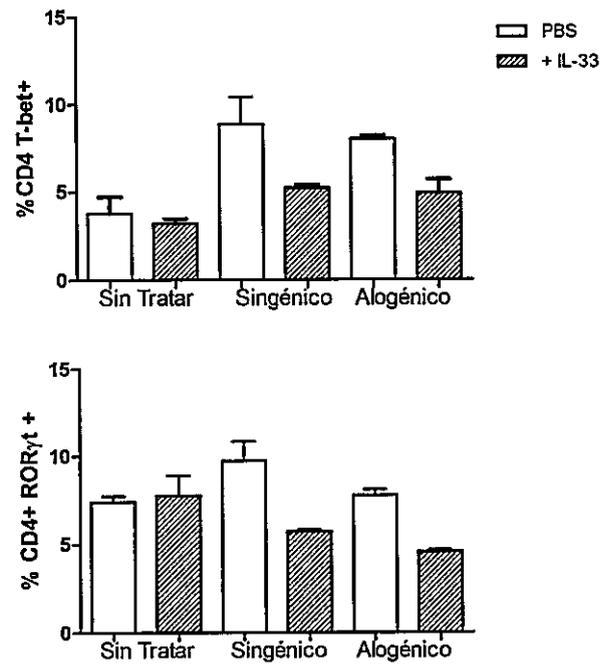


Figura Suplementaria 5. Expresión de T-bet y ROR-γt en GLd al día 10 post-trasplante.
 Niveles de T-bet (Th1) y ROR-γt (Th17) en células de GLd al 10 post-trasplante. N=1.