



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Linfocitos T reguladores inducibles producen factores generadores de linfocitos T reguladores *in Vitro*”

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

CAMILA ALEJANDRA FUENTES VILLEGAS

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora del Seminario de Título

Dr. Mario Roseblatt Silber
Co- Director Seminario de Título

Septiembre de 2011
Santiago - Chile

UCH-FC
Biot. Molecular
F9541
C.2



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. CAMILA ALEJANDRA FUENTES VILLEGAS**.

“Linfocitos T reguladores inducibles producen factores generadores de linfocitos T reguladores *in Vitro*”

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

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora Seminario de Título

Dr. Mario Roseblatt Silber
Co-Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Verónica Palma Alvarado
Presidente Comisión

Dra. María Inés Becker Contreras
Correctora

[Signature]



[Signature]

[Signature]

Santiago de Chile, septiembre de 2011

BIOGRAFIA



Me encontré con mis viejos el 16 de Julio de 1984 en la ciudad de Concepción. En ese tiempo mi papá se encontraba trabajando como médico general de zona en Laja, donde vivimos hasta que yo tenía 8 meses cuando nos trasladamos a Santiago.

Mis primeros años de colegio los hice en el Trehela's English School, donde guardo lindos recuerdos a pesar de solo haber estado unos pocos años. Así en tercero básico me cambiaron al que sería finalmente mi colegio de la vida, el Wenlock School. Mi paso por el Wenlock no fue fácil, pero mirándolo ahora con distancia creo me ayudaron a crecer y forjar mi carácter.

Desde bastante chica supe que me gustaba la biología y en particular la genética. Así decidí que aunque todos apostaban a que sería doctora lo mío era la biotecnología, una carrera que en ese tiempo era bastante desconocida.

Me tocó ser la última generación en dar la ya extinta PAA, para mi sorpresa sin los resultados esperados pues quedé en lista de espera. Así la vida me daba la primera de muchas lecciones. Pero hoy no puedo estar más agradecida porque terminé ingresando a Bachillerato en Ciencias Naturales y Exactas en la Universidad de Chile, siempre con Biotecnología en mente. El paso por Bachi es una de las mejores cosas que me han pasado, dejando como resultado grandes amistades que perduran hasta el día de hoy y espero para siempre. Al terminar el primer año decidí reintentarlo y me senté a dar la PSU. Sorprendentemente logré finalmente ingresar a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile.

Han sido varios años de mucho aprendizaje y esfuerzo. Momentos malos, momentos pésimos, pero también momentos inmensamente felices donde he visto frutos. Creo tomé la mejor decisión, hoy puedo decir felizmente que me apasiona profundamente lo que hago.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas personas las que pasan por mi mente, tanto que agradecer y espero de corazón sepan que sin ellos esta etapa hubiera sido aún más difícil.

Primero, mi pequeña familia. Mis viejitos lindos, ustedes han sido fundamentales en terminar esta importante etapa de mi vida,

Ma, gracias por siempre estar ahí para mí. Aunque no siempre estemos de acuerdo y a veces nos agarremos de las mechas, se que todas tus acciones vienen de la preocupación y del inmenso cariño que nos tenemos. Gracias por siempre anteponer mis necesidades y anhelos a los tuyos sin dudar.

Pa, gracias porque a pesar de que no siempre vemos las cosas de la misma manera, en los momentos duros siempre has estado ahí. Gracias por compartir conmigo tu amor por la ciencia, amor que creo compartiremos por el resto de la vida.

Quiero agradecer en especial a una pequeña personita que se integró hace poco a mi vida entregándome alegrías cuando más las necesitaba, mi Antonia linda. Gracias por hacerme sonreír cuando todo estaba mal y darme las ganas para seguir adelante.

Gracias a los tres porque sin ustedes no sería lo que soy. Gracias por ayudarme y apoyarme, por quererme y por aguantarme.

Y mención aparte a mi familia de lejos. A la Tía Chris, Tío Wayne, Melanie+1, Scott y Brandon, se que aunque están lejos siempre me tienen presente.

A la Pame, mi primi querida, gracias por siempre tener orejas para mi, eres mi Pepe Grillo.

Segundo, al InmunoLab. Gracias a cada uno de los que de alguna manera me ayudó durante estos casi 3 años que llevo con ustedes.

Gracias Leito por intentar que ir a trabajar al lab sea más que tan solo trabajar. Gracias por enseñarme tanto cuando llegue, por la paciencia y los buenos consejos.

Gracias Dani, por tus enseñanzas, por ayudarme tantas tardes sentada en el citómetro sin entender mucho al principio y porque junto al Leo entregan alegría a los días en el laboratorio cuando a veces pueden resultar un poco monótonos.

Gracias a mi Argentinilla querida, Gabi. Amiga, pucha que costó el comienzo pero hoy me enorgullece mucho ver cómo has progresado. Espero este sea el inicio de grandes cosas para ti.

Gracias agrandada (la Pauli), las cabras chicas: Sarah, Yessia, gracias Pame y Oscar. Todos aportaron su granito de arena para mejorar mi estadía en el lab.

Quiero agradecer a las que ya no están: Cinthia, gracias por los ratos de discusión con música metal de fondo, de verdad se extrañará tu música y mañosería por el lab. Val, gracias por recibirme de manera tan acogedora, espero el doctorado sea un linda experiencia.

Y por último, gracias Caco. Amiga, la vida a veces nos pone pruebas y hay que aperrar a lo que venga. En eso tú no te quedas atrás. Esta tesis te la debo a ti, por tus enseñanzas y paciencia conmigo. Gracias por las discusiones en tu oficina y por ayudarme a ser una mejor científica. Nunca pararé de leer lo prometo.

Especialmente quiero agradecer a mis tutores. Profe Mario y Profe María Rosa, les agradezco profundamente el apoyo que me han dado. El sacar adelante esta tesis fue más difícil de lo que hubiera querido, pero jamás me faltó su apoyo y comprensión y eso lo valoro inmensamente.

Gracias Profe María Rosa por ser más que una tutora académica. Estaré para siempre agradecida.

Finalmente debo agradecer a quienes me acompañaron durante todo este proceso desde primer año de Bachi. A Nacho, Jorge, y Andy, los adoro y sin ustedes pucha que hubieran sido fomes todos estos años. Son mis amigos de la vida! Al Leo, el Pato, la Carito, el Richy y Japonés los quiero mucho. Gracias por tantos momentos jugosos que hemos compartido. La Chicha y la Jocy, por ser mis compañeras de tantos

proyectos y estudio. Gracias por aguantar mi mandonería. Las kero. Gracias a quienes ya no están. Miguel, gracias por las risas y los lindos momentos que pasamos juntos.

Mención especial quiero hacer a todos los “bichos” que dieron su vida para que esta tesis fuera posible. Alguna vez dije jamás trabajaría con animales, la vida da muchas vueltas y a veces nos toca hacer cosas que no nos gustan mucho. Como sea, me esforcé al máximo para que la vida de cada uno no se perdiera en vano.

RESUMEN

Hace un siglo Paul Ehrlich propuso que el sistema inmune estaba programado para evitar la generación de respuestas autoinmunes en lo que denominó "horror autotoxicus" (Himmelweit, 1956-1960). En la actualidad los avances en el estudio de la tolerancia inmunológica han permitido determinar que existen varios tipos celulares dentro del sistema inmune que presentan capacidad supresora o inmunomodulatoria. Dentro de estos, los linfocitos T reguladores (Tregs) son una de las poblaciones celulares más relevantes para la mantención de la tolerancia en el sistema inmune. Existen 2 tipos de Tregs: los Tregs naturales (nTregs) que son producidos en el timo y forman parte de los mecanismos de tolerancia central, y los linfocitos T reguladores que son inducidos en la periferia (iTregs) a partir de linfocitos T vírgenes (LT vírgenes) en ambientes tolerogénicos. En este punto es de gran importancia la presencia de factores solubles, en particular citoquinas como TGF- β , ácido retinóico e IL-2 que inducen la expresión del factor de transcripción FoxP3, regulador maestro en el desarrollo y función de los Tregs. En base a esto, un posible mecanismo de generación de Tregs sería la generación de factores solubles que cooperarían en la generación de este subtipo celular permitiendo una generación a distancia, sin descartar un posible aporte del contacto celular.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades de los factores solubles que se producen durante la generación de Tregs alogénicos *in vitro*. Sorprendentemente estos factores solubles (medios condicionados) fueron capaces de inducir el factor de transcripción FoxP3 en LT vírgenes activados con células

presentadoras de antígeno (APCs), generando Tregs. Los Tregs generados expresan marcadores de actividad de Tregs e inhiben la producción de citoquinas y la proliferación de LT efectores *in vitro*. En resumen, estos resultados indican que durante la generación de Tregs se producen factores solubles que permiten la generación de Tregs con actividad supresora.

ABSTRACT

A century ago Paul Ehrlich proposed the idea that the immune system was programmed to avoid the generation of autoimmune responses in what he called "horror autotoxicus" (Himmelweit, 1956-1960). Today's advances in the study of immune tolerance have identified several cell types within the immune system that have suppressive or immunomodulatory capacity. Within these, regulatory T cells (Tregs) are one of the most relevant managers in maintaining the immune tolerance. Natural Tregs are produced in the thymus as part of central tolerance mechanisms, however there are also regulatory T cells that are induced in the periphery from naive T cells in tolerogenic environments where many signals must coexist to allow this generation. At this point is very important the presence of soluble factors, including cytokines such as TGF- β , retinoic acid and IL-2 to induce the expression of FoxP3. On this basis, a possible mechanism for Tregs generation could be the production of soluble factors that might cooperate in the generation of this lymphocyte, without ruling out a possible contribution of cell contact.

The aim of this work was to study the properties of soluble factors produced during the *in vitro* generation of allogeneic Tregs. Surprisingly these soluble factors (conditioned media) were capable of inducing the transcription factor FoxP3 on naive T cells activated by antigen presenting cells, generating Tregs. This Tregs express several activation Tregs markers, inhibit cytokine production and proliferation of effector T cells. In summary, these results showed that Tregs generation produced soluble factors with the capacity to induce Tregs

INDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INDICE DE CONTENIDOS.....	x
INDICE DE TABLAS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xiv
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA Y FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	1
1.2 HIPOTESIS.....	13
1.3 OBJETIVOS.....	13
1.3.1 Objetivo General	13
1.3.2 Objetivos Específicos	13
2. MATERIALES Y METODOS	14
2.1 RATONES.....	14
2.2 ANTICUERPOS Y REACTIVOS	14
2.3 PURIFICACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (APC) Y CÉLULAS DENDRÍTICAS DE BAZO (DC)	15
2.4 PURIFICACIÓN LINFOCITOS T VÍRGENES (CD4 ⁺ CD25 ⁻).....	17

2.5	GENERACIÓN DE TREGS ALOGÉNICOS UTILIZANDO CITOQUINAS EXÓGENAS O MEDIO CONDICIONADO (MC).....	18
2.6	CITOMETRÍA DE FLUJO Y MARCAJE INTRACELULAR	19
2.7	DETECCIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES MEDIANTE CBA (CYTOMETRIC BEAD ARRAY)	20
2.8	SEPARACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES POR CELL SORTING.....	20
2.9	ENSAYO DE SUPRESIÓN.....	21
2.10	ENSAYO DE TOLERANCIA INFECCIOSA	22
2.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
3.	RESULTADOS	24
3.1	GENERACION DE TREGS MEDIANTE LA ADICION DE MEDIO CONDICIONADO DE TREGS ALOGENICOS	24
3.2	CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LOS TREGS GENERADOS UTILIZANDO MEDIO CONDICIONADO MC (TILRA)	39
3.3	FUNCIONALIDAD DE LOS TREGS	45
4.	DISCUSION.....	49
5.	CONCLUSIONES	60
6.	BIBLIOGRAFIA.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. TGF- β y RA tienen un efecto sinérgico en la inhibición en la producción de citoquinas Th1/Th2/Th17.....	32
--	----

Tabla 2. El medio condicionado de las condiciones TILRA y TGF- β contienen bajos niveles de citoquinas Th1/Th2/Th17.....	36
---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Familia de la interleuquina 12.....	9
--	---

Figura 2. Fenotipo LT vírgenes utilizados para la generación de Tregs.....	26
---	----

Figura 3. Fenotipo APCs utilizadas para la generación de Tregs.....	27
--	----

Figura 4. La adición de TILRA genera un alto porcentaje de Tregs.....	28
--	----

Figura 5. TGF- β y RA actúan en sinergia para potenciar la generación de Tregs.....	30
--	----

Figura 6. Generación de Tregs con medio condicionado, MC (TILRA).....	33
--	----

Figura 7. El medio condicionado de las condiciones TILRA y TGF- β /RA inducen la generación de nuevos Tregs	35
Figura 8. Tregs producen factor(es) soluble(s) que inducen la generación de Tregs.....	38
Figura 9. Tregs producen factores solubles con mayor capacidad generadora de Tregs que la utilización de TILRA.....	40
Figura 10. Tregs generados utilizando medio condicionado TILRA expresan marcadores CD101, CD103 y GARP.....	43
Figura 11. Tregs generados utilizando MC (TILRA) expresan CTLA-4 y CD39.....	45
Figura 12. Tregs generados utilizando MC +TILRA no expresan Helios.....	46
Figura 13. Tregs generados con MC (TILRA) son funcionales <i>in vitro</i>	48
Figura 14. Tregs generados con MC (TILRA) inhiben la producción de citoquinas...50	
Figura 15. Tregs alogénicos generados <i>in vitro</i> no son capaces de generar tolerancia infecciosa.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs: Célula Presentadora de Antígeno

CFSE: Carboxyfluoresceína Diacetato Succinimidyl Ester

CTLA-4 Antígeno-4 Asociado al Linfocito T Citotóxico

DC: Célula Dendrítica

GFP: Proteína Fluorescente Verde

IFN- γ : Interferón γ

IL-2: Interleuquina 2

IL-4: Interleuquina 4

IL-6: Interleuquina 6

IL-12: Interleuquina 12

IL-17A: Interleuquina 17A

IL-23: Interleuquina 23

IL-35: Interleuquina 35

iTregs: Linfocitos T reguladores inducibles

LT: Linfocitos T

LTh: Linfocito T helper

MC: Medio Condicionado

MHC II: Complejo Principal de Histocompatibilidad II

nTregs: Linfocitos T reguladores naturales

RA: Ácido Retinóico

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TILRA: TGF- β + RA + IL-2

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral

Tregs: Linfocitos T Reguladores

1. INTRODUCCION

1.1 Exposición general del problema y fundamentación teórica

El sistema inmune es el encargado de proteger al organismo mediante mecanismos eficaces de defensa frente a los diversos patógenos que se encuentran en el ambiente. Al mismo tiempo el sistema inmune es responsable de mantener la tolerancia a moléculas propias que podrían ser reconocidas como extrañas y moléculas extrañas que no representan un peligro. Esta tolerancia frente a moléculas propias o moléculas inocuas se denomina tolerancia inmunológica y representa un fenómeno activo. Cuando este fino equilibrio entre inmunidad y tolerancia se pierde sus consecuencias son el desarrollo de múltiples enfermedades ya sea de inmunodeficiencia o autoinmunidad.

Los Tregs participan de manera vital en los mecanismos de tolerancia inmunológica al mantener la homeostasis celular, la protección contra la autoinmunidad, prevenir respuestas inmunes excesivas contra patógenos o alérgenos y ayudar a mantener la microflora comensal (Belkaid y Tarbell, 2009) (Sakaguchi y cols, 2006) (Sakaguchi y cols, 2008).

Los Tregs fueron inicialmente descritos en el modelo murino por Sakaguchi (Sakaguchi y cols. 1995) como linfocitos T que expresaban en su superficie las moléculas CD4 y la unidad α del receptor de interleuquina 2 (CD25) de manera constitutiva. Una mejor descripción de esta población celular se obtuvo con el descubrimiento de la expresión particular por parte de estas células del factor de

transcripción FoxP3. La pérdida de la expresión funcional de este gen conlleva a una proliferación severa linfocitaria y a una autoinmunidad multiorgánica como es el caso del mutante murino denominado "scurfy" (Khattari y cols, 2003) o como lo observado en pacientes humanos que padecen del síndrome de inmunodisregulación poliendocrinopatía y endocrinopatía ligada al cromosoma X (IPEX) (Bennett y cols, 2001).

Se han descrito dos orígenes para la generación de los Tregs; el primero es el timo donde las células FoxP3⁺ son generadas en sincronía con la selección positiva de linfocitos T CD4⁺ y el segundo ocurre en la periferia donde los linfocitos T vírgenes CD4⁺CD25⁻ son convertidos en células FoxP3⁺ en ambientes altamente tolerogénicos donde existen numerosas citoquinas que ayudarían a esta conversión (Curotto de Lafaille y cols, 2009).

Numerosos estudios han demostrado que los linfocitos T reguladores generados en el timo, llamados linfocitos T reguladores naturales (nTreg), son producidos mediante interacciones entre el receptor de linfocitos T (TCR) y el complejo principal de histocompatibilidad de clase dos (MHC-II) expresado en células presentadoras existentes en este órgano. Esta interacción ocurre normalmente durante la selección de linfocitos T donde se presentan antígenos propios, sin embargo cuando esta interacción es más fuerte de lo habitual, es decir el TCR reconoce con mayor avidez péptidos propios en el contexto de moléculas MHC-II, entonces este linfocito puede convertirse en un nTreg migrando a la periferia (Apostolou y cols, 2002; Sakaguchi y cols, 2001).

Los LT vírgenes pueden ser inducidos a expresar el factor de transcripción FoxP3 mediante diversos mecanismos, como por ejemplo la activación *in vitro* en presencia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e interleuquina 2 (IL-2) (Zheng y cols, 2007; Davidson y cols, 2007), la exposición *in vivo* a cantidades subinmunogénicas de péptido entregado mediante la utilización de bombas osmóticas (Apostolou y cols, 2004), la utilización de antígenos acoplados a anticuerpos contra DEC205 (CD205) expresado por células dendríticas tolerógenicas en sistemas transgénicos (Mahnke y cols, 2003).

En condiciones fisiológicas, los linfocitos T reguladores inducibles (iTregs) pueden ser generados en el ganglio mesentérico durante la inducción de tolerancia oral (Coombes y cols, 2007; Mucida y cols, 2005), o en la lámina propia del intestino en respuesta a la microbiota y a los antígenos alimenticios (Sun y cols, 2007). También se producen en tejidos que presentan inflamación crónica (Curotto de Lafaille y cols, 2008) y en tejidos trasplantados (Cobbold y cols, 2004).

En conclusión, el microambiente en el que ocurre la generación de iTregs es diverso y aún posee muchas incógnitas, sin embargo se han definido tres componentes necesarios para la conversión de LT vírgenes a iTregs: la estimulación a través del TCR, la presencia TGF- β y de IL-2.

La citoquina TGF- β pertenece a una familia de citoquinas regulatorias que poseen funciones pleiotrópicas en una amplia gama de linajes celulares involucrando numerosos procesos como la embriogénesis, carcinogénesis y la respuesta inmune (Blobe y cols, 2000). En mamíferos se han identificado tres miembros de esta familia

(TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3) siendo TGF- β 1 la que predominantemente se expresa en el sistema inmune (Li y cols, 2006).

La activación *in vitro* de LT vírgenes en presencia de TGF- β genera actividad supresora que se encuentra ligada a la inducción de la expresión del factor de transcripción FoxP3 (Chen y cols, 2003; Fantini y cols, 2004; Wan y Flavell, 2005). Esta inducción estaría mediada por el reclutamiento del factor de transcripción Smad3 a un elemento activador de FoxP3 (Tone y cols, 2008). La generación de Tregs inducida por TGF- β se ve aumentada cuando ocurre en presencia de IL-2 (Davidson y cols, 2007). La señalización mediada por IL-2 activa el factor de transcripción STAT5 el que se une al promotor de FoxP3 aumentando su expresión (Burchill y cols, 2007). Por lo tanto la expresión de FoxP3 en LT vírgenes activados en presencia de TGF- β e IL-2 se debería a un efecto complementario o sinérgico de la acción de varias cascadas de señalización.

Las células dendríticas (DC) tienen un importante rol en la generación de iTregs. Se ha descrito que en particular las DC asociadas a tejido intestinal que expresan el marcador de superficie CD103 (integrina α _E β ₇), promueven la conversión de LT vírgenes a iTregs (Coombes y cols, 2007). Además estas DC poseen la capacidad de inducir la expresión de receptores de homing a intestino, como la integrina α ₄ β ₇ y el receptor de quimioquina CCR9, en los linfocitos T (Mora y cols, 2003). Se ha demostrado que la capacidad de las DCs de inducir la expresión de receptores de homing a intestino está asociado a la capacidad de producir ácido retinóico (RA) a partir de retinol. El ácido retinóico por tanto es capaz de inducir la

expresión de receptores de homing a intestino en linfocitos T (Iwata y cols, 2004; Svensson y cols, 2008).

Estudios posteriores demostraron que el RA actúa en sinergia con TGF- β durante la generación de iTregs puesto que el porcentaje de iTregs generados al utilizar anticuerpos neutralizadores de TGF- β así como inhibidores de los receptores de ácido retinóico se ve disminuido (Benson y cols, 2007; Coombes y cols, 2007; Mucida y cols, 2007; Sun y cols, 2007). Estos datos en conjunto con los mencionados anteriormente permiten concluir que el ácido retinóico no solo induce receptores de homing a intestino en los linfocitos T sino que también coopera en la generación de tolerancia en el intestino a través de la generación de iTregs mediada por células dendríticas CD103⁺ (Coombes y cols, 2007). Además estudios recientes demostraron que el RA inhibe la generación de linfocitos Th17 (Mucida y cols, 2007) (Elias y cols, 2008). Este subtipo linfocitario está asociado a fenómenos de autoinmunidad e inflamación y es generado en presencia de TGF- β e IL-6 y se caracterizan por la secreción de IL-17. Estos estudios han demostrado que la presencia de ácido retinoico generaría un ambiente tolerogénico donde la adición de RA mas TGF- β favorecería la generación de Tregs por sobre la generación de linfocitos Th17 (Mucida y cols, 2007) (Elias y cols, 2008).

El RA actúa a nivel génico aumentando la expresión del factor transcripcional FoxP3. Esto ocurre debido a la existencia de dos familias de receptores nucleares de ácido retinóico; el receptor de ácido retinóico (RAR) y el receptor de retinoides X (RXR). Estos dos grupos de receptores forman heterodímeros RXR/RAR que pueden funcionar tanto como activadores o represores transcripcionales dependiendo de la

disponibilidad y el tipo de ligando retinoide presente. Para el caso de la inducción de la expresión de FoxP3, se ha demostrado que el ácido retinóico se une preferencialmente al receptor nuclear RAR. Esta unión induce la acetilación del promotor de FoxP3, lo que genera un cambio en la conformación de la cromatina hacia una conformación abierta facilitando su transcripción (Kim, 2008).

En la actualidad se han descrito varios marcadores de superficie para identificar Tregs, sin embargo el único marcador exclusivo en el modelo murino continua siendo el factor de transcripción FoxP3. Por otra parte, es posible realizar una caracterización fenotípica de este tipo celular distinguiendo dos subgrupos de moléculas. La primera hace relación a moléculas asociadas a su función supresora como: CD101 CTLA-4, Lag-3, CD103, Garp y CD39 (Fernandez y cols, 2007; Wang y cols, 2009; Deaglio y cols, 2007; Read y cols, 2006) y la segunda, a moléculas asociadas al homing que presentan estas células como: CD62L, CD49d, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, entre otras (Wei y cols, 2006).

La integrina $\alpha_E\beta_7$ (CD103) fue inicialmente descrita como un marcador de linfocitos T intraepiteliales residentes en la pared intestinal y en otros epitelios como el de la piel o pulmonar. El único ligando identificado para esta integrina es E-cadherina la que se expresa en células epiteliales pero no así endoteliales. La expresión de CD103 en Tregs está estrechamente ligada a su función supresora habiéndose descrito que la fracción CD103⁺ es una subpoblación de alto poder supresor tanto *in vitro* demostrado mediante ensayos de supresión, así como *in vivo* inhibiendo la generación de colitis (Lehmann y cols, 2002).

CD101 es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 1021 aminoácidos que contiene siete sitios de glicosilación en su dominio extracelular y una corta porción citoplasmática que contiene varios sitios de consenso de fosforilación. Es expresada por monocitos, granulocitos, células dendríticas y linfocitos T activados. CD101 ha sido descrita como un regulador negativo en la activación de linfocitos T humanas y ha sido asociada a funciones tolerogénicas en DC. Su expresión en Tregs ha sido asociada a linfocitos de alta capacidad supresora *in vitro* mediante ensayos de supresión y mediante modelos *in vivo* (Fernandez y cols, 2007).

GARP es un receptor huérfano de tipo toll, compuesto de repetidos ricos en leucina. Su expresión es casi indetectable en nTregs pero luego de su activación mediante el TCR aumenta considerablemente en su superficie. La inducción de la expresión de GARP en LT vírgenes les confiere un fenotipo regulatorio mediante la expresión de FoxP3 y función supresora. Por otra parte, el knock down de GARP en Tregs de origen murino reduce su capacidad supresora aunque se mantiene la expresión de FoxP3. Por lo tanto la expresión de GARP ha sido asociada a la función supresora de los Tregs y a su estado de activación (Battaglia y Roncarolo, 2009).

La familia de factores de transcripción Ikaros está compuesta por 5 proteínas que unen DNA. Dos de sus miembros; Eos y Pegasus están expresados en una diversidad de tejidos, mientras que los otros tres; Ikaros, Helios y Aiolos solo han sido reportados dentro del sistema hematopoyético. Su mecanismo de acción aún no está claramente descrito pero se cree que regulan la transcripción génica mediante la remodelación de la cromatina y estudios han demostrado que Ikaros y Helios interactúan en la remodelación del nucleosoma y en el complejo de metilación del

DNA. Este complejo es ATP dependiente y tiene actividad histona deacetilasa. Helios esta expresado en un subtipo de Tregs FoxP3⁺ en ratón y humanos, específicamente los nTregs, por lo cual es una herramienta útil para distinguir la población de nTregs de los iTregs (Thornton y cols, 2010).

Los Tregs son los principales encargados de mantener la tolerancia periférica en el sistema inmune. En un inicio se creyó que su función se basaba sólo en inhibir la proliferación de linfocitos T efectores. Sin embargo estudios posteriores *in vitro* demostraron que su acción no solo se basa en suprimir la proliferación de linfocitos T efectores, sino que también ejercen su acción modulando e inhibiendo la maduración y funcionalidad de DC (Vignali y cols, 2008). Esto ocurriría mediante la interacción entre CTLA-4 expresado en los Tregs y CD80/CD86 presente en la DC. Por una parte, esta interacción de alta afinidad impediría la interacción de CD80/CD86 con CD28 expresado en linfocitos T, afectando la capacidad activadora de las DC (Sansom y Walker, 2006). Por otra parte, se ha demostrado que la interacción CTLA4 con CD80/CD86 induce la expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en las DC (Fallarino y cols, 2003; Onodera y cols, 2009), una potente molécula regulatoria involucrada en el catabolismo del triptófano que produce la inhibición de la activación de linfocitos T efectores (Mellor y Munn, 2004).

Además de los factores ya mencionados, se ha demostrado que los Tregs poseen la capacidad de producir citoquinas inhibitorias como IL-10, TGF- β , y la recientemente descrita IL-35 (Vignali y cols, 2008). Esta última pertenece a la familia de la interleuquina 12 en la que también se encuentra la IL-23 y la IL-27. Estas cuatro

interleuquinas son heterodímeros compuestos de una cadena α (p19, p28 o p35) y una cadena β (p40 o Ebi3) tal como se muestra en la fig. 1.

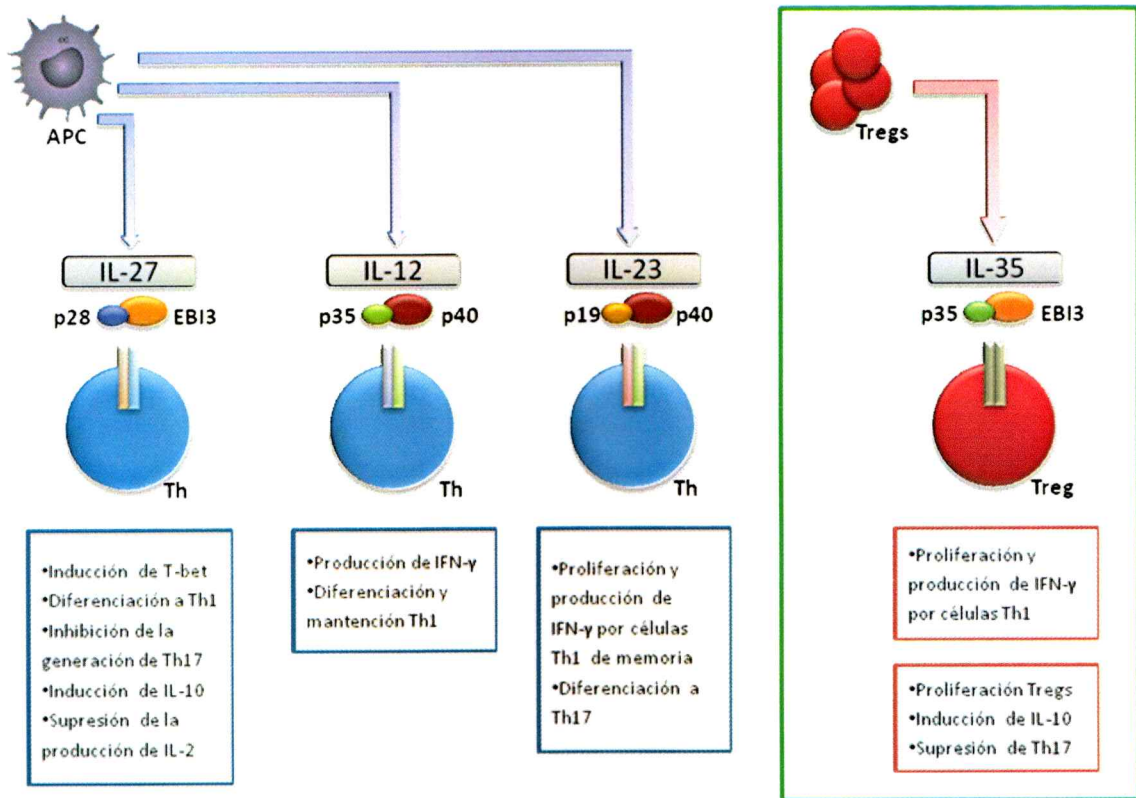


Figura 1. Familia de la interleuquina 12. La IL-35 es producida por los Tregs y actuaría sobre los mismos Tregs afectando su proliferación, generación y expansión. (Modificado de Yoshida y cols, 2008)

A pesar de que sus receptores comparten ciertas características estructurales, su fuente, actividad y cinéticas de expresión son diferentes. Aunque aún no ha sido posible determinar las moléculas involucradas tanto en el receptor de IL-35 como en la posterior señalización mediada por esta citoquina, es altamente probable que comparta algunas moléculas con otras ya presentes en el receptor y/o señalización de otras

interleuquinas presentes en la familia. En particular la IL-35 fue recientemente descrita como una citoquina asociada a los Tregs, involucrada tanto en la supresión mediada por estas células (Collison y cols, 2009a) como en su expansión (Castellani y col, 2010) y generación (Collison y cols, 2009b). Las últimas investigaciones realizadas por este grupo determinaron que la presencia de IL-35 generaría los denominados iT-35, linfocitos T productores de IL-35 que presentan alta capacidad supresora mediada por esta citoquina pero que carecen de la expresión de FoxP3 (Collison y cols, 2010).

Otros mecanismos utilizados por los Tregs para generar tolerancia es mediante citólisis a través de la producción de perforina y granzima (Vignali y cols, 2008) o bien generando una disrupción metabólica mediante la expresión de CD39 y CD73 y la consiguiente producción de adenosina (Borsellino y cols, 2007). CD39 es una de las ectoenzimas dominantes dentro del sistema inmune, cuya función es hidrolizar ATP o ADP a AMP y es expresada tanto por linfocitos B como DC y en varios subtipos linfocitarios. Además de remover un estímulo pro inflamatorio, como es el ATP, esta enzima actuaría en conjunto con CD73, otra ectonucleosidasa, presente en la superficie de los linfocitos para generar adenosina. Este nucleósido tendría un efecto inhibitorio suprimiendo la proliferación celular (Borsellino y cols, 2007) (Deaglio y cols, 2007). Se ha demostrado que Tregs que expresan CD39 *in vivo* presentan gran capacidad inhibitoria en modelos de artritis inducida por colágeno (Kochetkova y cols, 2010).

Un fenómeno que ayudaría a la mantención de la tolerancia periférica por parte de los Tregs sería su capacidad de convertir LT vírgenes a Tregs, en lo que se denomina "tolerancia infecciosa". Este término fue originalmente acuñado por los

autores Gershon y Kondo (Gershon y Kondo, 1971) y se refería a la supresión mediada por células con características regulatorias sobre la población de LT vírgenes, esto en el contexto de trasplante de médula ósea. Más tarde el concepto fue ampliado por el grupo de Waldmann y Cobbold (Qin y cols, 1993) para derivar en la definición actual. La tolerancia infecciosa fue descrita como el proceso mediante el cual un estado de tolerancia inducida es transferido de una población celular a otra. Esta definición resulta ser bastante amplia y poco específica, sin embargo en la actualidad numerosos estudios vinculan este fenómeno con los Tregs (Andersson y cols, 2008) (Jonuleir y cols, 2002) (Selvaraj y cols, 2008) (Collison y cols, 2010) demostrando la capacidad que tendrían estas células de inducir un fenotipo regulatorio en otros linfocitos T. Sin embargo el mecanismo molecular mediante el cual ocurre esta generación aun no está completamente dilucidado.

Existen varias hipótesis en cuanto a como ocurriría el fenómeno de tolerancia infecciosa, una de ellas hace relación a la presencia de TGF- β unido a la superficie de los Tregs en conjunto con el péptido asociado de latencia (LAP). Este complejo unido a la superficie sería importante para la función supresora de los Tregs sobre linfocitos T activados pero además podría inducir células CD4⁺FoxP3⁺ *in vitro* a partir de LT vírgenes de manera dependiente de contacto. Este sería un efecto directo de los Tregs sobre los LT vírgenes independiente de las APCs. Estos LT CD4⁺FoxP3⁺ inducidas mediante este mecanismo serían supresoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Andersson y cols, 2008).

Otra hipótesis descrita para el fenómeno de tolerancia infecciosa involucra la participación de DC en la generación de tolerancia infecciosa. En el contexto de

trasplante de piel, Tregs antígeno específicos inducirían en las DC la expresión de enzimas encargadas de consumir varios aminoácidos esenciales afectando de esta manera la proliferación de los linfocitos T circundantes. Esta disminución en la proliferación estaría asociada a una disminución en la señalización mediada por el blanco de la rapamicina en los mamíferos (mTOR) induciendo la expresión del factor de transcripción FoxP3 en las células sometidas a esta escasez de aminoácidos esenciales. Este efecto sería dependiente de la activación mediada por el TCR y del efecto sinérgico en conjunto con TGF- β (Cobbold y cols, 2009).

A pesar de que algunos grupos han presentado posibles mecanismos moleculares de la tolerancia infecciosa es necesario un mayor estudio de este fenómeno. Esto pues en la actualidad las terapias celulares utilizando Tregs ya sea en enfermedades autoinmunes o en trasplantes son cada día más posibles y fenómenos como el de tolerancia infecciosa mediada por estos Tregs podría llegar a ser perjudicial para los pacientes a causa de la generación de inmunosupresión no específica.

En este trabajo estudiamos las propiedades de los factores solubles que se producen durante la generación de Tregs alógenicos *in vitro*. Para esto utilizamos medio de cultivo condicionado por Tregs alogénicos para realizar una segunda generación de Tregs sin la adición de ningún factor exógeno. Estos experimentos nos permitieron determinar que durante la generación de Tregs se producen factores solubles que permiten la generación de Tregs con actividad supresora. Además se analizó la capacidad directa de Tregs generados *in vitro* de convertir LT vírgenes en Tregs con función supresora *in vitro* sin resultados positivos.

1.2 HIPOTESIS

Linfocitos T reguladores inducibles producen factores solubles capaces de generar linfocitos T reguladores a partir de linfocitos T vírgenes.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Estudiar las propiedades de los factores solubles que se producen durante la generación de linfocitos T reguladores.

1.3.2 Objetivos Específicos

- a. Generación de Tregs utilizando medio condicionado de iTregs.
- b. Caracterización fenotípica de Tregs generados utilizando el medio condicionado de iTregs.
- c. Demostrar mediante ensayos de supresión la funcionalidad de los Tregs generados utilizando el medio condicionado de iTregs.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Ratones

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de ratones: Balb/c (haplotipo H-2^d), C57BL/6 (haplotipo H-2^b), y el knock-in de GFP bajo el promotor de Foxp3 (Foxp3-GFP) en un background C57BL/6 (haplotipo H-2^b).

Todas las cepas de ratones se adquirieron en The Jackson Laboratory (Bay Harbor, USA) con excepción de la cepa Foxp3-GFP, que fue donada por el Dr. Randolph Noelle, King's College, London.

Los ratones se albergaron en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la Fundación Ciencia para la Vida. La manipulación de los animales se realizó de acuerdo a las normas de bioética de CONICYT y a las normas institucionales de la Fundación Ciencia para la Vida y la Facultad de Ciencias Universidad de Chile.

2.2 Anticuerpos y reactivos

Para la caracterización fenotípica de las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de eBioscience CD4 FITC (clon RM4-5), CD4 APC-H7 (clon GK1.5), CD25 PE (clon PC65.5), CD25 APC (clon PC65.5), Foxp3 PE-Cy7 (clon FJK-16s), control de isotipo Foxp3 (IgG 2a PE-Cy7, clon eBR2a), CD39 PE (clon 24DMS1), CTLA-4 PE (clon UC10-4F10-11), CD101 APC (clon RM101), CD103 FITC (clon M290), GARP PE (clon

YGIC86). Los siguientes anticuerpos se obtuvieron de BD Bioscience: B220 PE-CY7 (clon RA3-6b2), CD19 APC-H7 (clon 1D3), CD11c PE (clon HLE) e I-A^d FITC (clon ams-32-1) y de Biolegend: HELIOS ALEXA 647 (clon 22F6).

Para la activación de LT para los ensayos de supresión se utilizó el anticuerpo α -CD3 de eBioscience (clon 145-2C11).

Para la generación de Tregs se utilizó medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 2-mercaptoetanol 50 μ M (Invitrogen), Fungizona 0,25 μ g/ml (Invitrogen), 10% de suero fetal bovino (SFB)(Invitrogen), TGF- β (eBioscience) [2 ng/ml], IL-2 (eBioscience) [10 ng/ml] y RA (Sigma-Aldrich) [10 nM].

2.3 Purificación de células presentadoras de antígeno (APC) y células dendríticas de bazo (DC)

La preparación de APCs se hizo a partir de esplenocitos obtenidos de bazo de ratones Balb/c. Esta preparación está compuesta de células dendríticas (DC), linfocitos B, macrófagos, células mieloides supresoras y otras poblaciones celulares no identificadas (ver figura 3 en resultados).

Para la purificación de las APC, el bazo se disgregó mecánicamente y se resuspendió en 5 ml de PBS + 10% suero fetal bovino (SFB). Los tejidos se digirieron en presencia de 1 mg/ml de colagenasa D (Roche) y 20 μ g/ml de DNAsa I (Sigma), durante 45 minutos a 37°C en agitación. Posteriormente, la suspensión celular se pasó

a través de *cell strainers* de 70 μ m y los glóbulos rojos se lisaron resuspendiendo en 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron una vez con 10 ml de PBS + 0.5% SFB + 2 mM EDTA (buffer MACS) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C en agitación con 100 μ l de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec) por cada 1x10⁸ de células en un volumen final de 400 μ l de buffer MACS.

Se utilizó una preparación enriquecida en DCs, para los ensayos de supresión y de tolerancia infecciosa que se obtuvo de la misma manera que en el protocolo anterior solo que se utilizó 30 μ l de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec) por cada 1x10⁸ de células en un volumen final de 300 μ l de buffer MACS.

En ambos casos, luego de la incubación con MACS anti-CD11c, las células se lavaron una vez con 10 ml de buffer MACS, se resuspendieron a 1x10⁸ células/ml en buffer MACS y se seleccionaron positivamente usando un magneto (VarioMACS, Miltenyi Biotec). En ambos tipos de preparaciones se colectó la fracción positiva la cual contiene la fracción enriquecida en células CD11c⁺. El porcentaje de células dendríticas y linfocitos B en estas preparaciones se verificó por citometría de flujo mediante la expresión de CD11c, I-A^d, B220 y CD19. Además se utilizaron otros anticuerpos como F4/80, GR-1, CD11b y CD3 para analizar la existencia de otras poblaciones celulares en la preparación

2.4 Purificación linfocitos T vírgenes (CD4⁺CD25⁻)

Los linfocitos T vírgenes (LT vírgenes) se obtuvieron a partir del bazo de un ratón por selección inmunomagnética negativa (*untouched*). Para ello se perfundió un bazo de ratón con RPMI + 10% SFB y las células se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente se lisaron los glóbulos rojos con 2 ml de solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 10 ml de buffer MACS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Luego se resuspendieron en 40 µl de buffer por cada 1x10⁷ células, se agregó 10 µl de Biotin-Antibody Cocktail por cada 1 x10⁷ células totales y se incubaron durante 10 minutos a 4°C en agitación. Posteriormente, sin lavar las células, se agregaron 20 µl de partículas anti- Biotin por cada 1 x10⁷ más 30 µl de buffer MACS por cada 1 x10⁷ de células totales y se incubaron por 20 minutos más a 4°C en agitación. Transcurrido este tiempo las células se lavaron una vez con 10 ml de buffer MACS, se resuspendieron a 1x10⁸ células/ml en buffer MACS y se recolectó la fracción negativa la cual contiene las células CD4⁺ totales. Previa centrifugación, las células se resuspendieron en 100 µl de buffer MACS por cada 1 x10⁷ de células y se agregó 1µl del anticuerpo anti-CD25 PE por cada 1 x10⁷ de células. Se incubaron con agitación por 15 minutos a 4°C, luego se lavaron con 10 ml de buffer MACS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente las células se resuspendieron en 80 µl de buffer MACS por cada 1 x10⁷ células y se agregaron 20 µl de partículas anti-PE por cada 1 x10⁷ células. Se incubaron con agitación por 20 minutos a 4 °C. Transcurrido este tiempo se lavaron con 10mL de buffer MACS y se centrifugaron 600 x g por 7

minutos a 4°C. A continuación las células se resuspendieron a 1×10^8 células/ml en buffer MACS y se seleccionaron colectando la fracción negativa la cual contiene las células $CD4^+CD25^-$ (linfocitos T vírgenes). El porcentaje de células $CD4^+CD25^-$ se verificó por citometría de flujo. Obteniéndose purezas entre 89-93%.

2.5 Generación de Tregs alogénicos utilizando citoquinas exógenas o medio condicionado (MC)

Para generar Tregs alogénicos, se realizaron co-cultivos de APCs provenientes de ratones Balb/c con LT vírgenes ($CD4^+ CD25^-$) de ratones C57BL/6 ó GFP-FoxP3. Para ello se utilizó APCs y LT vírgenes purificados de acuerdo a los protocolos anteriormente descritos.

Las APCs (2×10^4 células/pozo) se co-cultivaron con LT vírgenes ($1,4 \times 10^5$ células/pozo) en medio de co-cultivo (IMDM + 10% SFB + fungizona + 2ME) en placas de 96 pozos de fondo redondo (Orange Scientific). Los co-cultivos se realizaron en un volumen final de 200 μ l por pozo, en presencia o ausencia de TGF- β [2 ng/ml], IL-2 [10 ng/ml], RA [10 nM] (TILRA). En algunos experimentos se utilizó medio condicionado por iTregs obtenido de un cocultivo de 6 días. El medio condicionado recuperado permaneció a 4°C y fue utilizado en menos de 24h después de ser recuperado.

Al cabo de 6 días de co-cultivo se recuperaron las células y se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de Foxp3 y otros marcadores característicos de linfocitos T reguladores inducidos (iTregs). Además se analizó la producción de citoquinas mediante análisis CBA (*Cytometryc Bead Array*).

2.6 Citometría de flujo y marcaje intracelular

Para la detección de moléculas de superficie, las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C con Fc-block en PBS + 2% SFB y a continuación sin lavar se incubaron las células por 30 minutos a 4°C en oscuridad con las correspondientes combinaciones de anticuerpos a la dilución adecuada. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS + 2% SFB para lo cual se centrifugaron a 600 x g durante 5 minutos a 4°C.

Para el marcaje intracelular, luego del marcaje de superficie las células se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en buffer de permeabilización y fijación 1X (Foxp3 staining kit, eBioscience) por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células se lavaron con 700 μ l del buffer de permeabilización 1X (Foxp3 staining kit, eBioscience) y se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C. En seguida las células se incubaron con los anticuerpos para marcaje intracelular FoxP3, IGg2a, Helios y CTLA-4 por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posterior a la incubación, las células se lavaron con 700 μ l de buffer de permeabilización (Foxp3 staining kit, eBioscience) y se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C. Finalmente las células se resuspendieron en 300 μ l de PBS + 2% SFB para ser analizadas por citometría de flujo. Para los análisis de citometría de flujo se utilizó el programa BD FACS Diva de BD Biosciences y el programa Flow Jo de Tree Star inc.

2.7 Detección de citoquinas en sobrenadantes mediante CBA (Cytometric Bead Array)

La detección de citoquinas en los sobrenadantes de los cocultivos para la generación de linfocitos T reguladores se realizó utilizando Cytometric Bead Array (CBA). El kit para Th1/Th2/Th17 de ratón (Cytokine Kit BD Bioscience) fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit permite detectar simultáneamente IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 por citometría de flujo. Se utilizaron 11 μ l de sobrenadante a los cuales se les agregó 2 μ l de cada tipo de perla específica para un tipo de citoquina más 11 μ l de *PE Detection Reagent*. Esta mezcla se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se lavaron las muestras con 200 μ l la solución de lavado provista en el kit centrifugándolas a 250 \times g durante 5 min, luego se resuspendieron en 300 μ l de la solución de lavado y se midió la concentración de citoquinas por citometría de flujo. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa BD CBA Software (BD TM).

2.8 Separación de linfocitos T reguladores por cell sorting

Luego del co-cultivo, los linfocitos T reguladores generados fueron aislados mediante *cell sorting*. Para esto se recuperaron las células de la placa y se lavaron con PBS + 2% SFB, se centrifugaron a 600 \times g por 5 minutos a 4°C. Enseguida las células se resuspendieron a una concentración de 1 $\times 10^7$ células/ml en PBS + 2% SFB y se incubaron por 20 minutos a 4°C en oscuridad con los anticuerpos anti-CD4 APC-H7 y anti-CD25 PE a la dilución adecuada. Luego se lavaron las células con PBS + 2% SFB centrifugándolas a 600 \times g por 5 minutos a 4°C y se resuspendieron en PBS + 2%

SFB a una concentración de 1×10^7 células/ml. En el caso del cell sorting realizado a los linfocitos T reguladores generados a partir de células provenientes del ratón GFP-FoxP3, las células fueron lavadas con PBS+2%SFB y resuspendidas a una concentración de 1×10^7 células/ml.

Las células fueron separadas utilizando un cell sorter (FacsAria, BD Bioscience) seleccionando las células $CD4^+ CD25^{hi}$ para los Tregs generados a partir de linfocitos T vírgenes obtenidos de un ratón C57BL/6 o seleccionando las células GFP^+ para los Tregs generados a partir de linfocitos T vírgenes obtenidos de un ratón GFP-FoxP3.

2.9 Ensayo de supresión

Para evaluar la capacidad supresora de los linfocitos T reguladores alógenicos, linfocitos T $CD4^+CD25^-$ vírgenes, purificados de acuerdo al protocolo descrito anteriormente, se marcaron con carboxyfluoresceína diacetato succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes) previo al cocultivo con APC alógenicas. Para ello, los linfocitos T vírgenes se lavaron 2 veces con PBS de manera de eliminar los restos de suero y se resuspendieron en 1 ml de PBS por cada 1×10^7 células en presencia de CFSE [$5 \mu M$]. Las células se agitaron en vortex por 10 segundos y luego se incubaron durante 10 minutos con agitación suave, en oscuridad y a temperatura ambiente. Al cabo de la incubación, se les agregó un volumen de SFB por las paredes del tubo y se incubó por un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a un volumen total de 10 ml con medio IMDM + 10% SFB, se centrifugaron a $600 \times g$ por 7 minutos a

4°C. Finalmente las células se resuspendieron a 5×10^6 células/ml en medio de cocultivo.

Para el ensayo de supresión se co-cultivaron linfocitos T efectores marcados con CFSE ($0,5 \times 10^6$ células/pozo) con DCs (1×10^6 células/pozo) en presencia de anti-CD3 [$1\mu\text{g/ml}$]. Estos co-cultivos se realizaron en presencia o ausencia de Tregs obtenidos mediante cell sorting. Se utilizaron dos proporciones diferentes de LT vírgenes versus Tregs; 1:1 ($0,5 \times 10^6$ LT vírgenes y $0,5 \times 10^6$ Tregs) y 1:2 ($0,5 \times 10^6$ LT vírgenes y 1×10^6 Tregs). Los co-cultivos se realizaron en medio de co-cultivo (IMDM + 10% SFB + fungizona + 2ME) en un volumen final de 200 μl por pozo y en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Al cabo de 3 días, los linfocitos T efectores se analizaron por citometría de flujo para determinar los ciclos de división celular mediante dilución de la marca de CFSE.

2.10 Ensayo de Tolerancia Infecciosa

Para determinar si los Tregs alogénicos generados *in vitro* poseen la capacidad de inducir la expresión de FoxP3 en LT vírgenes, se realizaron cocultivos de LT vírgenes de un ratón C57BL/6 y Tregs alogénicos GFP-FoxP3 obtenidos por cell sorting. Como control se utilizaron LT activados. Se utilizaron $0,5 \times 10^6$ LT vírgenes mas $0,5 \times 10^6$ ya sea de Tregs o LT activados como control por pozo. En las condiciones a las que se agregó DC, se adicionaron $0,02 \times 10^6$ células por pozo. Los co-cultivos se realizaron en medio de co-cultivo (IMDM + 10% SFB + fungizona + 2ME) en un volumen final de 200 μl por pozo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las

células se mantuvieron a 37°C a 5%CO₂ durante 3 días. Transcurrido este tiempo se analizó la expresión de FoxP3, CD4 y CD25 en la población GFP⁺ mediante citometría de flujo.

2.11 Análisis Estadístico

Los gráficos de barras son presentados como la media \pm la desviación estándar. Para el análisis estadístico y el diseño de los gráficos se usó el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.), utilizando el test de ANOVA de una vía con posterior test de comparación múltiple de Bonferroni.

3. RESULTADOS

3.1 GENERACION DE TREGS MEDIANTE LA ADICION DE MEDIO CONDICIONADO DE TREGS ALOGENICOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la capacidad de Tregs para generar o inducir la generación de Tregs. Este proceso puede llevarse a cabo de manera directa o indirecta. Esto significa que los Tregs actúan directamente, es decir mediante contacto celular con LT vírgenes para transformarlos en Tregs, o bien, los Tregs producen factores solubles que permiten la generación de Tregs.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que es posible generar Tregs a partir de LT vírgenes cultivados con APC en presencia de TGF- β , IL-2 y RA (TILRA). Estos Tregs generados expresan FoxP3 y una serie de marcadores característicos de Tregs, además poseen capacidad supresora *in vitro* e *in vivo* mejorando la aceptación de trasplantes alogénicos (C. Moore, Tesis doctoral 2010). Previa a la generación de Tregs, se analizaron los componentes celulares del cocultivo entre LT vírgenes y APCs alógenicas. Los LT vírgenes (CD4⁺CD25⁻) se obtuvieron de bazo de un ratón C57BL/6 (H-2^b) mediante selección inmunomagnética (ver figura 2). Las APCs provienen de un bazo de un ratón Balb/c (H-2^d), donde el resultado de la purificación inmunomagnética se muestra en la figura 3. Cabe señalar que en el caso de las APCs, se obtiene un conjunto de poblaciones celulares entre las cuales se encuentran células dendríticas (DC), linfocitos B, células mieloides supresoras y macrófagos, entre otros (Moore y cols, 2010). Para todos los experimentos realizados siempre se obtuvo alrededor de un 20-30% de células dendríticas (CD11c⁺ IAd⁺) y

entre un 40-50% de linfocitos B ($B220^+ CD19^+$) así como una contaminación de linfocitos T (población $CD3^+$) que fue siempre inferior al 10% del total de células obtenidas (Figura 3)

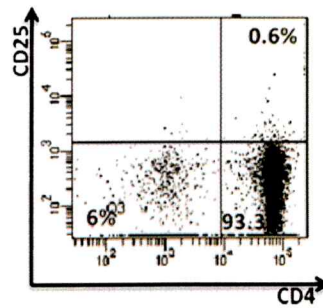


Figura 2. Fenotipo LT vírgenes utilizados para la generación de Tregs. Esplenocitos de un ratón C57BL/6 fueron utilizados para ser purificados mediante selección negativa y así obtener la fracción enriquecida en linfocitos T $CD4^+$. Luego se eliminó la fracción $CD25^+$ marcando con un anticuerpo anti- $CD25$ acoplado a ficoeritrina y beads inmunomagnéticas anti-ficoeritrina.

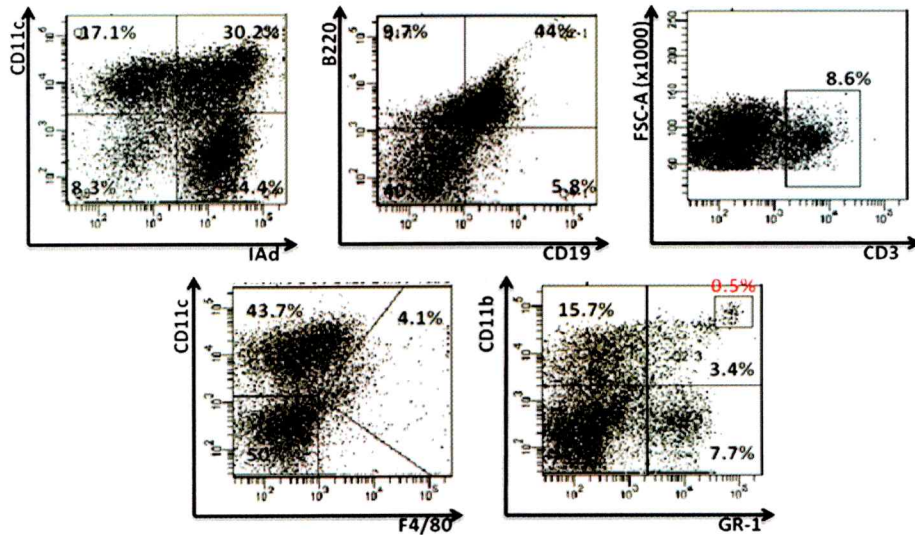


Figura 3. Fenotipo APCs utilizadas para la generación de Tregs. Se extrajeron esplenocitos de un ratón Balb/c y se purificaron mediante beads anti-CD11c colectando la fracción enriquecida en células CD11c⁺. Se muestran los marcajes para células dendríticas (CD11c⁺IAd⁺), para linfocitos B (CD19⁺B220⁺), para macrófagos (CD11c intermedio F4/80⁺) y para células mieloides supresoras en rojo (GR-1^{hi}CD11b^{hi}). Además se muestra la contaminación por linfocitos T (CD3⁺)

Los LT vírgenes y las APCs purificadas se cocultivaron por 6 días a 37 °C y 5% CO₂, luego de lo cual se analizó la expresión del factor de transcripción FoxP3 mediante citometría de flujo. En la condición donde se adicionó TILRA se obtuvo sobre un 50% de células FoxP3⁺CD25⁺ dentro de la población CD4⁺, mientras que en ausencia de TILRA (LT act) se observa solo un 2-3% de células FoxP3⁺. Como esperado en ausencia de TILRA se obtiene sobre el 50% de células activadas en base a la expresión de CD25. La población CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ obtenida en la condición TILRA corresponde en general a un 15-20% de las células totales (Figura 4)

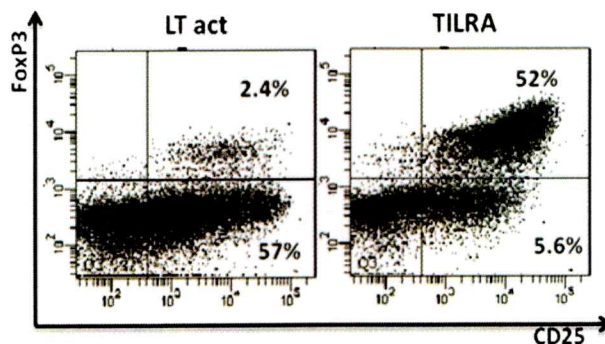


Figura 4. La adición de TILRA genera un alto porcentaje de Tregs. Análisis por citometría de flujo de la expresión de FoxP3 en los linfocitos T CD4⁺ cocultivos con APC alogénicas en presencia o ausencia de TILRA. Los valores en negro corresponden al total de células positivas dentro de la población CD4⁺.

En seguida analizamos el efecto de cada citoquina (TGF- β , IL-2 y RA) por separado en la generación de Tregs. Para esto se realizaron cocultivos entre LT vírgenes y APCs en presencia de cada una de estas citoquinas por separado y en distintas combinaciones. Posterior a los 6 días de cocultivo se analizó la expresión de FoxP3 como se muestra en la figura 5. En acuerdo con datos de la literatura (Fantini y cols, 2004), sólo se observó generación de células FoxP3⁺ en las condiciones a las que se añadió TGF- β y este efecto se vio potenciado al agregar RA (de un 2.7% en la condición con TGF- β a un 15.6% en la condición con TGF- β /RA de células FoxP3⁺ dentro de la población CD4⁺) (Chen y cols, 2003) (Benson y cols, 2007)(Nolting y cols, 2009). La adición de IL-2 generó un aumento en la inducción de FoxP3⁺ en presencia de TGF- β y RA donde se generó un 62% de células FoxP3⁺ dentro de la población

CD4⁺. Por lo tanto, la condición óptima para la generación de Tregs es aquella en la que se agrega TGF- β , IL-2 y RA.

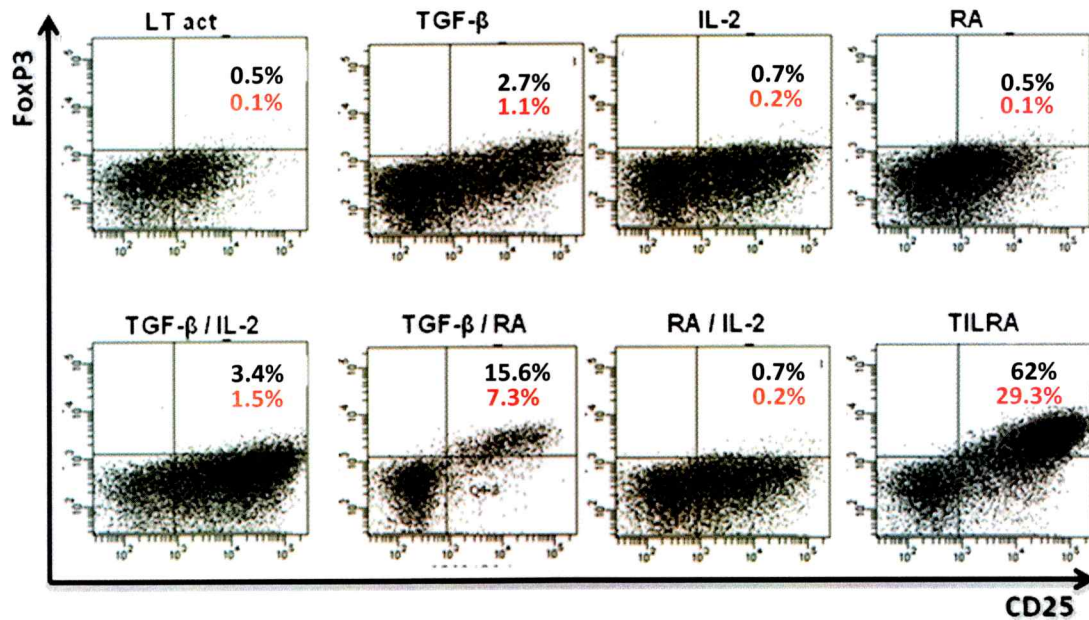


Figura 5. TGF- β y RA actúan en sinergia para potenciar la generación de Tregs. Análisis por citometría de flujo de la expresión de FoxP3 en los linfocitos T CD4⁺ en los cocultivos realizados en las distintas combinaciones de citoquinas. Los valores en negro corresponden al total de células positivas dentro de la población CD4⁺, mientras que en rojo se muestra el porcentaje de células positivas totales. Resultado representativo de tres experimentos independientes.

Además en los sobrenadantes de los cocultivos analizamos citoquinas características de LT polarizados hacia un fenotipo Th1/Th2/Th17 como IFN- γ , IL-17 e IL-4. (tabla 1). Aquellas condiciones en la que se observó una mayor generación de Tregs, TGF- β /RA (15.6%) y en mayor medida TILRA (62%), presentaron una baja producción de citoquinas durante el cocultivo al compararlas con el resto de las condiciones medidas como se muestra en la tabla 1. La presencia de TGF- β en el cocultivo genera una disminución en la producción de citoquinas si se compara con la condición de linfocitos T activados (LT act). En la literatura se encuentra descrito este efecto inhibitorio de TGF- β sobre la expresión de T-bet y GATA3 factores transcripcionales maestros de linfocitos Th1 y Th2 respectivamente (Park y cols, 2005) (Gorelik y cols, 200) (Lin y cols, 2005). Esto explicaría la baja producción de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10. La baja producción de IL-2 en presencia de TGF- β también se encuentra descrita en la literatura (Brabletz y col, 1993). Esta inhibición sería uno de los mecanismos mediante el cual TGF- β inhibiría la proliferación celular. En el caso de IL-6 e IL-17, se encuentra descrito que TGF- β induciría la expresión de IL-6 en algunas poblaciones celulares (Turner y cols, 1990)(Ge y cols, 2010), sin embargo este efecto no se observó en las células presentes en el cocultivo. Esta baja producción de IL-6 explicaría la baja producción de IL-17 pues es necesaria la presencia de TGF- β e IL-6 para la generación de linfocitos Th17 productores de IL-17 (Veldhoen y cols, 2006). Este efecto inhibitorio en la producción de citoquinas de TGF- β se ve disminuido cuando se agrega IL-2 al cocultivo observando un incremento en la producción de citoquinas Th1/Th2/Th17. La inhibición producida por TGF- β en la producción de citoquinas se ve potenciada al agregar RA al cocultivo lo que permite concluir que existe un efecto sinérgico entre TGF- β y RA lo que induce la expresión de FoxP3 en los

LT vírgenes inhibiendo la generación de LT polarizados hacia respuestas Th1/Th2/Th17, lo que se refleja en la baja producción de las citoquinas medidas.

Tabla 1. TGF- β y RA tienen un efecto sinérgico en la inhibición en la producción de citoquinas Th1/Th2/Th17. En la tabla se presenta la producción de las distintas citoquinas en pg/ml. Además se presenta el error estándar asociado cuando el valor de n es mayor a 1. Se presentan los resultados de los cocultivos presentados en la figura 5.

	NT	TGF- β	RA	IL-2	TGF- β /IL-2	TGF- β /RA	RA/IL-2	TILRA
IL-10	1770 \pm 360	201.5	1048	3247 \pm 1754	2042 \pm 612	36.17 \pm 6.8	3513	79.4 \pm 27
IL-17 ^a	503 \pm 361	229	95	162 \pm 49	424.7 \pm 191	21.5 \pm 17	94.6	108.7 \pm 26
TNF- α	417 \pm 15	102	423	440.7 \pm 7.	233.5 \pm 35.6	39.6 \pm 5.6	385	69.5 \pm 3.3
IFN- γ	2095 \pm 302	270.5	1290	2979 \pm 30	2027 \pm 640	4.25 \pm 0.3	3055	28.6 \pm 1.9
IL-6	208 \pm 48	25.8	377.4	145.7 \pm 35	60.23 \pm 30	10.50 \pm 1.6	245.4	16.9 \pm 2.8
IL-4	13 \pm 2	4.7	35.8	14.35 \pm 3	5.7 \pm 0.4	3.850 \pm 0.2	33.3	2.9 \pm 0.2
IL-2	43 \pm 9	11.6	30.5	421 \pm 237	433.1 \pm 194	6.6 \pm 0.4	177.6	850.4 \pm 224

Posterior a los 6 días de cocultivo, se recuperaron los sobrenadantes de todas las condiciones antes mencionadas en la figura 5 y se utilizaron como medio condicionado en un nuevo cocultivo entre LT vírgenes y APCs alógenicas, es decir, sin agregar citoquinas exógenas aparte de las producidas en el cocultivo. La figura 6 muestra el esquema experimental.

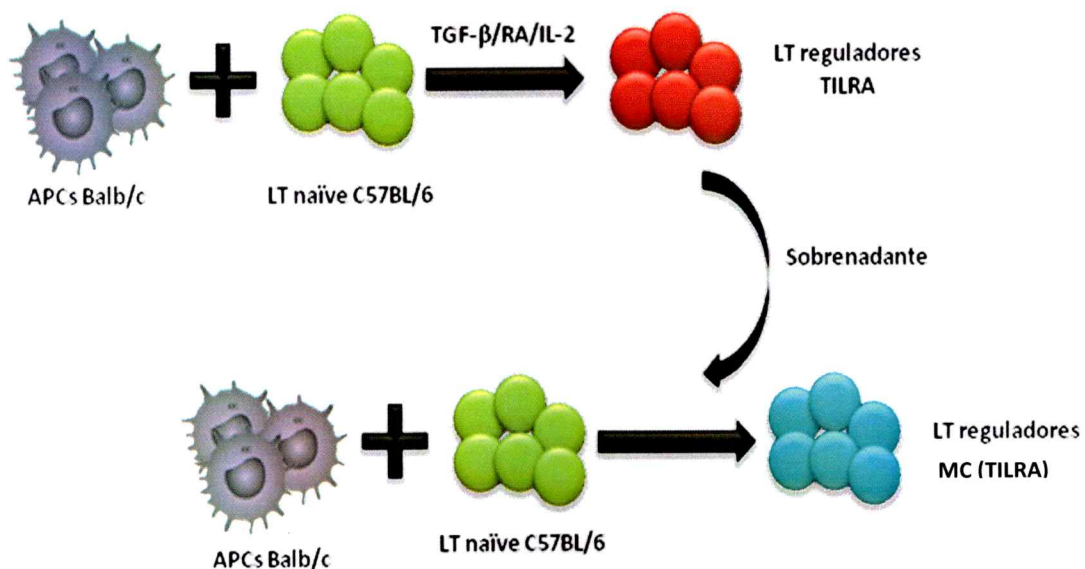


Figura 6. Generación de Tregs con medio condicionado, MC (TILRA). Se cocultivaron $0,14 \times 10^6$ LT vírgenes y $0,02 \times 10^6$ APCs por pozo en una placa de 96 pocillos en presencia de TILRA (TGF- β , RA e IL-2) durante 6 días. Luego se recuperó el sobrenadante de este cocultivo MC (TILRA) y se utilizó para cocultivar nuevamente $0,14 \times 10^6$ LT vírgenes más $0,02 \times 10^6$ APCs por pozo en una placa de 96 pocillos. Luego de 6 días se analizó la expresión de FoxP3 mediante citometría de flujo y se midió la presencia de citoquinas en el medio mediante CBA.

Una vez transcurridos los 6 días de cocultivo se analizó la expresión de FoxP3 mediante citometría de flujo, resultado que se muestra en la figura 7 y la producción de citoquinas mediante CBA (tabla 2).

Es posible observar la generación de Tregs en la condición de MC (TGF- β), MC (TGF- β /RA) y en mayor medida en la de MC (TILRA) con un 6.4%, un 27.9% y un 51.3% respectivamente de células FoxP3⁺ dentro de la población CD4⁺. No se observó presencia de células FoxP3⁺ en ninguna otra condición analizada, solo se observó una alta presencia de células activadas CD25⁺. Por tanto solo se observó generación de Tregs en aquellas condiciones donde se utilizaron medios condicionados donde previamente hubo generación de Tregs (TGF- β , TGF- β /RA y TILRA).

Las condiciones donde hubo generación de Tregs, MC(TGF- β), MC (TGF- β /RA) y MC(TILRA), presentan bajos niveles de citoquinas medidas mediante CBA a diferencia del resto de las condiciones. Este mismo fenómeno es lo que se observó previamente en la generación de Tregs utilizando citoquinas exógenas añadidas al cocultivo de LT vírgenes y APCs.

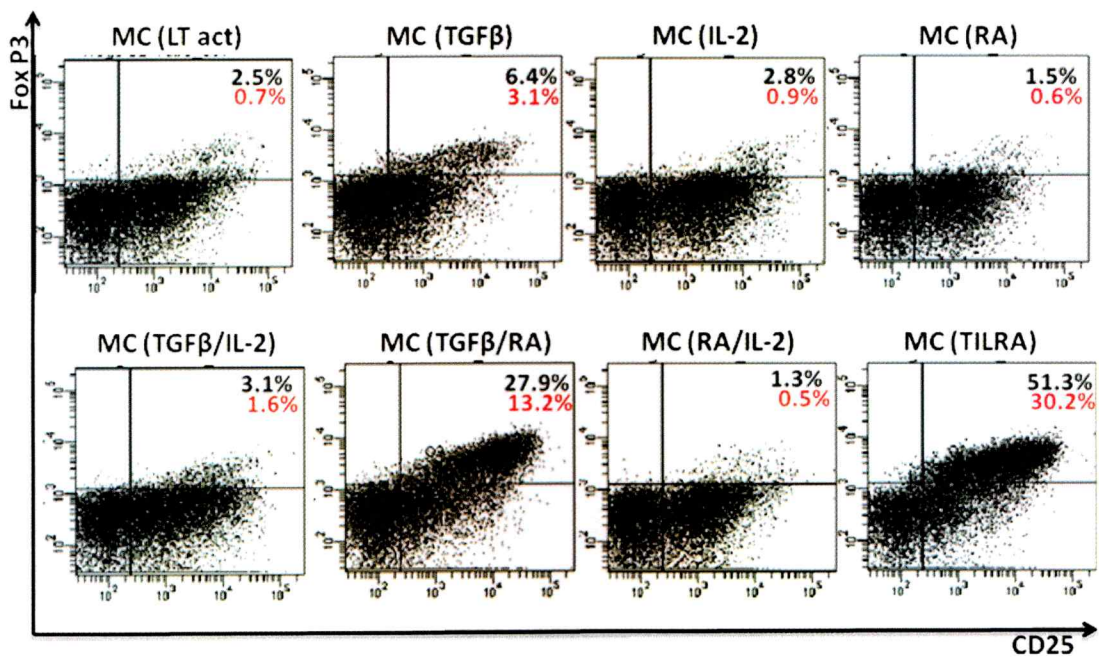


Figura 7. El medio condicionado de las condiciones TILRA y TGF- β /RA inducen la **generación de nuevos Tregs**. Para la generación de Tregs se utilizó el diseño experimental mostrado en la figura 6. Se muestra el porcentaje de células positivas dentro de la población CD4⁺ en negro para cada medio condicionado obtenido a partir del experimento mostrado en la figura 5 y en rojo el porcentaje a partir de total de células. El análisis se muestra a partir de la población CD4⁺. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Tabla 2. El medio condicionado de las condiciones TILRA y TGF- β contienen bajos niveles de citoquinas Th1/Th2/Th17. En la tabla se presenta la producción de las distintas citoquinas (pg/ml), n=1, del experimento de la figura 7.

	MC (LT act)	MC (TGF- β / IL-2)	MC (IL-2)	MC (RA)	MC (TGF- β / IL-2)	MC (TGF- β / RA)	MC (RA/ IL-2)	MC (TILRA)
IL-10	3993.9	2610.0	3611.7	1616.1	850.0	48.7	1379.0	125.1
IL-17 ^a	1001.0	2188.9	538.3	134.9	484.2	254.9	217.9	304.6
TNF- α	552.5	503.3	377.8	509.2	231.0	137.0	382.1	164.6
IFN- γ	4083.5	5000.0	3469.5	1484.5	917.2	39.0	2611.4	54.1
IL-6	742.3	629.2	771.6	936.1	111.9	68.8	742.3	63.7
IL-4	42.5	8.4	39.2	70.4	6.0	3.7	27.4	3.9
IL-2	21.2	66.6	64.6	21.0	20.6	14.4	63.5	158.1

Una posible explicación de los resultados mostrados en la figura 7 es la presencia de TGF- β y RA provenientes del primer cocultivo, pero esto no pudo ser evaluado directamente en este trabajo. Sin embargo evaluamos el efecto de TILRA que fue mantenido a 37°C por 6 días (Medio + TILRA), además de TILRA en presencia de APCs (APCs + TILRA) o LT vírgenes (LTv + TILRA) por 6 días a 37°C. Estas condiciones se compararon con el efecto de medio condicionado obtenido de una generación previa de Tregs (MC(TILRA)) y medio condicionado obtenido de una activación de linfocitos T alógena en ausencia de citoquinas (MC(LT act)). Cabe destacar que los medios condicionados no fueron cuidados en cuanto a la fotosensibilidad del RA.

En la figura 8 se muestra que después de 6 días a 37°C el medio condicionado MC (Medio TILRA) posee remanentes de las citoquinas añadidas inicialmente lo cual permite obtener un 18% de Tregs de los LT CD4⁺ en comparación a un 51% de Tregs obtenido en la condición donde se agregó medio condicionado proveniente de un cocultivo de LT vírgenes y APCs en presencia de TILRA donde se generaron Tregs (MC(TILRA)). Si consideramos que el mayor porcentaje de Tregs se produce cuando el medio condicionado proviene de un cocultivo de APCs y LT vírgenes en presencia de TILRA, esto sugiere un efecto cooperador de los diferentes componentes del cocultivo.

Cuando el medio condicionado proviene de un cultivo de APCs al que se le añadió TILRA (MC (APC+TILRA)) se observa un 28% de células FoxP3⁺, pero si el medio condicionado proviene de un cultivo de LT vírgenes al que se le añadió TILRA (MC (LTv + TILRA)) se produce un mayor porcentaje de Tregs lo que indica que los LT en presencia de TILRA producen factores que potencian TILRA en la generación de Tregs. Cabe notar que el medio condicionado del cocultivo de APCs y LT vírgenes en ausencia de TILRA, no produce Tregs en forma importante (MC (LT act)).

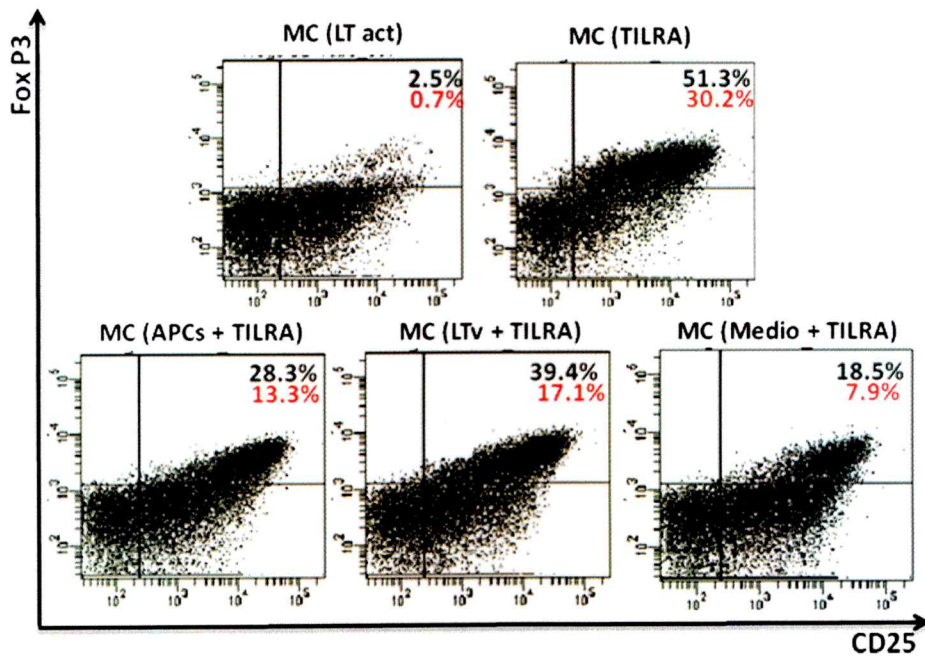


Figura 8. Tregs producen factor(es) soluble(s) que inducen la generación de Tregs.

Se utilizaron medios condicionados obtenidos a partir de la activación alogénica de LT vírgenes en ausencia de citoquinas (MC (LT act)), a partir de una generación previa de Tregs utilizando TILRA (MC(TILRA)), a partir de APCs o LT vírgenes mantenidos en cultivo durante 6 días con TILRA (MC(APCs + TILRA))(MC(LTv + TILRA)) y medio de cocultivo al que se le agregó TILRA mantenido durante 6 días a 37°C (MC(Medio TILRA)) para un posterior cocultivo entre LT vírgenes y APCs alógenicas. Posterior a 6 días se realizó el análisis por citometría de flujo de la expresión intracelular de la expresión de FoxP3. En negro se muestra el porcentaje de células CD25⁺FoxP3⁺ dentro de la población CD4⁺ y en rojo el porcentaje a partir del total. El análisis muestra la población de células CD4⁺

Para comparar la generación de Tregs mediado directamente por TILRA versus la generación utilizando medio condicionado y para profundizar en el mecanismo de generación de Tregs mediado por MC (TILRA), se realizó un cocultivo entre LT vírgenes y APC donde comparamos el efecto de TILRA, de MC (TILRA) y de la combinación del medio condicionado con TILRA más la presencia de TILRA recién preparado en la generación de Tregs. Luego de los 6 días de cocultivo se analizó la expresión de FoxP3 mediante citometría de flujo (figura 9).

La figura 9 muestra un alto porcentaje de células FoxP3⁺ en la condición que contiene TILRA, similar a lo observado en la condición que contiene TILRA más MC (TILRA). Cabe destacar que la condición que contenía solo el MC (TILRA) fue levemente superior en el porcentaje de células FoxP3⁺CD25⁺ dentro de la población CD4⁺ aunque respecto de las células totales se duplicó el número de células FoxP3⁺ (31.4% v/s 17.5%). Así también cabe notar que no se produjo un efecto sinérgico entre las citoquinas frescas y el MC (TILRA).

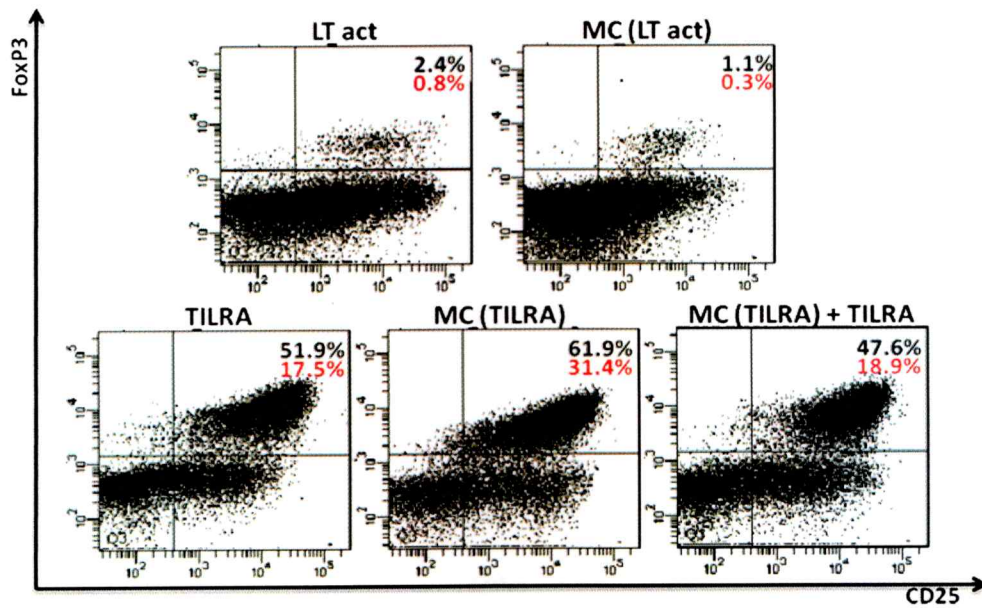


Figura 9. Tregs producen factores solubles con mayor capacidad generadora de Tregs que la utilización de TILRA. Se comparó el efecto de TILRA y de medio condicionado TILRA en la generación de Tregs. En negro se muestra el porcentaje dentro de la población CD4⁺ y en rojo el porcentaje a partir del total. El análisis muestra la población de células CD4⁺. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Por lo tanto es posible sugerir que los factores solubles presentes en el medio condicionado Tregs poseen una capacidad generadora comparable a la acción de TGF- β , IL-2 y RA en conjunto.

3.2 CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LOS TREGS GENERADOS UTILIZANDO MEDIO CONDICIONADO MC (TILRA)

Además de la expresión del factor de transcripción FoxP3, los Tregs expresan otros marcadores que aunque no son exclusivos de esta población celular, ya que pueden estar presentes también en linfocitos T activados, permiten en conjunto una mejor caracterización de este subtipo linfocitario. Por lo tanto se comparó la expresión de los distintos marcadores en Tregs generados con TILRA o MC (TILRA).

Específicamente se analizó mediante citometría de flujo la expresión de moléculas asociadas a la función supresora como CD103, CD39, CTLA-4, CD101 y GARP con el fin de determinar posibles mecanismos. Además se analizó la expresión del factor de transcripción Helios que recientemente fue descrito como una herramienta para diferenciar nTregs de los iTregs.

La expresión de CD101 y de CD103 ha sido vinculada a una alta potencia supresora *in vivo* de los Tregs (Fernandez y cols, 2007) (Lehmann y cols, 2002), así como la expresión de GARP ha sido vinculada al nivel de activación que presentarían los Tregs. (Battaglia y cols, 2009) Al analizar la expresión de CD101, CD103 y GARP en los Tregs generados con MC (TILRA), se observa que gran parte de la población CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ presentan estos marcadores en su superficie.

El porcentaje de células FoxP3⁺ que expresan CD101, CD103 y GARP es bastante similar entre los Tregs generados con TILRA y los Tregs generados con medio condicionado TILRA como se muestra en la figura 10A). Al analizar la media de

fluorescencia de la expresión de los tres marcadores que se muestra en la figura 10B) se observa que los Tregs generados con medio condicionado TILRA poseen similares niveles de expresión a los Tregs generados con TILRA. La expresión de estos marcadores por parte de los Tregs generados con medio condicionado daría cuenta de una alta potencia supresora que poseerían estos Tregs.

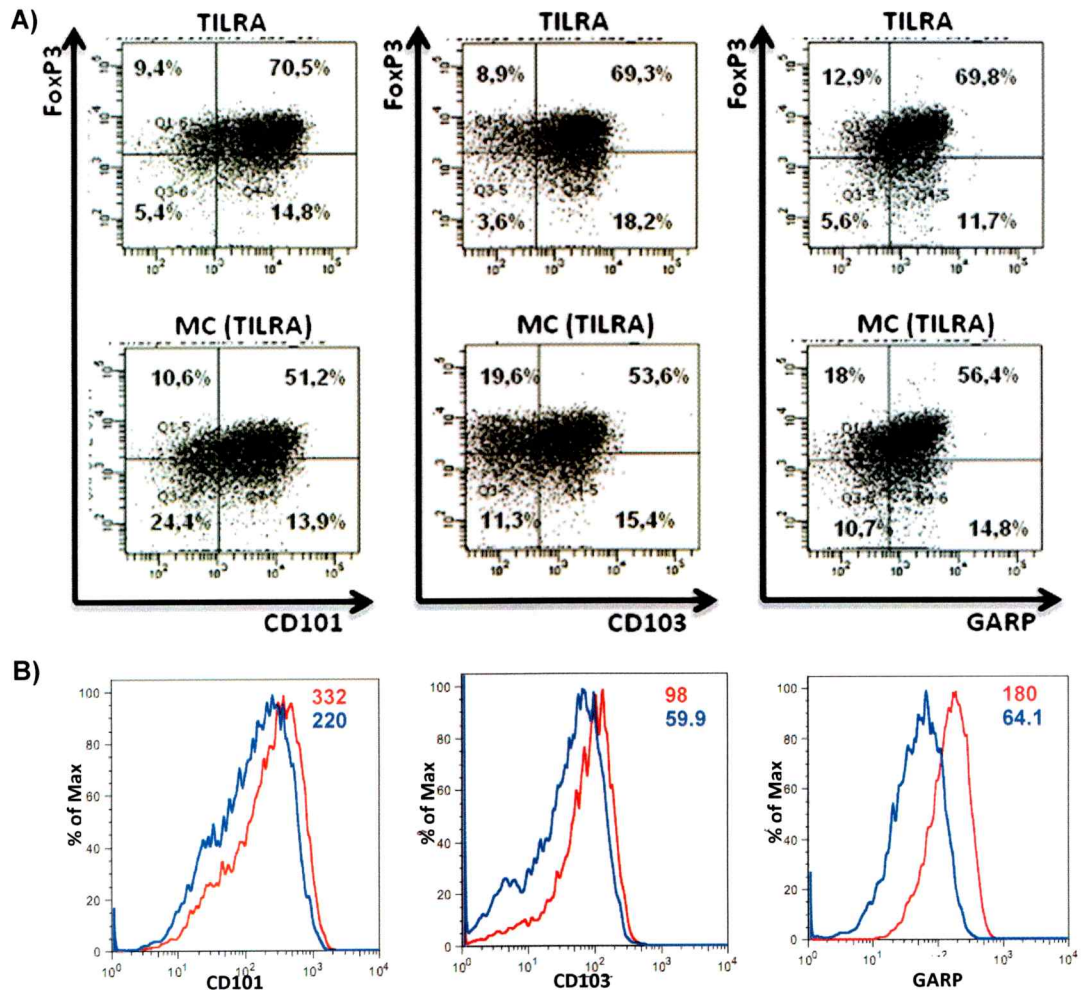


Figura 10. Tregs generados utilizando medio condicionado TILRA expresan marcadores CD101, CD103 y GARP. A) Tregs generados utilizando TILRA como MC (TILRA) expresan en su mayoría CD101, CD103 y GARP. Análisis representativo de dos experimentos independientes. Se muestra el análisis a partir de la población CD4⁺. **B)** Comparación de la expresión de los marcadores CD101, CD103 y GARP para los Tregs generados con TILRA (línea azul) y con MC(TILRA) (línea roja). Se muestra la expresión de los distintos marcadores en la población de linfocitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Las intensidades medias de fluorescencia para los distintos marcadores se muestran en el cuadrante superior derecho, en rojo para los Tregs generados con TILRA y en azul para los Tregs generados con MC(TILRA).

Al analizar la expresión de CTLA-4 y CD39, se observó que la población de Tregs generados con MC (TILRA) expresan ambas moléculas, así como los Tregs generados utilizando citoquinas, como se muestra en la figura 11A) y B). Esto daría cuenta de dos posibles mecanismos de acción de estos linfocitos en su acción supresora. Según la expresión de CTLA-4, los Tregs generados con medio condicionado tendrían la capacidad de actuar sobre DC modulando su función y activación (Read y cols 2006). La expresión de CD39 daría cuenta de otro posible mecanismo de acción supresora que poseerían los Tregs generados con medio condicionado TILRA mediante la disrupción metabólica (Deaglio y cols, 2007).

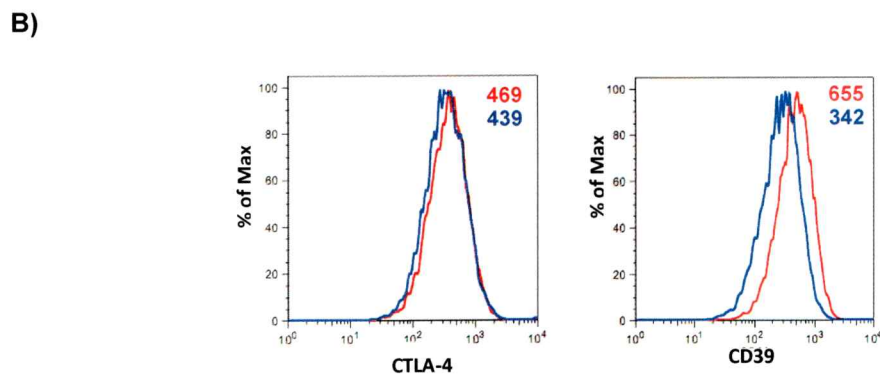
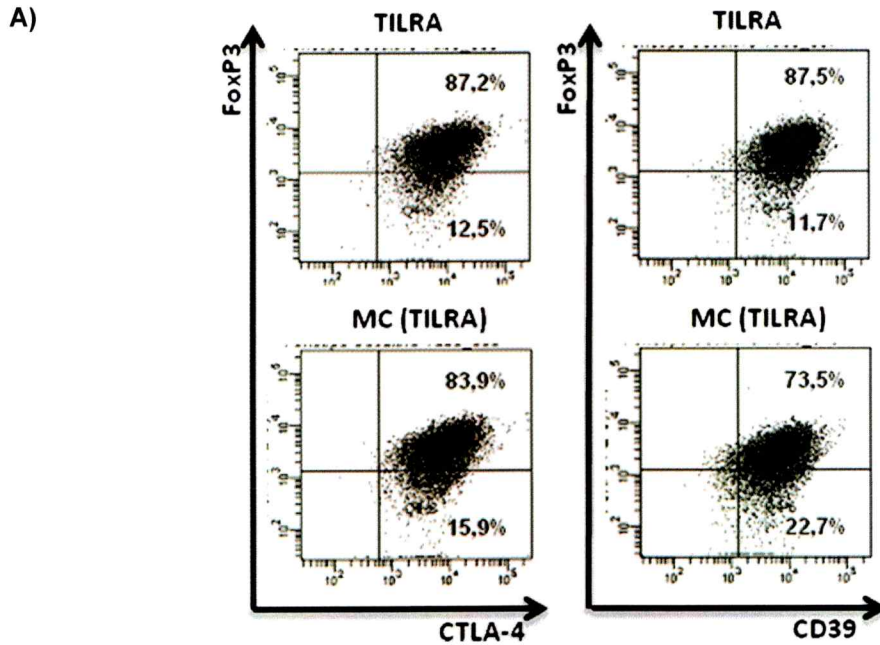


Figura 11. Tregs generados utilizando MC (TILRA) expresan CTLA-4 y CD39. Tanto Tregs generados con MC (TILRA) como generados con TILRA expresan CTLA-4 y CD39. Resultado representativo de dos experimentos independientes. **a)** Se muestra el análisis a partir de la población CD4⁺. **b)** Comparación de la expresión de CTLA-4 y CD39 en Tregs generados con TILRA (línea roja) y Tregs generados con medio condicionado TILRA (línea azul). Las intensidades medias de fluorescencia para los distintos marcadores se muestran en el cuadrante superior derecho, en rojo para los Tregs generados con TILRA y en azul para los Tregs generados con MC (TILRA).

Para determinar si los Tregs generados utilizando TILRA y utilizando medios condicionados TILRA son Tregs inducidos a partir de LT vírgenes o son expandidos a partir de una población inicial de Tregs presente en los cocultivos, analizamos la expresión de Helios. Tanto Tregs generados utilizando TILRA como aquellos generados utilizando MC (TILRA) carecen de la expresión de este factor transcripcional, lo que es coherente con el origen de estas células. La expresión de Helios es observada en nTregs, no así en iTregs como es en este caso, donde iTregs son generados a partir de LT vírgenes y no se debe a una posible expansión de nTregs que podrían estar contaminando la fracción de LT vírgenes utilizados en el cocultivo (figura 12).

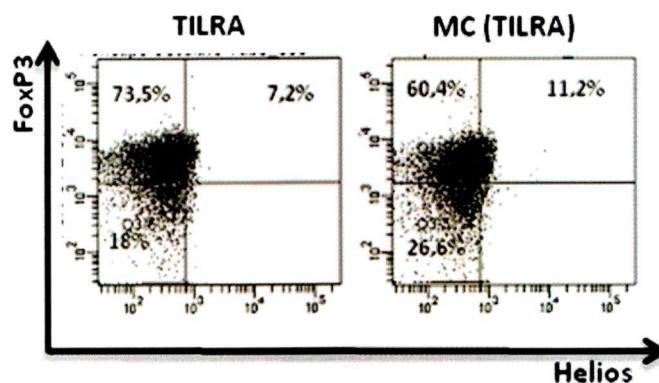


Figura 12. Tregs generados utilizando MC (TILRA) no expresan Helios. La ausencia de Helios demuestra que los Tregs generados en el cocultivo son inducidos y no una expansión de posibles nTregs presentes en el cocultivo. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

3.3 FUNCIONALIDAD DE LOS TREGS

Para demostrar la funcionalidad de los Tregs generados utilizando medio condicionado TILRA se realizó un ensayo de supresión. Se cocultivaron LT vírgenes ($CD4^+CD25^-$) los que fueron marcados utilizando carboxyfluoresceína diacetato succinimidyl ester (CFSE) en presencia de DC y el anticuerpo anti-CD3 (clon activador 145-2C11). El CFSE es un colorante que ingresa a la célula donde enzimas esterasas remueven los grupos acetatos presentes en la molécula permitiendo que el colorante se vuelva fluorescente y realice crosslinking con las proteínas intracelulares. De esta manera es retenido dentro de las células las que al proliferar mediante la duplicación citoplasmática generan una disminución en la intensidad de la fluorescencia del compuesto. Así es posible determinar los ciclos proliferativos de una población celular.

Se realizaron co-cultivos para generar Tregs utilizando sobrenadantes de una generación previa como se muestra en la figura 6. Al día 6 se purificó la fracción $CD4^+CD25^{hi}$ mediante cell sorting (figura 13) y se confirmó que esta fracción contenía al menos un 85% de células $FoxP3^+$. El ensayo de supresión se realizó en presencia de Tregs en las proporciones LT vírgenes: Tregs 1:1 y 1:2. Como control de proliferación los LT vírgenes se cultivaron en ausencia de Tregs.

En la figura 13 se observa que los Tregs generados utilizando medio condicionado inhiben la proliferación de los LT efectores de manera comparable a la inhibición ejercida por Tregs generados utilizando TILRA. Esta inhibición es dosis

dependiente puesto que en la proporción Tregs : LT vírgenes igual a 2:1 la supresión es mayor.

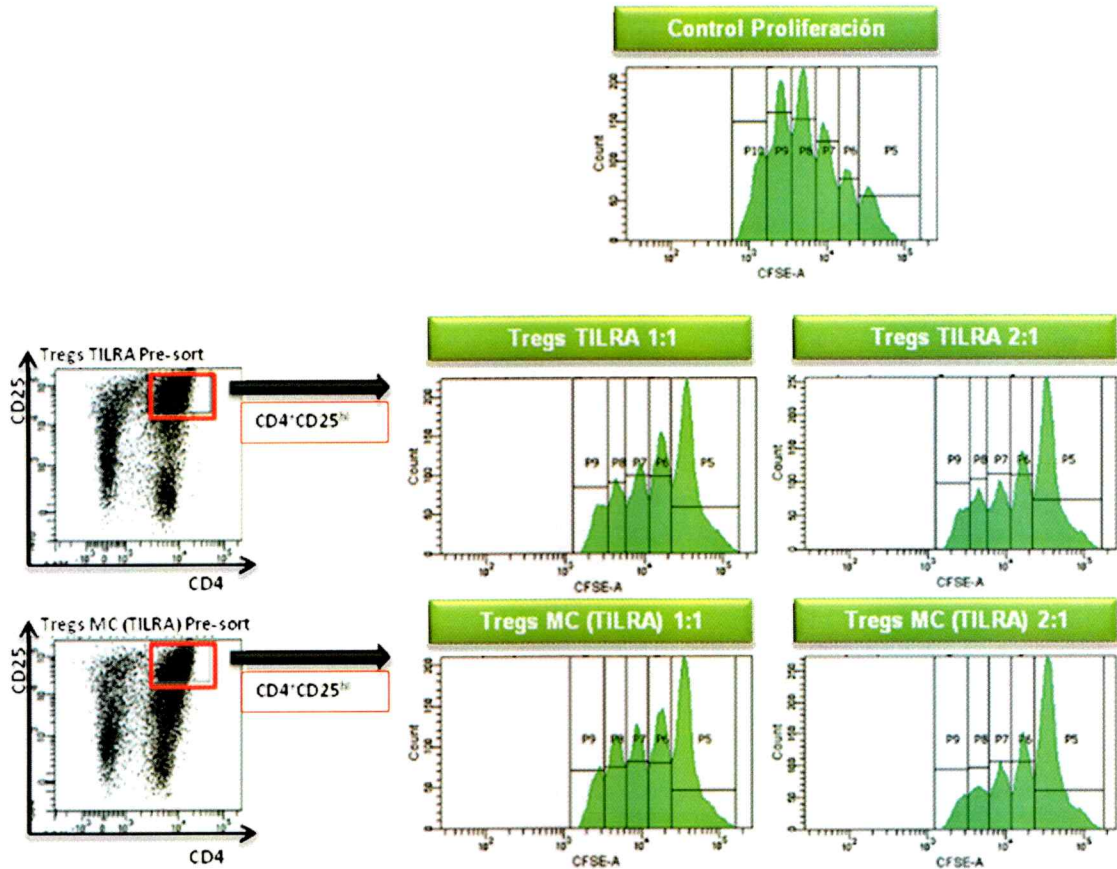


Figura 13. Tregs generados con MC (TILRA) son funcionales *in vitro*. Se generaron cocultivos para generar Tregs utilizando MC (TILRA) a partir de los cuales se aislaron las células CD4⁺ CD25^{hi} mediante cell sorting. Las células seleccionadas se cocultivaron a diferentes razones con LT vírgenes previamente marcados con CFSE, en presencia de DC y anti-CD3 [1ug/ml]. Luego de 3 días se analizó mediante citometría de flujo la dilución de CFSE como marcador de proliferación celular. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Además de evaluar la proliferación de los LT vírgenes, se recolectaron los sobrenadantes de las distintas condiciones del ensayo de supresión y se midió la producción de citoquinas mediante CBA (figura 14).

Se observa que los Tregs generados con MC (TILRA) al igual que los Tregs generados utilizando TILRA no solo suprimen la proliferación celular si no también la producción de citoquinas en el cocultivo. Cabe destacar que en las condiciones donde se añadieron Tregs generados con MC (TILRA) a diferencia de Tregs TILRA se observó en uno de los experimentos una considerable cantidad de IFN- γ . Estos resultados sugieren que esta segunda generación de Tregs además de suprimir la proliferación de LT efectores podría tener otras funciones adicionales en cuanto a su capacidad de producir citoquinas. No se podría descartar la adquisición de un fenotipo proinflamatorio al menos por una parte de la población de MC (TILRA) durante el ensayo de supresión lo que explicaría la presencia de altos niveles de IFN- γ .

Además tanto Tregs generados utilizando TILRA como aquellos generados utilizando medio condicionado TILRA presentan mayores niveles de IL-10 que el control de proliferación lo que podría indicar que la supresión que se observa en estas condiciones podría estar mediada en parte por esta citoquina, lo que se ha descrito previamente en la literatura (Vignali y cols, 2008).

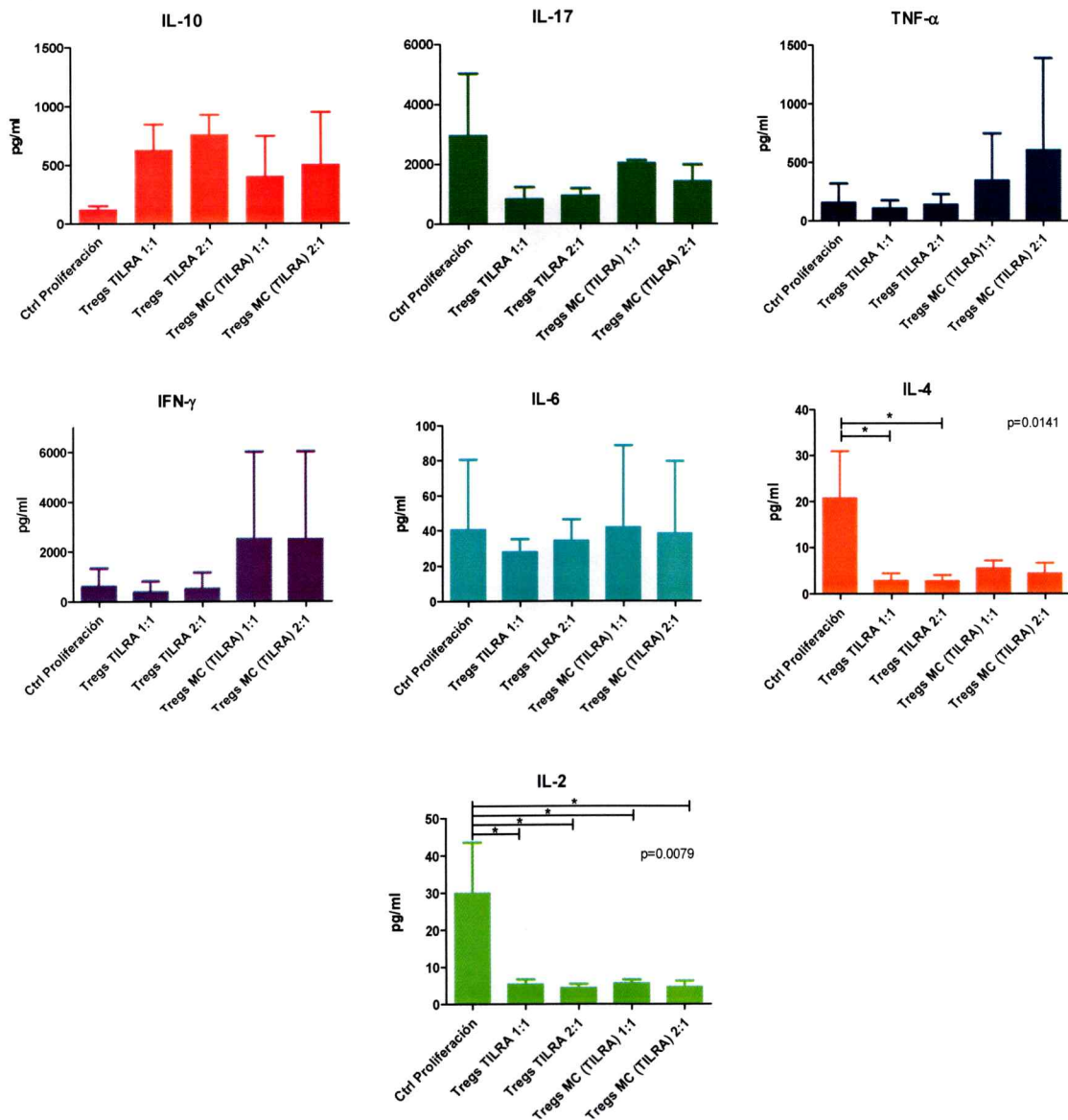


Figura 14. Tregs generados con MC (TILRA) inhiben la producción de citoquinas. La medición de citoquinas se realizó mediante citometría de flujo utilizando el kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes para las condiciones de control de proliferación, Tregs TILRA 1:1 y 2:1 y de dos experimentos para Tregs MC(TILRA) 1:1 y 2:1.

4. DISCUSION

En el presente seminario de título fue posible generar un nuevo protocolo para la generación de Tregs mediante la utilización de medios condicionados obtenidos a partir de una generación previa de Tregs utilizando la combinación de TGF- β , RA e IL-2 exógenos. Los Tregs generados mediante la utilización de medio condicionado TILRA expresan moléculas que denotan, según la literatura, un alto potencial supresor como son CD101, CD103 y GARP. (Fernandez y cols, 2007) (Lehmann y cols, 2002) (Battaglia y Roncarolo, 2009). Además expresan moléculas como CTLA-4 y CD39 que indicarían posibles mecanismos inmunosupresores (Deaglio y cols, 2007) (Sansom y Walker, 2006). Por otra parte ensayos de supresión *in vitro* demuestran la funcionalidad de estos Tregs en la inhibición tanto de la proliferación de linfocitos T efectores así como de la producción de citoquinas en estos cocultivos. Esta capacidad supresora fue comparable a la ejercida por Tregs generados con TGF- β , RA e IL-2 los que han demostrado no solo tener capacidad supresora *in vitro* si no también *in vivo* en modelos de trasplante alogénico (Tesis C. Moore 2010).

En primer lugar discutiremos como ocurre la generación de Tregs durante el primer cocultivo entre LT vírgenes y APCs alógenicas al que se le añaden TGF- β , RA, e IL-2. Está descrito en la literatura que TGF- β induce la expresión del factor de transcripción FoxP3 en LT vírgenes murinos, lo que genera la producción de iTregs en la periferia (Chen y cols, 2003). Esta inducción se ve ampliamente potenciada en presencia de RA, donde existe un efecto sinérgico entre RA y TGF- β lo que se observa en la figura 5, donde la presencia de TGF- β en el cocultivo genera la expresión de FoxP3 en aproximadamente un 3% de la población de LT CD4⁺ lo que se ve incrementado al

añadir RA hasta casi un 16% de células FoxP3⁺. Finalmente el rol de IL-2 tanto en la mantención como en la generación de Tregs está ampliamente descrita (Burchill y cols, 2002) (Davidson y cols, 2007). Por tanto es esperable el efecto que se observa al agregar esta citoquina en conjunto con TGF- β y RA, donde se alcanza el mayor porcentaje de generación de Tregs alcanzando un 62% de células FoxP3⁺ en la población de LT CD4⁺. Este protocolo de generación de Tregs alogénicos induce la producción de Tregs funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* (C. Moore Tesis doctoral, 2010).

La utilización del medio condicionado generado a partir de una generación previa de Tregs utilizando TILRA permite la generación de Tregs que expresan numerosos marcadores de manera similar a los Tregs generados utilizando citoquinas exógenas y que presentan capacidad supresora sobre la proliferación de linfocitos T efectores así como sobre la producción de citoquinas *in vitro*. Esta generación en parte es debida a la presencia de remanentes de TGF- β , RA e IL-2 presentes en el medio condicionado como se observa en la figura 8 donde se suplementó medio de cocultivo con TILRA y se mantuvo durante 6 días a 37°C para luego realizar un posterior cocultivo con este medio condicionado observándose un 18% de células FoxP3⁺. Sin embargo cuando este medio condicionado se genera a partir de un cocultivo de LT vírgenes y APCs alogénicas en presencia de TILRA el porcentaje de células FoxP3⁺ aumenta alcanzando niveles similares a los obtenidos utilizando directamente TILRA (porcentajes superiores a un 50% de las células FoxP3⁺ dentro de la población de linfocitos T CD4⁺) como se muestra en la figura 9. Estos resultados fuertemente sugieren que la generación de Tregs utilizando TILRA produce la liberación de factores solubles que cooperan en la inducción de FoxP3 en los LT vírgenes. Es difícil

determinar el origen de estos factores solubles, sin embargo en base a lo que se observa en la figura 8 donde se generaron medios condicionados a partir de cultivos de APCs solas y LT vírgenes solos, es posible sugerir que los LT producirían factores que tendrían un mayor efecto en la inducción posterior de FoxP3 en los LT vírgenes observándose un mayor porcentaje de células FoxP3⁺; 28% en la condición de MC (APCs + TILRA) versus un 39% en la condición MC (LT vírgenes + TILRA).

En el presente trabajo no fue posible dilucidar la identidad de los factores solubles que serían los responsables de la generación de Tregs al utilizar medio condicionado TILRA. Sin embargo un candidato posible podría ser la recientemente descrita IL-35, la que es producida por Tregs y que tendría efectos sobre la generación, mantención y función de los Tregs (Vignali y cols, 2008)(Collison y cols, 2009a)(Collison y cols, 2009b). Además un estudio reciente del grupo de Vignali vincularía esta citoquina con el fenómeno de tolerancia infecciosa, y de su efecto en la generación de un nuevo subtipo de Tregs que ellos denominaron iT_r-35 (Collison y cols, 2010).

Además del efecto que posee el medio condicionado TILRA sobre la inducción de FoxP3 en los LT vírgenes, también se observó una fuerte inhibición en la producción de citoquinas en este cocultivo como se presenta en la tabla 2. Este efecto también se observa durante la generación de Tregs utilizando directamente TILRA como se presenta en la tabla 1. Este efecto sería al menos en parte ocasionado por la presencia de TGF- β en los cocultivos, ya que su efecto inhibitorio en la producción de citoquinas está ampliamente descrito (Park y cols, 2005) (Gorelik y cols, 200) (Lin y cols, 2005) (Brabletz y col, 1993). En el caso de los medios condicionados, podría deberse a la presencia de TGF- β , pero no es posible descartar que los factores

solubles producidos durante el cocultivo tengan ya sea directa o indirectamente algún efecto sobre la inhibición en la producción de citoquinas.

La ausencia de expresión del factor de transcripción Helios por parte de los Tregs generados utilizando medio condicionado TILRA, como se muestra en la figura 12 permite descartar que se trate de una expansión de nTregs que pudieran encontrarse como contaminación dentro de la fracción de LT vírgenes en el inicio del cocultivo. De esta manera es posible afirmar que la utilización de medio condicionado genera Tregs *de novo* a partir de LT vírgenes.

Finalmente se comprobó la funcionalidad de los Tregs generados utilizando medio condicionado TILRA mediante un ensayo de supresión *in vitro*. En la figura 13 es posible observar la supresión ejercida por estos Tregs, la que es comparable a la que se observa por parte de los Tregs generados directamente con TILRA . En cuanto a la producción de citoquinas, los Tregs generados con TILRA mostraron un mayor efecto inhibitorio que los generados con medio condicionado, observándose una mayor producción de IFN- γ e IL-17 en las condiciones donde se añadieron Tregs generados con medio condicionado. En ese sentido un punto importante sería evaluar la estabilidad de los Tregs generados con medio condicionado, pues la producción de IFN- γ observada durante el ensayo de supresión podría deberse a que parte de la población de Tregs generada con medio condicionado pierda la expresión de FoxP3 y adquiera un fenotipo pro-inflamatorio, fenómeno que ha sido descrito por varios grupos durante los últimos años (Zhou y cols, 2009) y que ha abierto el cuestionamiento acerca de la factibilidad de utilizar Tregs inducidos como herramienta terapéutica. Podría ser que los Tregs generados con medio condicionado estén en vías de

diferenciación hacia otros subtipos linfocitarios y no correspondan a estados terminales de diferenciación, de hecho actualmente se encuentra ampliamente descrito el fenómeno de conversión de Tregs a linfocitos proinflamatorios T helper 17 (Mucida y cols, 2007), lo que daría cuenta de que la diferenciación a Treg podría no ser en todos los casos un estado terminal de diferenciación dándole plasticidad al sistema inmune.

En cuanto a los mecanismos que podrían utilizar los Tregs generados con medio condicionado TILRA para ejercer esta función inmunosupresora, la expresión de CTLA-4 y CD39 da cuenta de dos posibles mecanismos que podrían utilizar. Por una parte directamente modulando la acción de DC y por otra provocando una disrupción metabólica en su entorno afectando a las células colindantes. Además como se presenta en la figura 14, tanto en la condición donde se añaden Tregs generados directamente con TILRA así como en la que se añaden Tregs generados con medio condicionado TILRA se observan mayores niveles en la producción de IL-10 en comparación al control de proliferación. Aunque este resultado sugiere que los Tregs podrían estar produciendo IL-10 lo que se ha descrito como un mecanismo de inmunosupresión (Dieckmann y cols, 2002) (Roncarolo y cols, 2001), esto no puede ser asegurado debido a que a pesar de que la técnica de *CBA* es de gran utilidad pues permite la medición de numerosas citoquinas a la vez utilizando una muy baja cantidad de muestra, no permite determinar el origen de la citoquina medida. Para esto sería necesario complementar este resultado con una medición intracelular de IL-10 en los Tregs posterior al ensayo de supresión.

Aunque se tiene bastante conocimiento en cuanto a la generación de Tregs, existe poca información acerca del fenómeno de tolerancia infecciosa donde Tregs son

capaces de convertir LT vírgenes en Tregs. Una hipótesis sería que este fenómeno ocurriría durante la sinapsis inmunológica donde tanto Tregs como LT vírgenes interactuarían con una misma APC permitiendo su interacción y propiciando la conversión del LT vírgen a Treg. En la actualidad se desconoce el mecanismo molecular mediante el cual los Tregs generarían tolerancia infecciosa. Andersson y cols demostraron en el año 2008 que tanto nTregs como iTregs serían capaces de generar tolerancia infecciosa tanto *in vitro* como *in vivo*, dependiente de TGF- β (Andersson y cols, 2008).

Finalmente, los resultados obtenidos utilizando medio condicionado en la generación de Tregs, nos llevó a preguntarnos si Tregs alogénicos generados *in vitro* tendrían la capacidad de generar tolerancia infecciosa. Con este objetivo se realizó un cocultivo de APCs y LT vírgenes alógenicos en presencia de TILRA para generar Tregs. En este caso se utilizó un ratón GFP-FoxP3 (background C57BL6) como fuente de LT vírgenes. Luego de 6 días de cocultivo, las células FoxP3⁺, en este caso también GFP positivas, fueron sorteadas y nuevamente puestas en cultivo en conjunto con LT vírgenes provenientes de un ratón C57BL6 en presencia o ausencia de APCs alógenicas. Como control se utilizaron LT activados generados a partir del mismo cocultivo que originó a los Tregs. Posterior a 3 días se analizó la expresión de FoxP3 en la población GFP negativa. Como resultado preliminar se muestra la figura 15.

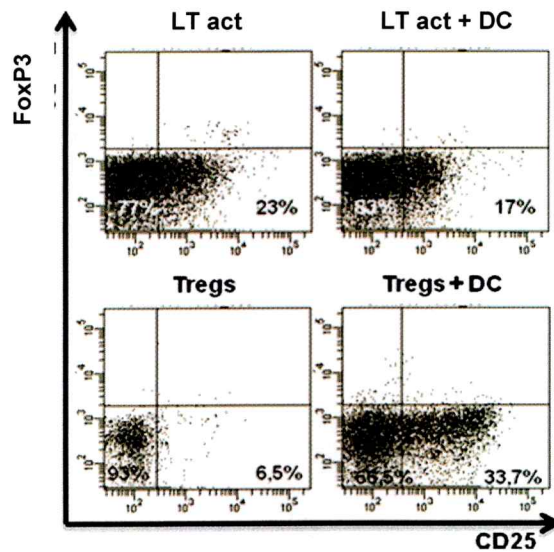


Figura 15. Tregs alogénicos generados *in vitro* no son capaces de generar tolerancia infecciosa. Se cultivaron LT vírgenes en presencia de Tregs sorteados o LT activadas en ausencia de citoquinas exógenas esto en presencia o ausencia de DC. El análisis se realizó en base a la población $CD4^+GFP^-$. Resultado representativo de tres experimentos independientes

Con el diseño experimental utilizado no se observó la inducción de FoxP3 en los LT vírgenes cocultivados con Tregs ya fuera en presencia o ausencia de DC. La diferencia entre el resultado preliminar aquí presentado y el obtenido por el grupo de Andersson quienes si lograron generar tolerancia infecciosa por parte de iTregs *in vitro* podría deberse a diferencias en las condiciones de cocultivo pues ellos realizaron cocultivos entre DC, LT vírgenes y Tregs a los que agregaron α -CD3 e IL-2 o a las diferencias en la generación de los Tregs, ya que este grupo utilizó Tregs generados de manera policlonal utilizando TGF- β e IL-2 y en este trabajo se utilizaron Tregs aloantígeno específicos generados utilizando además de TGF- β e IL-2 RA. Como

proyección se propone estudiar el efecto del RA en la generación de tolerancia infecciosa.

A pesar de este resultado es altamente posible que la inducción de Tregs utilizando medio condicionado, así como el fenómeno de tolerancia infecciosa descrito por el grupo de Andersson, este también mediada por TGF- β , ya sea remanentes del TGF- β que fue adicionado en un inicio a los cocultivos o que podría ser producido por los mismos Tregs generados por TGF- β . Esta idea se ve reforzada por la inducción de CD103 en los Tregs generados con medio condicionado pues la inducción de esta integrina está estrechamente relacionada a la presencia de TGF- β (Lehmann y cols, 2002).

En ambos casos, tanto para la generación de Tregs utilizando medio condicionado así como para la tolerancia infecciosa según el grupo de Andersson, TGF- β tendría un rol muy importante. Sin embargo, una diferencia significativa entre ambos mecanismos sería que este grupo demostró mediante ensayos en membranas transwell la necesidad de contacto para la generación de tolerancia infecciosa. En cambio la utilización de medios condicionados demostraría la existencia de factores solubles generados por los Tregs que permitirían una conversión a distancia sin la necesidad de contacto.

Recientemente se ha descrito la producción de IL-35 por parte de los Tregs, la que tendría una acción inmunosupresora y generadora de Tregs que producen IL-35 y carecen de la expresión de FoxP3 mediante el fenómeno de tolerancia infecciosa (Collison y cols, 2010). No podría descartarse la presencia y acción de esta

interleuquina en el medio condicionado TILRA ni tampoco que exista sinergia entre esta y otros factores presentes en este. Sin embargo, la tolerancia infecciosa descrita por el grupo de Collison generaría Tregs que carecen de la expresión de FoxP3 (Collison y cols, 2010). Como se muestra en la figura 7, la generación de Tregs mediada por MC (TILRA) genera Tregs que expresan FoxP3 lo que descartaría que el mecanismo fuera el mismo descrito por el grupo de Collison. Sin embargo esto podría sugerir que aunque los Tregs alogénicos generados con TILRA no son capaces de generar Tregs FoxP3⁺ si podrían generar células FoxP3⁻ con capacidad supresora mediada por IL-35, también llamados iT₃₅ por el grupo de Vignali y Collison.

Otra teoría que existe en la literatura con respecto a la generación de tolerancia infecciosa atribuye este fenómeno a la acción de Tregs sobre las DC (Cobbold y cols, 2009). El grupo de Waldmann y Cobbold fue uno de los pioneros en describir el fenómeno de tolerancia infecciosa basándose en estudios realizados en modelos de trasplante donde la adición de anticuerpos α -CD4 inducía la expresión de FoxP3 durante la estimulación antigénica in vitro y tolerancia a injertos de piel in vivo en ambos casos de manera dependiente de TGF- β . Esta tolerancia fue asociada a la presencia de Tregs que eran capaces de evitar el rechazo causado por la infusión de LT vírgenes específicos del donante (Cobbold y cols, 2004). Últimos trabajos de este grupo han demostrado la capacidad de los Tregs de inducir la expresión de ciertas enzimas en las DCs. Específicamente enzimas relacionadas con la degradación de aminoácidos como por ejemplo IDO, lo que genera una depleción de aminoácidos en el medio causando una inhibición en la vía de señalización mTOR/PI3K en los linfocitos T colindantes lo que en presencia de TGF- β actuaría en sinergia induciendo la expresión de FoxP3 (Cobbold y cols, 2009).

No es posible determinar con los resultados obtenidos en este seminario si el fenómeno de depleción de aminoácidos podría ocurrir en el medio condicionado. Para poder estudiar si este mecanismo está involucrado en la generación de Tregs mediante la utilización de medio condicionado se tendrían que utilizar herramientas como citometría de flujo y el uso de anticuerpos específicos que permiten el estudio de las vías de señalización, específicamente mTOR/PI3K pues sería la principal vía involucrada en este mecanismo.

Numerosas terapias celulares están siendo desarrolladas utilizando Tregs ya sea en su uso en trasplantes o en numerosas enfermedades autoinmunes como lupus o esclerosis múltiple (Bluestone, 2005). Actualmente la mayoría de estas dolencias se tratan con inmunosupresores los que ayudan a lidiar con las complicaciones pero poseen una serie de efectos no deseados como el desarrollo de neoplasias o inmunodeficiencias asociadas a las que el uso de Tregs específicos podría ser una buena alternativa.

En estos casos el ampliar el conocimiento acerca de la biología de los Tregs es de vital importancia, pues la generación de Tregs sin especificidad conocida podría generar un estado de tolerancia descontrolada que podría desembocar en el mismo efecto causado por el uso de inmunosupresores.

En el presente seminario de título fue posible dilucidar lo que es un nuevo mecanismo mediante el cual Tregs podrían aumentar su número mediante la secreción de factores solubles. Sin embargo no fue posible determinar mediante el diseño

experimental aquí presentado si estos Tregs alogénicos generados *in vitro* tienen la capacidad de generar tolerancia infecciosa.

5. CONCLUSIONES

- Durante la generación de Tregs utilizando la combinación de citoquinas TILRA se producen factores solubles que favorecen la inducción de FoxP3 en LT vírgenes. Nuestros resultados sugieren que los Tregs generados producirían estos factores solubles en un mecanismo que ayudaría a la generación de supresión inmune.
- Los Tregs generados utilizando medios condicionados de una generación previa de Tregs presentan un fenotipo muy similar al de los Tregs generados utilizando TILRA. La expresión de CD39, CTLA-4, CD101, CD103 y GARP denotan la capacidad supresora de los Tregs generados.
- La ausencia de la expresión de Helios indica que los Tregs generados con sobrenadantes corresponden a iTregs y no a la expansión de posibles nTregs contaminantes.
- Mediante ensayos de supresión se demostró la capacidad supresora de los Tregs generados con sobrenadantes. Estos no solo suprimen la proliferación de LT vírgenes si no también la producción de citoquinas durante el cocultivo.
- Los Tregs generados utilizando TILRA no inducen directamente la expresión de FoxP3 en los LT vírgenes descartando posiblemente un mecanismo de tolerancia infecciosa.

6. BIBLIOGRAFIA

Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, Shevach EM (2008) CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine* **205**:1975-1981

Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H (2002) Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature immunology* **3**:756-763

Apostolou I, von Boehmer H (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine* **199**:1401-1408

Battaglia M, Roncarolo MG. (2009). The Tregs' world according to GARP. *European journal of immunology* **39**: 3296-3300.

Belkaid, Y., and K. Tarbell. (2009). Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual review of immunology* **27**: 551-89.

Bennett C, Christie J, Ramsdell F, Brunkow M (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature* **27**:20-21

Benson MJ, Pino-lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1765-1774

Blobe G, Schiemann W, Lodish H (2000) Role of transforming growth factor-beta in human disease. *The New England journal of medicine* **342**:1350-1358

Bluestone J (2005) Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nature Reviews Immunology* **5**: 343-349

Borsellino G., Kleinewietfeld M, Mitri DD, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Ho S, Centonze D, Bernardi G, Luisa M, Acqua D. Rossini PM, Battistini L, Ro O, Falk K. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells : hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**: 1225-1232.

Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E. (1993) Transforming growth factor β and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Molecular and Cell Biology* **13**:1155–1162

Burchill M, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar B, Farrar M (2007) IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* **178**:280-290

Castellani ML, Anogeianaki A, Felaco P, Toniato E, De Lutiis MA, Shaik B, Fulcheri M, Vecchiet J, Tetè S, Salini V, Theoharides TC, Caraffa A, Antinolfi P, Frydas I, Conti P, Cuccurullo C, Ciampoli C, Cerulli G, Kempuraj D. (2010) IL-35, an anti-inflammatory cytokine which expands CD4⁺CD25⁺ Treg Cells. *J Biol Regul Homeost Agents* **24**: 131-135

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ virgin T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* **198**:1875-86

Cobbold S, 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. *The Journal of Immunology* **172**:6003-6010

Cobbold SP, Adams E, Farquhar CA, Nolan KF, Howie D, Lui KO, Fairchild PJ, Mellor AL, Ron D, Waldmann H (2009) Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:12055-60

Collison LW, and Vignali D (2008). Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunological reviews* **226**: 248-62.

Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali D (2009a) Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *Journal of immunology* **182**:6121-8

Collison, LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali, D (2009b) "Induction" of Regulatory T cell Function is IL-35 and IL-10 dependent. *Journal of immunology* **182**: 89.35

Collison, LW., Chaturvedi V., Henderson A. L., Giacomini P. R., Guy C., Bankoti J., Finkelstein D., Forbes K., Workman C. J., Brown S., Rehg J. E., Jones M. L., Ni H.-T., Artis D., Turk M. J., and Vignali D. (2010) IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology* **11**: 1093-1101.

Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun C, 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. *The Journal of experimental medicine* **204**:1757-1764

Curotto De Lafaille M, Lafaille J (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**:626-635

Curotto de Lafaille Ma, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ (2008) Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* **29**:114-126

Davidson T, DiPaolo R, Andersson J, Shevach E (2007) Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *The Journal of Immunology* **178**:4022-4026.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* **204**:1257-65

Dieckmann D, Bruett C, Ploettner H, Lutz M, Schuler G (2002) Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* **196**:247-253

Elias, K. M., A. Laurence, T. S. Davidson, G. Stephens, Y. Kanno, E. M. Shevach, J. J. O'Shea. (2008). Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* **111**: 1013-1020.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre M, Puccetti P (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology* **4**:1206-12

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of immunology* **172**:5149-5153

Fernandez I, Zeiser R, Karsunky H, Kambham N, Beilhack A, Soderstrom K, Negrin RS, Engleman E (2007) CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3⁺ regulatory T cells. *Journal of immunology* **179**:2808-1284

Ge, Q., L. M. Moir, J. L. Black, B. G. Oliver, and J. K. Burgess. (2010) TGFβ1 induces IL-6 and inhibits IL-8 release in human bronchial epithelial cells: the role of Smad2/3. *Journal of cellular physiology* **225**: 846-54.

Gershon RK y Kondo K (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**:903-14

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. (2005) The B7 family revisited. Annual review of immunology **23**: 515-548.

Himmelweit, F. (1956-1960) Collected Papers of Paul Ehrlich. Pergamon, London

Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song S (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. Immunity **21**:527-538

Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk aH (2002) Infectious Tolerance: Human CD25⁺ Regulatory T Cells Convey Suppressor Activity to Conventional CD4⁺ T Helper Cells. Journal of Experimental Medicine **196**:255-260

Khattari R, Cox T, Yasayko S, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. Nature immunology **4**:337-42

Kochetkova, I, Golden S, Holderness K, Callis G, Pascual DW. (2010) IL-35 Stimulation of CD39⁺ Regulatory T Cells Confers Protection against Collagen II-Induced Arthritis via the Production of IL-10. Journal of immunology **184**:7144-7153

Kim CH (2008) Regulation of FoxP3 regulatory T cells and Th17 cells by retinoids. Clinical & developmental immunology **28**:1-12

Lehmann J, Huehn J, Rosa MD, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. (2002). Expression of the integrin $\alpha_E\beta_7$ identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. PNAS **99**: 13031-13036.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AL, Flavell R (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annual review of immunology **24**:99-146

Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk A (2003) Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. Blood **101**:4862-4869

Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nature reviews immunology **4**:762-74

Mora J, Bono M, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh L, Roseblatt M, Von Andrian U (2003) Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* **424**:88–93

Moore C, Tesis Doctoral, Universidad Andrés Bello, 2010.

Moore, C., Sauma D., Reyes P. A., Morales J., Roseblatt M., Bono M. R., Fierro J. A. (2010) Dendritic cells and B cells cooperate in the generation of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) allogeneic T cells. *Transplantation proceedings* **42**: 371-5.

Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille J, de Lafaille M (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *Journal of Clinical Investigation* **115**:1923–1933

Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M (2007) Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* **317**:256-260

Nolting J, Daniel C, Reuter S, Stuelten C, Li P, Sucov H, Kim BG, Letterio J, Kretschmer K, Kim HJ, and von Boehmer H. (2009) Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. *The Journal of experimental medicine* **206**: 2131-2139

Onodera T, Jang MH, Guo Z, Yamasaki M, Hirata T, Bai Z, Tsuji NM, Nagakubo D, Yoshie O, Sakaguchi S, Takikawa O, Miyasaka M (2009) Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *The Journal of immunology* **183**:5608-5614

Qiao M, Thornton AM, Shevach EM (2007) CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells render naive CD4⁺ CD25⁻ T cells anergic and suppressive. *Immunology* **120**:447-455

Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H (1993) "Infectious" transplantation tolerance. *Science* **259**: 974-977

Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, Sharpe A, Powrie F (2006) Blockade of CTLA-4 on CD4+ CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *The Journal of Immunology* **177**:4376

Roncarolo, MG, Bacchetta R., Bordignon C., Narula S, Levings M. (2001). Type 1 regulatory T cells. *Immunological reviews* **182**: 68-79.

Sakaguchi, S., T. Takahashi, S. Yamazaki, Y. Kuniyasu, M. Itoh, N. Sakaguchi, and J. Shimizu. (1995) Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). *The journal of immunology* **155**: 1151-1164.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews* **182**:18-32

Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. (2006). Regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews* **212**: 8-27.

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**: 775-87.

Sansom DM, Walker LS (2006) The role of CD28 and cytotoxic regulatory T-cell biology. *Immunological Reviews* **212**:131-148

Selvaraj, R., and T. Geiger. (2008). Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF- β induced Foxp3+ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance. *The Journal of Immunology*, **180**: 2839-2838

Sun C, Hall J, Blank R, Bouladoux N, Oukka M, Mora J, Belkaid Y (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *Journal of Experimental Medicine* **204**:1757-1764

Svensson M, Johansson-Lindbom B, Zapata F, Jaensson E, Austenaa LM, Blomhoff R, Agace WW (2008) Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8+ T cells. *Mucosal immunology* **1**:38-48

Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM (2010) Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology* **184**:3433-41

Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M (2008) Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology* **9**:194-202

Turner M, Chantry D, Feldmann M. (1990). Transforming growth factor β induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* **2**:211– 216

Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**: 179-189.

Vignali, D, Collison L, Workman C. J. (2008) How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* **8**: 523-32.

Wan YY, Flavell Ra (2005) Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:5126-5131

Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D (2009) Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:13439-13444

Wei S, Kryczek I, Zou W (2006) Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* **108**:426-431

Yoshida, H., Y. Miyazaki, and M. Yoshiyuki. (2008) Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunological reviews* **226**: 234-247.

Zheng S, Wang J, Wang P, Gray J, Horwitz D (2007) IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4⁺ CD25⁻ cells to CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and for expansion of these cells. *The Journal of Immunology* **178**:2018-2027.

Zheng S, Wang J and Horwitz D (2008) Cutting edge: Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-b are resistant to TH17 conversion by IL-6. *The Journal of Immunology* **180**:7112-7116.

Zhou, X., S. L. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, C. Penaranda, M. Martínez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J. a Bluestone. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature immunology* **10**: 1000-1008.