

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

C I B I C I



FCQ

Facultad de
Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica Clínica
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
CIBICI-CONICET

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**IMPACTO DE LA TRISOMÍA 21 EN EL COMPARTIMIENTO DE CÉLULAS T
CIRCULANTES Y SU ASOCIACIÓN CON UNA RESPUESTA EXACERBADA
DE INTERFERONES TIPO I.**

Lic. Paula Araya

Director de Tesis: Prof. Dra. Mariana Maccioni

Esta tesis fue posible gracias a la colaboración del Dr. Joaquín Espinosa y el Linda Crnic Institute for Down Syndrome.

Córdoba, Argentina

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABREVIATURAS	9
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	13
BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÉLULAS T Y SU ROL EN LA RESPUESTA INMUNE.....	14
Mecanismos de diferenciación de la célula T.....	14
Respuesta inmune mediada por células T CD8+	15
Células T CD8+ efectoras	15
Células T CD8+ senescentes.....	16
Células T CD8+ exhaustas.....	17
Factores de transcripción en la diferenciación de células T CD8+.....	19
Respuesta inmune mediada por células T CD4+	21
Células Th: citocinas producidas y funciones	22
Células Treg: citocinas producidas y funciones.....	22
REGULACIÓN DE LA RESPUESTA DE INTERFERONES TIPO I: ROL PROTECTIVO Y PREJUDICIAL.....	26
LA TRISOMIA 21	29
Generalidades de la trisomía 21	29
Anomalías del sistema inmunológico asociadas con la Trisomía	31
La trisomía 21 causa alteraciones en la inmunidad innata.....	31
La trisomía 21 causa alteraciones en la inmunidad adaptativa.....	32
¿La Trisomía 21 podrá ser considerada una interferonopatía?	33
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	36
OBJETIVOS GENERALES Y CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO	37
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	39
OBJETIVO ESPECÍFICO I: INVESTIGAR CÓMO LA TRISOMIA 21 IMPACTA EN EL COMPARTIMIENTO DE CÉLULAS T CIRCULANTES	40

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T CIRCULANTES EN INDIVIDUOS CON TRISOMÍA 21	41
Estudio de la distribución global de las subpoblaciones de células T circulantes en individuos con Trisomía 21	41
Determinación de la distribución vírgenes/memoria en las subpoblaciones de células T circulantes en individuos con Trisomía 21	44
CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS T CD8+ Y CD4+ EN ADULTOS CON TRISOMÍA 21	49
Caracterización fenotípica y funcional de células T CD8+ circulantes en adultos con Trisomía 21	49
Caracterización fenotípica y funcional de las células T CD4+ circulantes en adultos con trisomía 21.	60
ENSAYOS FUNCIONALES DE CÉLULAS T EN INDIVIDUOS CON TRISOMÍA 21	64
OBJETIVO ESPECÍFICO II: ESTUDIAR EL IMPACTO DEL EJE IFN-I/IFNAR SOBRE LA BIOLOGÍA DEL COMPARTIMIENTO DE CÉLULAS T CIRCULANTES EN ADULTOS CON TRISOMÍA 21	74
IMPACTO GLOBAL DE LA TRISOMÍA 21 EN EL PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE CÉLULAS T.....	75
IMPACTO DE LA TRISOMÍA 21 SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE IFN-I EN CELULAS T CIRCULANTES	79
EFECTO DE LOS IFN-I SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS T EN INDIVIDUOS CON TRISOMÍA 21	84
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	91
IMPACTO DE LA TRISOMÍA 21 EN EL SISTEMA INMUNOLOGICO	92
LA TRISOMIA 21 IMPACTA EN LA DISTRIBUCIÓN Y ACTIVACIÓN DE CELULAS T CD8+.....	93
LA TRISOMIA 21 IMPACTA EN LA DISTRIBUCIÓN Y ACTIVACIÓN DE CELULAS T CD4+.....	96
LA TRISOMIA 21 AMPLIFICA LA SEÑALIZACIÓN DE INTERFERONES TIPO I ...	98
OBSERVACIONES FINALES	101
RESUMEN GRAFICO	102

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS	103
REACTIVOS	104
MUESTRAS CLÍNICAS.....	104
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	109
Separación de los componentes de la sangre	109
TECNICAS GENERALES	111
Citometría de flujo.....	111
Citometría de flujo tinción de viabilidad	111
Citometría de flujo de superficie	111
Citometría de flujo intracelular	112
Citometría de masa (CyTOF).....	114
Preparación de la muestra	114
Tinción de anticuerpos para citometría de masa (<i>barcoding</i> , superficie, intracelular y señalización)	114
Separación celular (<i>cell sorting</i>).....	118
Extracción ARN	118
Análisis ARNseq.....	119
Ensayo MSD (<i>Meso Scale Discovery</i>)	120
CULTIVO CELULAR	121
Ensayo de proliferación	121
Ensayo de microsupresión.....	121
Ensayo de microsupresión (utilizando Treg provenientes de PBMCs congeladas)	122
Protocolo de descongelamiento (día 1)	122
Purificación de células Treg y respondedoras a través de la clasificación FACS (día 2)	122
Experimento alogénico, aislamiento de células respondedoras a través de la clasificación FACS (día 5)	123
Configuración del ensayo de microsupresión	123
ANALISIS ESTADISTICO	124

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	125
CAPÍTULO 7: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	146

RESUMEN

RESUMEN

Durante la realización de la presente tesis doctoral se estudió en profundidad el impacto de la Trisomía 21 (T21) sobre el compartimiento de células T circulantes. La T21 causa el síndrome de Down (SD), uno de los trastornos genéticos más frecuentes en humanos, con una incidencia aproximadamente de 1 en 700 nacimientos vivos. Está caracterizado por una alta prevalencia de diversos trastornos autoinmunes, que afectan hasta un 60% de los individuos adultos. Esto sugiere anomalías en la inmunidad adaptativa; sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares que impulsan este fenotipo siguen sin estar claros.

En este trabajo de tesis realizamos una caracterización completa del compartimiento de células T provenientes de sangre periférica en adultos con SD y detectamos múltiples alteraciones comúnmente asociadas con afecciones autoinmunes. Hemos identificado que estos individuos poseen una disminución en los porcentajes de células T vírgenes, mientras que los subconjuntos de células T de memoria y terminalmente diferenciadas (TEMRA) se encuentran aumentados en el subgrupo de células T CD4+ convencionales (CD4+ Tconv) y células T CD8+, respectivamente. Al caracterizar los diferentes subtipos de células T determinamos que adultos con T21 poseen una mayor frecuencia y número de células T CD8+ citotóxicas que muestran un estado de activación mayor, acompañado por un aumento en la expresión de marcadores de senescencia comparado con personas sin SD. Además, observamos un aumento en la frecuencia y número de células T reguladoras (Treg), sin observar cambios en su fenotipo. Por otro lado, determinamos una menor frecuencia de las células T CD4+ Tconv, y éstas presentaban una polarización hacia un perfil Th17. Al estudiar los niveles plasmáticos de IL-17A, detectamos un aumento significativo en personas con SD con respecto a sus controles sin trisomía. Dichas alteraciones generan una desregulación en la homeostasis de células T.

Debido a que las células T CD8+ y CD4+ Tconv presentan un fenotipo de activación exacerbado, decidimos evaluar la funcionalidad de las células Treg para regularlas a través de su capacidad supresora. Al realizar ensayos de supresión de *criss-cross* o “cruzados”, determinamos que las células Tregs CD4+ trisómicas, suprimen tan bien como las células Treg de individuos control o disómicos (D21), pero que las células T efectoras CD8+ y CD4+ Tconv de personas con SD son resistentes a la supresión mediada por células Treg, independientemente del cariotipo de las mismas. A su vez, las células efectoras de personas con SD respondieron más eficazmente a la estimulación con anti-CD3/CD28 *in vitro*, mostrando un aumento significativo de la proliferación y la producción de moléculas efectoras. Esto último, sumado a lo anterior

evidencia un estado proinflamatorio, que podría explicar la alta susceptibilidad a desarrollar trastornos autoinmunes.

Al investigar mediante análisis transcriptómico que vías de señalización desreguladas por la T21 podrían explicar estos cambios indicativos de un estado inflamatorio, identificamos que leucocitos totales presentaban una firma molecular asociada con un estado de hiperactivación de las células T. Éste estado, se correlacionaba positivamente con la fuerte hiperactividad de los interferones tipo I (IFN-I) observado en el análisis transcriptómico de células T. Por otro lado, utilizando citometría de masa unicelular y diseñando un panel de anticuerpos centrado en las vías de activación involucradas en la señalización de los IFN-I, determinamos una sobreexpresión del receptor de interferón de tipo I (IFNAR1) en el compartimiento de células T de personas con T21, lo cual es compatible con la presencia extra en el chr21 del gen que codifica para esta subunidad del receptor. Cuando los leucocitos fueron estimulados *ex vivo* con IFN- α , se observó que éstos presentaban una fuerte hipersensibilidad al mismo, medida por el grado de fosforilación intracelular de los mediadores descritos bajo la vía de señalización de IFNAR.

En conjunto, estos resultados nos indican que la desregulación de las células T está asociada con la hiperactividad del interferón y ésta desregulación podría tener un impacto clínico y promover el desarrollo de las múltiples enfermedades asociadas a la T21.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AGS	<i>Aicardi-Goutières</i>
AIRE	Regulador autoinmune
APP	Proteína precursora amiloide
Barcode	Código de barra
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BTLA	<i>B and T-lymphocyte attenuator</i>
CD25	Subunidad alfa del receptor de IL-2
CDp	Células dendríticas plasmocitoides
CDs	Células Dendríticas
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
chr21	Cromosoma 21
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
CNS	Secuencias no codificadas conservadas
CPA	Células presentadoras de antígeno
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CyTOF	Citometría de masa de tiempo de vuelo
D21	Disomía 21
DEG	Genes expresados diferencialmente
DP	Doble positivas
Eff Treg	Treg efectoras
EOMES	Eomesodermin
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FasL	Ligando Fas
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-related</i>
gMMI	media geométrica de la intensidad del metal
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
GzmB	Granzima B
HCS	Células madre hematopoyéticas
ICOS	<i>Inducible T-cell COStimulator</i>

IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFNAR	Receptor de IFN-I
IFN-I	Interferones tipo I
IFN- α	<i>Interferon alpha</i>
IFN- β	<i>Interferon beta</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IRF	Factor regulador del interferón
IRGs	<i>IFN-regulated genes</i>
ISGF3	Factor de genes regulados por IFN 3
JAK1	<i>Janus Kinase 1</i>
KLRG1	<i>killer cell lectin like receptor G1</i>
LAG3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LAP1	<i>Latency Associated Protein 1</i>
LES	Lupus eritematoso sistémico
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MSD	<i>Meso Scale Discovery</i>
NK	<i>Natural killers</i>
NKT	<i>Natural killers T cells</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
Pd	Paladio
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
Poli A:U	<i>Polyadenylic - polyuridylic acid</i>
Poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRRs	Receptor de reconocimiento de patrones
pTreg	Células T regulatorias periféricas
RBCs	Glóbulos rojos
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>

RLRs	Receptores de tipo RIG-I
ROR γ t	<i>Retinoid related orphan receptor γt</i>
SD	Síndrome de Down
SP	Simple positivas
SPENCD	Espondiloendrodisplasia
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T21	Trisomía 21
T-bet	<i>T-box transcription factor</i>
TCM	Célula T de memoria central
TCR	<i>T cell Receptor</i>
Teff	Células T efectoras
TEM	Célula T de memoria efectora
TEMRA	Célula T diferenciada terminalmente
Tfh	<i>T follicular helper</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	<i>T helper</i>
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIM3	<i>Immunoglobulin domain of T cells and protein 3 containing mucin domain.</i>
TLRs	Receptores de tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T regulatorias
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
tTreg	Células T regulatorias tímicas
TYK2	<i>Tyrosin Kinase 2</i>
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VSR	Virus sincitial respiratorio
Xeljanz	Inhibidor de JAK1-3 tofacitinib

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÉLULAS T Y SU ROL EN LA RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune consiste en numerosos subconjuntos de células especializadas para permitir una amplia gama de funciones, desde la correcta cicatrización de heridas a protegernos de patógenos y cáncer. Todo ello debe ocurrir sin generar respuestas autoinmunes, en las que el sistema inmune ataca de manera inapropiada los propios órganos y que de forma descontrolada puede desencadenar en una enfermedad autoinmune. Las células T o linfocitos T forman parte del sistema inmune adaptativo, desempeñan un rol central en la inmunidad mediada por células, y pertenecen a un grupo heterogéneo de células inmunes capaces de otorgar protección al hospedador contra infecciones, lesiones y prácticamente cualquier noxa. Una particularidad de las células T, es que pueden ser distinguidas dentro del compartimiento linfóide de otros tipos celulares, como las células B, células NK (*natural killers*) e ILC (*innate lymphoid cells*), por la presencia del receptor de la célula T (TCR, *T cell receptor*), en la superficie de estas células (De Obaldia & Bhandoola, 2015).

Mecanismos de diferenciación de la célula T

Las células T son producidas por progenitores, células madre hematopoyéticas (HSC), que migran desde la médula ósea hacia el timo, donde finalizan su diferenciación; adoptando un destino de célula T con un TCR alfa-beta (TCR $\alpha\beta$) o TCR gamma-delta (TCR $\gamma\delta$), dependiendo de la recombinación que se genere entre los loci del TCR. En este estadio, los timocitos (células inmaduras) TCR $\alpha\beta$ + que expresan de manera simultánea la molécula CD4 y CD8, denominados timocitos doble positivos (DP), pueden diferenciarse en células NKT innatas (*natural killers T cells*), células T CD8+ simples positivas (SP) o CD4+ SP convencionales, estas células maduras posteriormente emigran del timo hacia periferia, donde allí ejercen su función efectora. Existe a su vez, una subpoblación de células T CD4+ denominadas células T regulatorias (Treg), que se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3 (*forkhead box P3*) que también se generan en timo (tTreg). Estas células van a cumplir un rol crucial en periferia regulando las respuestas efectoras; tal es así que pacientes con mutaciones en Foxp3 (síndrome de IPEX) o animales carentes de este factor de transcripción (ratones *scurfy*) padecen de trastornos autoinmunes sumamente severos (Bras & Geha, 2006; Chang et al., 2005; Hadaschik et al., 2015).

Los linfocitos T así desarrollados circulan posteriormente por sangre y el sistema linfático hasta que son activados al contactar con un antígeno específico. Los mismos

son presentados por células presentadoras de antígeno (CPA) como células dendríticas (CDs) o macrófagos, mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), el cual interactúa con el TCR que hay en la superficie del linfocito T. De esta manera, los linfocitos T pueden responder en forma específica, por ejemplo, contra patógenos y células tumorales (De Obaldia & Bhandoola, 2015; Germain, 2002; Klein, Kyewski, Allen, & Hogquist, 2014; Zúñiga-Pflücker, 2004). Durante este trabajo de tesis nos focalizaremos principalmente en células T CD8+, CD4+ convencionales (CD4+ Tconv) y CD4+ T regulatorias (CD4+ Treg), ya que una aberración de la respuesta mediada por células T CD8+ y CD4+ o una falla en la regulación por células CD4+ Treg de una respuesta exacerbada, podrían estar asociadas al desarrollo de trastornos autoinmunes y de un gran espectro de enfermedades mediado por células T.

Respuesta inmune mediada por células T CD8+

Las células T CD8 son una subpoblación crítica de células T, mediadores fundamentales de la inmunidad adaptativa. Incluyen los linfocitos T citotóxicos (CTL), que son importantes para matar las células cancerosas o infectadas por virus, y los linfocitos T CD8+ disfuncionales, que aparecen en ciertas situaciones de cronicidad.

Células T CD8+ efectoras

Las células T CD8+ vírgenes recirculan a través de los órganos linfoides secundarios y pueden activarse a través de su TCR mediante el contacto con antígenos específicos expresados en el contexto de moléculas del CMH clase I, presentes en las CPA. Después de la activación mediada por el receptor de antígeno, las células T CD8+ comienzan a proliferar y se diferencian en células efectoras o linfocitos T citotóxicos (CTL). Los CTL pueden matar células una vez que reconozcan nuevamente el péptido antigénico en el contexto de CMH clase I en una célula diana, por lo cual proporcionan protección principalmente contra infecciones virales o células transformadas. Los mecanismos efectoras que los CTL pueden usar para atacar a las células diana comprenden entre otras moléculas efectoras, a la perforina, las granzimas y al ligando Fas (FasL), así como la producción de quimiocinas y citocinas efectoras como *C-X-C motif chemokine 10* (CXCL10) y *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1, CCL2), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF), respectivamente (Halle, Halle, & Förster, 2017; N. Zhang & Bevan, 2011) (Figura 1).

Durante una infección aguda primaria, se genera por expansión clonal un gran número de células CTL específicas, que son en su gran mayoría células que poseen una vida media corta. Después de la eliminación del antígeno, la gran mayoría de los CTL sufren apoptosis y la respuesta se contrae, dejando atrás una población mucho más

minúscula numéricamente denominadas células T CD8+ de memoria. Las células T de memoria, que pueden expandirse nuevamente de forma rápida para montar una nueva respuesta efectora frente a una infección secundaria (Halle et al., 2017). Las células CD8+ T de memoria se pueden subdividir en células T CD8 de "memoria central" y "memoria efectora" en función de sus propiedades migratorias (Geginat, Lanzavecchia, & Sallusto, 2003; Mahnke, Brodie, Sallusto, Roederer, & Lugli, 2013). Además, ciertas infecciones específicas pueden dar lugar a células T de "memoria residentes", las cuales residen permanentemente en tejidos no linfoides (Halle et al., 2017; Sathaliyawala et al., 2013).

Células T CD8+ senescentes

La senescencia es el proceso mediante el cual las células dejan de dividirse de manera irreversible y entran en un estado de arresto permanente del crecimiento sin sufrir muerte celular. La senescencia puede ser inducida por daños en el ADN que no han sido reparados u otros tipos de estrés celular (Blasco, Partridge, Serrano, Kroemer, & Lo, 2013; He & Sharpless, 2017). La senescencia se encuentra acompañada de distintas alteraciones fenotípicas, incluida la remodelación de la cromatina, la reprogramación metabólica, el aumento de la autofagia, resistencia a la apoptosis, expresión de moléculas antiproliferativas y activación de rutas de señalización de detección de daños (Akbar & Henson, 2011; He & Sharpless, 2017; Kobbe, 2018) (Figura 1).

La senescencia es una característica importante del envejecimiento celular y del organismo cuando las células alcanzan un punto final en el desarrollo o replicativo. Aunque el envejecimiento no es una enfermedad en sí misma, se lo ha definido como "un fenómeno autoinmune generalizado, leve pero prolongado" (Sergiev, Dontsova, & Berezkin, 2015; Walford, 1963). El proceso de envejecimiento se caracteriza por la inducción de un nivel de inflamación, que aunque bajo, lleva a un aumento de interleucina (IL)-1 β , IL-6 y TNF, y se define como envejecimiento inflamatorio, lo que contribuye a la patogenia de las enfermedades relacionadas con la edad (Franceschi, Garagnani, Parini, Giuliani, & Santoro, 2018). Los principales cambios en el envejecimiento del sistema inmunológico adaptativo se producen en el compartimiento de células T (Tu & Rao, 2016; Weyand & Goronzy, 2016), donde se ha asociado a la senescencia con respuestas de células T CD8+ disminuidas o ineficaces en individuos o ratones ancianos (Akbar & Henson, 2011; Decman et al., 2015; Mcelhaney & Effros, 2009).

Varios marcadores fenotípicos han sido asociados con senescencia en las células T CD8+, como es el caso de CD57 y KLRG1 (*killer cell lectin like receptor G1*)

utilizados tanto en humano como en ratón (Henson & Akbar, 2009; Hoji, Connolly, Buchanan, & Rinaldo, 2007; Xu & Larbi, 2017). En adición, las células KLRG1+ presentan telómeros acortados, indicativo de una extensa historia proliferativa y deterioro de la integridad genómica (Henson et al., 2015). Aunque las células T CD8+ senescentes preservan su función efectora (es decir, la capacidad de producir citocinas e incluso matar células diana), la falta de potencial proliferativo deteriora su capacidad para montar respuestas inmunes robustas y expandirse en número después de la reinfección (Kobbe, 2018). Durante la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las células T CD8+ CD57+ senescentes producen IFN- γ pero su capacidad proliferativa es baja y son más sensibles a la muerte celular inducida por activación (Brenchley et al., 2003) (Figura 1). Por lo tanto, la acumulación de células CD8+ T senescentes puede conducir al deterioro de las respuestas inmunológicas protectoras (Wherry & Kurachi, 2015).

Células T CD8+ exhaustas

En situaciones de enfermedades crónicas, como en infecciones virales crónicas y cáncer, que implican una exposición persistente a un antígeno y / o inflamación, las células T CD8+ efectoras adquieren progresivamente un estado de células T "agotada" o disfuncional, donde éstas no pueden montar una respuesta efectiva frente a una infección (Pauken & Wherry, 2015). El agotamiento de las células T CD8+ se asocia con la pérdida de la función de las células T CD8+ incluida la citotoxicidad y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF e IFN- γ (C. Wang, Singer, & Anderson, 2017; Wherry & Kurachi, 2015) (Figura 1). Estas células siguen sobreviviendo por la persistencia de un antígeno, por lo cual se ha reportado su dependencia del antígeno para la supervivencia, aunque no pueden generar una inmunidad protectora favorable (Wang, Singer, & Anderson, 2017). A su vez, tanto en ratones como en humanos las células T CD8+ agotadas muestran marcadores fenotípicos que se asocian típicamente con poblaciones de células T de memoria efectoras (Ichman, Ruener, Ape, & Aters, 2002; Wherry, Blattman, Murali-krishna, Most, & Ahmed, 2003). Durante la infección por el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV, *Lymphocytic choriomeningitis virus*) en ratones, las células T CD8+ agotadas expresan bajos niveles de CD62L (también conocida como L-selectina), receptor de quimiocina 7 (CCR7), receptor de IL-7 (CD127) y receptor de IL-15 (CD122) (Shin, Blackburn, Blattman, & Wherry, 2007; Wherry, Barber, Kaech, Blattman, & Ahmed, 2004). Otra de las características de las células T CD8+ agotadas es que están sujetas a una regulación negativa: esto involucra la señalización a través de múltiples receptores inhibitorios que inhiben la respuesta funcional y proliferativa (Blackburn et al., 2009). Se ha demostrado que *programmed*

death-1 (PD-1) es el receptor inhibitorio más expresado en las células T CD8+ durante infecciones crónicas, y tiene un rol importante en la regulación del agotamiento de las células T en modelos de infección (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009). A su vez, se ha observado un aumento en la expresión de PD-1 durante la infección crónica por LCMV en ratones (Barber et al., 2006); esto también ocurre durante las infecciones por VIH, virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC) (Boni et al., 2007; Petrovas et al., 2006; Trautmann et al., 2006; Urbani et al., 2006). Una observación importante es que el bloqueo de la vía de señalización de PD-1 puede restaurar las respuestas de células T específicas (tanto su proliferación como la secreción de citocinas) en ratones infectados con LCMV (Barber et al., 2006) y en humanos con infecciones crónicas como VIH (Petrovas et al., 2006; Trautmann et al., 2006), VHB (Boettler et al., 2006) y VHC (Urbani et al., 2006). También se ha demostrado que otros receptores inhibitorios, además de PD-1, inducen una falta de respuesta de las células T durante las infecciones crónicas, como el receptor LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*), 2B4 (también conocido como CD244), CD160, TIM3 (*Immunoglobulin domain of T cells and protein 3 containing mucin domain*, conocido como HAVCR2), BTLA (*B and T-lymphocyte attenuator*, conocido como CD272), TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains), CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, también conocido como CD152), entre otros (Blackburn et al., 2009).

Las células T CD8+ agotadas pueden dividirse en grupos que expresan diferentes números y combinaciones de receptores inhibitorios (Figura 1). Utilizando el modelo de infección LCMV en ratones, se demostró que el patrón de coexpresión de los diferentes receptores inhibitorios afecta la calidad funcional de las células T CD8+ específicas para el virus durante la infección (Blackburn et al., 2009; Wherry et al., 2007). Además, el bloqueo simultáneo de TIM3 y el ligando de PD-1 (PD-L1) ha demostrado ser más eficaz para restaurar la inmunidad antitumoral que el bloqueo de una única vía (Fourcade et al., 2010). Asimismo, ciertas citocinas como IL-10 y TGF- β (*transforming growth factor beta*), así como las células Treg, también pueden contribuir a la falta de funcionalidad de las células T en situaciones de alta carga antigénica (Yi, Cox, & Zajac, 2010).

Aunque la expresión de los receptores inhibitorios cambia durante la diferenciación de las células T, la expresión de estos receptores *per se* no indica que una célula T se encuentra en un estado de agotamiento. Por ejemplo, las células T humanas que expresan PD-1, CTLA-4 y otros receptores inhibitorios pueden mostrar actividad funcional después de la activación (Greenwald, Freeman, & Sharpe, 2005). Las células T humanas en etapas intermedias de diferenciación expresan altos niveles de PD-1 y CTLA-4, y estas células poseen telómeros relativamente largos, por lo que

se las define como células T pre-senescentes o diferenciadas en etapa terminal. El perfil genético de los diferentes subgrupos de células T ha mostrado un aumento en la expresión del receptor inhibitorio en las últimas etapas de la diferenciación (Cao, Gollapudi, Sharma, Jia, & Gupta, 2010; Czesnikiewicz-guzik et al., 2008; Iii, Levine, & Becker, 2005), pero los datos de microarreglos de ADN generados a partir de células T senescentes y agotadas no se han comparado directamente. Sin embargo, las poblaciones de células T en las últimas etapas de la diferenciación expresan niveles relativamente altos de estos receptores inhibitorios, lo que indica que existe la posibilidad de controlar la función de las células T que están cerca de la senescencia por la señalización de receptores inhibitorios (Akbar & Henson, 2011).

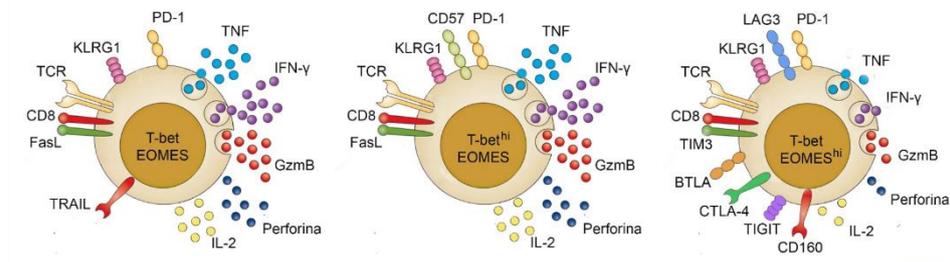
Factores de transcripción en la diferenciación de células T CD8+

Los factores de transcripción T-bet (*T-box transcription factor*) y Eomes (*Eomesodermin*), han sido implicados como reguladores en la diferenciación y función de las células T CD8+ (Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2014). Durante las etapas iniciales de la activación de las células T CD8+, T-bet y Eomes cooperan para promover la formación de linfocitos citotóxicos mediante la inducción de la expresión de las moléculas citolíticas perforina y granzima B (Banerjee et al., 2015; Intlekofer et al., 2005, 2007; N. S. Joshi et al., 2007; Pipkin et al., 2010). En el contexto de las células T CD8+ de memoria, tanto T-bet como Eomes mantienen los fenotipos de memoria estabilizando la expresión de IL-2R β , promoviendo así la señalización de IL-15 y la proliferación homeostática de células de memoria (Banerjee et al., 2015; Intlekofer et al., 2005, 2007; Pipkin et al., 2010).

Mientras que T-bet y Eomes tienen roles cooperativos y redundantes en las células T CD8+, también tienen influencias únicas sobre la función de las células T CD8+. En modelos murinos, las células T CD8+ efectoras se caracterizan por niveles altos de T-bet que disminuyen gradualmente a medida que las células avanzan hacia un fenotipo de memoria (Joshi et al., 2011). En contraste, mientras Eomes se expresa en las células efectoras, su expresión aumenta a medida que las células pasan de un estado efector hacia un estado de memoria (Banerjee et al., 2015; Joshi et al., 2011; Pipkin et al., 2010). Los estudios en ratón sobre la sobreexpresión de T-bet, sugieren que los altos niveles de T-bet conducen a la diferenciación terminal (Joshi et al., 2007). Por el contrario, los ratones deficientes para Eomes poseen defectos en la formación de la memoria a largo plazo y la renovación homeostática (Banerjee et al., 2015; Intlekofer et al., 2005; McLane et al., 2013).

Además de jugar un rol en la diferenciación de células T CD8+ efectoras, estos factores de transcripción también participan en el desarrollo progresivo de senescencia y agotamiento, condiciones que han sido asociadas con infección viral crónica y / o inflamación crónica (McLane et al., 2013; Rutishauser & Kaech, 2010; Wherry & Kurachi, 2015). Algunos estudios han comenzado a delinear cómo el equilibrio de la actividad de los factores de transcripción afecta la función de las células T CD8+. Se predijo en un análisis computacional que Eomes sería un factor de transcripción clave involucrado en la disfunción de las células T CD8+ durante la infección crónica por LCMV (Doering et al., 2012). Tanto en la infección crónica por LCMV murina como en la infección por VIH en humanos, se observó que la expresión de Eomes y T-bet no se correlacionaban positivamente, con la expresión de Eomes marcando un subconjunto terminal de linfocitos T CD8+ disfuncionales con capacidad proliferativa reducida y la expresión de T-bet marcando un subconjunto progenitor con alta capacidad proliferativa (Buggert et al., 2014; Paley, 2012). Es importante tener en cuenta que la expresión de un solo factor de transcripción no es suficiente para identificar el estado disfuncional, ya que los factores de transcripción a menudo se reclutan para desempeñar funciones dependientes del contexto, debido a que T-bet y Eomes tienen distintos roles en diferentes etapas de la diferenciación de las células T CD8+ (Kaech & Cui, 2012).

De acuerdo con el balance de T-bet y EOMES como un determinante importante del fenotipo disfuncional, Eomes está asociado con un fenotipo disfuncional, mientras que T-bet está asociado con la inducción de funciones efectoras y activación. (Buggert et al., 2014; Doering et al., 2012; Intlekofer et al., 2007). Esto nos indica que determinar los niveles de T-bet y Eomes es importante para identificar la función y el destino de una célula T CD8+ (Figura 1).



Características	Persistencia del antígeno y / o inflamación		
	Células T efectoras	Células T senescentes	Células T exhaustas
-Potencial proliferativo	+++	+/-	+/-
-Producción de citocinas	+++	+	+/-
-Marcadores de memoria	+++	+/-	+/-
-Receptores inhibitorios	-	+/-	+++
-Autorregulación impulsada por IL-7 y/o IL-15	++	-	-
-Dependencia antigénica	-	+	+

Figura 1: Características generales de las células T CD8+ efectoras, senescentes y agotadas. Después de la presentación antigénica, las células T CD8+ activadas reciben señales de múltiples citocinas que promueven la diferenciación a células T CD8+ efectoras, las cuales pueden eliminar el antígeno, poseen propiedades proliferativas, producen citocinas como IL-2, IFN- γ y TNF y expresan bajos niveles de receptores inhibitorios (iRs). A su vez, migran a los sitios periféricos durante la infección aguda para ejercer su función efectora. Por el contrario, durante la infección crónica, el antígeno y la inflamación persisten después de la fase efectora. A medida que avanza la infección y continúa la estimulación de las células T, las células T pierden funciones efectoras de manera jerárquica y adquieren un fenotipo senescente y/o agotado. Típicamente, las funciones tales como la producción de IL-2 y la polifuncionalidad, así como la alta capacidad proliferativa, se pierden pronto; a esto le siguen defectos en la producción de IFN γ , TNF y quimiocinas, así como en la desgranulación. El agotamiento de las células T también se acompaña de un aumento progresivo en la cantidad y diversidad de los receptores inhibitorios que se expresan, incluida PD-1, LAG3, BTLA, CTLA-4, CD160, TIM3 y TIGIT. TCR, *T cell receptor*, IL-, interleucina, TNF, *Tumor necrosis factor*, IFN, interferón, GzmB, granzima B, TRAIL, *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand*, FasL, Ligando de Fas, KLRG1, *killer-cell lectin like receptor G1*, PD-1, *programmed death-1*, CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*; LAG3, *lymphocyte-activation gene 3*, TIGIT, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*, BTLA, *B- and T-lymphocyte attenuator*, TIM3, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*. Adaptado de Nature Reviews. Wherry & Kurachi, 2015.

Respuesta inmune mediada por células T CD4+

Las células T CD4+ conocidas como linfocitos T colaboradores o linfocitos Th (*T helper*), son una subpoblación de células T restringidas al CMH clase II y desempeñan un rol central en la función del sistema inmune: colaboran con las células B para la producción de anticuerpos, potencian y mantienen las respuestas de las células T CD8+, regulan la función de los macrófagos, orquestan respuestas inmunitarias contra una amplia variedad de microorganismos patógenos y regulan/suprimen la respuesta inmune tanto en situaciones de autoinmunidad, como en respuestas asociadas a otras patologías como asma, alergia e inmunidad tumoral, además de ajustar la magnitud y persistencia de una respuesta contra patógenos. Las células T CD4+ son mediadores importantes de la memoria inmunológica, y cuando disminuyen sus números o se pierden sus funciones, el hospedador se vuelve susceptible a una amplia gama de trastornos infecciosos (Zhu, Yamane, & Paul, 2010).

Las células T CD4+ vírgenes pueden activarse tras la interacción con el péptido antigénico presentado en el contexto de CMH clase II presente en CPA y según las condiciones en las que ocurre este primer encuentro pueden diferenciarse en subtipos específicos. Además de los subtipos de células T cooperadoras tipo 1 y 2 (Th1 y Th2 respectivamente), que fueron los primeramente descritos, también pueden diferenciarse a otros subtipos definidos más recientemente, tales como las Th17, Tfh (*T follicular helper*), y pTreg (células T reguladoras periféricas) (Figura 2). Esta diferenciación o polarización se rige predominantemente por las citocinas que se producen en el

microambiente (Figura 2) y, hasta cierto punto, por la fuerza de la interacción del TCR con el antígeno (Boyton & Altmann, 2002).

Células Th: citocinas producidas y funciones

Las células Th1 se caracterizan por su producción de IFN- γ y están implicadas en la inmunidad celular contra microorganismos intracelulares. La IL-12 producida por células inmunes innatas, así como IFN- γ producida por células NK y células T, polarizan las células hacia el programa de diferenciación de células Th1 mediante la acción de los factores de transcripción STAT4 (*Signal transducer and activator of transcription 4*), STAT1 y T-bet (Zhou, Chong, & Littman, 2009; Zhu & Paul, 2008) (Figura 2).

Las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13 y se requieren para la inmunidad humoral para controlar los helmintos y otros patógenos extracelulares. La diferenciación de células Th2 requiere la acción de los factores de transcripción GATA3 (*GATA binding protein 3*) bajo la vía de señalización de IL-4 y STAT6 (Zhou et al., 2009; Zhu & Paul, 2008) (Figura 2).

Las células Th17 producen IL-17A, IL-17F e IL-22 y juegan un rol importante en la eliminación de bacterias y hongos extracelulares, especialmente en las superficies de la mucosa. La diferenciación de células Th17 requiere ROR γ t (*retinoid related orphan receptor γ t*), un factor de transcripción inducido por TGF- β en combinación con las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-21 e IL-23, que activan la fosforilación de STAT3. (Chaudhry et al., 2009; Z. Chen, Laurence, & Shea, 2007) (Figura 2).

Las células Tfh son un subconjunto de células T colaboradoras que regulan la maduración de las respuestas de células B. La diferenciación de estas células requiere la citocina IL-21 y depende del factor de transcripción Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6 protein*) (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2010; Zhou et al., 2009; Zhu et al., 2010) (Figura 2).

Células Treg: citocinas producidas y funciones

Para obtener el control efectivo de infecciones y evitar así, el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inmunopatológicas, se requiere una regulación estricta de las respuestas de células T efectoras. Las respuestas aberrantes de las células Th1 y Th17 promueven la generación de enfermedades autoinmunes, mientras que las células Th2 son responsables del desarrollo de alergia y asma (Chaudhry et al., 2009; Chung et al., 2011; Koch et al., 2009; Zhou et al., 2009) Las células Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3, son indispensables para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica a lo propio y la homeostasis mediante la supresión de

respuestas inmunes excesivas perjudiciales para el hospedador (Rudensky, 2011; Sakaguchi, Yamaguchi, Nomura, & Ono, 2008).

Se han identificado dos categorías principales de células Treg Foxp3+: las células tTreg que se generan en timo y las células pTreg generadas en periferia a partir de células CD4+ Tconv. Las células tTreg requieren de múltiples señales para definir su desarrollo tales como, una alta afinidad y avidéz entre el TCR y el CMH clase II conteniendo un autoantígeno, la presencia de IL-2, ya que estas células expresan altos niveles de CD25 (subunidad alfa del receptor de IL-2) y la participación de CD28 cuya señalización complementa al TCR en etapas tempranas del desarrollo. La diferenciación a células pTreg depende de la señalización de TGF- β y de la presencia de CTLA-4 en lugar de CD28 (Figura 2) (Josefowicz, Lu, & Rudensky, 2012; Zhou et al., 2009). Existe evidencia sustancial de que Foxp3, codificado en el cromosoma X, juega un papel crítico en el desarrollo y la función de las células Treg (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2003; Hori, 2011). Sin embargo, hay varias indicaciones de que la mera expresión de Foxp3 *per se* podría no ser suficiente para mantener establemente la función supresora de las células Treg o para delinear de forma fiable las células Treg funcionales. Por ejemplo, las células Tconv humanas activadas transitoriamente expresan bajos niveles Foxp3 sin adquirir actividad supresora de células Treg, e incluso producen citocinas proinflamatorias tras la activación, pero no expresan otros genes asociados a la firma de células Treg, como CTLA-4 e IL-2R α (Allan et al., 2007; Miyara, Yoshioka, Kitoh, Shima, Wing, Niwa, Heike, et al., 2009). En la actualidad se sabe que la regulación epigenética es indispensable para iniciar y mantener la expresión de Foxp3 y otras moléculas claves en las células Treg. Esto se debe a que en el *locus* de Foxp3 se encuentran 4 elementos regulatorios, un promotor de Foxp3 y 3 secuencias no codificantes conservadas denominadas CNS1, CNS2 y CNS3. Las CNS son importantes en la regulación transcripcional de la expresión de Foxp3 ya que, favorecen la inducción de Foxp3 en células T CD4+ en periferia, mantienen de manera estable la expresión de Foxp3 en células tTreg y están implicados en la regulación temprana de la activación del *locus* Foxp3, respectivamente (Josefowicz et al., 2012; Morikawa & Sakaguchi, 2014).

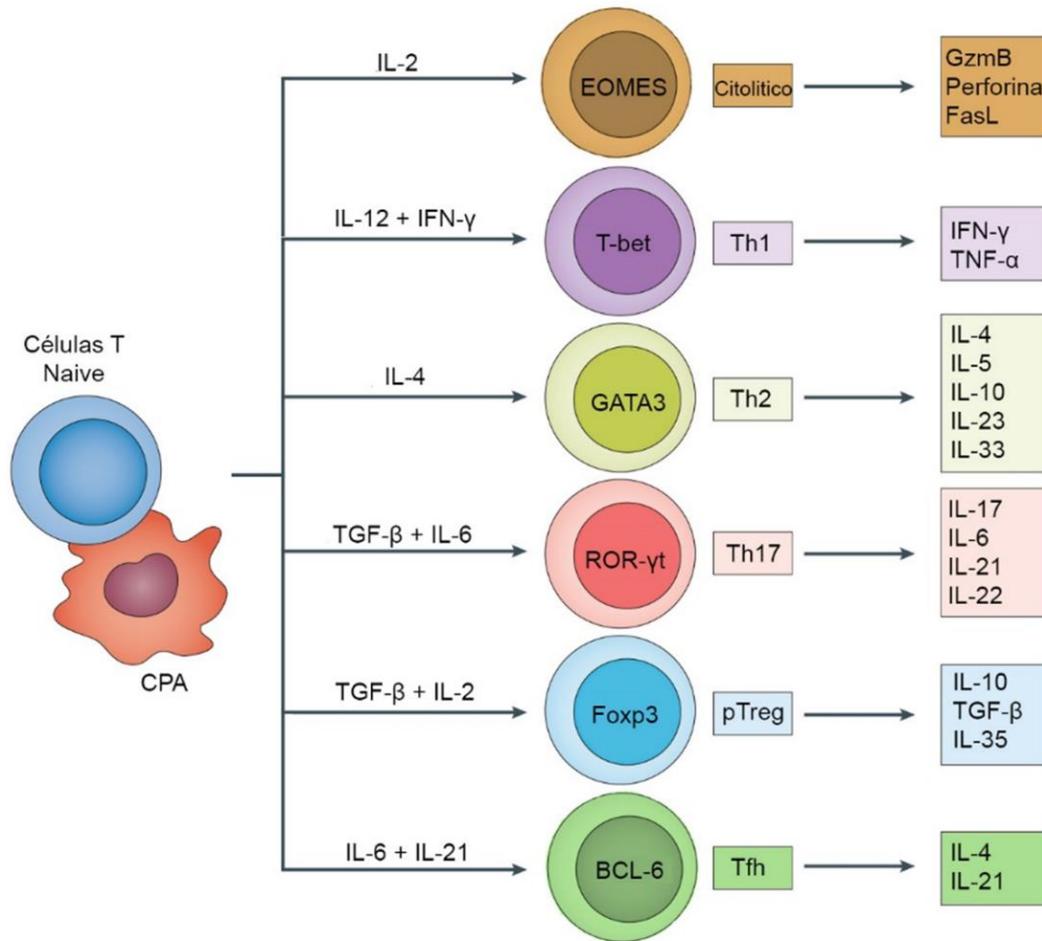


Figura 2: Polarización de células T CD4+ vírgenes en subpoblaciones de células Th. Cuando se realiza la presentación antigénica por células presentadoras de antígenos (CPA), las células T CD4+ vírgenes pueden diferenciarse en células Th1, Th2, Th17, pTreg y Tfh. Estos programas de diferenciación están controlados por citocinas presentes en el medio, como IL-12 e IFN- γ , que son importantes para la diferenciación de células Th1, e IL-4, que es crucial para la diferenciación de células Th2. TGF- β junto con IL-6 induce la diferenciación de células Th17, mientras que la diferenciación a pTreg es inducida por TGF- β , ácido retinoico (RA) e IL-2. La diferenciación de células Tfh requiere IL-21. Se han identificado factores de transcripción específicos que establecen el programa de diferenciación de cada subconjunto de células T colaboradoras: T-bet para células Th1, GATA3 para células Th2, ROR γ t para células Th17 y Foxp3 para células iTreg. CPA, célula presentadora de antígeno; Eomes, *Eomesodermin*, T-bet, *T box transcription factor*, BCL-6, *B-cell lymphoma 6 protein*, FOXP3, *forkhead box P3*; GATA3, *GATA binding protein 3*; IFN- γ , *interferón gamma*; ROR γ t, *retinoid related orphan receptor γ t*; TGF- β , *transforming growth factor beta*; TNF- α , *Tumor necrosis factor alpha*, IL-, *interleucina*, pTreg, células T reguladora periféricas; Tfh, *T follicular helper*, FasL, ligando Fas. Adaptado de Nature Reviews. Meng X. et al, 2016.

Las células Treg ejercen su función regulando las respuestas de células T efectoras y previniendo así sus efectos potencialmente patogénicos a través de una variedad de mecanismos (Figura 3). La acción de las Tregs puede estar mediada por la secreción de citocinas inmunosupresoras, como IL-10, TGF- β , IL-35 y galectina-1 o por mecanismos dependientes del contacto células-célula a través de moléculas tales como CTLA-4, GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related*), KLRG1, PD-1, CD39, CD73,

ICOS (Inducible T-cell costimulator), TIGIT y LAG-3. Estos mecanismos pueden clasificarse en diversas categorías, dentro de las cuales existen: (i) modulación de la actividad de CPA a través de: la interacción entre CTLA-4 presente en células Treg con los receptores coestimuladores en la superficie de CPA; la señal mediada por TIGIT presente en las Treg que induciría la producción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β por las CDs; la interacción de LAG-3 que puede interactuar con CMH clase II presente en la CPA, que promueve un fenotipo inmaduro en las CDs, que conduce a una disminución en la activación de células vírgenes/efectoras. (ii) liberación de citocinas inhibitorias por las células Treg, tales como IL10, TGF- β e IL-35, suprimiendo la activación de células T y modulando la función de CPA, inhibiendo la expresión de CD80 y CMH. (iii) citotoxicidad directa ejercida por células Treg en ciertas circunstancias, a través de la producción de perforinas / granzimas e inducción de apoptosis en células efectoras y CPA. (iv) alteración metabólica gatillada por células Treg, por ejemplo, estimulando a las CPA a producir enzimas que consumen aminoácidos esenciales, previniendo la proliferación de células efectoras/vírgenes; o pueden producir la inactivación catalítica de adenosina trifosfato (ATP, *adenosine triphosphate*) por las exoenzimas CD39/CD73 expresados en su superficie. (v) expresión de altos niveles de CD25 en células Treg, que favorece la con las células T efectoras por esta citocina, privando de IL-2 al resto de las poblaciones de células T. (vi) expresión de altos niveles de receptores coestimulatorios tales como GITR y ICOS en células Treg, que son importantes en el control de la función de las células Treg (Caridade, Graca, & Ribeiro, 2013; Josefowicz et al., 2012; Miyara & Sakaguchi, 2007; Shevach, 2009; Vignali, Collison, & Workman, 2008) (Figura 3).

Una reducción en el número o la capacidad funcional de las células Treg puede alterar el delicado equilibrio inmunológico entre la respuesta inmune y la regulación, dando como resultado el desarrollo de una patología o trastornos autoinmunes.

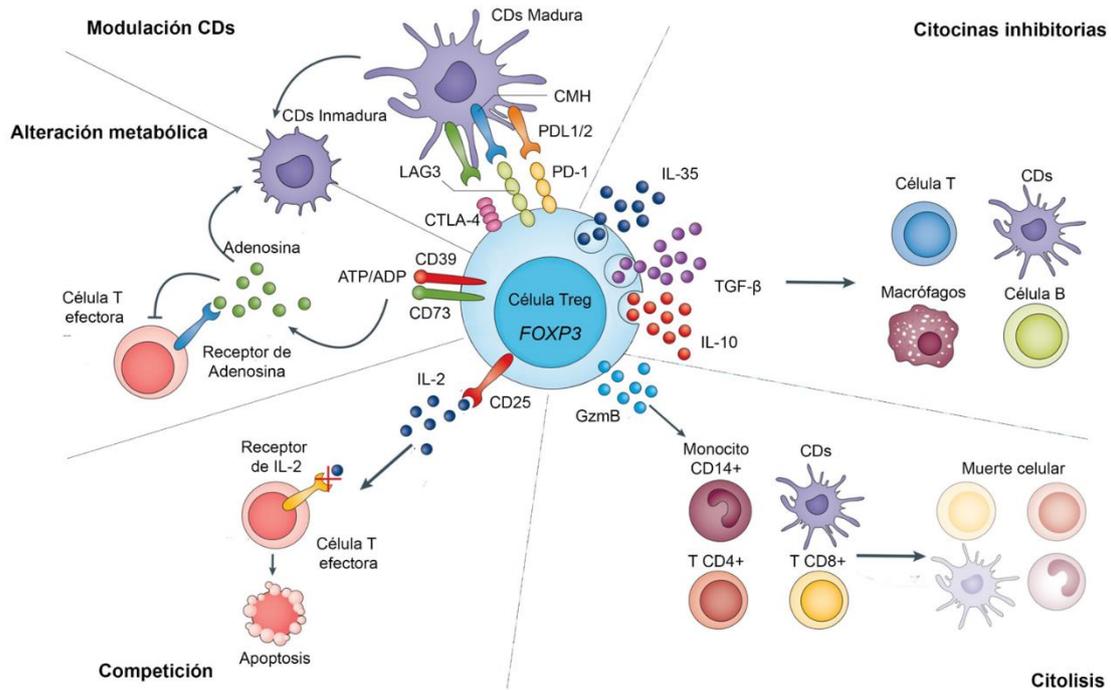


Figura 3: **Mecanismos de supresión mediados por las células Treg.** Una variedad de mecanismos moleculares opera de forma complementaria para contribuir a la supresión mediada por células Treg. Todos estos mecanismos se pueden clasificar en dos categorías principales: mecanismos independientes de contacto celular (producción de citocinas inhibitorias, privación de IL-2 y ATP / ADP) y mecanismos dependientes del contacto celular (inducción de citólisis y modulación de CPA). CDs, célula dendrítica, CMH, complejo mayor de histocompatibilidad, CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*; LAG3, *lymphocyte-activation gene 3*, PD-1, *programmed death-1*, PDL1/2, *programmed death ligand-1/2*, IL-, interleucina, GzmB, granzima B, TGF, *transforming growth factor*, Foxp3, *forkhead box P3*. Adaptado de Nature Reviews. Meng X. et al, 2016.

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA DE INTERFERONES TIPO I: ROL PROTECTIVO Y PREJUDICIAL

La familia de los interferones tipo I (IFN-I) incluye un gen para IFN-β (interferón beta) y 13 o 14 genes para IFN-α (interferón alfa), en humanos y ratón respectivamente. Es importante diferenciarlos de los interferones tipo II y de los menos conocidos interferones tipo III. La familia de los interferones tipo II, incluye únicamente al IFN-γ que es producido principalmente por células T en el contexto de una respuesta inmune adaptativa. Los IFN-I fueron descritos por primera vez en la década de los '50 como agentes antivirales, al volver resistentes a infecciones virales a células cultivadas con los mismos virus (K. Chen, Liu, & Cao, 2017).

Casi todas las células del cuerpo tienen la capacidad de producir IFN-I en respuesta a la activación de receptores de la inmunidad innata denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), principalmente ante la detección de ácidos

nucleicos virales. Dentro de estos PRRs capaces de inducir IFN-I se encuentran los receptores de tipo Toll (TLRs, TLR4, TLR3, TLR7, TLR9), los receptores de tipo RIG-I (RLRs, RIG-I, MDA5) y sensores de ADN citosólicos (cGAS); sus vías de señalización son distintas, pero todos convergen en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-12, TNF) e IFN-I (IFN- α , IFN- β).

Dentro de las células de la inmunidad innata, una subpoblación de CDs, las células dendríticas plasmocitoides (CDp) tienen como rol fundamental la producción de grandes cantidades de IFN- α en respuesta principalmente a infecciones virales, debido a sus altos niveles de expresión del factor de transcripción regulador del interferón 7 (IRF7) y a la expresión constitutiva de muchos de los PRRs involucrados en la inducción de una respuesta de IFN-I (Crouse, Kalinke, & Oxenius, 2015; Webster, Assil, & Dreux, 2016).

Una vez secretados, los IFN-I señalizan a través de IFNAR (receptor de IFN-I) constituido por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2 presente de manera ubicua en la mayoría de las poblaciones celulares. Tras interactuar con IFN-I, se fosforila el propio receptor y las quinasas asociadas al mismo, JAK1 (*Janus Kinase 1*) y TYK2 (*Tyrosin Kinase 2*) que llevan a la fosforilación de proteínas STATs (*Signal transducer and activator of transcription*) induciendo su dimerización. Posteriormente, estas proteínas fosforiladas translocan al núcleo para la inducción de la transcripción de un conjunto de genes denominados genes regulados por IFN (*IRGs, IFN-regulated genes*). A lo largo de los años, se han identificado miles de potenciales IRGs que han sido recolectados en una base de datos denominada Interferoma, que demuestra que un conjunto de estos genes se activan dependiendo del contexto y del tipo celular reconociendo IFN-I (Samarajiwa, Forster, Auchettl, & Hertzog, 2009). El complejo STAT de señalización prototípico para IFN-I es el factor de genes regulados por IFN 3 (ISGF3, *IFN-stimulated gene factor 3*) compuesto por STAT1, STAT2 e IRF9 (Figura 4). Este ISGF3 induce la transcripción de la mayoría de los genes de respuesta a IFN-I, que llevan a la síntesis de proteínas efectoras responsables de los efectos antivirales, antitumorales e inmunorregulatorios de los IFN-I. Los IFN-I también pueden señalizar a través de los homodímeros STAT1, que están más comúnmente asociados con la ruta de señalización mediada por IFN- γ . Otros heterodímeros y homodímeros STAT también pueden activarse, incluidos STAT3, STAT4 y STAT5. También se pueden activar otras vías de señalización que no dependen de la actividad de JAK y / o STAT, incluidas las MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) y la vía PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), lo

que provoca diversos efectos en las células (McNab, Mayer-Barber, Sher, Wack, & O'Garra, 2015; Parker, Rautela, & Hertzog, 2016) (Figura 4).

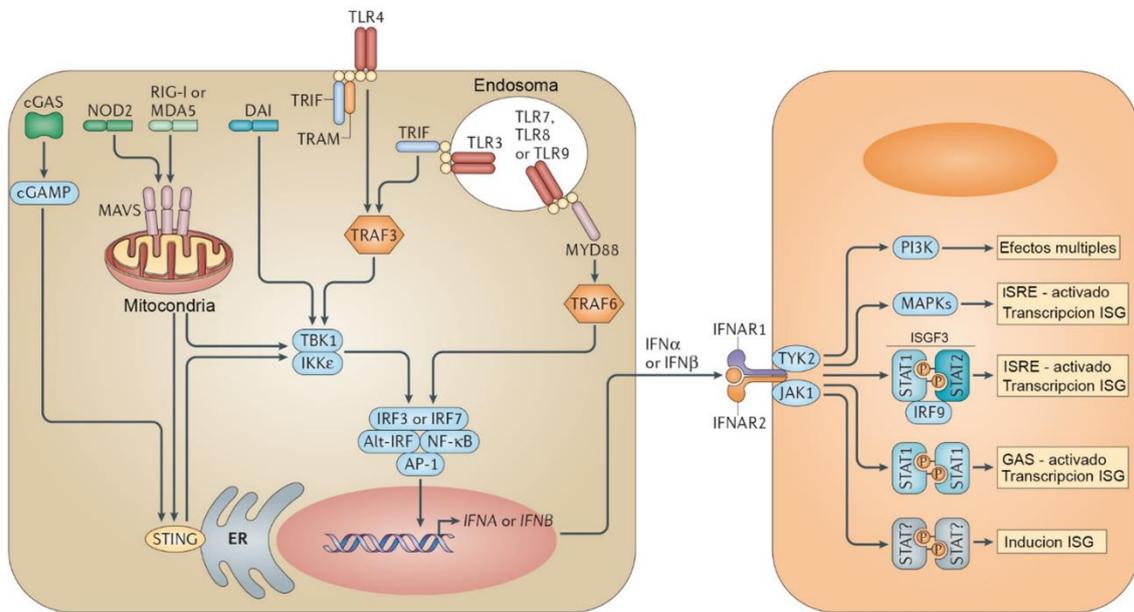


Figura 4: Vías de inducción de IFN-I y señalización del receptor. Reconocimiento de productos microbianos por PRRs pueden conducir a la inducción de los genes que codifican a IFN-I, por varias vías de señalización distintas. La interacción de IFN-I con el heterodímero IFNAR1/2 activa TYK2 y JAK1, las cuales desencadenan distintas vías de señalización siendo la principal la de ISGF3. También se pueden activar otras vías de señalización, incluidas la vía MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) y la vía PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase pathway*), lo que conduce a diversos efectos sobre la célula. Al translocar al núcleo se induce todo un programa antiviral, antitumoral e inmunorregulatorio. Alt-IRF, IRF alternativos, IRF3-7, *Interferon regulatory factor3 and 7*; AP-1, activator protein 1; cGAMP, *cyclic di-GMP-AMP*; cGAS, *cytosolic GAMP synthase*; DAI, *DNA-dependent activator of IRFs*; ER, *endoplasmic reticulum*; GAS, *γ-activated sequence*; IKKε, *IκB kinase-ε*; MAVS, *mitochondrial antiviral signalling protein*; MDA5, *melanoma differentiation-associated gene 5*; MYD88, *myeloid differentiation primary response protein 88*; NF-κB, *nuclear factor-κB*; NOD2, *NOD-containing protein 2*; STING, *stimulator of IFN genes*; TBK1, *TANK-binding kinase 1*; TRAF, *TNF receptor-associated factor*; TRAM, *TLR adaptor molecule*; TRIF, *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ*; TYK2, *tyrosine kinase 2*. Adaptado de Nature Reviews. McNab F. et al. 2015.

Estudios recientes han descubierto un rol patogénico central de los IFN-I. Hace relativamente pocos años que se logró la disección genética y molecular de algunos trastornos mendelianos raros asociados con la sobreproducción constitutiva de IFN-I, a los que se denominó interferonopatías. En estas patologías, los niveles elevados de IFN-I son sumamente perjudiciales para el huésped al promover respuestas autoinflamatorias y una ruptura de la tolerancia inmunológica, lo que lleva a la autoinmunidad. En general, en estas enfermedades existe una activación inapropiada de IFN-I, debido a alteraciones en el metabolismo de los ácidos nucleicos intracelulares o de nucleótido citosólicos o en los mecanismos de reconocimiento inmune de estos

ácidos nucleicos, todos éstos eventos claves en la patogénesis de las interferonopatías de tipo I (Crow, 2011; Lee-kirsch, 2017; Webster et al., 2016)

Varias patologías clínicas estériles se caracterizan por la aberrante inducción de IFN-I: la primera en identificarse fue i) el síndrome de Aicardi-Goutières (AGS) (Crow & Manel, 2015), y posteriormente se incluyeron ii) el lupus familiar de la Chilblan (Lee-kirsch et al., 2006) iii) la espondiloendrodisplasia (SPENCD) (Briggs et al., 2011; Lausch et al., 2011) y iv) la forma monogénica de lupus eritematoso sistémico (LES) (Baechler et al., 2016; Blanco, 2013). A su vez, se descubrieron una serie de enfermedades genéticas que pertenecen a esta familia. En estas patologías se han encontrado mutaciones en varias nucleasas o PRRs y las CDp tienen un rol central como la principal fuente de IFN-I en la mayoría de estas enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias. Los eventos centrales en la iniciación de estas enfermedades incluyen la activación de TLRs en las células dendríticas CDp y la inducción de IFN-I (Ganguly, 2018).

Las interferonopatías de tipo I son enfermedades crónicas multisistémicas que causan morbilidad significativa y grave. La etiología inflamatoria de las interferonopatías tipo I indica que son susceptibles a tratamientos inmunomoduladores. En la actualidad se están utilizando terapias inhibitorias dirigidas hacia IFN- α/β , el receptor de IFN- α (IFNAR) o la vía JAK/STAT para inhibir la respuesta patógena de IFN-I, lo cual está resultando terapéuticamente eficaz en algunas de ellas (Belot et al., 2016; König et al., 2017).

LA TRISOMIA 21

Generalidades de la trisomía 21

La mayoría de las personas poseen dos copias de cada cromosoma en sus células. Sin embargo, el síndrome de Down (SD), uno de los trastornos genéticos humanos más complejos, es causado por la presencia de una tercera copia del cromosoma 21 (chr21) en algunas o en todas las células de un individuo, lo cual afecta el desarrollo humano de diversas formas en todos los sistemas de órganos principales. También conocido como Trisomía 21 (T21), el SD tiene una frecuencia de aproximadamente 1 de cada 700 nacimientos (Alexander et al., 2016)

Uno de los aspectos más intrigantes de la T21 es que causa un espectro alterado de enfermedad en la población con SD, protegiendo a estos individuos de algunas enfermedades, como la mayoría de las neoplasias malignas sólidas (Hasle, Friedman, Olsen, & Rasmussen, 2016), pero predisponiéndolos a desarrollar otras, como la enfermedad de Alzheimer, y convulsiones de etiología desconocida que podrían estar relacionadas con la neuroinflamación crónica (Hartley et al., 2014). Es de destacar, que las personas con T21 tiene alta predisposición a desarrollar un espectro específico de

afecciones autoinmunes, que incluyen la enfermedad tiroidea autoinmune (Ivarsson et al., 1997; Kinik, Özçay, & Varan, 2006; Lavigne et al., 2017), enfermedades celíacas (Kinik et al., 2006; Marild et al., 2013), diabetes tipo I (Anwar, Walker, & Frier, 1998; Kinik et al., 2006) y un rango de afecciones autoinmunes y autoinflamatorias de la piel (Madan, Williams, & Lear, 2006; Schepis, Barone, Siragusa, Pettinato, & Romano, 2002). Con la excepción de la enfermedad de Alzheimer, cuyo alto riesgo se ha adjudicado a la presencia del gen de la proteína precursora amiloide (APP), codificado en el chr21, las bases moleculares y celulares de esta diferente susceptibilidad a un espectro de enfermedades no están claras (Figura 5).

Mortalidad por cancer		Sistema cardiovascular	
Tumores solidos	↓, >14 veces	Enfermedad de arterias coronarias	↓, >2 veces
Mama	↓, >25 veces	Hipertensión	↓, >3 veces
Próstata	↓, >12 veces	Fibrilación auricular	↓, >3 veces
Colon	↓, >12 veces	Infarto de miocardio	↓, >2 veces
Oral	↓, >20 veces	Hipotensión	↑, >2,5 veces
Pulmón	↓, >50 veces	Defectos congénitos de corazón	↑, >30 veces
Ovario	↓, >14 veces	Sistema nervioso	
Riñón	↓, >12 veces	Deterioro cognitivo	100%
Melanoma	↓, >16 veces	Patología cerebral AD	100% +de 40 años
Cerebro	↓, >11 veces	AD asociada a la demencia	75% +de 60 años
Páncreas	↓, >7 veces	Desorden del espectro autista	↑, >10 veces
Estomago	↓, >7 veces	Epilepsia	↑, >8 veces
Vejiga	↓, >5 veces	Espasmos infantiles	↑, >40 veces
Endometrio	↓, >4,5 veces	Desordenes autoinmunes	
Hígado	↓, >2 veces	Hipotiroidismo	↑, >10 veces
Testículo	↑, >3 veces	Enfermedades celíacas	↑, >10 veces
Sistema respiratorio		Diabetes tipo I	↑, >3 veces
Apnea obstructiva del sueño	↑, >5 veces	Vitiligo	↑, >10 veces
Infecciones del tracto respiratorio	↑	Alopecia areata	↑, >10 veces
Sistema musculoesquelético		Desordenes hematologicos	
Hipotonía	↑	Tombocitopenia	↑
Colágenopatías	↑	Linfopenia T y B	↑
Inestabilidad atlantoaxial	↑	TMD	↑, >10 veces
Obesidad	↑	Leucemias pediatricas	
Problemas de visión	>60%	ALL, AML	↑, >10 veces
Problemas de audición	>70%	AMKL	↑, >400 veces

Figura 5: **Individuos con T21 tiene un espectro de enfermedad diferente.** Resumen de diversos estudios epidemiológicos que revelan una disminución o aumento de la incidencia de diversas afecciones médicas. * El deterioro cognitivo muestra mucha variación, con algunos individuos dentro del rango de cociente intelectual definido para la población general. AD, *Alzheimer disease*, TMD, *Transient myeloproliferative disorder*, ALL, *Acute lymphoblastic leukemia*, AML, *Acute myeloid leukemia*, AMKL, *Acute megakaryoblastic leukemia*. Adaptado de Human Trisomy Project. Linda Crnic Institute for Down syndrome.

Anomalías del sistema inmunológico asociadas con la Trisomía

En la población típica se ha establecido que el sistema inmunológico es un modulador clave de muchas de las afecciones médicas que padecen, con una incidencia exacerbada, las personas con SD. Sin embargo, poco se sabe acerca de la desregulación inmunológica en personas con T21 que podría contribuir a la alta prevalencia de trastornos autoinmunes y al estado crónico autoinflamatorio. Aunque en la actualidad está bien documentado que las personas con SD muestran signos de una gran desregulación inmunológica (Asim, Kumar, Muthuswamy, Jain, & Agarwal, 2015; Kusters, Verstegen, Gemen, & De Vries, 2009; Ram & Chinen, 2011; Ugazio, Maccario, Notarangelo, & Burgio, 1990), la literatura disponible no proporciona una imagen clara de la extensión y etiología de este fenómeno. Muchos informes comparan individuos con SD institucionalizados con la población típica, una comparación que ya no es válida en esta era moderna de inclusión, a la vez que hay muchos informes que apoyan conclusiones contradictorias.

La trisomía 21 causa alteraciones en la inmunidad innata

Los primeros estudios realizados para evaluar la funcionalidad del sistema inmunológico y la gran susceptibilidad a infecciones que poseen individuos con T21 a fines de la década de 1970, demostraron grandes defectos en la quimiotaxis de los neutrófilos; mientras que, la fagocitosis y la respuesta de estallido oxidativo, no se observaron afectadas (Barkin, Weston, Humbert, & Maire, 1979; Izumi et al., 1989).

Por otro lado, numerosos estudios demuestran que individuos con SD presentan una mayor frecuencia de células NK (A. Cossarizza et al., 1990; Cuadrado & Barrena, 1996), evidencia que respalda que estos individuos son considerados un modelo de envejecimiento acelerado, ya que un aumento en el porcentaje de células NK ha sido asociado con el envejecimiento (B. A. Cossarizza et al., 1991). Sin embargo, estos estudios fueron realizados en pequeños grupos de individuos con T21 utilizando citometría de flujo que en ese momento no permitía diferenciar entre las células NK y NKT, ésta última población caracterizada por la expresión de un TCR. Otros estudios, muestran una disminución en el número absoluto de células NK CD3-CD16+ y / o CD56+ en grupos de individuos con diferentes edades (De Hingh et al., 2005). Por último, en la década de 1980 se describieron poblaciones de células NK con diferentes actividades, identificando aquellas poblaciones que poseían baja, intermedia y alta citotoxicidad frente a la línea celular K562, sensible a NK. Varios autores describieron un aumento significativo de las células NK que poseen una baja funcionalidad en individuos con T21. Sin embargo, la longevidad de estas las células se encontraba aumentada (Nurmi, Huttunen, et al., 1982).

La trisomía 21 causa alteraciones en la inmunidad adaptativa

Estudios histopatológicos de tejido tímico en personas con SD mostraron hipoplasia y una arquitectura comprometida, incluso en recién nacidos (Jochanan et al., 1979; Luigi M Larocca et al., 1990). Esto podría explicar la menor producción tímica de los timocitos $\alpha\beta^+$ maduros (Murphy, Lempert, & Epstein, 1990). A su vez, la sobreexpresión de citocinas como TNF e IFN- γ en el timo de personas con SD, generan una desregulación en la activación y función de otras poblaciones celulares. Esto contribuye a una anatomía tímica alterada, lo que lleva a generar una disminución de timocitos maduros (Murphy, Friend, Pike-Nobile, & Epstein, 1992). Asimismo, hay reportes que demuestran una disminución de los porcentajes de células T vírgenes emigradas recientemente del timo y un aumento significativo de los porcentajes de células de memoria central y de células T terminalmente diferenciadas en personas con SD (Barrena, Echaniz, Garcia- Serrano, & Cuadrado, 1993; Bloemers et al., 2011; Guazzarotti, 2009; Roat et al., 2008), apoyando la noción de envejecimiento precoz del sistema inmunológico en personas con SD (A. Cossarizza et al., 1990).

Varios informes han intentado analizar el impacto de T21 en la composición y función del compartimento de células T periféricas. Hasta ahora, los hallazgos demuestran una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4+, aumentando la relación CD8+/CD4+ en sangre periférica (A. Cossarizza et al., 1990; Guazzarotti, 2009; Pellegrini et al., 2012) Sin embargo, la caracterización de las células T CD4+ se ha limitado a la expresión de algunos marcadores fenotípicos (Roat et al., 2008) y sólo recientemente su estado de polarización o producción de citocinas se ha investigado en la población pediátrica (Jakubiuk-tomaszuk et al., 2015; Schoch et al., 2017). Con respecto a las células T CD8+, los datos también son escasos: la mayoría de los informes indican una mayor frecuencia de células T CD8+ dentro del compartimento de células T en comparación con la población típica, sin información sobre su estado funcional (Guazzarotti, 2009; Roat et al., 2008). Además, considerando la mayor prevalencia de autoinmunidad en personas con SD, es sorprendente que sólo unos pocos estudios hayan abordado el estado de sus células Treg. Hasta el momento, se ha informado que las personas con SD tienen una mayor frecuencia de células Treg en la sangre (Pellegrini et al., 2012; Roat et al., 2008; Schoch et al., 2017), con un potencial inhibidor aparentemente disminuido, al menos en los ensayos de supresión *in vitro* convencionales (Pellegrini et al., 2012).

Por otro lado, personas con SD poseen una hipergammaglobulinemia considerable de inmunoglobulina IgG e IgA después de la edad de 5 años, con altos niveles de IgG1 e IgG3 y bajos niveles de IgG2 e IgG4, mientras que los niveles de IgM disminuyen en la adolescencia y los de IgD se encuentran elevados. A su vez, las

respuestas de anticuerpos generada frente a antígenos vacunales tales como influenza A, polio oral, tos ferina acelular, tétanos y polisacárido neumocócico es baja en individuos con T21. Los autoanticuerpos contra la tiroglobulina humana y la gliadina se observan con mayor frecuencia en los niños con SD, al igual que los títulos elevados frente a la caseína y la betalactoglobulina (Burgio et al., 1975; Kusters et al., 2009).

Similar a lo que sucede con los linfocitos T, las personas con T21 poseen una linfocitopenia de células B, con una disminución en su expansión normal en el primer año de vida (De Hingh et al., 2005). Estas anomalías pueden deberse a un defecto intrínseco de los linfocitos B o como consecuencia de alteraciones en la función de linfocitos T colaboradores que causan un control inadecuado en la activación y proliferación de linfocitos B.

En individuos con T21, la combinación de linfocitopenia B e hipergammaglobulinemia sugiere que las respuestas de anticuerpos puedan ser oligoclonales y / o inadecuadas.

¿La Trisomía 21 podrá ser considerada una interferonopatía?

En lo que respecta al aumento del riesgo a afecciones autoinmunes en personas con SD, varios reguladores inmunes importantes con funciones en el control de la tolerancia y la autoinmunidad están codificados en el chr21, incluidos cuatro de las seis subunidades del receptor de la familia de los IFN: las dos subunidades del receptor de los IFN-I (IFNAR1, IFNAR2), una subunidad del receptor de IFN-II (IFNIR2) y una de las subunidades de receptor de IFN-III (IL10RB). Esta última subunidad actúa también, como parte del receptor de IL-10, IL-22, IL-26 e IL-28 (Weerd & Nguyen, 2012). El rol que cumple la señalización de IFN-I en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes está bien documentado, ya que muchos estudios genómicos (GWAS, *Genome-Wide Association Study*) revelan fuertes asociaciones genéticas entre polimorfismos en los componentes de la vía de IFN y diversos trastornos autoinmunes (K. Chen et al., 2017). Otro regulador inmunitario clave codificado en chr21 es el factor de transcripción AIRE (regulador autoinmune), que es crucial para la inducción de tolerancia central contra autoantígenos en el timo (Consortium, 1997; Giménez-barcons et al., 2016).

Recientemente, los análisis de transcriptomas de cuatro tipos de células diferentes obtenidos de personas con y sin SD demostraron que la T21 causa alteraciones generalizadas en la expresión de genes en todo el genoma, incluida una activación consistente de la respuesta transcripcional de IFN, lo que conduce a una retroalimentación positiva y una mayor amplificación de la señalización del interferón como era de esperar, por el mayor número de copias de los genes de sus receptores (Figura 6). Este aumento de la señalización, a su vez, aumenta la expresión de

diferentes genes de respuesta al interferón en distintos tipos de células, lo que explica potencialmente la variabilidad observada en los fenotipos asociados con la T21 (Sullivan et al., 2016).

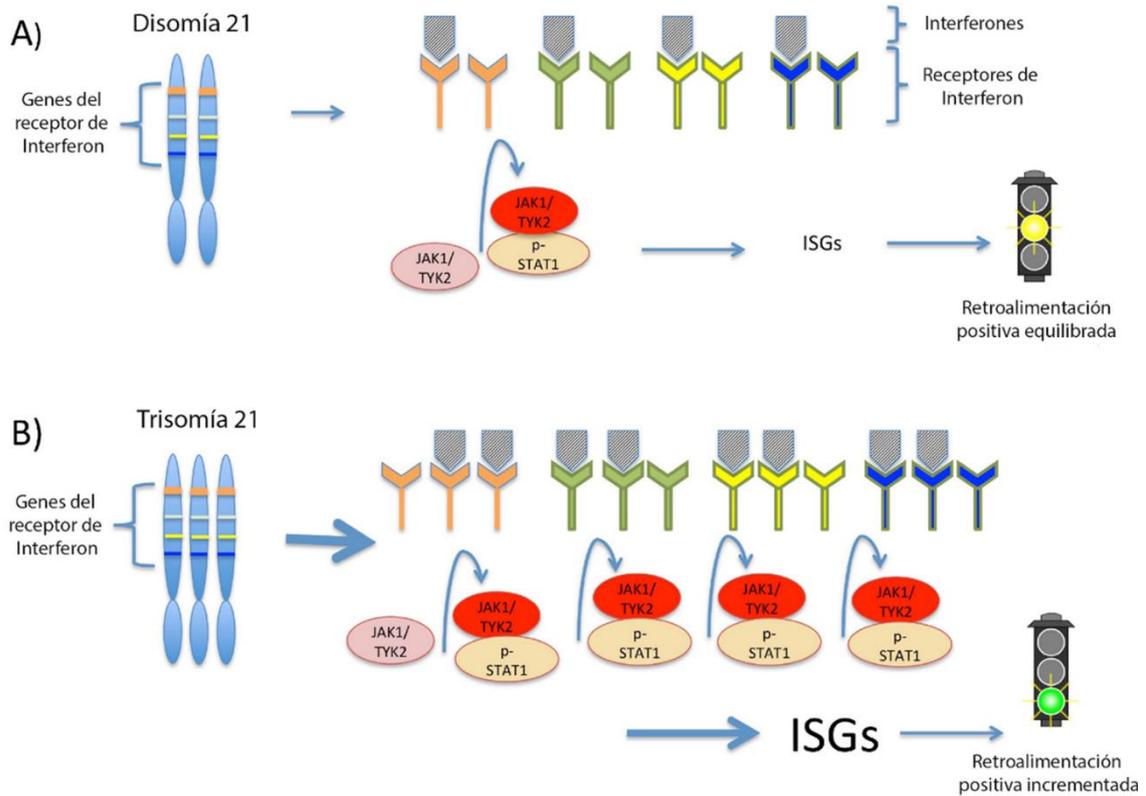


Figura 6: La señalización de interferón se amplifica mediante trisomía 21. El cromosoma 21 codifica cuatro tipos de receptores de interferón. (A) En células con dos copias de este cromosoma (disomía 21), la unión de interferones a los receptores activa dos quinazas, JAK1 y TYK2. Estas quinazas activan, por ejemplo, al factor de transcripción STAT1, que luego promueve la transcripción de un conjunto de ISG. (B) En las células con tres copias del cromosoma 21 (trisomía 21), la mayor abundancia de receptores de interferón aumenta la transcripción de los ISG, incluidos los genes que codifican los interferones. Esto finalmente conduciría a una mayor retroalimentación positiva e hiperactivación de la señalización del interferón, que puede dañar la célula. Adaptado de eLife – Sullivan et al. 2016.

En estudios realizados en cuatro cohortes diferentes de personas con SD (172 participantes, 120 con T21), se identificaron docenas de proteínas con expresión desregulada en el proteoma plasmático de estos individuos. Las más prominentes entre estas proteínas son numerosos factores implicados en el control inmunológico, la cascada del complemento y la señalización de factores de crecimiento, demostrando que estos individuos poseen signos de autoinflamación crónica (Figura 7A) (Sullivan et al., 2017). Debido a la mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes, trastornos mieloproliferativos y leucemias en personas con T21, y debido a que varios estudios han identificado diferencias en la señalización inmune a través del análisis transcriptómico de células y tejidos de personas con SD y modelos de ratón de SD (Alexander et al.,

2016; Ling et al., 2014; Sullivan et al., 2016), en este trabajo nos focalizamos en los resultados obtenidos en la categoría “Control Inmunológico”, los cuales revelaron que personas con T21 tienen niveles significativamente elevados de citocinas inflamatorias y quimiocinas potentes que actúan bajo la señalización de IFN, incluidas IL-6, IL-22, MCP-1, TNF y *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) (Figura 7B) (Sullivan et al., 2017). Un análisis reciente que involucró la medición de citocinas en niños con SD confirmó y amplió estos hallazgos, mostrando una elevación constante de citocinas proinflamatorias adicionales, como IFN- γ e IL-1 β (Zhang et al., 2017). Por lo tanto, está claro que las personas con SD muestran signos de inflamación crónica, incluso en ausencia de diagnósticos confirmados de trastornos autoinmunes.

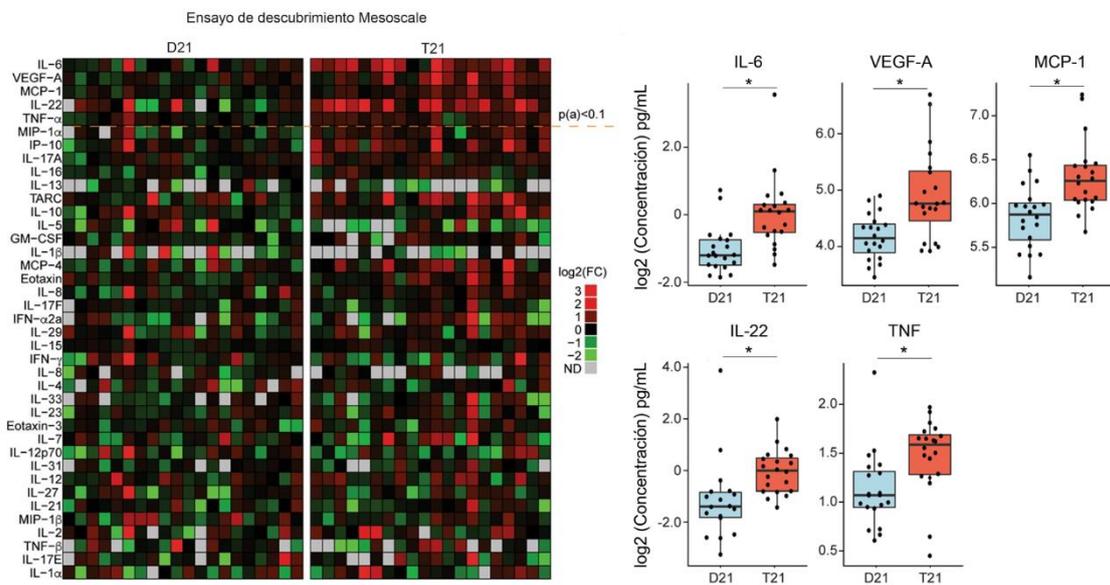


Figura 7: Personas con trisomía 21 presentan niveles elevados de proteínas proinflamatorias en plasma. Mapa de calor (panel izquierdo) que muestra los resultados de un ensayo de mesoescala (MSD) que mide los niveles de 38 marcadores inflamatorios (ver Materiales y Métodos). Las proteínas se clasifican según sus niveles en plasma desde las más significativamente diferentes (superior, IL-6) a no significativamente diferentes (inferior, IL-1 α). La línea punteada horizontal marca p(adj) < 0.1 punto de corte. Diagramas de puntos (panel derecho) para los cinco marcadores inflamatorios más significativos detectados en el ensayo MSD. Adaptado de Scientific reports – Sullivan et al. 2017.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES Y CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

La T21 afecta a múltiples sistemas de órganos durante el desarrollo y causa un espectro de enfermedades alterado en personas con SD, lo que aumenta significativamente el riesgo a desarrollar enfermedades como el Alzheimer, leucemia y numerosas condiciones autoinmunes, mientras que las protege de desarrollar tumores malignos sólidos. En la actualidad a este fenotipo se lo asocia con una desregulación del sistema inmunológico. Sin embargo, el fenotipo asociado al SD es muy variable entre los individuos con T21, incluso en aquellos sujetos que presentan rasgos típicos del síndrome tales como el deterioro cognitivo y la predisposición a la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, una comprensión más profunda de cómo esta desregulación inmune contribuye a muchas de las facetas del SD nos permitiría dilucidar no sólo los mecanismos que impulsan tal variabilidad fenotípica de las diferentes patologías, sino también nos daría la oportunidad para que un mejor diagnóstico y nuevas estrategias terapéuticas puedan comenzar a ser utilizadas y generen una mejor calidad de vida a esta población especial.

Recientemente, en nuestro laboratorio se generó una colaboración con el laboratorio del Dr. Joaquín Espinosa en el Linda Crnic Institute for Down Syndrome – Colorado, Estados Unidos, debido a que este laboratorio ha reportado que individuos con T21 presentan una señalización de IFN-I hiperactivada, la cual podría deberse al resultado de la dosificación génica incrementada de las cuatro subunidades de los receptores de los distintos tipos de IFN codificadas en el chr21, promoviendo una activación constante de la respuesta transcripcional de los IFN-I.

En este trabajo de tesis nos propusimos como objetivo general caracterizar exhaustivamente el compartimiento de células T en personas adultas con T21, utilizando metodologías no usadas previamente como son: la citometría de flujo multidimensional, ensayos funcionales, medición de citocinas y análisis transcriptómico. Nos propusimos también investigar si la hiperactivación del eje IFN-I/IFNAR descrita está asociada a las alteraciones en las células T previamente reportadas. Nuestra hipótesis es que la hiperactivación exacerbada del eje IFN-I/IFNAR generaría muchas de las anomalías reportadas en el compartimiento de células T y dichas anomalías explicarían el espectro único de enfermedades observado.

Colectivamente, nuestros resultados podrían identificar posibles nodos de intervención para ayudar a las personas con SD a llevar un mejor estilo de vida e incluso desentrañar nuevos mecanismos etiopatogénicos de enfermedades que también padece la población típica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS**Objetivo específico I: Investigar cómo la T21 impacta en el compartimiento de células T circulantes.**

PARTE IA: Caracterización de la distribución global de subpoblaciones de células T circulantes en adultos con Trisomía 21 por citometría de flujo multidimensional.

PARTE IB: Estudio fenotípico y funcional de las subpoblaciones de células T circulantes en adultos con Trisomía 21.

Objetivo específico II: Estudiar el impacto del eje IFN-I / IFNAR sobre la biología del compartimiento de células T circulantes en adultos con Trisomía 21.

PARTE IIA: Determinación del impacto global de la Trisomía 21 en el programa transcripcional de células T.

PARTE IIB: Estudio del impacto de la Trisomía 21 sobre la señalización de IFN-I en células T circulantes.

PARTE IIC: Efecto de los IFN-I sobre la funcionalidad de células T en adultos con Trisomía 21.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

OBJETIVO ESPECÍFICO I: INVESTIGAR CÓMO LA TRISOMIA 21 IMPACTA EN EL COMPARTIMIENTO DE CÉLULAS T CIRCULANTES

PARTE IA: Caracterización de la distribución global de subpoblaciones de células T circulantes en adultos con Trisomía 21 por citometría de flujo multidimensional.

PARTE IB: Estudio fenotípico y funcional de las subpoblaciones de células T circulantes en adultos con Trisomía 21.

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T CIRCULANTES EN INDIVIDUOS CON TRISOMÍA 21

Estudio de la distribución global de las subpoblaciones de células T circulantes en individuos con Trisomía 21

Como mencionamos anteriormente, las personas con SD poseen un espectro alterado de enfermedades, siendo más susceptibles a desarrollar algunas de ellas y menos propensas a otras. Por ejemplo, las personas con T21 están altamente predispuestas a desarrollar enfermedades autoinmunes como el hipotiroidismo de Hashimoto, enfermedades celíacas, diabetes tipo I, alopecia areata, vitíligo y artritis reumatoide, así como diversas convulsiones de etiología desconocida que podrían estar vinculadas a la neuroinflamación. Todavía no está claro cómo la copia adicional del chr21 impacta en estas diversas susceptibilidades.

En colaboración con el laboratorio del Dr. Joaquín Espinosa en el Linda Crnic Institute for Down Syndrome – Colorado, Estados Unidos, investigamos el impacto de la T21 en el compartimiento de células T de sangre periférica de individuos adultos jóvenes, sanos con o sin SD entre 20 y 45 años de edad que concurren al Linda Crnic Institute for Down Syndrome (ver Materiales y métodos para obtener detalles de las cohortes). Todas las extracciones de sangre se realizaron durante un breve período de tiempo en las horas de la mañana para evitar efectos circadianos. Los participantes con signos activos o antecedentes recientes de infecciones fueron excluidos.

Lo primero que se llevó a cabo fue la caracterización de las distintas subpoblaciones de linfocitos T utilizando citometría de flujo multiparamétrica. Dichas poblaciones se caracterizaron a través de marcadores clásicos de linaje como CD3 (marcador de células T), CD4 y CD8 para identificar a las diferentes subpoblaciones de células T; las células Treg se identificaron utilizando al factor de transcripción Foxp3 para definir las, ya que éste funciona como un regulador principal de esta población celular (Fontenot et al., 2005; J. M. Kim, Rasmussen, & Rudensky, 2007; Miyara & Sakaguchi, 2007; Vignali et al., 2008), así como una gran cantidad de marcadores fenotípicos (ver Materiales y métodos para obtener detalles sobre la lista de anticuerpos utilizados, Tabla 6).

Realizamos nuestros estudios utilizando una cohorte de 23 personas adultas, 9 de ellos con T21 y 14 controles típicos de la misma edad y género (D21) (Tabla 1, Materiales y métodos). Al evaluar la distribución de la población de células T CD3+ totales, observamos que la T21 no tiene un impacto significativo en su frecuencia, ni en el número absoluto de las mismas entre todas las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) vivas, ya que no observamos diferencias significativas en estos parámetros medidos en individuos con y sin T21 (Figura I 1A y B). Para determinar la

proporción de las distintas subpoblaciones de células T en individuos con SD, realizamos un estudio comparativo de la frecuencia de células T CD4+ y CD8+ circulantes, y encontramos que los individuos con T21 presentan un mayor porcentaje de células T CD8+, acompañado por una frecuencia disminuida de células T CD4+ (Figura I 1A y C). Por ende, los individuos con T21 presentan una relación de células T CD4+/CD8+ disminuida notablemente en comparación a la de individuos sin T21 (datos no mostrados). Posteriormente subclasificamos a las células T CD4+ según la expresión de los receptores CD25 y CD127 y de esa manera definimos a las células CD4+ Tconv (CD25^{lo}CD127^{hi}) y CD4+ Treg (CD25^{hi} CD127^{lo}). Como se puede ver en el panel inferior de la Figura 1A, las células CD4+ CD25^{hi} CD127^{lo} expresan en un 80-90% el factor de transcripción Foxp3, validando así una estrategia de identificación de células CD4+ Treg. Pudimos observar un aumento en la frecuencia de células CD4+ Treg y una disminución en el porcentaje de células CD4+ Tconv (Figura I 1A y C). Luego determinamos el número de células por mL en sangre periférica, para identificar a las poblaciones que podrían estar generando la distribución anómala de los diferentes subtipos de células T. Encontramos que las personas con SD presentan un mayor número de células T CD8+ y CD4+ Treg, mientras que no se observaron diferencias en el número de células T CD4+ totales y células T CD4+ Tconv con respecto a personas sin SD (Figura I 1D). Es de destacar, que hubo una fuerte correlación positiva entre los números de células T CD8+ y CD4+ Treg (Figura I 1E). Este fenotipo caracterizado por un aumento simultáneo de células T CD8+ y CD4+ Treg, ha sido observado en condiciones autoinflamatorias humanas, como así en modelos de ratón de enfermedades autoinflamatorias (Gao et al., 2015; Kanangat et al., 1996; Lili et al., 2012; Wehrens et al., 2011; Zeng et al., 2013).

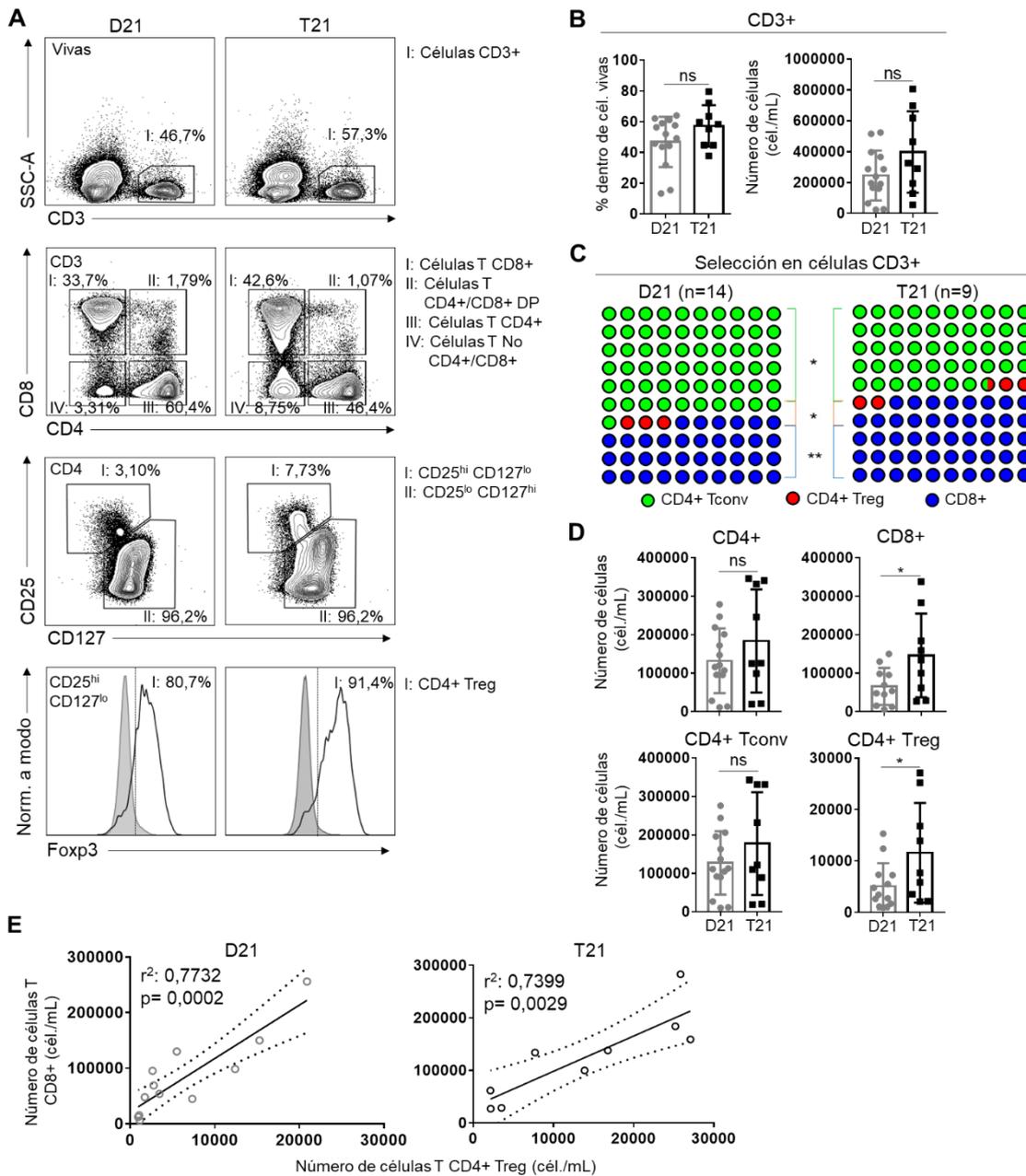


Figura 1: **Adultos con trisomía 21 muestran una desregulación en la homeostasis de células T.** Análisis de citometría de flujo multiparamétrica del compartimento de células T en sangre periférica provenientes de individuos sin (D21) y con T21. **A)** Estrategia de *gating* o selección empleada para caracterizar la distribución del compartimento de células T. **B)** Frecuencia (panel izquierdo) y número (panel derecho) de células T CD3+ totales en personas sin (D21) y con T21 (n=14 D21 y n=9 T21). Cada punto corresponde a un individuo. **C)** Frecuencia representativa de las poblaciones de células CD4+ Tconv, CD4+ Treg dentro de las células CD4+ totales y CD8+ T dentro de las células CD3+. **D)** Número de células en sangre periférica (células/mL) de las poblaciones de células T CD4+, CD8+, CD4+ Tconv y CD4+ Treg, respectivamente (n=14 D21 y n=9 T21). **E)** Correlación entre el número de células T CD8+ frente al número de células CD4+ Treg en individuos sin (panel izquierdo) y con T21 (panel derecho). Los datos en (B) y (C) se muestran como media ± s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada; los datos en (C) se muestran como media con significancia determinada por la prueba t no apareada, los datos en (E) se muestran como correlación con la significancia determinada por la correlación de Pearson. ns (no significativo), *p<0,05, **p<0,01, *** p <0,001.

Determinación de la distribución vírgenes/memoria en las subpoblaciones de células T circulantes en individuos con Trisomía 21

De acuerdo a su estado de diferenciación, las células T se clasifican convencionalmente como células vírgenes, de memoria y efectoras, según su ubicación, su estado funcional y si ya han contactado con su antígeno específico. A su vez, la distribución relativa de estas poblaciones garantiza una respuesta inmune adecuada contra diferentes estímulos inmunes (Thome et al., 2014). Por lo tanto, para obtener una visión general imparcial o no supervisada de la distribución de las subpoblaciones de células T en personas con SD, redujimos sistemáticamente los datos de citometría de flujo multiparamétrica a dos dimensiones aplicando el algoritmo de “agrupamiento estocástico de valores/parámetros vecinos” (t-SNE, *t-distributed stochastic neighbor embedding*), el cual nos permite conservar la estructura global de los datos teniendo en cuenta los parámetros totales utilizados; en nuestro caso consideramos la expresión diferencial de 12 marcadores (parámetros), incluidos marcadores de superficie, factores de transcripción, moléculas de señalización y activación (Figura I 2). Para realizar este tipo de análisis, todas las muestras se concatenan juntas, y posteriormente en el mismo software se pueden identificar los distintos grupos de trabajo y condiciones; de esta manera se obtienen como resultado los gráficos que se muestra en la Figura I 2, en donde se observa un “continente” de puntos y donde cada punto representa una célula proveniente de una de las tantas muestras analizadas (ya sea con T21 o D21). La proximidad de cada punto con su vecino implica similitud en la expresión de la totalidad de los marcadores analizados, generándose así *clusters* o “agrupamientos” o “islas” de células que compartirían características similares. Posteriormente, utilizando herramientas del software se puede visualizar la expresión de un marcador en particular e identificar en qué *cluster* de células se está expresando el mismo. Por ejemplo, en la Figura I 2, el marcador KLRG1 se localiza en islas de células que están ubicadas en la parte central del continente y en el extremo superior izquierdo y medio. Lo mismo sucede con el marcador CD57 que se ubica mayormente en la isla superior derecha, indicando que las células que se localizan en esa región del continente coexpresan estos marcadores. Los análisis de t-SNE se realizaron junto con FlowSOM *clustering* (*self-organizing map*) (Gassen et al., 2015; Nowicka et al., 2018). Este es un algoritmo que genera *clusters* de manera no supervisada, agrupando las células en función de todos los parámetros utilizados, lo que nos permite obtener una visión general clara de cómo se comportan todos los marcadores en todas las células. Este análisis nos permitió resolver nueve subpoblaciones diferentes de células T: células T CD8+ vírgenes, de memoria central (TCM), de memoria efectora (TEM) y efectoras diferenciadas terminalmente (TEMRA), células CD4+ Tconv vírgenes y de memoria, células CD4+

Treg, células T CD4+/CD8+ DP y células T no CD4+/CD8+, de esa manera se puede comparar estos continentes con la distribución no supervisada de las distintas subpoblaciones en las muestras T21 versus las D21 (Figura I 3A). En la Figura I 3B se encuentra representado la intensidad de expresión de cada marcador en las diferentes subpoblaciones celulares identificadas por FlowSOM. Centrándonos en la distribución del compartimiento de células T CD8+ y CD4+ en sangre periférica, este análisis no supervisado (Figura I 3A) reveló que el cambio más importante entre las células T CD3+ en los diferentes individuos con T21 es la disminución significativa en la proporción de células T vírgenes, tanto CD8+ como CD4+, lo cual se acompaña con un aumento significativo en la frecuencia de células T CD8+ TEMRA y células T CD4+ de memoria en comparación con los controles típicos. En la Figura I 3C se muestra la distribución de estas poblaciones celulares identificadas por FlowSOM, en donde cada barra ejemplifica un individuo particular y cada subtipo celular se identifica con un color distinto.

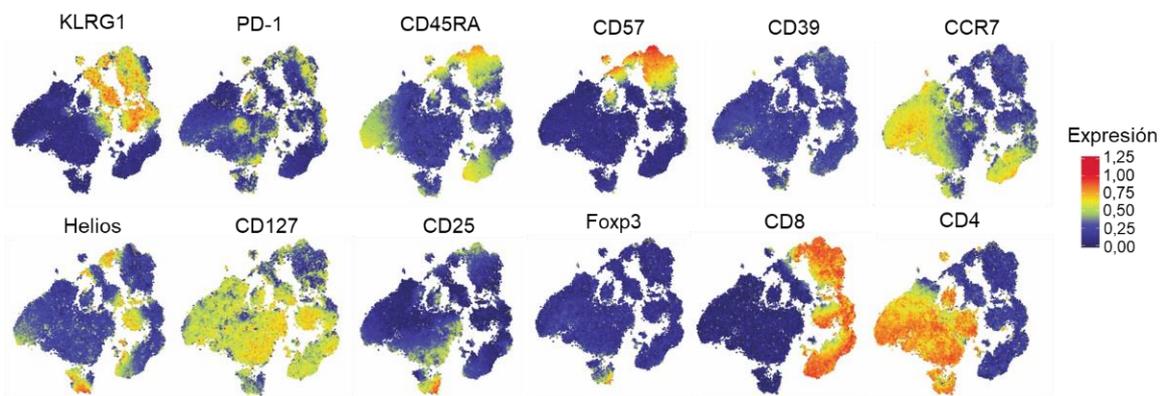


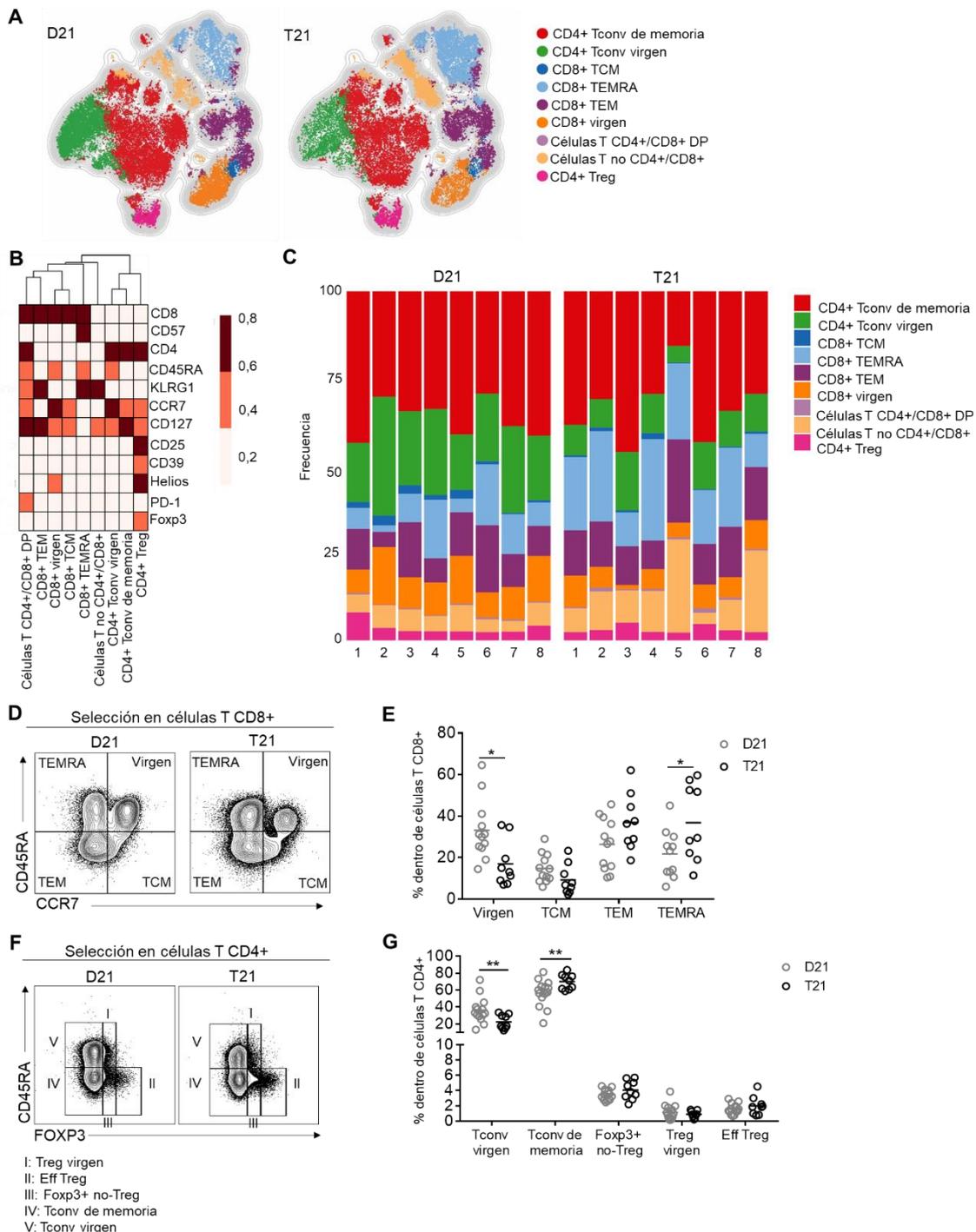
Figura I 2: Expresión de los distintos marcadores en las células T. Análisis de reducción de los datos multiparamétricos de las células T circulantes a dos dimensiones utilizando el algoritmo (t-SNE) en individuos con y sin Trisomía 21. Análisis t-SNE que muestra la intensidad de expresión de los parámetros utilizados para identificar los diferentes *clusters* en el continente. Los datos que se muestran son de una sola persona y son representativos de todas las muestras utilizadas.

En paralelo, decidimos analizar con mayor detalle la distribución del subconjunto de células T CD8+ y CD4+ vírgenes/memoria utilizando una estrategia de selección manual. Una vez definidas las células T CD8+, utilizamos marcadores bien establecidos de superficie como CD45RA y el receptor de quimiocinas tipo 7 (CCR7) que permiten la distinción de cuatro subpoblaciones de células T CD8+ (Figura I 3D): Vírgenes (CD45RA+ / CCR7+); TCM (CD45RA- / CCR7+ ubicada principalmente en órganos linfoides secundarios y en menor grado en sangre periférica); TEM (CD45RA- / CCR7- localizada principalmente en la sangre y en menor grado en sitios periféricos); y TEMRA (CD45RA + / CCR7-) que se encuentran principalmente en tejidos inflamados y exhiben baja capacidad proliferativa) (Figura I 3D) (Mahnke et al., 2013; Thome et al., 2014).

Esta estrategia nos reveló que personas con SD presentan una reducción significativa en la frecuencia de células T CD8+ vírgenes circulantes (16.9% vs 33.2%; $p < 0.05$) la cual fue compensada por un aumento significativo en la población CD8+ TEMRA (36.8% vs 21.6%; $p < 0.05$) (Figura I 3E). Sin embargo, las células T CD8+ de individuos con T21 exhibieron una distribución similar en las células TCM, acompañado con un leve aumento, pero no significativo del subconjunto TEM con respecto a sus controles (Figura I 3E). Estos resultados nos revelan que, además de un aumento en el número de células T CD8+, individuos con SD presentan una distribución alterada, indicativa de un tránsito acelerado de estado virgen al terminalmente diferenciado, lo cual concuerda con informes previamente publicados (Barrena, Echaniz, Garcia-Serrano, & Cuadrado, 1993; Bloemers et al., 2011; Guazzarotti, 2009; Murphy & Epstein, 1992; Roat et al., 2008; Schoch et al., 2017).

A continuación, realizamos un análisis análogo para estudiar la distribución de las células T CD4+ Tconv y CD4+ Treg y su fenotipo virgen/memoria. Para examinar mejor la población de células Treg, analizamos la expresión intracelular de Foxp3, dentro del compartimiento de células T CD4+. Cabe destacar que, a diferencia de lo que sucede en ratón en donde la expresión de Foxp3 está restringida a las células CD4+ Treg, en humanos las células T activadas pueden expresar de manera transitoria a Foxp3 sin ganar actividad supresora (Tran, Ramsey, & Shevach, 2007; J. Wang, Ioan-Facsinay, van der Voort, Huizinga, & Toes, 2007). Es por ello que es necesario utilizar otros marcadores además de CD4 y Foxp3 para identificar esta población celular en humanos y evaluar su distribución. Según lo descrito por el grupo de Sakaguchi (Miyara, Yoshioka, Kitoh, Shima, Wing, Niwa, Parizot, et al., 2009; Tanaka & Sakaguchi, 2016) y representado en la Figura I 3F, las células humanas CD4+ Foxp3+ se pueden separar en tres subpoblaciones funcional y fenotípicamente diferentes basadas en la expresión de CD45RA y Foxp3: Treg vírgenes (I), Treg efectoras (Eff Treg) (II), y células Foxp3+ no Treg (III), las cuales representan a células Tconv recientemente activadas. Las poblaciones de células Foxp3- corresponden a células Tconv de memoria (CD45RA-) (IV) y vírgenes (V) (CD45RA+). Este análisis demostró que, aunque la T21 no altera significativamente el número total de células CD4+ Tconv, causa una redistribución en la frecuencia de estas poblaciones, con una disminución significativa en el porcentaje de células Tconv vírgenes (22,4% vs 36,1%, $p < 0,01$); pero, hubo un incremento significativo en la frecuencia de células Tconv de memoria en la mayoría de los individuos estudiados (69,9% vs 56,4%, $p < 0,01$) (Figura I 3G). En contraste, aunque las personas con SD tienen un número mayor de células CD4+ Treg en sangre, observamos que estos individuos presentan frecuencias similares en las subpoblaciones de células T CD4+ Treg con respecto a sus controles (Figura I 3G).

Como era de esperar, las células Treg efectoras fueron la población con la mayor expresión de Foxp3 en relación con las otras poblaciones estudiadas (Figura I 3H), muestran el fenotipo CD25^{hi} CD127^{lo} clásico y no producen IFN- γ (Figura I 3I). De manera interesante, las células Treg efectoras de individuos con T21 mostraron un aumento significativo en la expresión de Foxp3 en comparación con los controles euploides (MFI 1645 vs 1239, $p < 0,0001$) (Figura I 3H). Estos resultados nos indican que individuos con T21 poseen células Treg activadas, además de poseer una mayor frecuencia y número de las mismas en sangre periférica.



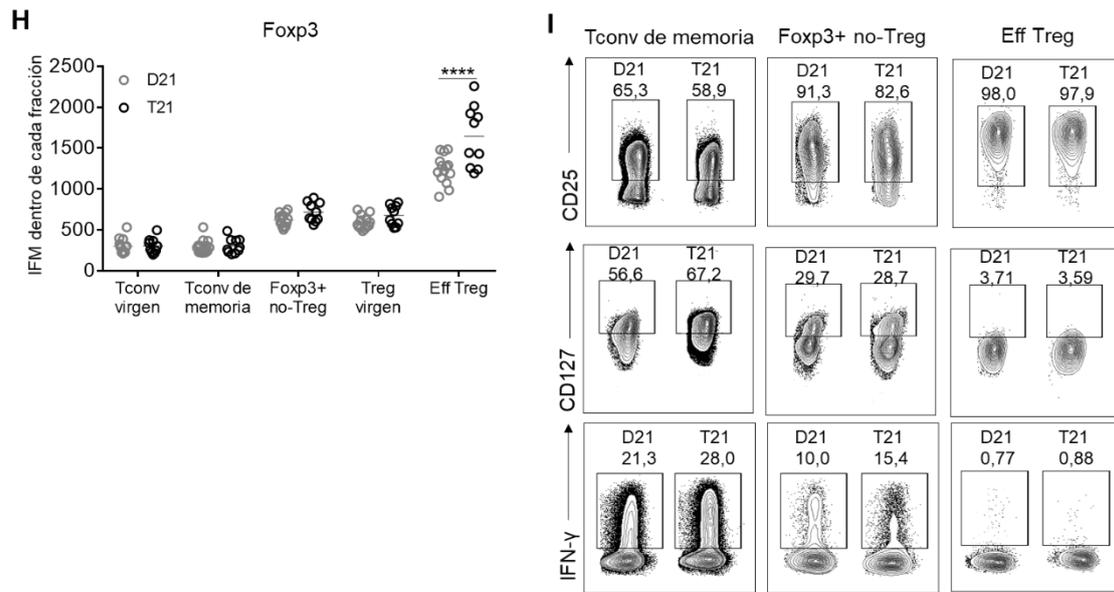


Figura I 3: Adultos con trisomía 21 presentan alteraciones en la distribución vírgenes y memoria en el compartimiento de células T CD8+ y CD4 Análisis de reducción de los datos multiparamétricos de las células T circulantes a dos dimensiones utilizando el algoritmo (t-SNE) y FlowSOM-clustering en individuos sin (D21) y con T21. **A)** Ilustración del mapa t-SNE que muestra de manera no supervisada las diferentes subpoblaciones dentro del compartimiento de células T seleccionadas en individuos sin (D21) y con T21, analizadas con FlowSOM-Clustering. **B)** Mapa de calor que muestra los valores de expresión de los marcadores utilizados para cada población definida de la Figura I 3A. Rojo oscuro y blanco indican la expresión superior e inferior, respectivamente. **C)** Proporción de las distintas poblaciones de células T CD3+ obtenida por FlowSOM-Clustering, de cada muestra procesada (1-8). **D)** Estrategia *gating* o selección manual empleada para identificar la distribución de células vírgenes/memoria del subconjunto de células T CD8+. **E)** Frecuencia de células T CD8+ vírgenes/memoria analizadas por la expresión de los marcadores CCR7 y CD45RA. **F)** Estrategia de *gating* o selección manual empleada para analizar la distribución naive/memoria del subconjunto de células T CD4+. **G)** Frecuencia de células T CD4+ vírgenes/memoria definidas por la expresión de CD45RA y FOXP3. **I)** Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de FOXP3 dentro de los diferentes subconjuntos de células T CD4+ definidos en (G). **H)** Análisis de citometría de flujo representativo de la expresión de CD25, CD127 e IFN-γ en los subconjuntos de células T CD4+ indicados. Los datos en (E), (G) y (H) se muestran como media ± s.e.m con significancia determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak. * p <0.05; ** p <0,01; **** p <0.0001.

En conjunto, estos resultados revelan que la T21 altera la homeostasis de las células T, generando cambios tanto en la frecuencia y en el número, como en la distribución de subtipos claves de células T circulantes, lo que justifica una caracterización más profunda de estas poblaciones.

CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS T CD8+ Y CD4+ EN ADULTOS CON TRISOMÍA 21

Caracterización fenotípica y funcional de células T CD8+ circulantes en adultos con Trisomía 21

Durante infecciones agudas o vacunaciones, se forman células T de memoria que persisten a largo plazo y pueden adoptar rápidamente funciones efectoras y expandirse luego de la reinfección o nuevo desafío (Kaech & Cui, 2012; Masopust & Schenkel, 2013). Por el contrario, durante exposiciones persistentes a antígenos y/o inflamación crónica, este programa de diferenciación de las células T de memoria está notablemente alterado. Un estado de diferenciación alterado es el denominado agotamiento de células T, caracterizado por funciones efectoras deficientes y una alta expresión de múltiples receptores inhibitorios (Ahmadzadeh et al., 2009; Crawford et al., 2014; Pauken & Wherry, 2015; Wu et al., 2014).

Habiendo observado que personas con SD poseen un aumento tanto en la frecuencia, como en el número de células T CD8+ totales, y que su distribución se encuentra alterada hacia un estado de diferenciación terminal, sumado a los reportes que indican un estado de inflamación crónica en estas personas, decidimos investigar cómo la T21 afecta la funcionalidad de células T CD8+. Para ello, utilizamos citometría de flujo multiparamétrica y simultáneamente medimos la expresión de marcadores de activación, proliferación, agotamiento y senescencia en este subconjunto de células T. Primero, evaluamos la presencia de las moléculas efectoras que utilizan las células T CD8+ para atacar a las células diana, como granzima B (GzmB), y la producción de citocinas como IFN- γ y TNF (Halle et al., 2017; N. Zhang & Bevan, 2011). Sorprendentemente, luego de la estimulación con ésteres de forbol (PMA)/ionomicina, las tres moléculas efectoras se encontraron significativamente elevados en las células T CD8+ de adultos con T21 en comparación con los controles euploides estimulados en las mismas condiciones (GzmB: 43.8% vs 22.3%, $p < 0.01$; IFN- γ : 53.9% vs 31.6% $p < 0.001$; TNF: 54,8% frente a 31,4%, $p < 0,0001$) (Figura I 4A). Este aumento también fue evidente en la frecuencia de las células T CD8+ que producen simultáneamente estos marcadores efectoras, GzmB e IFN- γ (26.0% vs 11.9%; $p < 0.01$) e IFN- γ y TNF (42.3% vs 21.8; $p < 0.0001$) (Figura I 4B).

Para examinar si estos resultados pudieran explicarse simplemente por la disminución de las células T CD8+ vírgenes en las personas con SD, analizamos la expresión de estos marcadores en los subconjuntos vírgenes, TCM, TEM y TEMRA (Figura I 4C). Es de destacar, que si bien todos los subconjuntos mostraron una tendencia a mayor expresión de los tres marcadores en personas con SD, mientras que las diferencias significativas se observaron en el subconjunto vírgenes, y en menor

grado en los subconjuntos TEMRA (Figura I 4C). Por lo tanto, estos resultados establecen además una clara desregulación del estado virgen en células T CD8+ en personas con SD. El hecho de que las células T vírgenes respondieran fácilmente a la PMA/ionomicina fue algo que llamó nuestra atención, aunque se ha reportado que citocinas como los IFN- γ pueden licenciar a las células T CD8+ vírgenes para producir moléculas efectoras (Urban, Berg, & Welsh, 2016). A su vez, no podemos descartar la posible contaminación de células T no-vírgenes en el subconjunto virgen en personas con SD, debido a que por dificultades experimentales no pudimos añadir más marcadores que nos permitan identificar de manera más rigurosa a la subpoblación de células vírgenes, y por lo tanto no hemos realizado un análisis más detallado de las mismas. Es por ello, que decidimos utilizar otra estrategia para controlar las posibles diferencias en la proporción de células T CD8+ vírgenes en individuos con T21 frente a sus controles típicos: en ésta estudiamos la expresión de los marcadores funcionales luego de excluir de nuestra estrategia de selección del compartimiento de células T CD8+ a las células vírgenes (CD45RA+ CCR7+), denominando a esta nueva selección células T CD8+ no-vírgenes. Como esperábamos, al igual que el total de células T CD8+ totales, también observamos un aumento significativo en la frecuencia de células T CD8+ no-vírgenes en individuos con T21 (81% vs 60,1%, $P < 0,01$) (Figura I 4D). Estos resultados nos permiten validar una redistribución del compartimiento de células T CD8+ en individuos con SD hacia un estado de diferenciación terminal.

En general, los marcadores funcionales (GzmB, IFN- γ y TNF) fueron expresados en un mayor porcentaje de células T CD8+ no-vírgenes en comparación con lo observado en las células T CD8+ totales en la cohorte de individuos con y sin T21 (Figura I 4A). Sin embargo, al examinar a las células T CD8+ no-vírgenes observamos que el porcentaje de GzmB, IFN- γ y TNF (45,3%, 68,4 y 67,9 vs 27,7%, 46,8 y 59,1, $P < 0,05$) permanecieron elevados en los individuos con T21 en comparación con los individuos sin T21 (Figura I 4E). Estos datos sugieren que individuos con T21 presentan una mayor polifuncionalidad en sus células T CD8+ debido a un aumento en el estado de activación de estas células asociado con una mayor diferenciación al estadio efector terminal del compartimiento de células T CD8+ frente a sus controles.

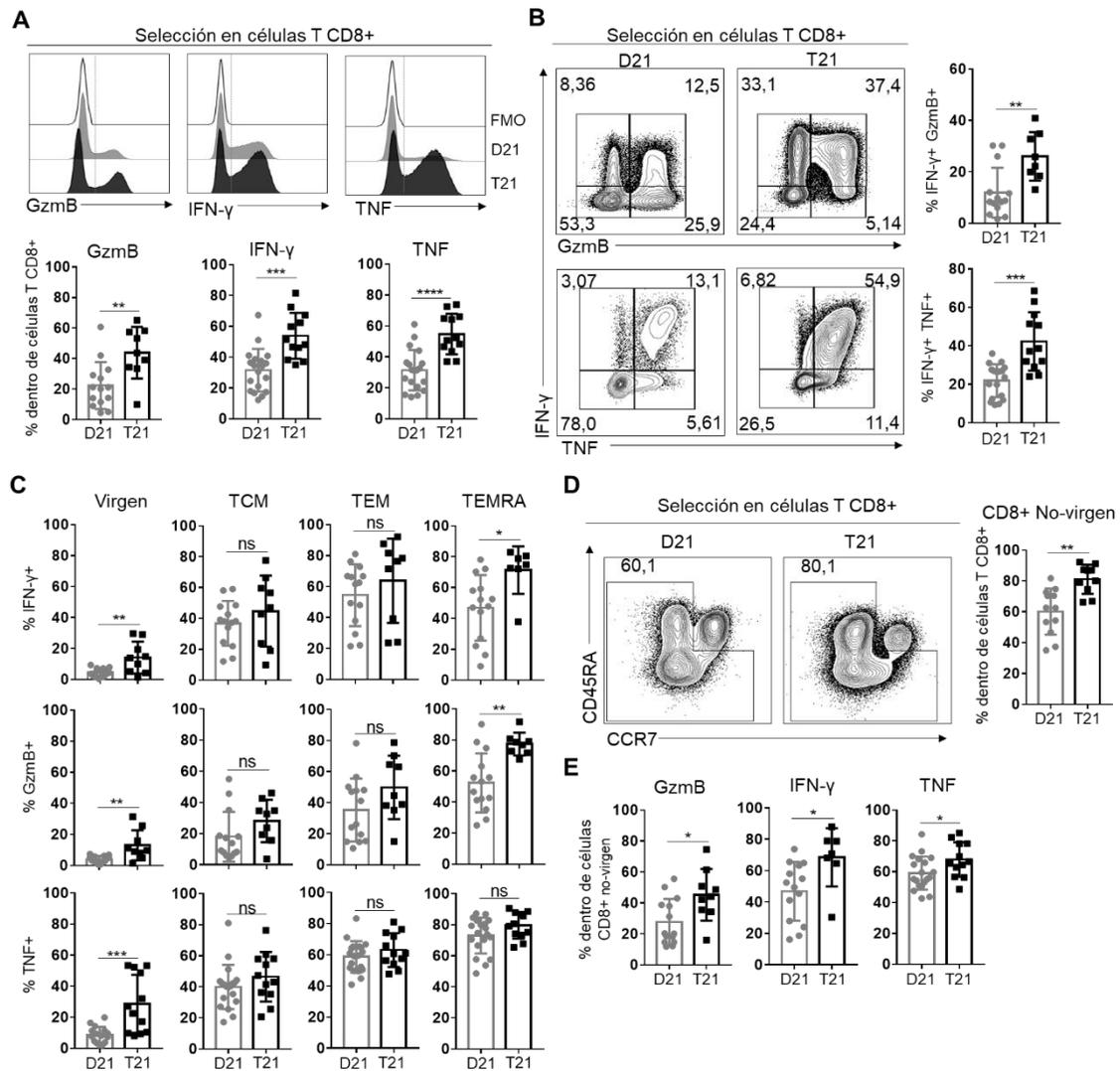


Figura 1 4: **Adultos con Trisomía 21 poseen células T CD8+ con signos de hiperactivación.** PBMCs frescas de individuos sin (D21) y con T21 fueron estimuladas *ex vivo* con PMA/Ionomicina durante 4 horas y luego marcadas para CD3, CD8, GzmB, IFN- γ , TNF, Ki-67, PD-1, TIGIT, BTLA, CD57, KLRG1, T-bet, EOMES, CD45RA y CCR7. **A)** Análisis de citometría de flujo representativos (paneles superiores) y frecuencias (paneles inferiores) de células que expresan de GzmB, IFN- γ y TNF dentro de las células T CD8+ totales (n=14 D21 y n=9 T21). Histogramas representativos de los niveles de expresión de estos marcadores en las células T CD8+ totales de individuos con T21 (negro) y de controles típicos (D21, gris), en comparación con el FMO de cada molécula en células T CD8+ (blancas). **B)** Proporción de células T CD8+ que expresan simultáneamente IFN- γ y GzmB (panel superior) e IFN- γ y TNF (panel inferior), en individuos sin (D21) y con T21. **C)** Frecuencia de células que expresan GzmB, IFN- γ y TNF en los diferentes subconjuntos de células T CD8+ definidos en la Figura 1 3D, en individuos sin (D21) y con T21. **D)** Análisis de citometría de flujo representativo (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho) de células T CD8+ no naive dentro de las células T CD8+ totales, en individuos sin (D21) y con T21. **E)** Porcentaje de células T CD8+ no naive positivas para GzmB, IFN- γ y TNF en individuos sin (D21) y con T21. Los datos en (A) hasta (E) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada; ns (no significativo), * p <0.05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.

Los cambios en la frecuencia y en la distribución del compartimiento de células T CD8+ en individuos con T21 podrían deberse a una activación antigénica sostenida y/o al recambio homeostático. Por ello, investigamos la capacidad proliferativa de las células en cada una de las subpoblaciones de células T CD8+ definidas por la expresión de CD45RA y CCR7 (Figura I 3D) mediante el examen de la expresión de Ki-67, luego de la estimulación con PMA/ionomicina, ya que esta proteína nuclear se encuentra presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis). Las personas con SD muestran una mayor proporción de células T CD8+ positivas para Ki-67 (76.5% vs 52.2; $p < 0.01$), lo que indica una mayor proliferación de las células T CD8+ en respuesta a un estímulo activador (Figura I 5A). Posteriormente, determinamos la expresión de Ki-67 dentro del compartimiento de células T CD8+, para identificar a la subpoblación que posee mayor capacidad proliferativa. Se determinó un aumento significativo principalmente en la frecuencia de células TEMRA (90,3% vs 70,9%, $p < 0,05$) y en menor medida en células vírgenes (25,7% vs 10,8%, $p < 0,01$) positivas para Ki-67 en individuos con T21 (Figura I 5B), mientras que las células TCM y TEM en estos individuos presentan un porcentaje similar de células Ki-67+ que individuos sin T21. Finalmente, cuando analizamos la expresión de Ki-67 en la población de células T CD8+ no-vírgenes (es decir excluyendo a las células CD45RA+ CCR7+), observamos que Ki-67 se expresa de forma similar en ambos grupos de individuos (Figura I 5C), considerando que el aumento de células T CD8+ Ki-67+ en individuos con T21 se atribuye tanto a las células vírgenes (CD45RA+ CCR7-) como a las células TEMRA (CD45RA+ CCR7+).

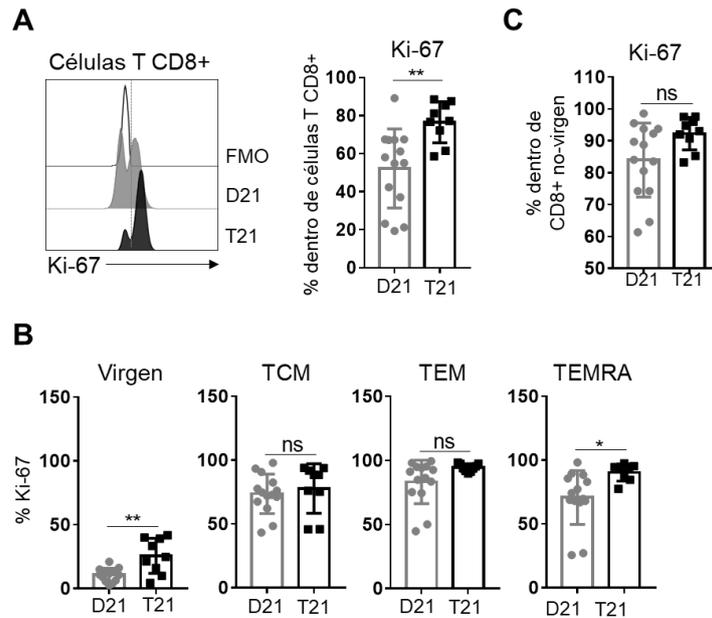


Figura I 5: **Adultos con Trisomía 21 poseen células T CD8+ con más capacidad proliferativa.** PBMCs frescas de individuos con y sin Trisomía 21 fueron estimuladas *ex vivo* con PMA/Ionomicina durante 4 horas y luego marcadas para CD3, CD8, GzmB, IFN- γ , TNF, Ki-67, PD-1, TIGIT, BTLA, CD57, KLRG1, T-bet, Eomes, CD45RA y CCR7. **A)** Histograma representativo (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho) de la expresión de Ki-67 dentro de las células T CD8+ totales en adultos sin (D21) y con T21 (n=14 D21 y n=9 T21). **B)** Proporción de Ki-67 en los diferentes subconjuntos de células T CD8+ definidos en la Figura 1 3D, en individuos sin (D21) y con T21. **C)** Porcentaje de células T CD8+ no-virgenes positivas para Ki-67 en individuos sin (D21) y con T21. Los datos en (A) hasta (C) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada; ns (no significativo), * p <0.05; ** p <0,01.

Posteriormente, exploramos la expresión en las células T CD8+ de adulto con T21 de los factores de transcripción T-bet y Eomes, que participan en la diferenciación del linaje de esta población celular (Banerjee et al., 2015; Buggert et al., 2014; Dolfi et al., 2013; Intlekofer et al., 2005, 2007; McLane et al., 2013; Pearce et al., 2014). Es importante destacar, que observamos un incremento significativo en la frecuencia de células T-bet+ (48,8% vs 22,3%; p<0,001) y Eomes+ (57,5% vs 33,1%; p<0,001) en la población T CD8+ en personas con SD (Figura I 6A). Del mismo modo, al evaluar la coexpresión de T-bet y Eomes determinamos un incremento significativo (33,2% vs 11,8%; p<0,001) en las células T CD8+ en individuos con SD (Figura I 6B). Además, los niveles de expresión de T-bet, pero no de Eomes, se encontraron elevados significativamente en la población de células dobles positivas, con respecto a sus controles euploides (Figura I 6C, MFI: 5291 vs 4276; p <0.05). Por otro lado, examinamos cómo se asociaban la expresión de T-bet y EOMES con marcadores efectores de la función de las células T CD8+. Para ello, utilizamos el software SPICE (Roederer, Nozzi, & Nason, 2010), un algoritmo que permite descubrir posibles

correlaciones a partir de un conjunto de datos multivariados, organizando gráficamente los datos normalizados: como se puede observar en los gráficos de la Figura 6D, cada porción de la torta indica el porcentaje de células que expresa simultáneamente 1, 2, 3 y 4 marcadores, caracterizados por los arcos que circunscriben la torta. La coexpresión de marcadores nos da una idea del grado de activación de las células. Por ejemplo, en personas euploides el 55% de las células T CD8+ no expresan ninguna de las moléculas estudiadas, mientras que en las personas con T21 este porcentaje cae abruptamente a 26%. A partir de estos análisis, identificamos que, en personas con SD, hay un aumento significativo de células T CD8+ que coexpresan IFN- γ , TNF, T-bet y EOMES (28,0% vs 12,0%; $p < 0.0001$) (Figura I 6D), lo cual nos sugiere que las células T CD8+ de individuos con SD se encuentran en un estado altamente activado y con funciones efectoras. Por último, para definir el fenotipo de las células T CD8+ de estos individuos, evaluamos la relación T-bet/EOMES y observamos un aumento significativo en personas con SD (8,58 vs 7,00, $p < 0.05$) con respecto a sus controles típicos (Figura I 6E), por lo que estos resultados nos revelan que las células T CD8+ de personas con SD poseen un fenotipo efector.

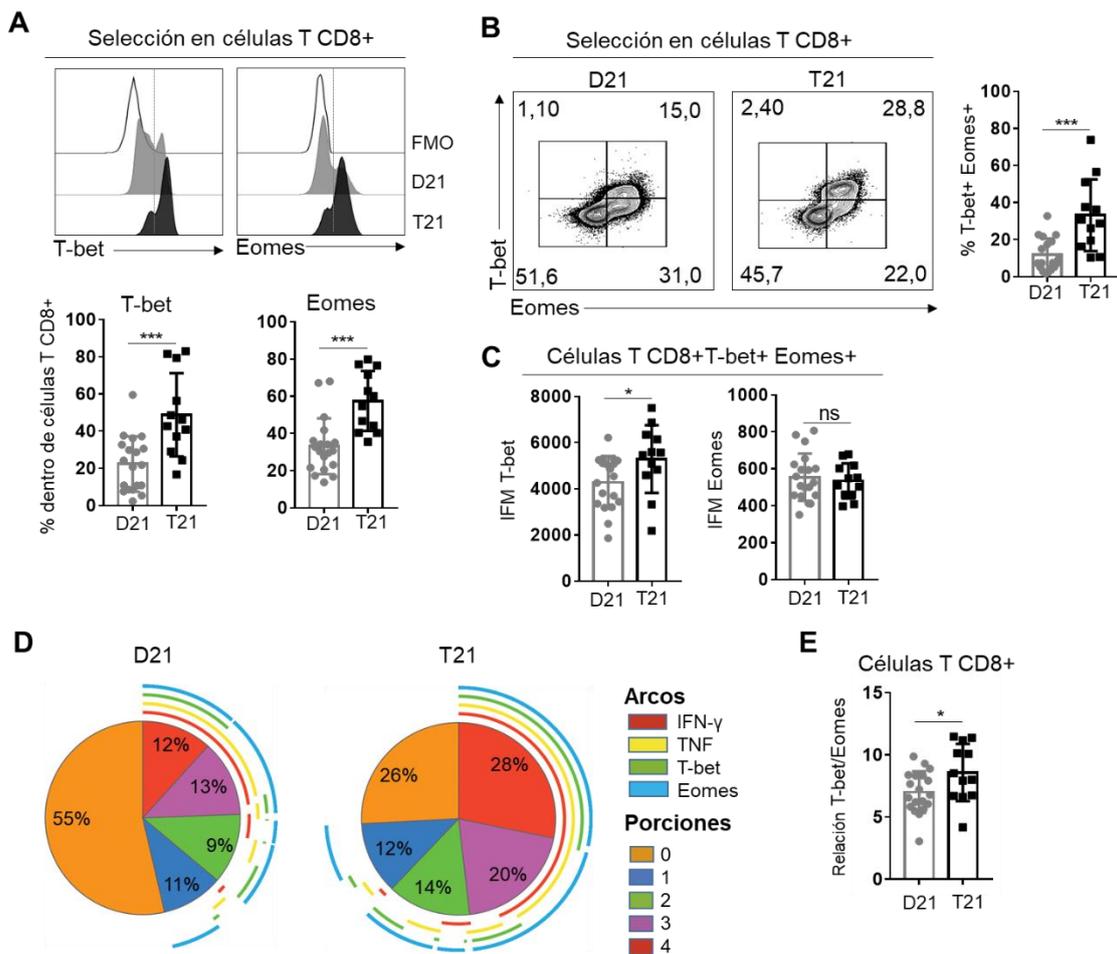


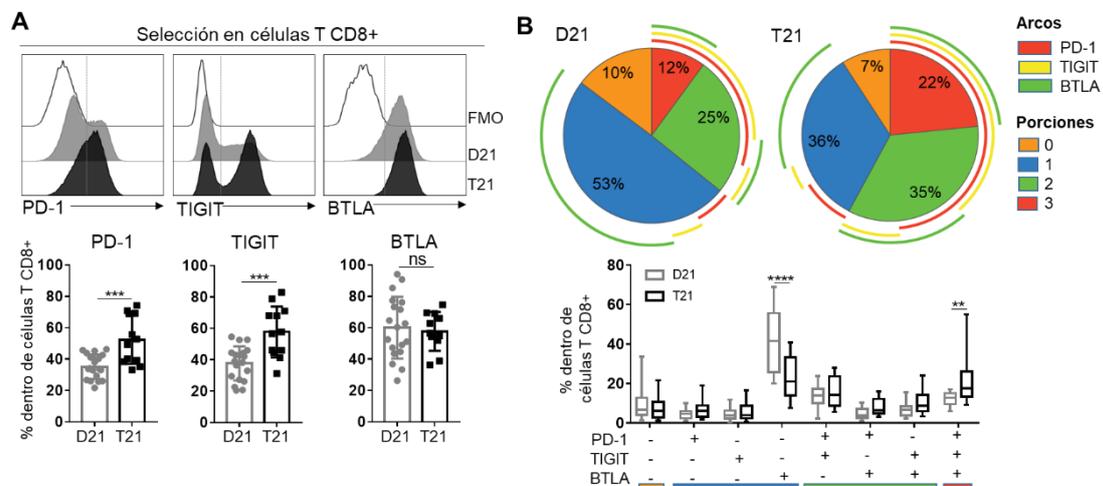
Figura I 6: Adultos con Trisomía 21 presentan un incremento en la expresión de los factores de transcripción T-bet y Eomes en las células T CD8+. PBMCs frescas de individuos sin (D21) y con T21 fueron estimuladas *ex vivo* con PMA/Ionomicina durante 4 horas y luego marcadas para CD3, CD8, GzmB, IFN- γ , TNF, Ki-67, PD-1, TIGIT, BTLA, CD57, KLRG1, T-bet, Eomes, CD45RA y CCR7. **A)** Histograma representativo (paneles superiores) y frecuencia (paneles inferiores) de T-bet y Eomes en las células T CD8+ totales en individuos sin (D21) y con T21 (n=19 D21 y n=12 T21). Los histogramas muestran los niveles de expresión de estos marcadores en las células T CD8+ totales de individuos con T21 (negro) y de controles típicos (D21, gris), en comparación con el FMO de cada molécula en células T CD8+ (blancas). **B)** Expresión simultánea de T-bet y Eomes, con gráficos representativos que comparan el porcentaje de células positivas, dentro del total de células T CD8+ en individuos sin (D21) y con SD. **C)** Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de T-bet y Eomes dentro de células T CD8+ positivas para T-bet y Eomes. **D)** Gráficos circulares que ilustran el tamaño relativo de la población de células T CD8+ con expresión única o simultánea de los marcadores IFN- γ , TNF, T-bet y Eomes en individuos sin (D21) y con T21 (n=19 D21 y n=12 T21). Los colores de las porciones circulares corresponden al número de marcadores expresados en una célula (naranja para 0, azul para 1, etc.). Los arcos alrededor de las porciones representan qué marcador (s) se expresan (es decir, IFN- γ rojo; TNF amarillo, etc.). **E)** Relación de T-bet y Eomes dentro de las células T CD8+ totales en personas sin (D21) y con SD (n=19 D21 y n=12 T21). Los datos en (A) hasta (C) y (E) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada; * p <0.05; *** p <0,001.

Hasta el momento, estos hallazgos sugieren que las células T CD8+ de personas con SD tienen un programa de diferenciación notablemente alterado hacia un estado funcional efector/citotóxico.

El hecho de que personas con T21 mostraran una mayor frecuencia de células T CD8+ TEMRA nos llevó a estudiar si estas células habrían adquirido un fenotipo de agotamiento/senescencia, que generalmente se observa en entornos inflamatorios crónicos (Wherry & Kurachi, 2015). Para examinar las vías asociadas con el agotamiento y la senescencia en células T CD8+ en individuos con T21, utilizamos nuevamente citometría de flujo multiparamétrica para evaluar la expresión de los receptores inhibitorios (PD-1, CD39, TIGIT, CTLA-4 y BTLA), moléculas coestimuladoras (ICOS y GITR), así como marcadores de senescencia asociados con un historial de un mayor número de divisiones celulares y acortamiento de telómeros como CD57 y KLRG1 (Brenchley et al., 2003; Henson & Akbar, 2009; Hoji et al., 2007; Ibegbu et al., 2005). Es de destacar, que la expresión de los receptores inhibitorios de CD39 y CTLA-4 y todas las moléculas coestimuladoras se detectaron en menos del 3% en las células T CD8+ (datos no mostrados); sin embargo, esta falta de detección no se debe a un defecto experimental, ya que estos marcadores se detectaron fácilmente en Tregs (ver más adelante la Figura I 9).

A partir de esto se determinó, que los individuos con SD tienen una mayor frecuencia de células T CD8+ que expresan los receptores inhibitorios PD-1 (52.3% vs 35.1%; p <0.001) y TIGIT (57.7% vs 37.7%; p <0.001), pero no así BTLA (Figura I 7A).

A continuación, utilizamos SPICE para identificar las posibles combinaciones de expresión entre los receptores inhibitorios estudiados; este análisis demostró que adultos con SD poseen un menor porcentaje de células T CD8+ que expresan en su superficie un único receptor inhibitorio (36,0% versus 53,0%; $p < 0.0001$), mientras que presentan una proporción significativamente mayor de células T CD8+ que coexpresan tres receptores inhibitorios (22,0% versus 12,0%; $p < 0.01$) en comparación con los controles típicos (Figura I 7B). Para examinar que subpoblación podrían explicar estas diferencias observadas en las células T CD8+ en individuos con T21, decidimos evaluar la expresión de los receptores inhibitorios dentro del compartimiento de células T CD8+, analizando separadamente las células T CD8 vírgenes, TEM, TCM y TEMRA. El mayor porcentaje de células que expresan PD-1 y TIGIT se observó mayoritariamente en células TEMRA, pero no hubo diferencias significativas entre ambas cohortes de individuos, mientras que llamativamente se demostró un incremento significativo en el porcentaje en las células T CD8+ vírgenes y TCM que expresan PD1 y TIGIT (vírgenes: 33,5% y 21,2 vs 12,6% y 8,7; $p < 0,01$ y TCM: 42,5% y 53,6% vs 26,0% y 43,2; $p < 0,05$), con respecto a sus controles euploides (Figura I 7C). Cuando evaluamos el porcentaje de células que expresan BTLA no observamos diferencias significativas dentro del compartimiento de células T CD8+, pero las células vírgenes fueron la población con mayor porcentaje de expresión de este receptor en ambos individuos (Figura I 7C). Esto se debe a que BTLA se expresa de manera constitutiva en esta subpoblación de células T (Krieg, Han, Stone, Goularte, & Kaye, 2005). Por otro lado, al examinar a las células T CD8+ no-vírgenes, observamos que sólo aumentó el porcentaje de células positivas para PD-1 no así las células positivas para TIGIT y BTLA, en comparación con sujetos sin T21. (Figura I 7D).



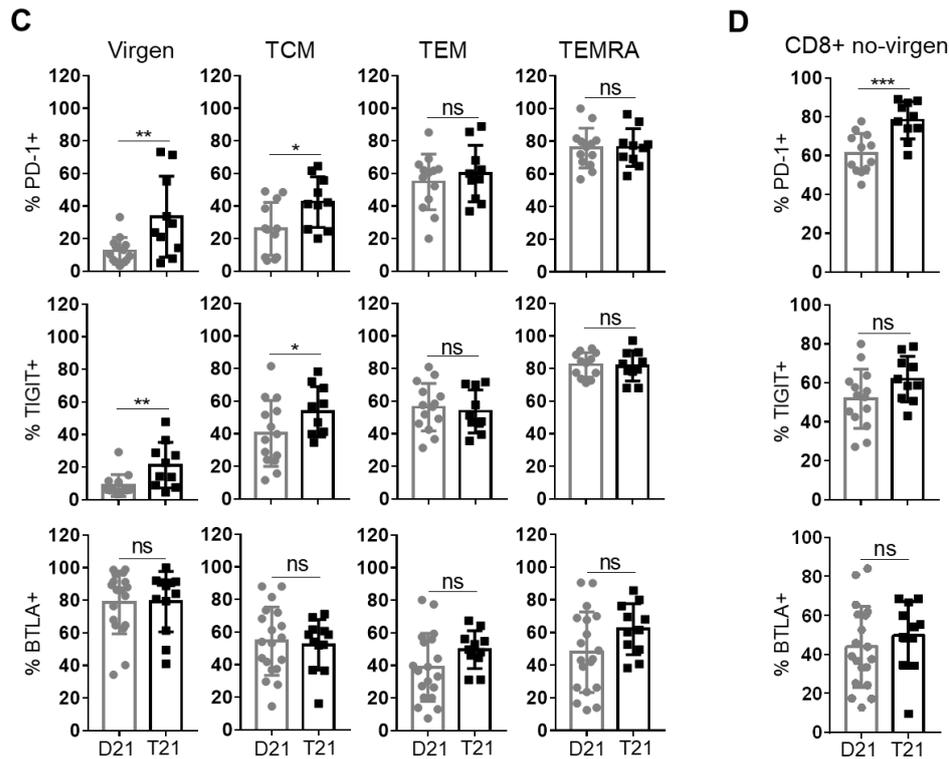


Figura 17: Adultos con Trisomía 21 muestran un incremento en la expresión de receptores inhibitorios en las células T CD8+. PBMCs frescas de individuos sin (D21) y con T21 fueron estimuladas *ex vivo* con PMA/Ionomicina durante 4 horas y luego marcadas para CD3, CD8, GzmB, IFN- γ , TNF, Ki-67, PD-1, TIGIT, BTLA, CD57, KLRG1, T-bet, Eomes, CD45RA y CCR7. **A)** Histograma representativos (paneles superiores) y frecuencias (paneles inferiores) de células que expresan PD-1, TIGIT y BLTA dentro de las células T CD8+ totales en individuos con y sin T21 (n=19 D21 y n=12 T21). Los histogramas muestran los niveles de expresión de estos marcadores en las células T CD8+ totales de individuos con T21 (negro) y de controles típicos (D21, gris), en comparación con el FMO de cada molécula en células T CD8+ (blancas). **B)** Gráficos circulares que ilustran el porcentaje relativo de la expresión simultánea de receptores inhibitorios en las células T CD8+ totales de personas sin (D21) y con T21 (n= 19 D21 y n=12 T21). Los colores de las porciones circulares corresponden al número de receptores inhibitorios expresados en una célula (naranja para 0, azul para 1, etc.). Los arcos alrededor de las porciones representan qué receptor (es) inhibitorio (s) se expresa (n) (es decir, PD-1 rojo; TIGIT amarillo, etc.) (panel superior), frecuencia de células T CD8+ que expresan 1, 2 o 3 receptores simultáneamente en individuos con y sin T21 (panel inferior). **C)** Proporción de células que expresan PD-1, TIGIT y BLTA en los diferentes subconjuntos de células T CD8+ definidos en la Figura 1 3D, en individuos sin (D21) y con SD. **D)** Porcentaje de células T CD8+ no-virgenes positivas para PD-1, TIGIT y BLTA en individuos sin (D21) y con T21. Los datos en (A), (C) y (D) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada, los datos en (B) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak. ns (no significativo), * p <0.05; ** p <0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

Nuestros datos demuestran que las células T CD8+ de individuos con T21 podrían presentar un fenotipo de hiperactivación y no de agotamiento, ya que estas células no han perdido características clásicas de una función efectora, como lo son la capacidad de secretar moléculas y citocinas proinflamatorias como GzmB, IFN- γ y TNF

(Figura I 4A-B) y mantienen su capacidad para proliferar frente a estímulos policlonales. (Figura I 5). A su vez, expresan de manera simultánea múltiples marcadores inhibitorios, los cuales aumentan su expresión normalmente en procesos fisiológicos de activación para regular y controlar una respuesta inmune en curso.

Por otro lado, nos pareció importante determinar marcadores de senescencia en células T CD8+, debido a que se ha reportado que los individuos con SD tienen un envejecimiento acelerado de su sistema inmune (A. Cossarizza et al., 1990; Cuadrado & Barrena, 1996; Kusters et al., 2009), y porque células que están sometidas a una gran proliferación sufren un proceso de acortamiento de telómeros distintivo de la senescencia (Akbar & Henson, 2011; Mcelhaney & Effros, 2009). Cuando examinamos la expresión de los marcadores de senescencia observamos que individuos con T21 poseen un mayor porcentaje de células T CD8+ positivas para CD57 (42,6% vs 17,7%; $p < 0,0001$) y KLRG1 (64,5% vs 38,1%, $p < 0,0001$) (Figura I 8A). El análisis de la expresión simultánea de CD57 y KLRG1, reveló que el porcentaje de células T CD8+ KLRG1+ CD57- (30,3% vs 21,8%; $p < 0,05$), KLRG1+ CD57+ (33,1% vs 12,8%; $p < 0,0001$) y KLRG1- CD57+ (3,1% vs 1,2%; $p < 0,01$) se encontraba incrementado significativamente en individuos con T21 frente a individuos sin T21 (Figura I 8B). Considerando que individuos con SD presentan una mayor proporción de células no-virgenes y al evaluar la expresión de estos marcadores de senescencia en la misma observamos que se encontraban significativamente aumentados (datos no mostrados), por lo que decidimos evaluar la coexpresión de estos marcadores dentro de la población de células T CD8+ no-virgenes. Se determinó un incremento significativo en el porcentaje de células CD57+ KLRG1+ (41,4 vs 26,7; $p < 0,01$) (Figura I 8C), lo que indica, que el subconjunto de células T CD8+ no-virgenes expresa una mayor frecuencia de células T CD8+ con marcadores de senescencia.

Como previamente fue mencionado, en la respuesta de las células T CD8+, el estado efector precede al estado de memoria, el cual podría desviarse a un fenotipo agotado y/o senescente en caso de la persistencia de antígenos o factores ambientales, respectivamente. De acuerdo con esta descripción, nosotros hipotetizamos que las células podrían existir en un estado intermedio en el que expresan marcadores de activación, inhibitorios y senescentes. Para investigar este fenotipo más a fondo, evaluamos la coexpresión de los marcadores de activación y senescencia. Es de destacar, que las personas con SD muestran una frecuencia significativamente elevada de células que coexpresan IFN- γ o TNF con PD-1, KLRG1 y CD57 (IFN- γ + PD-1+ KLRG1+ CD57+: 23,0% vs 11,0%, $p < 0,0001$, Figura I 8D; TNF+ PD-1+ KLRG1+ CD57+: 22,0% vs 10,0%, $p < 0,0001$, Figura I 8E), lo cual nos indica que personas con SD muestran porcentajes elevados de células T CD8+ en este estado bivalente. A

continuación, determinamos la expresión de T-bet y EOMES en las células T CD8+ positivas para CD57 y KLRG1, este análisis reveló que los adultos jóvenes con SD exhiben un aumento de T-bet (pero no EOMES) en las células T CD8+ KLRG1+ CD57+ (5553,8 vs 4369,7, $p < 0.05$) y KLRG1+ CD57- (5468,4 vs 4338,1, $p < 0.05$) (Figura I 8F). Estos hallazgos sugieren que las células T CD8+ de las personas con SD poseen un fenotipo asociado con la senescencia, lo cual concuerda con otros reportes previamente publicados en individuos con edad avanzada (Dolfi et al., 2013).

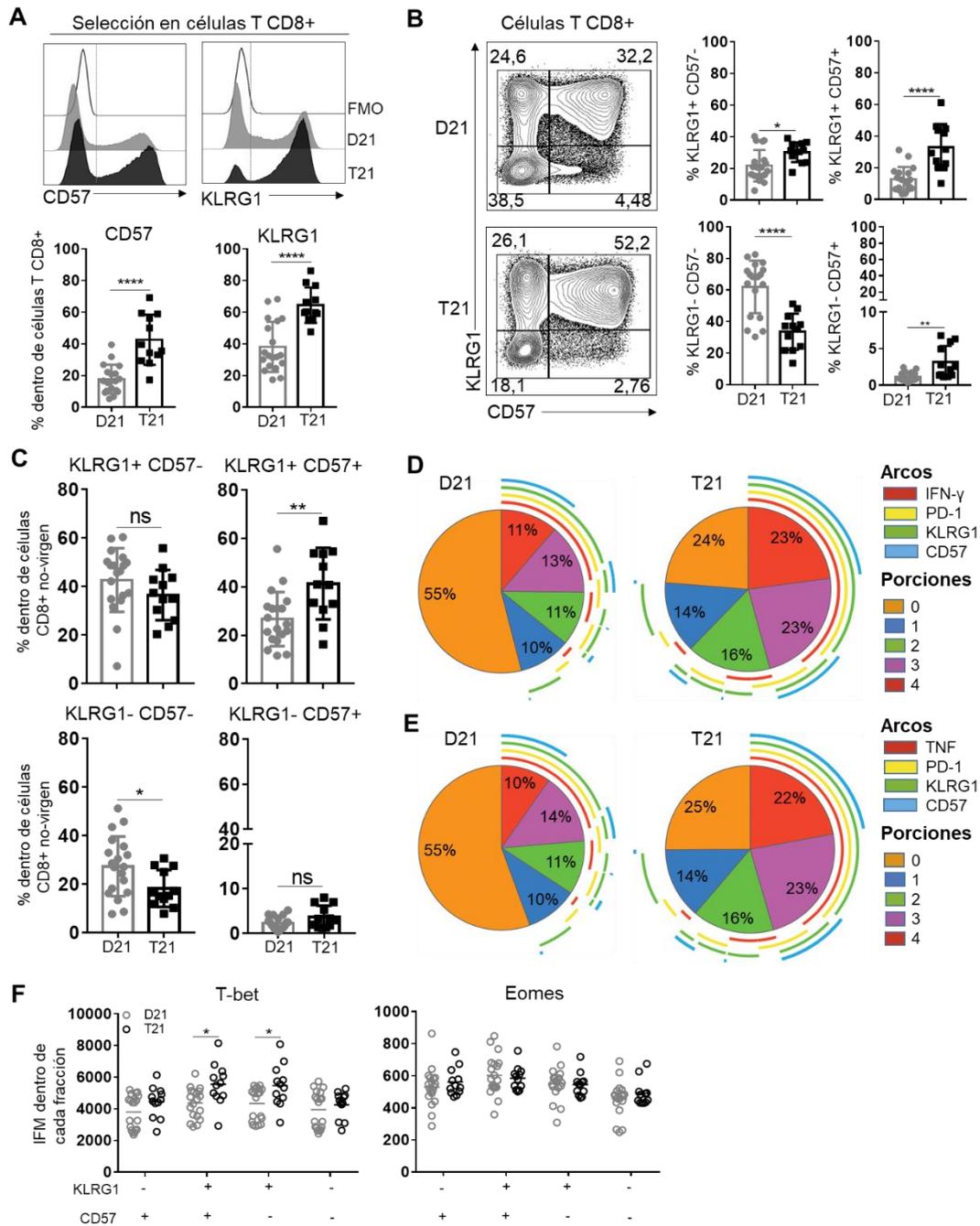


Figura I 8: Adultos con Trisomía 21 muestran un incremento en la expresión de marcadores de senescencia en las células T CD8+. PBMCs frescas de individuos sin (D21) y con T21 fueron estimuladas *ex vivo* con PMA/Ionomicina durante 4 horas y luego marcadas para CD3, CD8, GzmB, IFN- γ , TNF, Ki-67, PD-1, TIGIT, BTLA, CD57, KLRG1, T-bet, Eomes, CD45RA y CCR7. **A)** Histogramas representativos (paneles superiores) y frecuencias (paneles inferiores) de células que expresan CD57 y KLRG1 dentro de las células T CD8+ totales en individuos sin (D21) y con T21 (n=19 D21 y n=12 T21). Los histogramas muestran los niveles de expresión de estos marcadores en las células T CD8+ totales de individuos con T21 (negro) y de controles típicos (D21, gris), en comparación con el FMO de cada molécula en células T CD8+ (blancas). **B)** Gráficos de citometría de flujo representativos (paneles izquierdos) y frecuencia (paneles derechos) de la expresión simultánea de KLRG1 y CD57 en las células T CD8+ totales. **C)** Porcentaje de células T CD8+ no-virgenes positivas para CD57 y KLRG1 en individuos con y sin SD. **D-E)** Gráficos circulares que ilustran el tamaño relativo de la expresión única o simultánea de los marcadores IFN- γ (D) / TNF (E) con PD-1, KLRG1 y CD57 en la población de células T CD8+ totales en individuos sin (D21) y con T21 (n=19 D21 y n=12 T21). Los colores de las porciones circulares corresponden al número de marcadores expresados en una célula (naranja para 0, azul para 1, etc.). Los arcos alrededor de las porciones representan qué marcador (s) se expresan (es decir, IFN- γ o TNF rojo; PD-1 amarillo, etc.). **F)** Expresión relativa de T-bet (panel izquierdo) y Eomes (panel derecho) en células T CD8+ con expresión simple o doble de CD57 y KLRG1. Los datos en (A) hasta (C) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada, los datos en (F) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak. ns (no significativo), * p <0.05; ** p <0,01, **** p<0,0001.

En conjunto, estos resultados demuestran que los individuos con SD poseen células T CD8+ circulantes en un estadio de diferenciación terminal con un fenotipo efector hiperactivado, donde expresan receptores inhibitorios y marcadores de senescencia, pero tras la estimulación *ex vivo*, son capaces de proliferar y producir citocinas efectoras en mayor medida que sus controles euploides.

Caracterización fenotípica y funcional de las células T CD4+ circulantes en adultos con trisomía 21.

Las células T CD4+ humanas pueden diferenciarse en subconjuntos de células T con capacidad para producir citocinas diferentes a la vez que tienen patrones de migración que le permiten alojarse en tejidos afectados distintos. Aunque el efecto de los procesos inmunes persistentes sobre la diferenciación y función de las células T CD4+ han sido menos estudiados, estos subconjuntos de células T no contienen solamente células diferenciadas terminalmente, sino que la mayoría poseen una gran plasticidad. Particularmente, las células T de memoria particularmente pueden adquirir diferentes propiedades y funciones en respuestas inmunitarias secundarias (Becattini et al., 2015; Gray, Westerhof, & MacLeod, 2018). Además, existe evidencia de que al igual que las células T CD8+, las células T CD4+ pueden adquirir funciones reguladoras tras la estimulación crónica en tejidos inflamados, con una mayor expresión de receptores inhibitorios (Crawford et al., 2014).

Debido a que nuestros hallazgos hasta el momento demuestran que individuos con SD presentan alteraciones en la distribución de las células T CD4⁺ vírgenes/memoria y en el estado de activación de las células T CD8⁺, decidimos examinar el compartimiento de las células T CD4⁺ para investigar el estado de activación y la funcionalidad de subpoblaciones identificadas de acuerdo a la expresión de CD45RA y Foxp3 (Figura I 3F). Para abordar esto, realizamos una evaluación exhaustiva del fenotipo de las células T CD4⁺ mediante citometría de flujo multiparamétrica, donde se determinó la expresión de moléculas coestimuladoras (ICOS y GITR), receptores inhibitorios (CTLA4, PD-1, CD39, TIGIT, KLRG1), marcadores de activación (CD25, CD39 y Helios), un marcador de proliferación (Ki-67) y moléculas efectoras asociadas con la polarización y funcionalidad de las células T CD4⁺ (IFN- γ , IL-17A, LAP-1 y GzmB); como así también la expresión de proteínas asociadas con la activación, función supresora y especialización de las células Treg (CD25, ICOS, GITR, CTLA-4, PD-1, CD39, TIGIT, KLRG1, Helios, Ki-67, LAP-1, IL-17A, IFN- γ y GzmB).

Para dilucidar los cambios fenotípicos que presentan las personas con SD en esta población celular, realizamos un análisis multivariado cuantitativo de todos los parámetros evaluados, los cuales fueron representados en gráficos radiales (Figura I 9A). De esta manera podemos observar qué variables (parámetros) son similares o si hay cambios entre cada variable en las distintas subpoblaciones de células T CD4⁺ provenientes de individuos con y sin SD. Los datos se muestran en forma de dos dimensiones de manera tal que las variables cuantitativas evaluadas se encuentran representadas en los extremos de los ejes equiángulares que nacen de un mismo punto central, siendo la posición relativa y el ángulo de cada eje uniforme. Cada valor de variable evaluada, se traza a lo largo de su eje individual y todas las variables en un conjunto de datos se conectan para formar un polígono permitiendo de forma sencilla comparar los valores de cada variable en los distintos grupos estudiados. En nuestro caso, los valores de las variables (frecuencia de una molécula estudiada) fueron relativizados realizando una transformación aplicando el logaritmo en base 2 de la frecuencia de expresión de cada molécula, y los datos fueron graficados como un punto en cada eje. Estos gráficos radiales resumen el perfil fenotípico de los diferentes subconjuntos de células T CD4⁺ en personas con o sin T21 (Figura I 9A).

Se identificaron varias diferencias significativas entre personas con y sin SD. Primero, entre las células Tconv vírgenes, las cuales se encuentran reducidas en número y frecuencia en personas con SD (Figura I 3G), observamos una mayor capacidad de respuesta frente al estímulo PMA/Ionomicina, similar a lo observado previamente en células T CD8⁺ en las que las células vírgenes secretaban cantidades significativamente mayores de citocinas y presentaban una mayor capacidad

proliferativa con respecto a sus controles euploides frente a un estímulo *in vitro*. Esto se evidencia con el aumento significativo en el porcentaje de células positivas para Ki-67 como así también los receptores CD39, GITR, ICOS y TIGIT, pero no PD-1, indicativos de un estado activado (Figura I 9A). Llamativamente, células Tconv vírgenes de personas con SD también mostraron un aumento marcado en la expresión de IL-17A y en menor medida IFN- γ (Figura I 9A y B). En segundo lugar, las células Tconv de memoria, cuya proporción se encuentra significativamente aumentada en personas con SD (Figura I 3G), mostraron al igual que las células Tconv vírgenes, un incremento en el porcentaje de células positivas para CD39, GITR y TIGIT, al mismo tiempo que presentaban un estado polarizado hacia un perfil Th17, debido al aumento significativo en la producción de IL-17A (7,55% frente a 2,13%, $p < 0,001$) (Figura I 9A y B). Este fenotipo podría potencialmente evidenciar la alteración en la distribución de células Tconv vírgenes y de memoria en personas con SD, mientras que también apunta a un cambio en la polarización hacia un perfil Th17. En tercer lugar, las células Foxp3+ no-Treg mostraron pocas diferencias en la expresión de los distintos marcadores estudiados. Sin embargo, las células Treg mostraron algunos cambios, por ejemplo, mayor frecuencia de células Treg vírgenes Ki-67 positivas, consistente con el mayor número de estas células que presentan las personas con SD. Además, células Treg vírgenes mostraron una mayor frecuencia de Helios, el cual además de ser un marcador de activación, se lo ha utilizado para identificar a las células Treg provenientes de timo de aquellas generadas en periferia (Dhamne, Chung, Alousi, Cooper, & Tran, 2013; MacDonald et al., 2013); a su vez, observamos una reducción en el porcentaje de células positivas para PD-1 (Figura I 9A). Por otro lado, células Eff Treg, las cuales expresan más Foxp3 según los resultados mostrados en Figura I 3H, mostraron un perfil fenotípico similar al de sus controles (Figura I 9A).

Para confirmar este estado de polarización hacia un perfil Th17, medimos los niveles plasmáticos de IL-17A utilizando un ensayo denominado *Meso Scale Discovery* (MSD), el cual se utiliza para realizar la medición de múltiples moléculas en plasma de una cohorte de 40 adultos, 20 de ellos con SD (Tabla 2, Materiales y métodos). De manera interesante, observamos que las personas con SD tienen niveles significativamente elevados de IL-17A en plasma (Figura I 9C). Estos resultados nos sugieren que individuos con T21 presentan una mayor proporción de células Tconv vírgenes y de memoria productoras de IL-17, un fenotipo comúnmente asociado a varias condiciones inflamatorias y autoinmunes (Miossec & Kolls, 2012; Tabarkiewicz, Pogoda, & Karczmarczyk, 2015; Waite & Skokos, 2012; Yang, Sundrud, Skepner, & Yamagata,

2014). Esto señala una vez más el estado proinflamatorio observado en personas con SD y podría explicar su alta susceptibilidad a desarrollar condiciones autoinmunes.

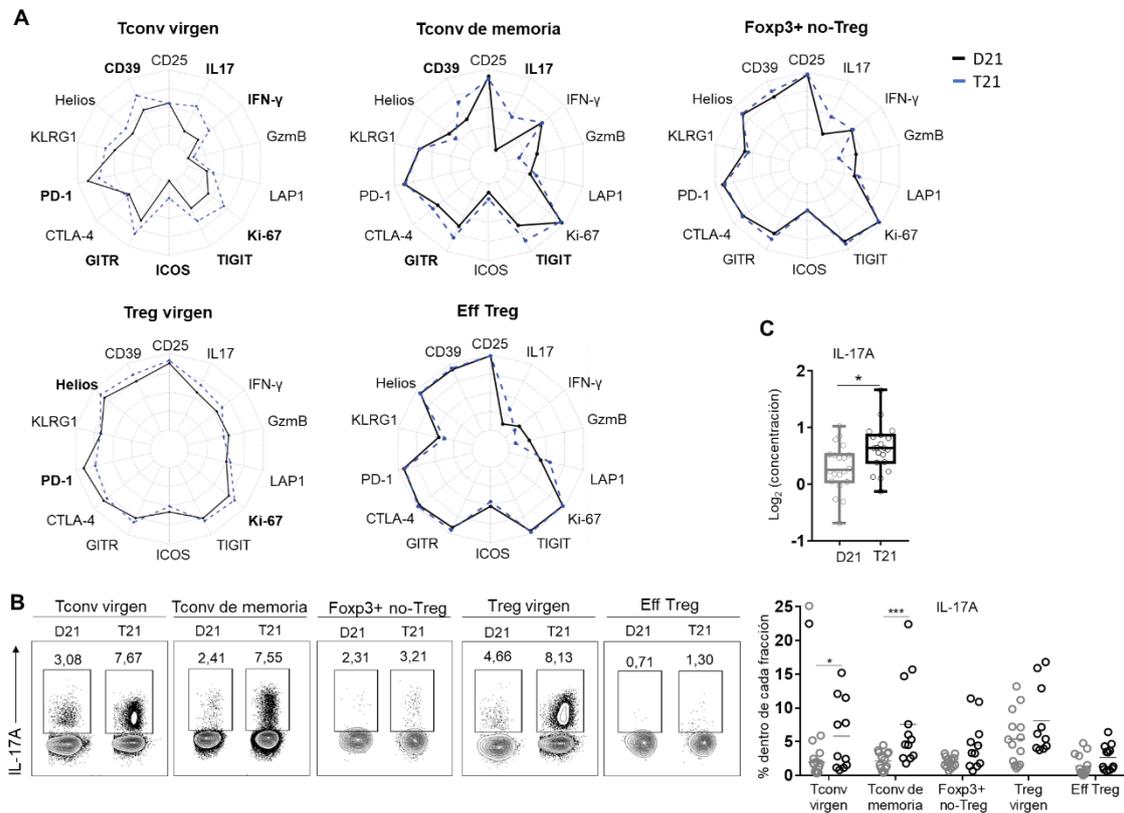


Figura 19: Adultos con Trisomía 21 poseen células T CD4+ polarizadas hacia un perfil Th17. PBMCs frescas de individuos sin (D21) y con T21 fueron estimuladas *ex vivo* con PMA/Ionomicina durante 4 horas y luego marcadas para CD3, CD4, FOXP3, CD25, CD39, Helios, KLRG1, PD-1, CTLA-4, GITR, ICOS, TIGIT, Ki-67, LAP-1, GzmB, IFN- γ e IL-17. **A)** Gráficos radiales que resumen el fenotipo observado en las distintas subpoblaciones de células T CD4+ en sangre periférica de individuos con T21 (línea azul) y sin T21 (línea negra) (n=9 T21 y n=14 D21). Cada radar representa la frecuencia de los diferentes parámetros indicados en una escala log₂ de la frecuencia de cada marcador. Los parámetros significativamente diferentes se encuentran representados en negrita **B)** Análisis de citometría de flujo representativo (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho) de IL-17A en las distintas subpoblaciones de células T CD4+ en individuos sin (D21) y con T21 (n=19 D21 y n=12 T21). **C)** Niveles de concentración de IL-17A (log₂ concentración) en plasma de individuos sin (D21) y con T21 (n=20 D21 y n=20 T21) obtenidos por un ensayo MSD (*Meso Scale Discovery*). Los datos en (A) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak, los datos en (C) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada. ns (no significativo), * p <0.05; *** p <0,001.

ENSAYOS FUNCIONALES DE CÉLULAS T EN INDIVIDUOS CON TRISOMÍA 21

El fenotipo de activación exacerbado observado en células CD8+ y CD4+ Tconv periféricas de individuos con SD no se encuentra acompañado de grandes cambios fenotípicos en la población de células CD4+ Treg, aparte de su mayor número y niveles de expresión de Foxp3 aumentados (Figura I 1D y Figura I 3H). Estos hallazgos llamaron nuestra atención dado que cabría de esperarse que el sistema inmune tratara de regular de alguna manera ese umbral de activación tan bajo que tienen las células T CD4+ y CD8+ en adultos con SD. Así hipotetizamos de que las células CD4+ Treg en individuos con T21 podrían de alguna manera ser ineficientes para controlar la funcionalidad de las células T efectoras. Por lo tanto, utilizamos una cohorte de 16 personas adultas, 7 de ellos con T21 y 9 controles típicos de la misma edad y género (D21) (Tabla 3, Materiales y métodos) y realizamos un clásico ensayo de supresión autólogo, donde las células respondedoras y supresoras utilizadas provenían del mismo individuo. Para realizar estos ensayos, utilizamos métodos de purificación y separación celular basados en *cell sorting* donde aislamos las células CD4+ Tconv y CD4+ Treg de adultos con y sin SD provenientes de muestras frescas de sangre periférica utilizando sus marcadores celulares.

Para realizar el ensayo de supresión autólogo, células CD4+ Tconv provenientes de individuos con y sin T21 fueron marcadas con *CellTracer Violet* como indicador de proliferación, y se sembraron en presencia de perlas anti-CD3/CD28, para promover la activación y posterior proliferación celular. Posteriormente, se agregaron al cultivo las células CD4+ Treg del mismo individuo, en diferentes relaciones (detallado en Materiales y Métodos). Luego de 5 días de incubación determinamos la proliferación de las células CD4+ Tconv en las distintas condiciones ensayadas mediante citometría de flujo. Se esperaba observar que la presencia de las Treg en el cultivo disminuya la capacidad de las Tconv de proliferar frente al estímulo. Esto se evidencia por una reducción en el número de picos de los histogramas de proliferación. En este ensayo observamos que las Treg de adultos sin T21 son capaces de suprimir la proliferación de células CD4+ Tconv, siendo más notable en la relación 1:1 (Treg: Tconv) (Figura I 10A-B); en cambio las Treg de adultos con T21 evidencian una capacidad de supresión disminuida, lo cual se observa en un menor porcentaje de supresión comparado con sus controles típicos en la relación 1:1 (60,0% versus 44,2, $p < 0,001$), sin encontrarse diferencias significativas en las demás condiciones (Figura I 10A-B).

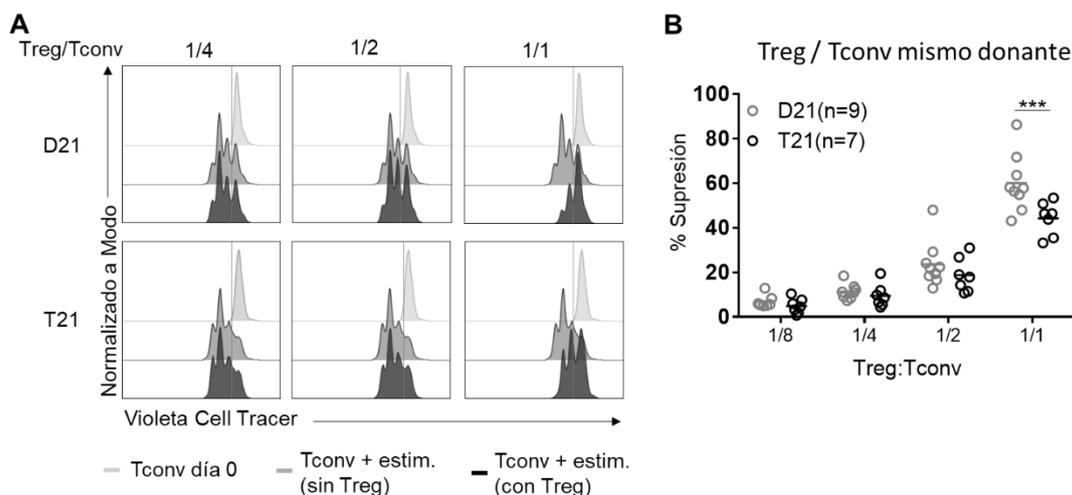


Figura 10: **Adultos con trisomía 21 poseen células Treg con una capacidad supresora disminuida en ensayos de supresión autólogos.** Células CD4+ Tconv (CD4+ CD25low CD127high) y células CD4+ Treg (CD4+ CD25high CD127low) provenientes de individuos sin (D21) y con T21 fueron cultivadas en diferentes relaciones, para realizar un ensayo de supresión autólogos. **A)** Histogramas representativos que muestran la proliferación de las células T CD4+ Tconv de individuos sin (D21) y con T21, determinada por la dilución del colorante Violeta luego de ser cultivadas 5 días con células CD4+ Treg, en presencia de perlas anti-CD3/anti-CD28. Control negativo de proliferación Tconv día 0 (línea gris claro), células Tconv estimuladas con anti-CD3/CD28 en ausencia de Treg (línea gris oscura) y células Tconv estimuladas con anti-CD3/CD28 en presencia de Treg (línea negra). **C)** Porcentaje de supresión de la proliferación de células CD4+ Tconv luego de 5 días de cultivo en presencia de anti-CD3/CD28 siguiendo las proporciones indicadas de células CD4+ Treg: Tconv, en individuos sin (D21) y con T21. Los datos se muestran como media \pm s.e.m, en (B) la significancia está determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak. *** $p < 0,001$.

A partir de estos resultados planteamos tres posibles explicaciones para la disminución de la supresión mediada por células CD4+ Treg en individuos con T21: la primera es que adultos con T21 poseen células CD4+ Treg con alteraciones en su capacidad supresora; la segunda es que estos individuos presenten células T efectoras resistentes a la supresión y la tercera es una combinación de ambas. Para abordar esto, realizamos un experimento de supresión *criss-cross* o “cruzado” (D’Alise et al., 2008; Schneider et al., 2008; Venigalla et al., 2008; Wehrens et al., 2011), para lo cual utilizamos una cohorte de 20 personas adultas, 10 de ellos con T21 y 10 controles típicos de la misma edad y género (D21) (Tabla 3, Materiales y métodos), donde empleamos los mismos métodos de purificación y separación celular utilizados en el ensayo de supresión autólogo. En este caso, luego de procesar las muestras, se purificaron células T CD8+, CD4+ Tconv y CD4+ Treg de adultos con y sin T21.

Para llevar a cabo el ensayo de supresión *criss-cross*, se sembraron células T CD8+ y las CD4+ Tconv, denominadas de ahora en más células respondedoras, provenientes de individuos con y sin T21, las cuales fueron marcadas con *CellTracer*

Violet para evaluar su proliferación, en presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD3/CD28. Luego, a las células respondedoras se le sumaron las células CD4+ Treg de individuos distintos con y sin T21; en diferentes relaciones. Las células se incubaron durante 5 días y luego se evaluó la capacidad proliferativa de células T CD8+ y las CD4+ Tconv utilizando citometría de flujo.

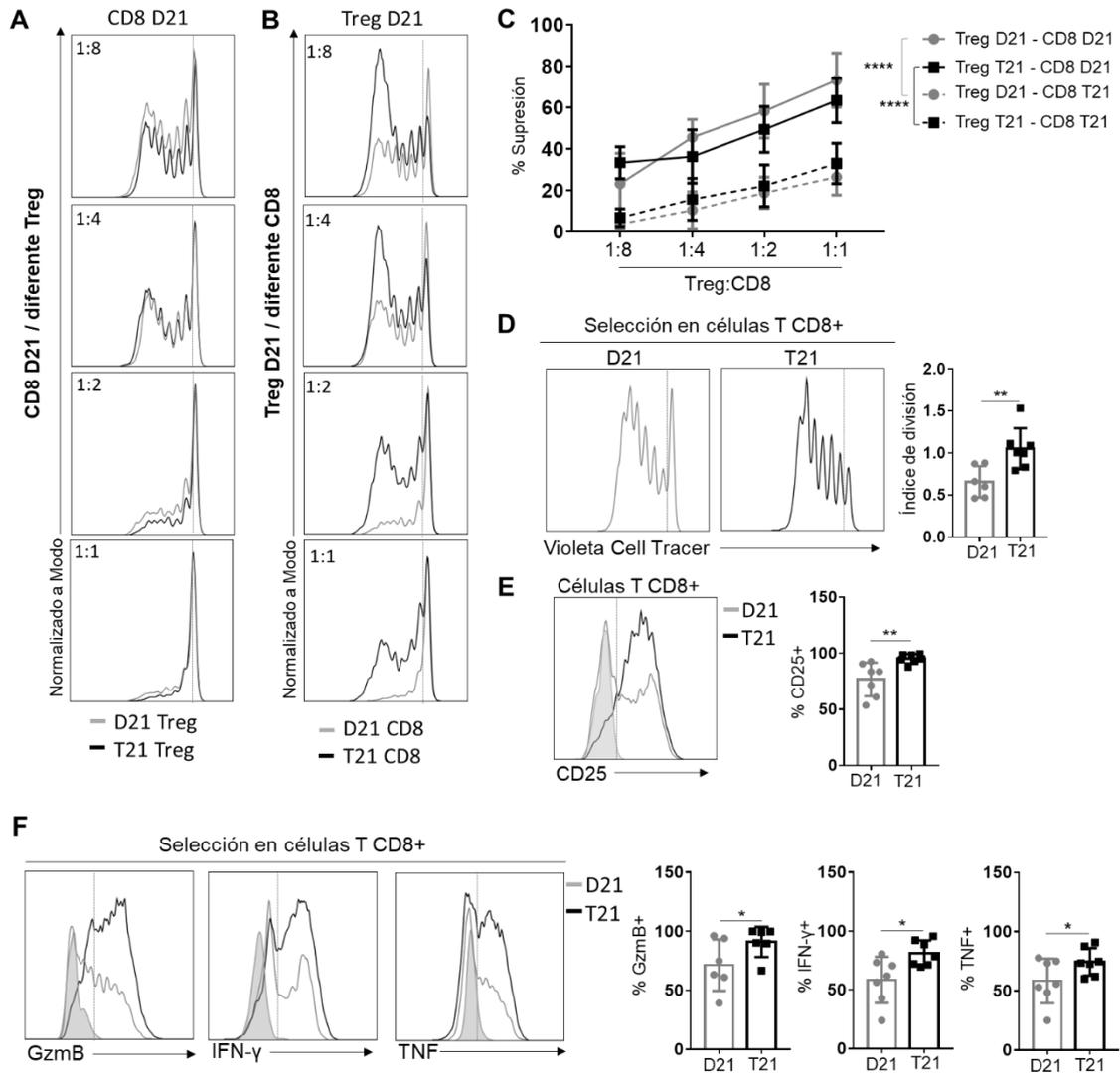


Figura I 11: **Adultos con Trisomía 21 poseen células T CD8+ refractarias a la supresión mediadas por células CD4+ Treg.** Células CD4+ Treg (CD4+ CD25^{high} CD127^{low}) y células T CD8+ de individuos sin (D21) y con T21 fueron cultivadas en diferentes relaciones, para realizar un ensayo de supresión "criss-cross". Histograma representativo que compara: **A)** la proliferación de las células T CD8+ de adultos sin (D21) y con T21, determinada por la dilución del colorante Violeta cultivadas con células CD4+ Treg de D21 y T21 en diferentes relaciones frente a las mismas células T CD8+ de D21. **B)** la proliferación de las células T CD8+ de adultos sin (D21) y con T21, cultivadas con células CD4+ Treg D21 en diferentes relaciones con células T CD8+ de D21 o T21 marcadas con violeta. **C)** Porcentaje de supresión en la combinación "criss-cross" luego de 5 días de cultivo en presencia de anti-CD3 / CD28 siguiendo las proporciones indicadas de células CD4+ Treg: CD8+, células T CD8+ respondedoras D21 (línea continua) y T21 (línea discontinua), células CD4+ Treg D21 (línea gris) y T21 (línea negra). **D)** Histograma representativo muestra la dilución del colorante de proliferación celular (panel izquierdo) y el Índice de División (panel derecho) de células T CD8+ de individuos con y sin SD, luego de 5 días de cultivo en presencia de anti-CD3 / CD28. **E-F)** Análisis representativo de citometría de flujo (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho) de células que expresan (E) CD25 y (F) GzmB, IFN- γ y TNF en las células T CD8+, después de 5 días de cultivo en presencia de anti-CD3 / CD28 y estimuladas las últimas 4 horas con PMA / Ionomycin. Los datos en (C) se muestran como media \pm s.e.m, la significancia está determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Tukey; en (D), (E) y (F) se muestran como media \pm s.e.m, la significancia está determinada por la prueba t no apareada. n=9/grupo. * p <0,05, ** p <0,01, **** p <0,0001.

Sorprendentemente, observamos que las células CD4+ Treg de cualquiera de los dos cariotipos presentaban una capacidad similar para suprimir a las células T CD8+ y CD4+ Tconv respondedoras de individuos euploides (Figura I 11A y Figura I 12A). Por el contrario, tanto las células T CD8+ como CD4+ Tconv provenientes de individuos con T21 fueron claramente resistentes a la supresión mediada por CD4+ Treg, independientemente del cariotipo Treg (Figura I 11B-C y Figura I 12B-C). Para explorar más a fondo este fenómeno, analizamos la proliferación y los marcadores de activación en las células respondedoras tras la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia de Treg. Este ensayo reveló que las células T CD8+ provenientes de individuos con T21 poseen una mayor tasa de proliferación, un aumento significativo en la frecuencia de células CD25+ y una mayor producción de moléculas efectoras como GzmB, IFN- γ y TNF (Figura I 11D-F), con respecto a sus controles euploides. Del mismo modo, observamos que las células CD4+ Tconv de individuos con T21, presentaban un aumento significativo de la proliferación, expresión de CD25 y la producción de IFN- γ (Figura I 12D-F), con respecto a sus controles típicos. Estos resultados nos indican que personas con SD poseen células T efectoras con una gran capacidad de respuesta ante estímulos *in vitro* (en este caso anti-CD3/CD28) refractarias a la supresión mediada por células CD4+ Treg, independientemente del cariotipo de las células supresoras.

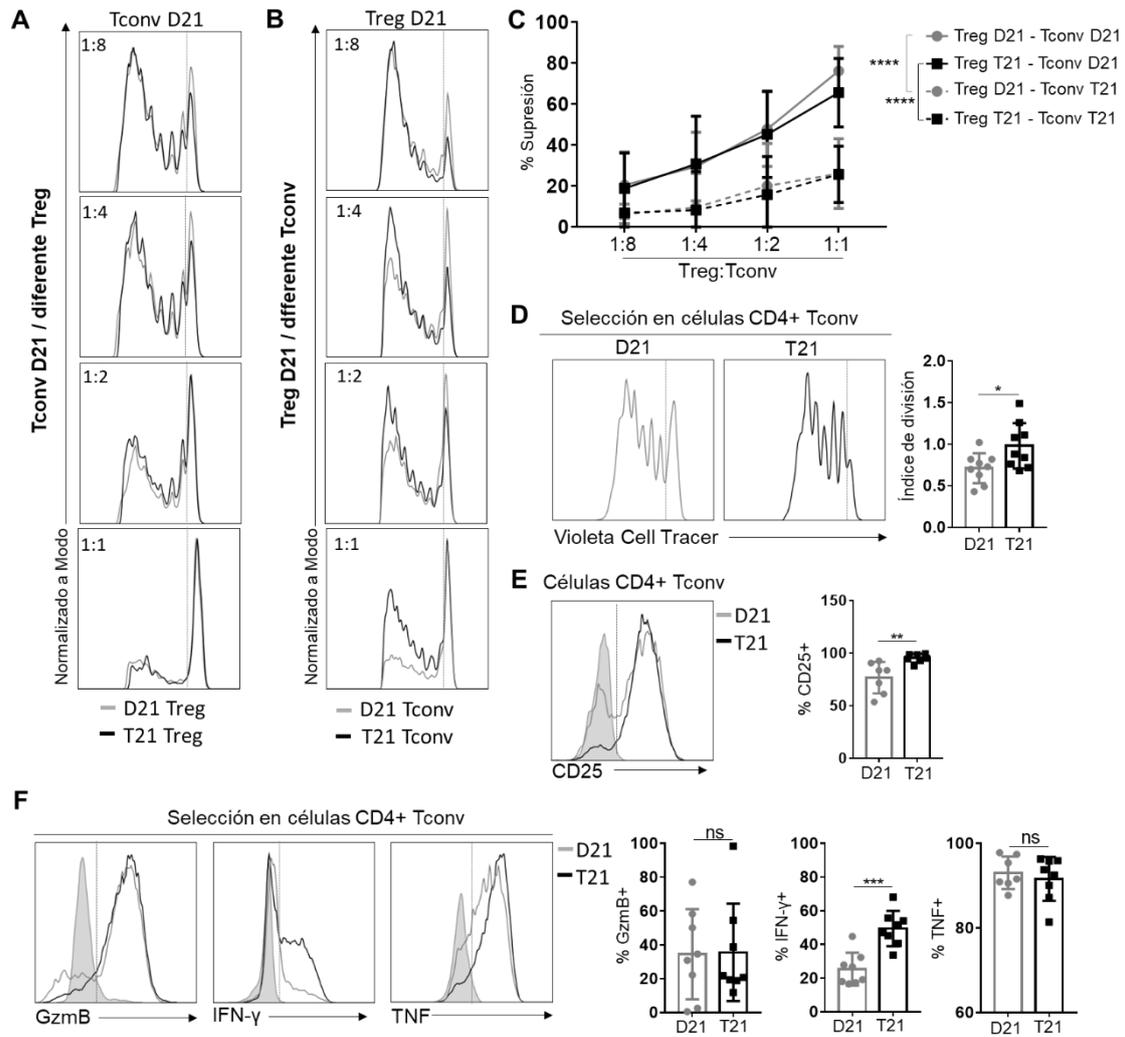


Figura 12: Adultos con Trisomía 21 poseen células T CD4+ Tconv refractarias a la supresión mediadas por células CD4+ Treg. Células CD4+ Treg (CD4+ CD25high CD127low) y células T CD4+ Tconv (CD4+ CD25low CD127high) de individuos sin (D21) y con T21 fueron cultivadas en diferentes relaciones, para realizar un ensayo de supresión “criss-cross”. Histograma representativo que compara: **A)** Proliferación de las células T CD4+ Tconv de adultos sin (D21) y con T21, determinada por la dilución del colorante Violeta cultivadas con células CD4+ Treg de D21 y T21 en diferentes relaciones frente a las mismas células T CD4+ Tconv de D21. **B)** Proliferación de las células T CD4+ Tconv de adultos sin (D21) y con T21, cultivadas con células CD4+ Treg D21 en diferentes relaciones con células T CD8+ de D21 o T21 marcadas con violeta **C)** Porcentaje de supresión en la combinación “criss-cross” luego de 5 días de cultivo en presencia de anti-CD3/CD28 siguiendo las proporciones indicadas de células CD4+ Treg: Tconv, células T CD4+ Tconv respondedoras D21 (línea continua) y T21 (línea discontinua), células CD4+ Treg D21 (línea gris) y T21 (línea negra). **D)** Histograma representativo muestra la dilución del colorante de proliferación celular (panel izquierdo) y el Índice de División (panel derecho) de células T CD4+ Tconv de individuos con y sin SD, luego de 5 días de cultivo en presencia de anti-CD3 / CD28. **E-F)** Análisis representativo de citometría de flujo (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho) de células que expresan (E) CD25 y (F) GzmB, IFN-γ y TNF en las células T CD4+ Tconv, después de 5 días de cultivo en presencia de anti-CD3/CD28 y estimuladas las últimas 4 horas con PMA / Ionomycin. Los datos en (C) se muestran como media ± s.e.m, la significancia está determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Tukey; en (D), (E) y (F) los datos se muestran como media ± s.e.m, la significancia está determinada por la prueba t no apareada. n=9/grupo. ns (no significativo), * p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001.

Para estudiar más en profundidad el impacto global de la T21 en el programa transcripcional de las células CD4⁺ Treg, comparamos los perfiles de expresión génica de las células CD4⁺ Treg provenientes de individuos con y sin SD, y caracterizamos el potencial funcional de estas células a nivel molecular. Para ello, las células CD4⁺ Treg fueron purificadas (como CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{lo}) de sangre periférica de una cohorte de 12 participantes del protocolo de investigación, 6 con T21 y 6 controles típicos de la misma edad y género (D21), y realizamos un análisis transcriptómico mediante secuenciación de ARN (ARN-seq). Al comparar las células T21 versus D21 identificamos una firma distintiva causada por la T21, donde 134 ARNm se encontraban expresados diferencialmente (*differentially expressed genes*: DEG) ($p_{adj} < 0.1$), 43 ARNm disminuidos y 91 ARNm aumentados en las células CD4⁺ Treg T21 (utilizando un valor p ajustado que recorta resultados falsos positivos. FDR <10%, Figura I 13A). Cuando evaluamos dónde se ubicaban los DEG en todo el genoma encontramos, como era de esperar, que muchos genes codificados en el chr21 estaban sobreexpresados, debido a la propia trisomía. Sin embargo, ~73% de los DEG se encontraban codificados en otros cromosomas, mostrando un patrón obvio de regulación donde genes se encuentran aumentados y disminuidos (Figura I 13B). Posteriormente, investigamos en qué medida los cambios en la expresión génica observados estaban causados por la T21, o en otras palabras si se ven afectados por los genes codificados en el chr21. Para ello realizamos un análisis de componentes principales (PCA) en el cual observamos que el transcriptoma de células Treg de individuos con T21 se segrega completamente (PC1 44,27%) del transcriptoma de los controles típicos (Figura I 13C); en cambio, no observamos lo mismo cuando utilizamos los primeros 500 genes, dentro de los cuales se encontraban los DEG, del genoma total (Figura I 13D). Estos resultados nos indican que el impacto global en el transcriptoma de las células Treg trisómicas se ve afectado principalmente por la presencia de una copia extra del chr21 y los genes codificados en él, como era de esperarse. El resto de los genes DEG no muestran un compartimiento diferente entre individuos con T21 y controles típicos, indicando, que al menos en las condiciones ensayadas el programa transcripcional de las Treg de T21 y D21 no es tan diferente (Figura I 13D).

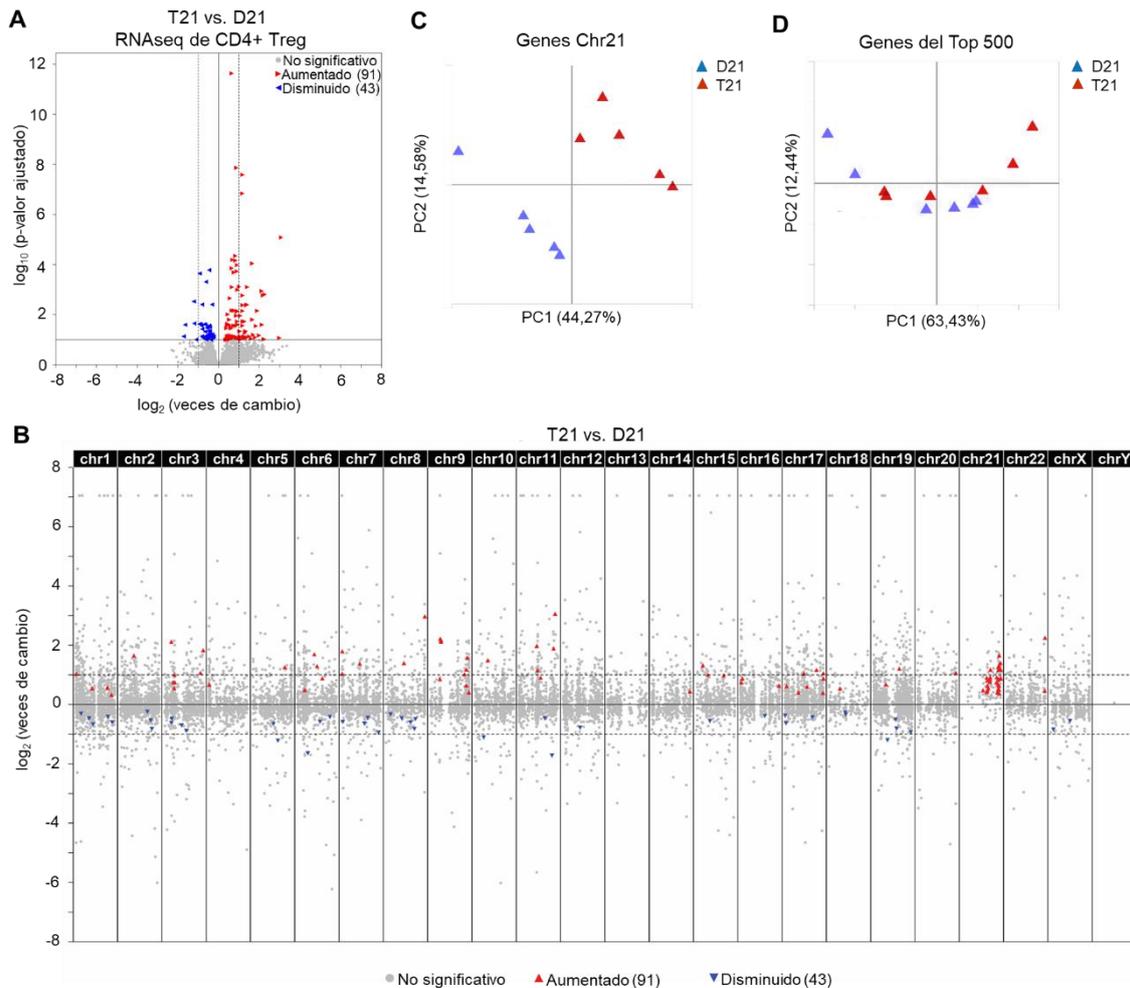
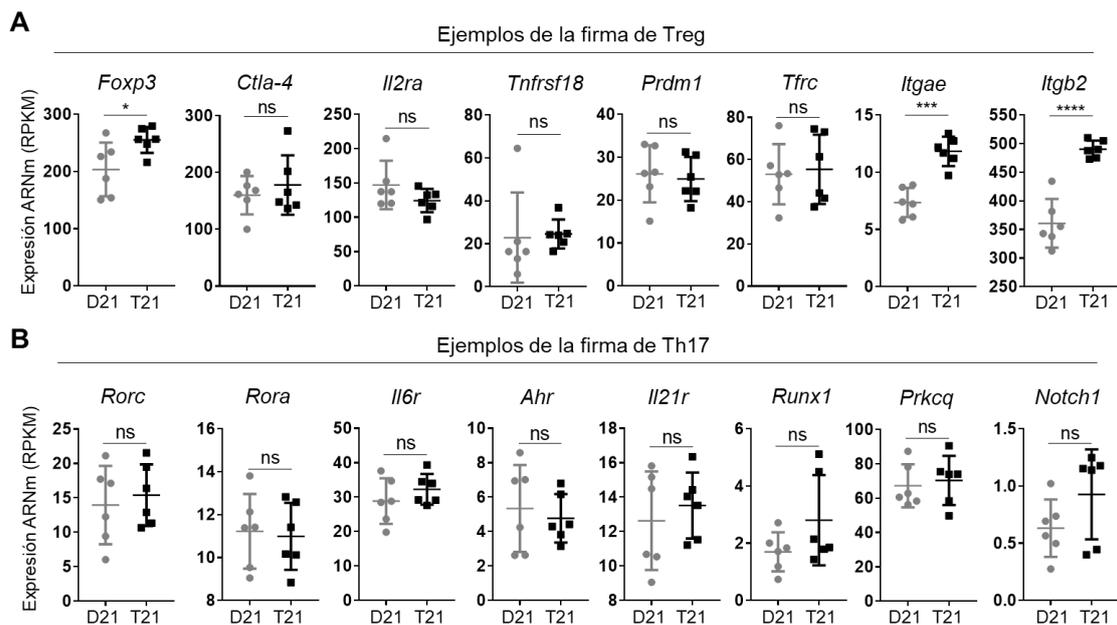


Figura I 13: Células T regulatorias de adultos con T21 poseen un perfil de expresión génica similar al de sus controles típicos. Análisis transcriptómico realizado a partir de células CD4+ Treg (CD4+ CD25high CD127low) de individuos sin (D21) y con T21. **A)** Gráfico volcán que muestra las veces de cambio (T21 sobre D21) y los valores de p para los ARNm detectados por RNAseq. Los genes expresados diferencialmente se marcan en rojo (significativamente aumentados), azul (significativamente disminuidos) y gris (no significativo), (FDR <10). **B)** Gráfico Manhattan que muestra los genes expresados diferencialmente en cada cromosoma. Genes en rojo (significativamente aumentados), azul (significativamente disminuidos) y gris (no significativo). **C-D)** Análisis de componentes principales (PCA) (C) basado en la lista de genes codificados en el chr21 que están diferencialmente expresados, D) basado en el top 500 de genes en todo el genoma. Los genes expresados diferencialmente (DEG), se definen por DEseq2 (FDR <10%), Los valores de p se calcularon con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, padj <0,1.

Por último, para comparar la firma de las células Treg de personas con y sin SD, evaluamos la expresión de genes que participan en la activación, función supresora y especialización de estas células, de la misma manera que hicimos mediante citometría de flujo. Determinamos un aumento significativo en la expresión de *foxp3* en las células Treg T21, lo cual fue predecible ya que la expresión de Foxp3 por citometría de flujo fue mayor (Figura I 3H), mientras que la mayoría de los transcritos de la firma Treg, además de los medidos por citometría de flujo, se encontraban representados de la

misma manera en las células D21 y las T21, incluyendo *Ctla4*, *Il2ra*, *Tnfrsf18*, *Il10*, *Tigit*, *Tfrc*, *Prdm1*, *Il7r*, *Ccr7*, *Cd45ra*, *Cd28*, *Cd38*, *Cd137*, entre otros. En contraste *Itgb2* e *Itgae*, a los cuales se le ha atribuido una actividad reguladora al expresarse en células Treg, se encontraron significativamente aumentados en individuos con T21 con respecto a sus controles (Figura I 14A). A su vez, cuando evaluamos la expresión de genes asociados a la especialización funcional de las células Treg, observamos que células CD4+ Treg provenientes de individuos con T21 presentaban niveles similares de algunos transcritos asociados con una firma Th17, como lo *son Rorc*, *Rora*, *IL6R*, *Batf*, *Runx1*, *Stat3*, *IL21R*, *Notch 1*, *Notch2*, *Prkcq* y *Ahr* (Figura I 14B). De manera similar, observamos que las células Treg de estos individuos no presentaron diferencias en la expresión de genes asociados con un perfil Th2, como *Gata3*, *Gfi1*, *Stat5a*, *Stat5b*, *Il4ra*, *Il1r2*, *Irf4* e *Il10* (Figura I 13C). Por último, cuando evaluamos el perfil de especialización hacia Th1, no se encontraron diferencias en la expresión de genes, como *Tbx21*, *Eomes*, *Ifng*, *Stat1*, *Runx3*, *Ifngr1*, *Tnf*, *Gzmb*, *Socs3*, *Il12rb* e *Il12rb2*, entre ambos cariotipos de células Treg (Figura I 14D). Estos resultados revelaron que células Treg T21 tiene un perfil transcripcional similar al de las Treg D21.



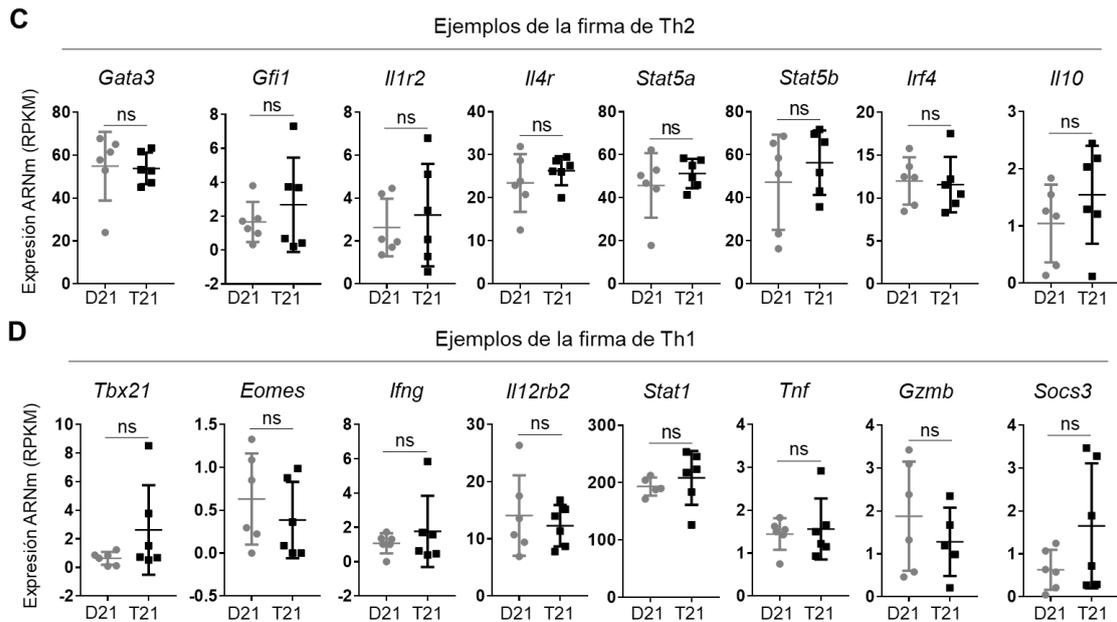


Figura I 14: Células T regulatorias de adultos con trisomía 21 poseen un perfil transcripcional similar al de sus controles. Análisis transcriptómico realizado a partir de células CD4+ Treg (CD4+ CD25high CD127low) de individuos sin (D21) y con T21. Los diagramas de caja y bigotes muestran ejemplos de la expresión de ARN para las firmas de **A) Treg, B) Th17, C) Th2 y D) Th1.** Los valores de expresión de ARNm se muestran en lecturas por kilobase por millón (RPKM). Los datos en (A) hasta (D) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada, ns (no significativo), * $p < 0.05$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

En conjunto estos resultados demuestran que el defecto en la regulación de células T en personas con SD, se debe a que células T efectoras son resistentes a la supresión mediada por células Treg, lo cual podría explicarse por el microambiente hiperactivado e inflamatorio de individuos con SD.

Conclusiones parciales I:

- Individuos con T21 presentan una distribución similar de células T totales tanto en frecuencia como en número de células.
- Individuos con T21, presentan una relación asimétrica de células T CD4+ / CD8+ con respecto a individuos sin T21, debido a que poseen una disminución en la frecuencia de células T CD4+, acompañado por un aumento en el porcentaje y número de células T CD8+.
- Dentro de las células T CD4+, observamos que individuos con T21 presentan un aumento en la frecuencia y número de células T CD4+ Treg, mientras que muestran una disminución en el porcentaje células T CD4+ Tconv.
- Individuos con T21 presentan alteraciones en el compartimiento de células T CD8+, debido a una disminución significativa en la frecuencia de células T vírgenes, acompañado por un aumento significativo en la población TEMRA.
- Dentro del compartimiento de CD4+, individuos con T21 presentan frecuencias similares en las subpoblaciones de células T CD4+ Treg, pero en el compartimiento de células CD4+ Tconv muestran una mayor frecuencia de células T de memoria y un porcentaje reducido de células T vírgenes.
- Células T CD8+ de individuos con T21 reflejan un fenotipo de activación continua y de diferenciación terminal, a pesar de expresar marcadores de senescencia y receptores inhibitorios, revelan un aumento significativo en la capacidad proliferativa y en la producción de GzmB, IFN- γ y TNF.
- Las células T CD4+ y CD8+ vírgenes muestran un umbral de activación sorprendentemente bajo, con respecto a sus controles euploides.
- En individuos con T21 las células T CD4+ Tconv se ven más favorecidas a un perfil Th17, mientras que células Eff Treg se encuentran más activadas por poseer una mayor expresión de FOXP3.
- Los ensayos funcionales muestran que las células T efectoras CD8+ y CD4+ de las personas con SD son refractarias a la supresión mediada por Treg, independientemente del cariotipo Treg.
- Análisis transcriptómico de células Treg revela que personas con SD poseen un perfil de expresión génica similar a células Treg provenientes de individuos sin SD.

OBJETIVO ESPECÍFICO II: ESTUDIAR EL IMPACTO DEL EJE IFN-I/IFNAR SOBRE LA BIOLOGÍA DEL COMPARTIMIENTO DE CÉLULAS T CIRCULANTES EN ADULTOS CON TRISOMÍA 21

PARTE IIA: Determinación del impacto global de la Trisomía 21 en el programa transcripcional de células T.

PARTE IIB: Estudio del impacto de la Trisomía 21 sobre la señalización de IFN-I en células T circulantes.

PARTE IIC: Efecto de los IFN-I sobre la funcionalidad de células T en individuos con Trisomía 21.

IMPACTO GLOBAL DE LA TRISOMÍA 21 EN EL PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE CÉLULAS T

Con el fin de investigar las vías de señalización desreguladas por la T21, que podrían explicar estos cambios observados en las células T, realizamos un análisis transcriptómico de glóbulos blancos totales. El estudio se realizó en una cohorte de 19 individuos, 10 de ellos con T21 y 9 controles típicos de la misma edad y género (ver Materiales y Métodos para detalles de la cohorte, Tabla 4). Los leucocitos totales fueron purificados de sangre total, luego se aisló el ARN y se realizó el ARNseq. Detectamos, que la T21 causa una firma distintiva de expresión génica que consiste en 497 ARNm disminuidos y 406 ARNm aumentados (FDR <10%, Figura II 1A). Cabe destacar que 96 de los genes que se encuentran aumentados, pero ninguno de los genes disminuidos, están codificados en el chr21; esto concuerda con los efectos esperados debido a la mayor dosis génica (marcados en verde en la Figura II 1A). Sin embargo, alrededor del 90% de la firma asociada a la T21 se encuentra codificada en otras partes del genoma, lo que indica la existencia de cascadas de señalización desreguladas por la trisomía. Para identificar estas vías de señalización, empleamos la herramienta de análisis denominada *Upstream Regulator* del software IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) (Krämer, Green, Pollard, & Tugendreich, 2014), este software basado en algoritmos se lo utiliza para el análisis, integración e interpretación de datos derivados de experimentos ómicos, para identificar nuevos biomarcadores basándose en datos previamente publicados. Esta estrategia reveló que las dos primeras vías de señalización que se predicen activadas en los leucocitos totales en T21 son la señalización de CD3 y CD28, ambos coreceptores de membrana que median la activación de las células T (Figura II 1B). Es importante destacar que estas predicciones son impulsadas en gran medida por los ARNm que no están codificados en el chr21 (Figura II 1B) y que se encuentran aumentados significativamente y forman parte de estas vías de señalización. A su vez, todos los genes en la firma molecular de CD28 son parte de la firma CD3. Al analizar estas firmas, se observó un aumento significativo en la expresión de muchos genes regulados luego de la activación de las células T, como CCR5, CCL5, CXCR6, GFI1, RORC y FOXP3, en las células provenientes de personas con SD (Figura II 1C) (Gilks, Bear, Grimes, & Tschlis, 1993; Gornalusse et al., 2015; Heesch et al., 2014; Kmiecik et al., 2009; Latta, Mohan, & Issekutz, 2007; X. Li & von Boehmer, 2011; Mukherjee, Schaller, Neupane, Kunkel, & Lukacs, 2009; Murooka, Rahbar, Platanius, & Fish, 2010; Sato et al., 2005; J. Wang et al., 2007). Aunque existen variaciones entre los individuos con T21, el score de activación de CD3, (el cual se determina según la sobre-expresión o no de un determinado grupo de genes firmemente involucrados en la activación de estas células, en este caso, calculado a partir de 38

genes), se encontraba significativamente más altos que en las personas típicas (Figura II 1D). Estos resultados indican que, luego de evaluar el transcriptoma de todas las poblaciones de leucocitos, la señal más destacada en individuos con SD, es la sobreexpresión de genes involucrados en la activación de las células T. Así mismo, determinamos que otras vías de señalización que se predecían activadas en personas con SD incluyen varias citocinas como IL-18, IL-1 β e IL-2; y múltiples componentes de la vía de señalización de IFN dentro de los cuales encontramos a IRF7, TLR7, IFNbeta, IFNG, IFNalfa (Figura II 1B).

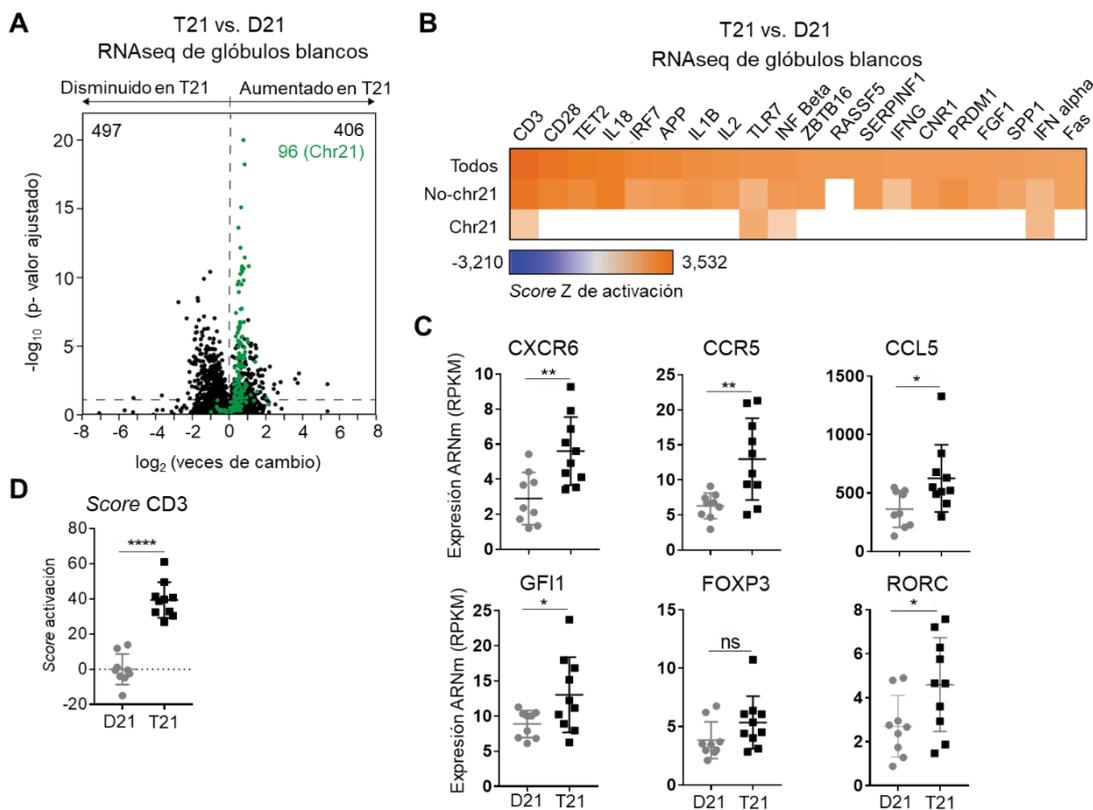
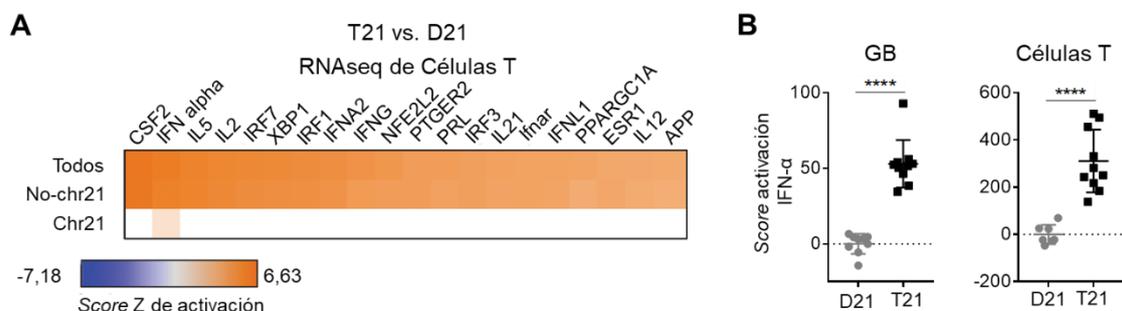


Figura II 1: Análisis transcriptómico de leucocitos totales de adultos con Trisomía 21 revela firmas de expresión génica indicativas de activación de células T. El análisis de ARNseq se realizó con glóbulos blancos totales de 19 participantes, 10 de ellos con Trisomía 21. **A)** Gráfico de volcán que muestra las veces de cambio (T21 sobre D21) y los valores de p para los ARNm detectados por RNAseq. Los ARNm codificados por los genes en el cromosoma 21 están marcados de verde. El número de genes significativamente disminuidos y aumentados (FDR<10%) se indica en las esquinas superior izquierda y derecha, respectivamente. **B)** Mapa de calor que muestra los resultados del análisis de los datos de RNAseq en (A) utilizando la herramienta *Upstream Regulator* del software IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Las vías de señalización que se predicen que se activarán aparecen en la parte superior. De arriba hacia abajo, el análisis se realizó utilizando todos los genes expresados diferencialmente (DEG). Los DEG no codificados en chr21 (No-chr21) y los DEG en chr21. **C)** Gráficos de puntos que muestran datos para genes representativos del RNAseq que pertenecen a la firma de activación CD3. RPKM: lecturas por kilobase por millón. **D)** Gráficos de puntos que muestran los valores de puntuación de activación de CD3 para cada muestra evaluada de individuos típicos (D21) o individuos con síndrome de Down (T21). Los datos en (C) y (D) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada. ns (no significativo); * p <0,05; ** p <0,01; **** p <0,0001.

Luego, para obtener más información sobre este fenómeno, analizamos los datos de ARNseq que fueron generados previamente por el grupo del Dr. Joaquín Espinosa, a partir de células T totales previamente purificadas (CD45+ CD3+ CD14- CD19- CD56-) de una cohorte de 17 participantes, 10 con T21 (Sullivan et al., 2016b). Cuando realizamos el mismo análisis con IPA en este conjunto de datos, cinco de las primeras diez vías de señalización que se predecían activas, pertenecían a la vía de IFN (IFNalfa, IRF7, IRF1, IFNA2, IFNG) (Figura II 2A), lo cual es consistente con hallazgos anteriores del grupo, donde se observaba cómo la T21 activa la respuesta IFN en múltiples tipos de células (Sullivan et al., 2016). Una vez más, esta firma molecular se constituye por genes que se no encuentran codificados en el chr21, y está enriquecida por genes canónicos estimulados por IFN. Al igual que con el *score* de activación de CD3, existe un *score* de activación de la vía de IFN, generado por autores que identificaron numerosos genes de esta vía que se expresan diferencialmente si la misma está activada (Samarajiwa et al., 2009). En personas con SD, los valores de *score* de IFN se encuentran significativamente elevados, tanto en células T totales como en los leucocitos totales (Figura II 2B). Posteriormente, evaluamos la correlación entre las firmas de CD3 e IFN en los leucocitos totales y se observó que estas firmas no se superponen completamente, pero existe una fuerte correlación positiva entre el *score* de CD3 e IFN tanto en individuos euploides como trisómicos, presentando *scores* mucho más elevados los individuos con T21 (Figura II 2C). Finalmente, el ARNseq de las células T confirmó un aumento en la inducción transcripcional de T-bet (TBX21) y EOMES en las células T de personas con SD (Figura II 2D), lo que proporciona evidencia adicional al fenotipo hiperactivado observado en las células T CD8+ de personas con SD. Es de destacar, que la expresión de T-bet y EOMES se correlacionó positivamente, y significativamente, con el *score* de IFN alfa en las células T (Figura II 2E).



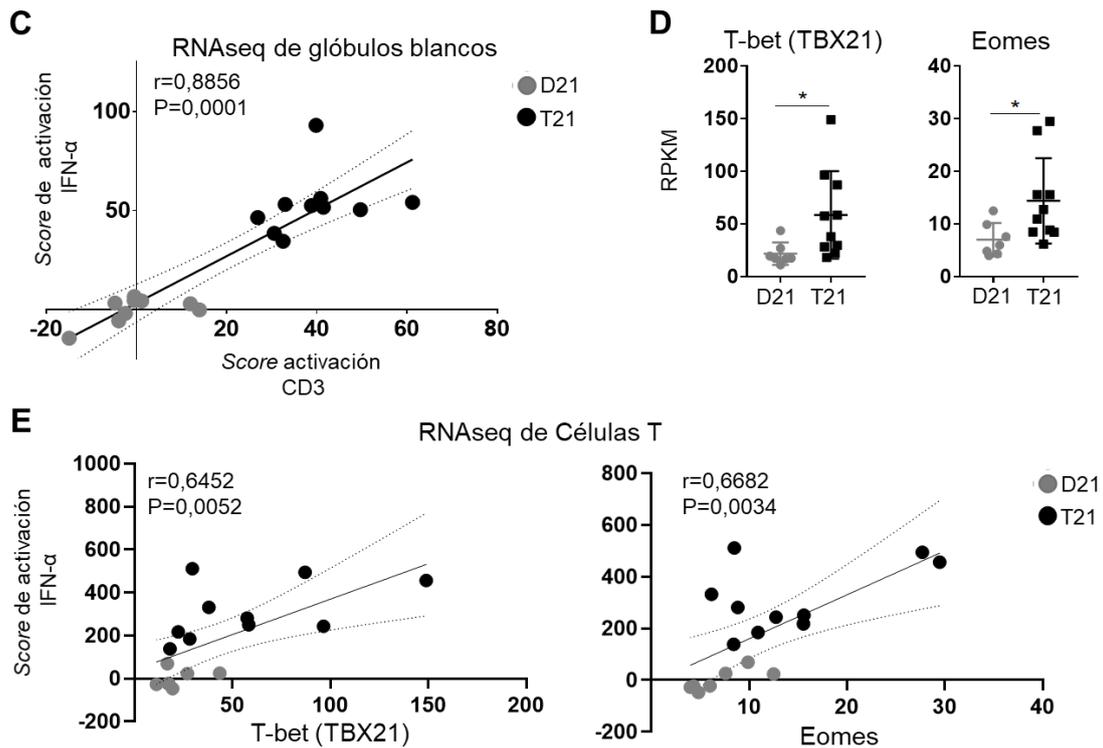


Figura II 2: Análisis transcriptómico de leucocitos totales y células T en adultos con Trisomía 21 revela firmas de activación de células T asociadas con hiperactividad de IFN. Análisis de ARNseq se realizó con glóbulos blancos totales (células totales) de 19 participantes, 10 de ellos con Trisomía 21 comparado con datos del RNAseq de células T totales de 17 participantes, 10 de ellos con Trisomía 21. **A)** Mapa de calor que muestra los resultados del análisis de los datos de RNAseq de células T totales realizado en Sullivan et al 2016, utilizando la herramienta *Upstream Regulator* del software IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Los factores que se predicen que se activarán aparecen en la parte superior. De arriba hacia abajo, el análisis se realizó utilizando todos los genes expresados diferencialmente (DEG), los DEG no codificados en chr21 (No-chr21) y los DEG en chr21. **B)** Gráficos que muestran los valores de puntuación de IFN- α calculados a partir del RNAseq de células T (panel izquierdo) o de glóbulos blancos completos (panel derecho). **C)** Diagramas de dispersión y análisis de correlación de Pearson entre los valores de puntuación de IFN- α frente a los valores de puntuación de CD3 en personas con y sin SD. **D)** Gráficos de dispersión que muestran los datos de expresión RNAseq para T-bet y Eomes en células T de individuos con y sin T21. **E)** Diagramas de dispersión y análisis de correlación de Pearson entre los valores de puntuación de T-bet (panel izquierdo) y Eomes (panel derecho) frente a los valores de puntuación de IFN- α en el RNAseq de células T en individuos sin (D21) y con T21. Los datos en (B) y (D) se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada, los datos de (C) y (E) se muestran como una correlación con la significancia determinada por la correlación de Pearson; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 **** p <0,0001.

Estos resultados sugieren que células T de personas con SD están en un estado de activación marcado que ocurre simultáneamente con una hiperactividad marcada de IFN.

IMPACTO DE LA TRISOMÍA 21 SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE IFN-I EN CELULAS T CIRCULANTES

Luego de haber identificado que las células T en personas con SD poseen un transcriptoma indicativo de hiperactivación asociado con una firma molecular acorde a una respuesta de IFN exacerbada, decidimos examinar datos ya generados en el grupo del Dr. Espinosa mediante citometría de masa unicelular (Citometría tiempo de vuelo, CyTOF) donde se evaluó la expresión de la proteína en superficie IFNAR1, codificada en el chr21, en 99 subtipos celulares distintos. Cabe destacar que la sobreexpresión de IFNAR1 fue obvia y generalizada, observando un aumento significativo en la expresión de este receptor en 88 de las 99 poblaciones evaluadas, dentro de las cuales se encontraban las células T (Waugh et al., enviado para su publicación). Posteriormente, cuando nos focalizamos en los diferentes subconjuntos de células T de individuos con T21 determinamos niveles significativamente más altos en la expresión de IFNAR1 tanto en linfocitos T CD8+ (23.3 vs 16.6, $p < 0.01$), como en células CD4+ Tconv (22.4 vs 15.7, $p < 0.01$) y CD4+ Treg (23.5 vs 16.6, $p < 0.01$), como así también su frecuencia, con respecto a sus controles típicos (Figura II 3).

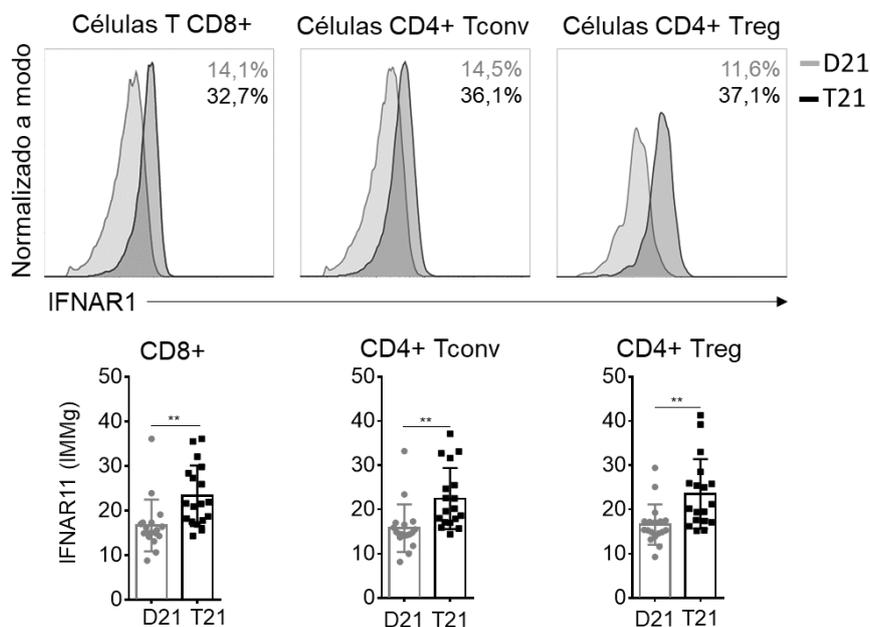


Figura II 3: **Adultos con trisomía 21 poseen una mayor frecuencia y expresión del receptor IFNAR1 en el compartimiento de células T.** La tecnología de citometría de masa de tiempo de vuelo (CyTOF) se utilizó para medir la expresión de la proteína de superficie IFNAR1 en 99 tipos de células inmunitarias diferentes en muestras de sangre periférica de adultos con y sin trisomía 21 (n=36, 18 con T21). Representación gráfica (paneles superiores) y gráficos de dispersión (Paneles inferiores) que muestran la expresión de IFNAR1 como media geométrica de la intensidad del metal (gMFI) entre los subconjuntos de células T CD8+, CD4+ Tconv y CD4+ Treg en individuos sin (D21) y con T21. Los histogramas muestran los niveles de expresión de IFNAR1 en individuos con T21 (negro) en comparación con controles típicos (D21, gris). Los datos se muestran como media \pm s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada; ** $p < 0,01$.

A partir de estos resultados, decidimos realizar una caracterización más profunda de la cascada de señalización inducida luego de la estimulación con uno de los ligandos de IFNAR, el IFN- α (IFNA2). Esta cascada depende de la identidad y el estado de activación de las células respondedoras a IFN-I. La unión de IFN- α al complejo IFNAR inicia la cascada de señalización canónica, que involucra los mediadores JAK-STAT, y la fosforilación y dimerización de moléculas STAT, seguida de su translocación al núcleo. Allí regulan la expresión de genes estimulados por IFN. Existen otras vías de señalización no canónica, donde IFN también puede inducir un conjunto de expresión de genes independiente de STATs, tales como la vía de las MAPK, NF- κ B y PI3K/AKT. Además, IFN regula la traducción de algunos ISG a través de la señalización de mTOR (K. Chen et al., 2017; Hervas-Stubbs et al., 2011). Para tener una aproximación de las vías activadas en las distintas subpoblaciones de células T, diseñamos un panel de anticuerpos específicos, donde además de utilizar marcadores para definir las distintas subpoblaciones de células, utilizamos anticuerpos para identificar STAT1-6, las quinasas ERK1/2 y el factor de transcripción 4E-BP1 fosforilados (este último involucrado en la vía de mTOR) (Hervas-Stubbs et al., 2011; S. Joshi, Kaur, Kroczyńska, & Plataniás, 2010; Kaur et al., 2008; Livingstone et al., 2015).

Para ello, evaluamos el estado de fosforilación de STAT1-6, ERK1/2 y 4E-BP1 por CyTOF, en condiciones basales y estimuladas con IFN (Figura II 4 y 5). Inicialmente, analizamos el impacto de la T21 en la señalización basal antes de cualquier estimulación con IFN- α *ex vivo*, lo que reveló, como era de esperar que algunos de los mediadores fosforilados analizados se encontraron aumentados en las células T de individuos con T21. En la Figura II 4A se observan gráficos de “volcán” en donde se grafica la los valores de p y las veces de cambios entre los cariotipos (T21 versus D21) para ocho fosfo-epítopes inducibles por IFN medidos por la tecnología CyTOF en sangre periférica de individuos con y sin T21. Las veces de cambio se calcularon como la relación del arcoseno de muestras de personas con SD (T21) menos la de muestras de personas típicas (D21). Los puntos que caen en el cuadrante superior derecho indican una relación T21/D21 significativamente aumentada. Es importante destacar, que el tipo de célula con mayor impacto por la T21 en condiciones no estimuladas fueron las células T CD8+, que mostraron niveles significativamente elevados en la fosforilación de 4E-BP1 y STAT4, mientras que en las células CD4+ Tconv solo observamos un aumento significativo en la fosforilación de 4E-BP1, una observación consistente con reportes previos que informaron la activación de la vía de mTOR en individuos con SD (Troca-Marín, Casañas, Benito, & Montesinos, 2014). Por otro lado, cuando evaluamos a las células CD4+ Treg observamos una mayor fosforilación de STAT6 medido directamente *ex vivo*, lo cual puede deberse a que la activación de STAT6 está involucrado en el

mantenimiento, el desarrollo y la sobrevivencia de las células CD4+ Treg (Sanchez-Guajardo et al., 2007) (Figura II 4A). Estos resultados, revelan que, en condiciones basales, hay una mayor activación de células T en adultos con SD. Esto podría deberse en gran parte, al aumento de citocinas proinflamatorias observados previamente en individuos con SD (Carta et al., 2002; Rostami, Douraghi, Mohammadi, & Nikmanesh, 2012; Sullivan et al., 2017; Y. Zhang et al., 2017).

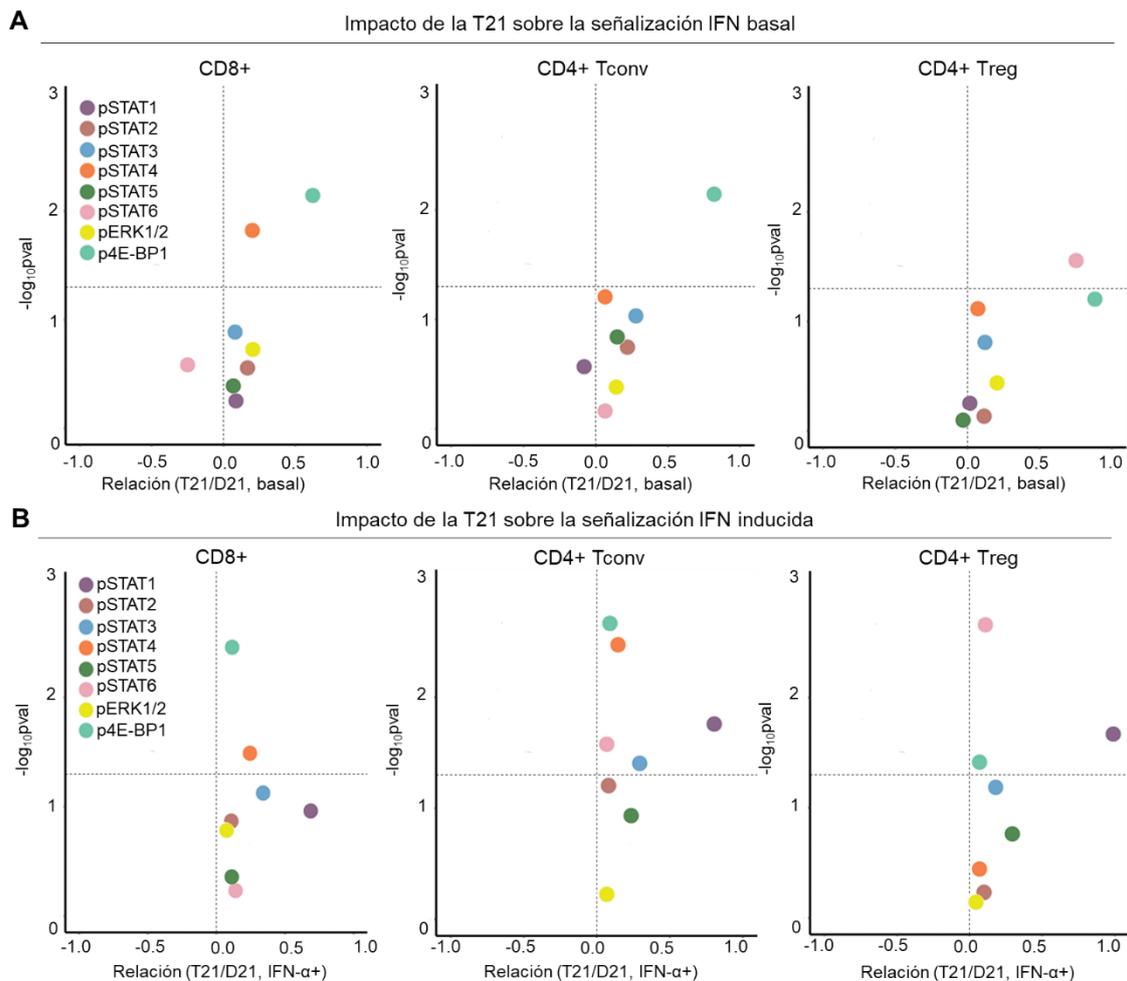


Figura II 4: La trisomía 21 causa hipersensibilidad en el compartimento de células T al IFN- α . El estado de fosforilación de STAT1-6, ERK1/2 y 4E-BP1 fue medido por CyTOF en el compartimento de células T en sangre entera de individuos sin (D21) y con T21 (n=36, 18 con T21), luego de la incubación directamente ex vivo durante 30 minutos con (IFN- α +) o sin (basal) IFN α -2a (10,000 U/mL). Gráficos de volcán muestran los valores de p y las veces de cambios entre los cariotipos (T21 versus D21) para ocho fosfo-epítopes inducibles por IFN en sangre periférica de individuos con y sin T21 en **A**) condiciones basales y **B**) después de la estimulación con IFN α 2A durante 30 minutos. Las veces de cambio se calcularon como la relación del arcoseno de muestras de personas con SD (T21) menos la de muestras de personas típicas (D21). Todos los datos representan una única corrida de CyTOF que contiene un total de n= 8 réplicas biológicamente independientes por cohorte T21 y D21. La significancia estadística fue determinada por una prueba t de Student. La línea discontinua vertical representa la línea media sin cambios. La línea discontinua horizontal representa el valor de p de 0.05 según lo calculado por la prueba t de Student.

Posteriormente, al evaluar el impacto de T21 en la fosforilación de mediadores de las distintas cascadas de señalización que pudieran activarse luego de la estimulación con IFN- α *ex vivo*, observamos que las células T CD8⁺ de individuos con SD mostraron un patrón similar al de la condición basal, donde se observó un aumento significativo en la fosforilación de 4E-BP1 y STAT4, mientras que en las células CD4⁺ Tconv hubo un aumento significativo en la fosforilación de 4E-BP1, STAT1, 3, 4 y 6. Por último, las células CD4⁺ Treg mostraron un incremento en la fosforilación de 4E-BP1, STAT1 y 6 (Figura II 4B). Es de destacar, que existen diferencias en el tipo de vía de señalización utilizada por los distintos tipos celulares, luego de la activación del eje IFN-IFNAR, y también en cómo impacta la T21 en cada una de estas células. Mientras que la T21 causa un aumento en la fosforilación en la mayoría de los epítopes en los distintos tipos celulares, existen claras diferencias cuantitativas. Por ejemplo, pSTAT1 y p4E-BP1 fueron inducidos en todos los subtipos de células T. A su vez, la fosforilación de pSTAT4 es otro claro ejemplo de los efectos específicos de tipo celular en personas con T21, ya que fue inducido en las células T CD8, mientras que la fosforilación de STAT6 fue inducida en las células CD4⁺ Treg, seguido por las células CD4⁺Tconv (Figura II 5). Estos hallazgos se pueden observar más fácilmente cuando graficamos nuestros resultados en gráficos de radiales (Figura II5) en donde podemos observar qué mediador de las vías canónicas y no canónicas del eje IFN-I/IFNAR fueron fosforilados en cada tipo celular y la “magnitud de la respuesta” en los individuos con T21 y controles relativizados a los valores observados para cada molécula en condiciones basales.

Estos resultados coinciden con la noción de que, mientras que STAT1 es el factor de transcripción canónico que se encuentra bajo la señalización de los IFN-I, STAT4 desempeña funciones más restringidas, como la inducción de la expresión de GZMB en las células T tras la estimulación con IFN (Gil et al., 2012; Newby et al., 2017; Suarez-Ramirez, Tarrío, Kim, Demers, & Biron, 2014), lo cual concuerda con el aumento de la expresión de GZMB observada consistentemente en los subconjuntos de células T CD8⁺ mediante citometría de flujo (Figura I 4A).

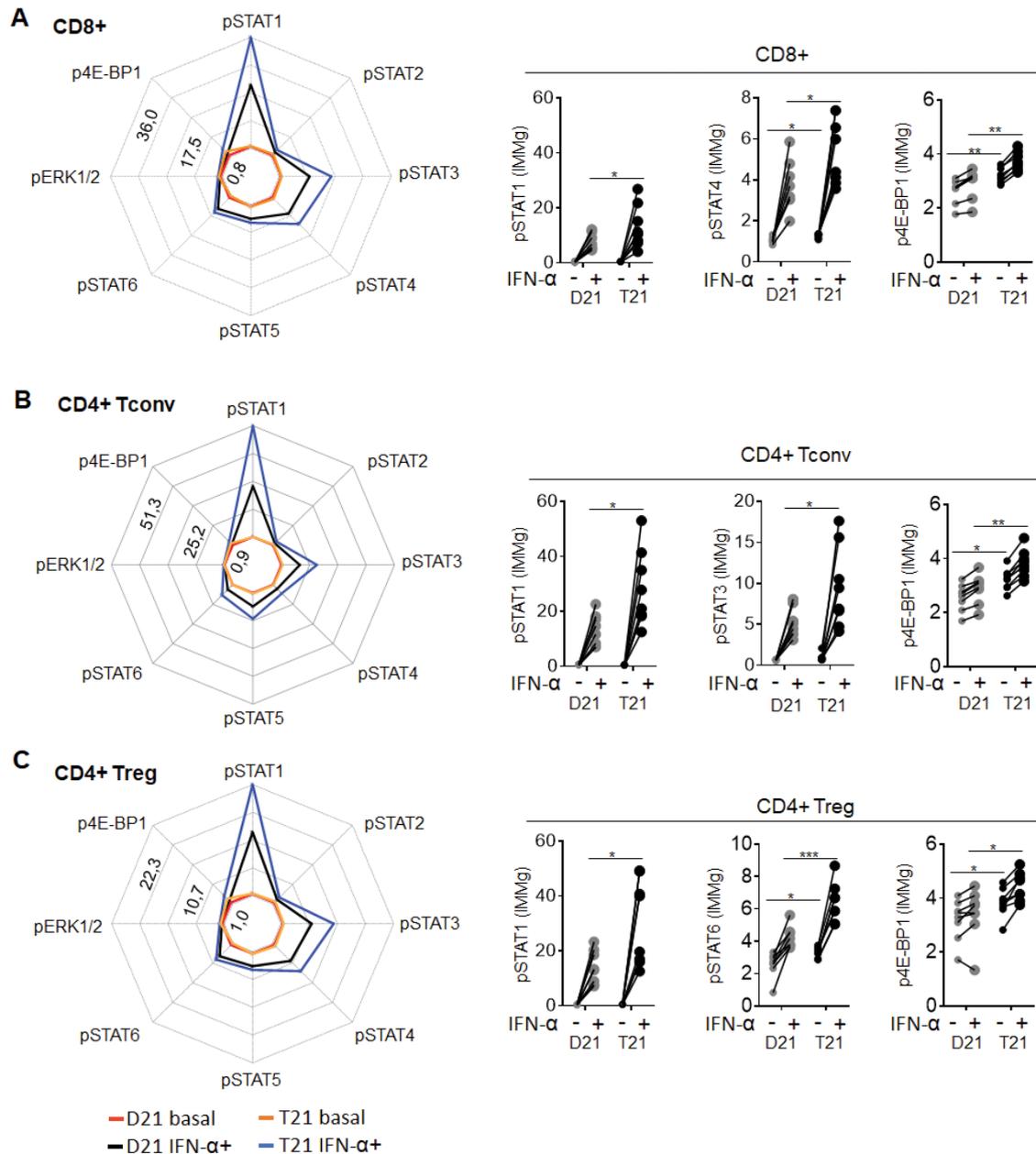


Figura II 5: La estimulación con IFN-α amplifica la señalización canónica y no canónica de IFN en células T CD8+, CD4+ Tconv y CD4+ Treg de adultos con Trisomía 21. La tecnología de citometría de masa de tiempo de vuelo (CyTOF) se utilizó para medir el estado de fosforilación de STAT1-6, ERK1/2 y 4E-BP1 en el compartimento de células T en sangre entera de individuos sin (D21) y con T21 (n=36, 18 con T21), luego de la incubación directamente ex vivo durante 30 minutos con (IFN-α+) o sin (basal) IFNα-2a (10,000 U/mL). Los gráficos radiales resumen la expresión de los fosfo-epítomos como media geométrica de la intensidad del metal (gMMI) de los subconjuntos de **A)** células T CD8+, **B)** células CD4+ Tconv y **C)** células CD4+ Treg en las cuatro condiciones experimentales indicadas. Los gráficos de puntos muestran datos sin procesar de todos los participantes para los fosfo-epítomos indicados para cada célula. Los datos de los gráficos de puntos en (A), (B) y (C) se muestran como media ± s.e.m con significancia determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

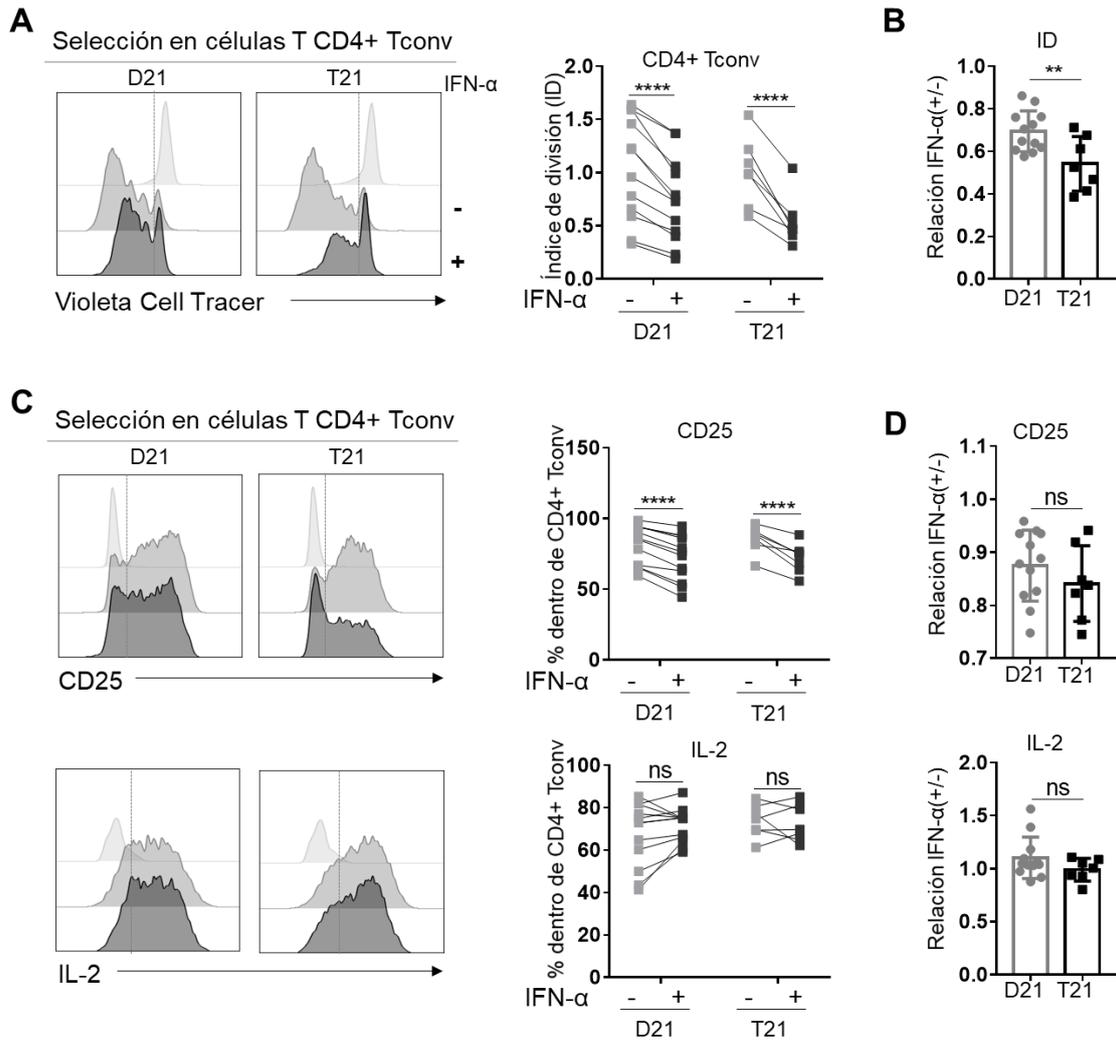
En conjunto, estos resultados demuestran que la T21 tiene un alto impacto sobre los diferentes subtipos de células T, ya que cada subtipo demostró una activación basal de la vía de los IFN-I e incluso una hipersensibilidad importante a la estimulación con IFN- α .

EFEECTO DE LOS IFN-I SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS T EN INDIVIDUOS CON TRISOMÍA 21

Teniendo en cuenta que individuos con SD poseen una señalización de IFN-I amplificada en células T CD8+, CD4+ Tconv y CD4+ Treg, y con la finalidad de entender mejor la función del eje IFN-I/IFNAR en la biología de estas poblaciones celulares, llevamos a cabo ensayos funcionales, donde purificamos estas poblaciones celulares mediante *cell sorting*. Se purificaron las células T CD4+ Tconv y CD4+ Treg, de acuerdo a su fenotipo CD4+ CD25^{low} CD127^{high} y CD4+ CD25^{high} CD127^{low}, respectivamente. Por un lado, se realizó un ensayo de proliferación para evaluar la capacidad proliferativa de células CD4+ Tconv de individuos con T21 en presencia o ausencia de IFN- α . Por otro lado, se realizó un ensayo de supresión con el objetivo de evaluar la capacidad funcional de células CD4+ Treg de personas con SD en presencia o ausencia de IFN- α .

Determinamos que las células CD4+ Tconv de personas con o sin SD poseían una menor capacidad proliferativa (frente a anti-CD3/CD28) en presencia de IFN- α evidenciado por una disminución en el índice de división (0,54 vs 1,01 en T21 y 0,74 vs 1,03 en D21, $p < 0,0001$) (Figura II 6A). Para analizar si esta disminución era mayor en células de individuos con T21 realizamos una relación del índice de división entre ambas condiciones (presencia vs ausencia de IFN- α), y observamos que individuos con T21 presentaron una relación significativamente menor en células CD4+ Tconv con respecto a individuos sin T21 (0,5 vs 0,7, $p < 0,01$) (Figura II 6B), indicando que el IFN- α afecta en mayor medida la capacidad proliferativa de células T CD4+ Tconv en individuos con T21. Cabe destacar que al estudiar marcadores de activación como la expresión de CD25 y la producción de IL-2, observamos que en presencia de IFN- α , las células T CD4+ Tconv de individuos con y sin T21 presentaron un menor porcentaje de células positivas para CD25, mientras que no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células positivas para IL-2 (Figura II 6C). Al realizar la relación entre células T CD4+ Tconv positivas para CD25 e IL-2 en presencia o ausencia de IFN- α no se encontraron diferencias entre ambos individuos (Figura II 6D). Por último, evaluamos si IFN- α además de alterar la capacidad proliferativa, tenía algún impacto sobre la funcionalidad de estas células; no se observaron diferencias en la capacidad de producir IFN- γ luego de la estimulación con IFN- α , pero si hubo un aumento significativo en la

producción de IL-10 y GzmB en ambos grupos de individuos (Figura II 6E). Al calcular la relación entre células T CD4+ Tconv positivas para IFN- γ , IL-10 y GzmB, nuevamente no se encontraron diferencias entre ambos grupos de individuos (Figura II 6F). En conjunto, estos resultados nos indican que los IFN-I impactan sobre la activación de las células CD4+ Tconv de personas con SD, alterando su capacidad proliferativa de forma más pronunciada comparado con sus controles.



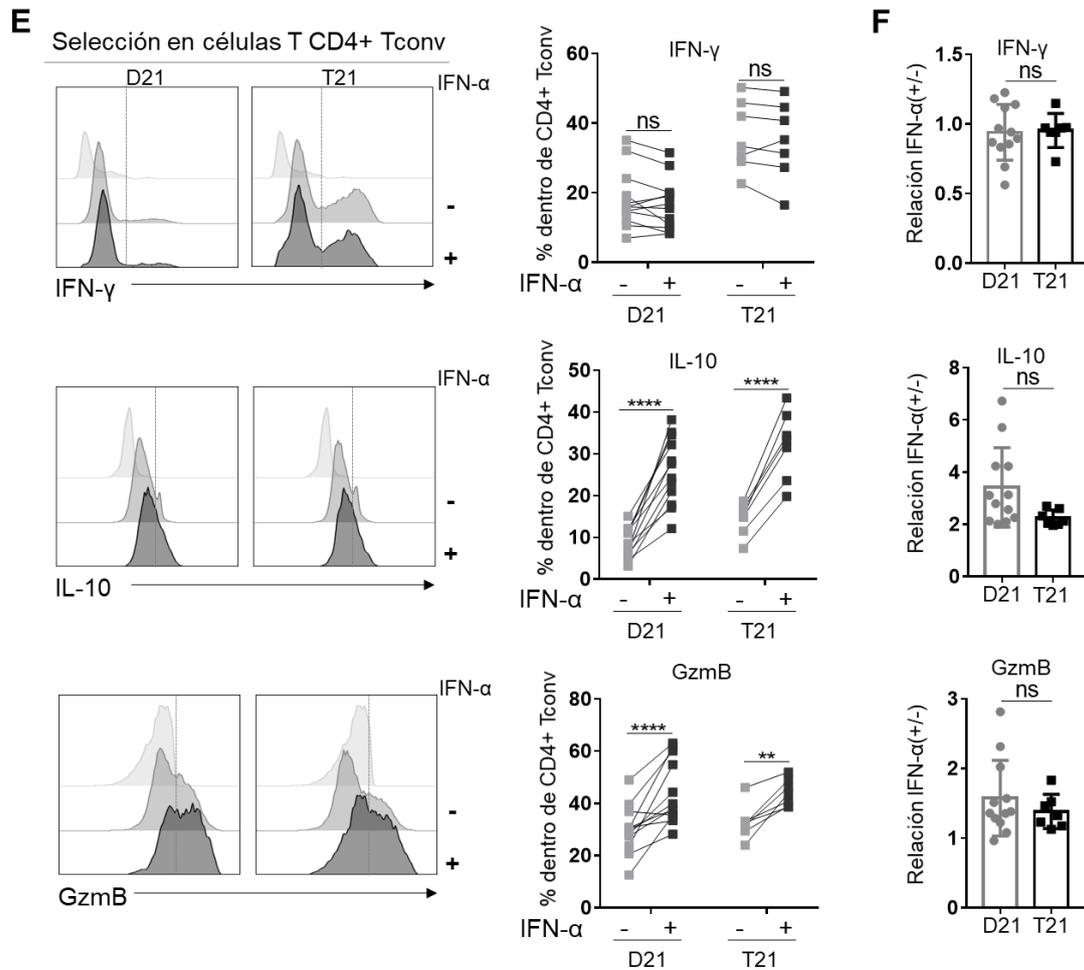


Figura II 6: **La estimulación con IFN-α disminuye la capacidad proliferativa de células T CD4+ Tconv de forma más pronunciada en individuos con T21 comparado con sus controles.** Células CD4+ Tconv (CD4+ CD25^{low} CD127^{high}) de individuos sin (D21) y con T21 fueron estimuladas con (IFN-α+) o sin (IFN-α-) IFNα-2a (10,000 U/mL). **A)** Histogramas representativos que muestran la dilución del colorante Violeta (panel izquierdo) e índice de división (panel derecho) de la proliferación de las células T CD4+ Tconv luego de ser cultivadas 72h, en presencia de perlas anti-CD3/anti-CD28, estimuladas con o sin IFN-α (gris oscuro y gris claro, respectivamente). **B)** Relación del índice de división (ID) de células T CD4+ Tconv de individuos sin (D21) y con T21 en presencia o ausencia de IFN-α. **C)** Histogramas representativos (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho) de la expresión de CD25 (panel superior) e IL-2 (panel inferior) en las células T CD4+ Tconv luego de ser cultivadas 72h, en presencia de perlas anti-CD3/anti-CD28, estimuladas con o sin IFN-α (gris oscuro y gris claro, respectivamente). **D)** Relación de la frecuencia de expresión de CD25 e IL-2 en las células T CD4+ Tconv de individuos sin (D21) y con T21 en presencia o ausencia de IFN-α. **E)** Histogramas representativos (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho) de la expresión de IFN-γ (panel superior), IL-10 (panel intermedio) y GzmB (panel inferior) en las células T CD4+ Tconv luego de ser cultivadas 72h, en presencia de perlas anti-CD3/anti-CD28, estimuladas con o sin IFN-α (gris oscuro y gris claro, respectivamente). **F)** Relación de la frecuencia de expresión de IFN-γ, IL-10 y GzmB en las células T CD4+ Tconv de individuos sin (D21) y con T21 en presencia o ausencia de IFN-α. Los datos en (A), (C) y (E) se muestran como media ± s.e.m con significancia determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak, los datos en (B), (D) y (F) como media ± s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada. ns (no significativo), ** p <0,01; **** p <0,0001.

Posteriormente, quisimos evaluar si IFN- α alteraba la capacidad supresora de las células T CD4+ Treg de individuos con T21, al igual que lo hace en personas típicas (Bacher et al., 2013) en un ensayo de supresión. De la misma manera que en el ensayo de proliferación, se sembraron células T CD4+ Tconv, en este caso provenientes de un donante sano (HD), que fueron previamente marcadas con *CellTracer Violet*, en presencia de perlas anti-CD3/CD28. Posteriormente, a las células respondedoras se le sumaron las células T CD4+ Treg de individuos con y sin T21 estimuladas previamente durante 24hs con o sin IFN- α . Las células Treg fueron sembradas en relaciones diferentes (detallado en Materiales y Métodos). Cuando evaluamos la capacidad supresora de las células Treg luego de 72hs de incubación, determinamos que en condiciones basales no hubo diferencias en los porcentajes de supresión entre ambos cariotipos de células CD4+ Treg (68.8% vs 58.8%, p=ns) (Figura II 7A). Sin embargo, la incubación previa con IFN- α produjo una disminución significativa en la capacidad supresora mediada por células CD4+ Treg de ambos cariotipos en la relación 1:1 en ambos individuos (54,0% vs 68,8 en T21, 51,9% vs 58,8% en D21, p<0,001 y p<0,05, respectivamente) (Figura II 7A). Es de destacar, que al realizar la relación entre el porcentaje de supresión mediado por células CD4+ Treg en presencia y ausencia de IFN- α , no se encontraron diferencias en ningún grupo experimental (Figura II 7B). Cuando estudiamos marcadores de activación y funcionales, al igual que en el ensayo de proliferación, en las células CD4+ Tconv se observó que individuos con T21 presentaban un mayor porcentaje de CD25 luego de que células CD4+ Treg fueron estimuladas con IFN- α en la relación Treg: Tconv 1:1, lo cual es un indicativo de mayor activación, sin observarse diferencias significativas en el porcentaje de IL-2, IFN- γ , IL-10 y GzmB (Figura II 7C). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la relación entre células T CD4+ Tconv positivas para CD25, IL-2, IFN- γ , IL-10 y GzmB, en la relación 1:1 con células Treg que fueron o no estimuladas con IFN- α (Figura II 7D).

Estos resultados nos indican que IFN- α tiene la capacidad de modular la capacidad supresora de células CD4+ Treg, independientemente de la presencia de una copia extra de su receptor en el chr21.

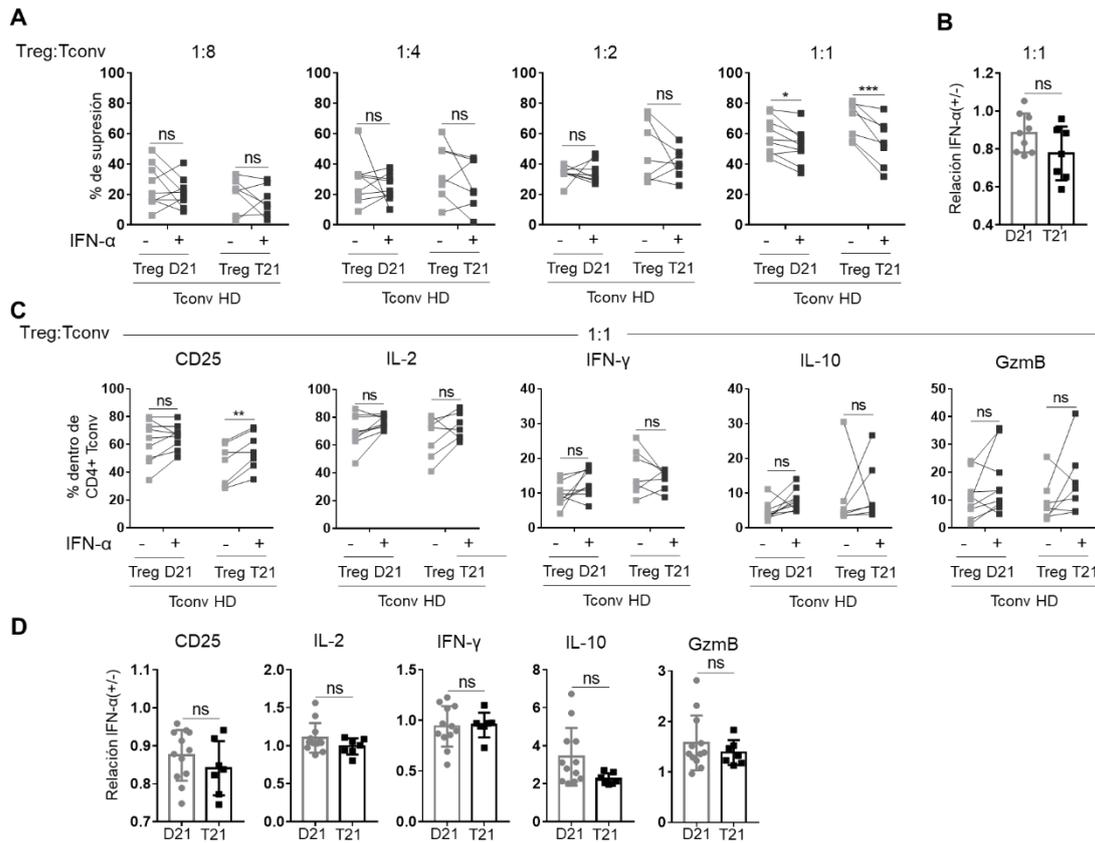


Figura II 7: La estimulación con IFN-α inhibe la capacidad supresora de las células T CD4+ Treg de individuos con y sin Trisomía 21. Células CD4+ Treg (CD4+ CD25high CD127low) de individuos con y sin SD fueron estimuladas con (IFN-α+) o sin (IFN-α-) IFNα-2a (10,000 U/mL) durante 24 hs antes de cultivarlas en diferentes relaciones con células T CD4+ Tconv (CD4+ CD25low CD127high) provenientes de un donante sano (HD) para realizar un ensayo de supresión, donde las células fueron estimuladas con perlas anti-CD3/CD28, y posteriormente se midió la proliferación de células T CD4+ Tconv basándonos en la dilución del marcador de proliferación Violeta. **A**) Porcentaje de Supresión mediado por células CD4+ Treg de individuos sin (D21) y con T21 cultivadas en distintas relaciones Treg:Tconv. Células CD4+ Treg fueron previamente estimuladas con o sin IFN-α (gris oscuro y gris claro, respectivamente), y luego se cultivaron durante 3 días en presencia de perlas anti-CD3/ CD28. **B**) Relación del porcentaje de supresión mediado por células CD4+ Treg de individuos sin (D21) o con T21 en presencia o ausencia de IFN-α en la relación 1:1 con células T CD4+ Tconv provenientes de donantes sanos utilizadas como respondedoras. **C**) Frecuencia de la expresión de CD25, IL-2, IFN-γ, IL-10 y GzmB en las células T CD4+ Tconv luego de ser cultivadas 72h junto con células T CD4+ Treg (relación 1:1) de individuos sin (D21) y con T21 en presencia o ausencia de IFN-α (gris oscuro y gris claro, respectivamente), en presencia de perlas anti-CD3/anti-CD28. **D**) Relación de la frecuencia de expresión de CD25, IL-2, IFN-γ, IL-10 y GzmB en las células T CD4+ Tconv de donante sano luego de ser cultivadas 72h junto con células T CD4+ Treg (relación 1:1) de individuos sin (D21) y con T21 en presencia o ausencia de IFN-α (se grafica media±SEM. t-test de Student). Los datos en (A) y (C) se muestran como media ± s.e.m con significancia determinada por el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba posterior de Sidak, los datos en (B) y (D) como media ± s.e.m con significancia determinada por la prueba t no apareada. ns (no significativo), * p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

En general estos resultados indican que las células T provenientes de personas con SD presentan un estado de activación exacerbado. Asimismo, estas células T poseen una amplificación en la señalización de IFN-I en condiciones basales y luego de la estimulación, muestran una hiperrespuesta a IFN-I. A su vez, IFN- α altera la capacidad proliferativa y supresora de células T CD4+ Tconv y Treg, respectivamente e independientemente de su cariotipo.

Conclusiones parciales II:

- Personas con SD presentan células T con un estado de activación exacerbado el cual ocurre simultáneamente con una hiperactividad marcada de IFN.
- Individuos con SD poseen una mayor expresión de receptor IFNAR1 en todas las subpoblaciones de células T.
- Personas con SD presentan una amplificación en la señalización de IFN-I en células T CD8+, CD4+ Tconv y CD4+ Treg circulantes en condiciones basales y una hiperrespuesta luego de la estimulación con IFN- α .
- IFN-I disminuye la capacidad proliferativa de células T CD4+ Tconv de individuos con SD aún más que a sus controles euploides.
- IFN-I inhibe la capacidad supresora mediada por células CD4+ Treg de igual manera en individuos con y sin T21.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

IMPACTO DE LA TRISOMÍA 21 EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

El impacto clínico de la T21 en la población con SD es altamente variable, con un gran número de anomalías en el sistema inmunológico en esta población. A pesar de mucho esfuerzo y numerosos trabajos de investigación en esta área, poco se sabe acerca de los mecanismos mediante los cuales la T21 causa las diversas alteraciones inmunológicas previamente reportadas en personas con SD. Incluso muchos informes apoyan conclusiones contradictorias. En general, muchos de estos estudios fueron realizados entre individuos con SD institucionalizados comparados con personas de la población general, los cuales brindan resultados poco comparables y confiables (Agarwal et al., 1970; Burgio et al., 1975; Luigi Maria Larocca et al., 1988; Montagna et al., 1988; Marianne Murphy & Epstein, 1992; Nurmi, Huttunen, et al., 1982; Nurmi, Leinonen, Haiva, Tiilikainen, & Kouvalainen, 1982). La situación se vuelve aún más compleja cuando se desea investigar el sistema inmunológico de personas adultas, ya que se vuelve más difícil analizar los efectos directos de la presencia de una copia extra del chr21 en comparación con las variables ambientales, del entorno y estilo de vida que cada una de estas personas posee a lo largo de toda su vida.

Un impacto obvio de la T21 que genera alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos en niños con SD, ha sido atribuido a alteraciones en la arquitectura tímica evidente en niños recién nacidos y a la involución acelerada y la atrofia del timo, que sin duda afectan el desarrollo temprano del compartimiento de células T periféricas (Bloemers et al., 2011; Bloemers, Bleek, Kimpen, & Bont, 2010; Kusters et al., 2009; Ram & Chinen, 2011). Estos reportes concuerdan en que el perfil inmunológico de personas con SD se asemeja al previamente descrito en personas con edad avanzada, donde se observan alteraciones en la distribución de los subconjuntos de células T vírgenes con respecto a las células T efectoras y de memoria (probablemente debido a la disminución de la producción y salida a la periferia de células del timo en la infancia temprana), una relación invertida de CD4+/CD8+ de etiología desconocida y una respuesta inmunológica disfuncional (Bloemers et al., 2011; Bloemers, Bleek, et al., 2010; A. Y. Joshi, Abraham, Snyder, & Boyce, 2011). Nuestros hallazgos obtenidos utilizando nuevas tecnologías y estrategias corroboran estos resultados. Por otro lado, estas alteraciones pueden agravarse aún más en niños con resección quirúrgica parcial o completa del timo (Appay, Sauce, & Prelog, 2010; Bloemers, Broers, et al., 2010; Prelog et al., 2009; Sauce et al., 2009), situación bastante común en niños o recién nacidos con SD sometidos a cirugías cardíacas debido a usuales cardiopatías congénitas. Es importante destacar, que la mayoría de los estudios reportados

proporcionan información escasa sobre el estado previos a la timectomía para distinguir los efectos directos de la T21 con respecto a los de la timectomía. En nuestro caso, algunos individuos se sometieron a una resección del timo durante una cirugía cardíaca correctiva de defectos cardíacos congénitos en la niñez, pero el análisis de subgrupos de individuos no timectomizados indicó que la mayoría de las observaciones fueron independientes de la resección quirúrgica del timo.

Debido a que poco se sabe acerca de las características y la función del compartimiento de células T en adultos plenamente desarrollados con SD, enfocamos nuestro trabajo de tesis en el estudio del compartimiento de células T en esta población. Esto se debe al notable aumento en la esperanza de vida de las personas con SD, que casi se ha triplicado en las últimas cuatro décadas (Alexander et al., 2016). Además, un aspecto sumamente interesante a evaluar es porqué las personas con SD padecen un espectro de enfermedades diferente en relación con la población adulta típica, incluida la menor susceptibilidad a desarrollar tumores malignos sólidos (Hasle et al., 2016) y una mayor prevalencia de trastornos autoinmunes (Anwar et al., 1998; Hartley et al., 2014; Ivarsson et al., 1997; Kinik et al., 2006; Madan et al., 2006; Marild et al., 2013; Schepis et al., 2002). Nos hemos focalizado en la identificación fenotípica y funcional de células T CD8+, CD4+ Tconv y CD4+ Treg, para poder establecer relaciones de causa-efecto entre alteraciones inmunológicas específicas y las diversas manifestaciones clínicas de las personas con SD.

LA TRISOMIA 21 IMPACTA EN LA DISTRIBUCIÓN Y ACTIVACIÓN DE CELULAS T CD8+

Al centrar nuestro estudio en el compartimiento de células T en personas con SD, pudimos determinar, como ya se ha demostrado en otros trabajos previos, que personas con SD poseen una mayor frecuencia de células T CD8+. Complementariamente, nuestros resultados demuestran que adultos con SD tienen un mayor número de células T CD8+, lo que conlleva a una disminución en la relación CD4+/CD8+. El aumento en las células T CD8+ se correlaciona positivamente con el aumento en la frecuencia y el número de células CD4+ Treg. Este fenómeno es similar al observado en condiciones inflamatorias crónicas, como es el caso de vitíligo, en donde se ha reportado un mayor número de células CD8+ CTL, en paralelo a un mayor número de células Treg, siendo la capacidad supresora de las mismas menor en estos pacientes (Lili et al., 2012). Algo similar sucede en pacientes con artritis idiopática juvenil donde células Treg son ineficientes en ejercer su función supresora, debido a la resistencia de las células efectoras a ser suprimidas (Wehrens et al., 2011). A su vez, en modelos murinos de inflamación crónica se observa una gran expansión de células

T CD8+ hiperactivadas y una restricción en la actividad de células Treg Foxp3+ (Gao et al., 2015; Kanangat et al., 1996; Lili et al., 2012; Petrelli et al., 2018; Wehrens et al., 2011). Esto sugiere que el aumento de ambas poblaciones podría deberse a una hiperactivación de la función de las células efectoras o una pérdida de la función de células CD4+ Treg.

Además, al analizar la distribución de estos linfocitos T CD8+ en personas con SD observamos un enriquecimiento de células TEMRA, acompañado por una disminución de células vírgenes comparado con sus controles típicos, lo cual es un rasgo patognomónico de los procesos inmunes crónicos, por ejemplo, infecciones virales crónicas y cáncer (Mahnke et al., 2013; Thome et al., 2014). A su vez, cuando evaluamos el fenotipo de las células T CD8+ en estos individuos determinamos que son altamente funcionales debido a un aumento en la frecuencia de células positivas para moléculas efectoras como GZMB (enzima proteolítica capaz de inducir la lisis de células blanco), IFN- γ y TNF, y tienen una mayor capacidad proliferativa que los controles típicos, luego de la estimulación policlonal. También, observamos signos obvios de polifuncionalidad, con un incremento de células T CD8+ que expresaban de manera simultánea varias moléculas efectoras (es decir, GZMB, IFN- γ , TNF) comparado con controles típicos. Asimismo, células T CD8+ de personas con SD también coexpresan más de un receptor inhibitorio (PD-1, TIGIT y BTLA) en su superficie, lo cual podría ser un signo de agotamiento. Sin embargo, dado la capacidad de proliferar y de producir moléculas efectoras, consideramos que la expresión de receptores inhibitorios es una consecuencia más de la hiperactivación y no de agotamiento de estas células. Además, estos individuos poseen una mayor frecuencia de células T CD8+ con marcadores de senescencia como KLRG-1 y CD57 comparado con sus controles típicos. Por último, exploramos la expresión de los factores de transcripción T-bet y EOMES en las células T CD8+ en personas con T21, dos factores de transcripción que participan durante la diferenciación de células T efectoras, y que se expresan de forma diferente en células T senescentes y exhaustas (Buggert et al., 2014; Dolfi et al., 2013; Intlekofer et al., 2007; McLane et al., 2013). Determinamos que las células T CD8+ en personas con T21 presentan un aumento en la relación T-bet/EOMES. Estos resultados indican que los individuos con SD poseen células T CD8+ con un fenotipo efector hiperactivado, funcional, y además de las características de envejecimiento prematuro reportadas previamente en niños, nuestro trabajo demuestra que el compartimiento de células T CD8+ de personas con SD comparte características observadas tanto en condiciones autoinmunes / autoinflamatorias (Blanco, Pitard, & Taupin, 2005; Kis-Toth et al., 2017; Lili et al., 2012; Ortega et al., 2009; Pinkse et al., 2005; Xing et al., 2014); como así también en infecciones virales persistentes, como el VIH y el Citomegalovirus (CMV), y

otras patologías en las que el IFN-I está activado crónicamente (Ballegaard et al., 2018; Dolfi et al., 2013; Serrano-villar et al., 2014; Xing et al., 2014). En la actualidad, se ha demostrado que la señalización de IFN-I desempeña un rol dual en las infecciones virales crónicas: ya que puede aumentar el control inicial de la replicación viral que implica la activación de la respuesta de las células T CD8+ controla la expresión de mecanismos inhibitorios, tales como PD-1/PD-L1 e IL-10 que conducirían a la diferenciación de las células T hacia un estado de agotamiento y a la persistencia viral (Dikopoulos et al., 2005; Snell & Brooks, 2015; Stewart et al., 2013; Y. Wang et al., 2012). Además, se ha demostrado que IFN- α inhibe la actividad de la telomerasa en células T CD8+ en humanos mediante mecanismos transcripcionales y postraduccionales. A su vez, acelera la diferenciación de esta población, promoviendo así la acumulación de células T CD8+ CD27- CD28- altamente diferenciadas/senescentes durante el envejecimiento e infecciones virales persistentes (Das et al., 2008; Khan et al., 2002; Lanna et al., 2013; Wills et al., 2002). Por otra parte, en algunos modelos de cáncer, se ha demostrado que la inducción de IFN tipo I, es crucial para el “*cross priming*” de los linfocitos T CD8+, ya que IFN- β es sentido por células CD11c+ muy temprano después de la implantación del tumor y esta primera ola de IFN- β es importante para el control del desarrollo tumoral (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011). A su vez, la administración intratumoral de *Polyadenylic - polyuridylic acid* (Poli A:U), ligando de TLR3 que induce IFN-I, promueve una respuesta antitumoral, con una mayor frecuencia y número de células T CD8+ GzmB+, asociada con un incremento en la expresión de PD-1/PDL-1 (Nocera et al., 2016; Roselli et al., 2019). Estos resultados junto con nuestros hallazgos nos permiten hipotetizar que individuos con T21 podrían desarrollar una respuesta antitumoral natural, y prevenir el desarrollo de tumores sólidos.

Por lo tanto, el fenotipo observado en las células T CD8+ en adultos con SD es totalmente compatible con situaciones con hiperactividad de IFN-I crónica. Es de destacar que en algunos contextos autoinmunes la inducción de agotamiento celular puede ser beneficioso (Gangaplara et al., 2018; Mckinney, Lee, Jayne, Lyons, & Smith, 2015) y este equilibrio entre la expresión de marcadores funcionales, inhibitorios y senescentes en un contexto de hiperactivación general en las células T CD8+, probablemente desempeñe un papel importante en el estado de salud de estos individuos.

LA TRISOMIA 21 IMPACTA EN LA DISTRIBUCIÓN Y ACTIVACIÓN DE CELULAS T CD4+

Una vez caracterizadas las células T CD8+ en personas con SD, y al haber identificado alteraciones en la relación CD4+/CD8+ en estos individuos, decidimos enfocar nuestros estudios en las células T CD4+. Como era de esperar, debido a un aumento en la frecuencia y en el número de las células T CD8+ en personas con SD, estos individuos presentan una disminución en la frecuencia de células T CD4+, mientras que el número de las mismas no se vio afectado con respecto a los controles típicos, indicando posibles alteraciones en la homeostasis de células T.

Dado que las células T CD4+ son una población de linfocitos muy diversa, normalmente se las clasifica como células Tconv y Treg, las células Tconv tienen una gran capacidad de controlar la respuesta inmune adaptativa contra patógenos y células transformadas activando a otras células efectoras, mientras que las células Treg se las define como encargadas de suprimir las actividades potencialmente perjudiciales de las células T efectoras (Fontenot et al., 2003; Hori, 2011; Vignali et al., 2008). Pudimos determinar que personas con SD poseen una disminución en la frecuencia de células CD4+ Tconv, acompañado por un aumento en el porcentaje de células CD4+ Treg comparado con controles típicos. También identificamos un aumento en el número de células CD4+ Treg, pero sin ver cambios en el número de las células Tconv, reflejando nuevamente una alteración en la homeostasis del compartimiento de células T. De hecho, al analizar la distribución de los linfocitos CD4+ Tconv y Treg en personas con SD determinamos, de manera similar a lo observado en las células T CD8+, un incremento de células Tconv de memoria y una disminución de células Tconv vírgenes, mientras que la distribución de células Treg no se veía afectada con respecto a sus controles, fenotipo que también puede asociarse a los procesos inmunes crónicos previamente nombrados en la sección anterior.

Hasta el momento, estudios basados en la caracterización del estado de activación y polarización de las células CD4+ Tconv en individuos con SD han llevado a conclusiones contradictorias. Algunos reportes en niños con SD demuestran una disminución en la expresión génica de IL-17A en los glóbulos blancos y una reducción significativa de células Th17. Cabe aclarar que esta disminución se observó principalmente en los niveles de ARNm de IL-17A en glóbulos blancos totales, en donde la fuente de IL-17A puede provenir de muchos otros tipos celulares además de los linfocitos T CD4+, objetos de nuestro estudio. Otros trabajos obtienen resultados más similares a los nuestros, indicando que individuos con T21 presentan una relación TH1/Th2 incrementada, siendo mayores los porcentajes de células Th1 y Th17 con respecto a sus controles (Jakubiuk-tomaszuk et al., 2015; Schoch et al., 2017). En este

trabajo de tesis al estudiar el fenotipo de las células CD4+ Tconv en personas con SD determinamos un aumento en la frecuencia de células positivas para moléculas coestimuladoras y de diferenciación de células T como lo son GITR, ICOS y CD39, comparado con sus controles típicos. Asimismo, observamos una disminución en el porcentaje de células CD4+ Tconv positivas para PD-1 acompañado por un aumento en la frecuencia de células positivas para TIGIT, ambos receptores inhibitorios que suelen expresarse en varios subconjuntos de células T activadas contrarrestando su función efectora. A su vez, determinamos que personas con SD exhiben un aumento en la proporción de células CD4+ Tconv positivas para IL-17A, luego de la estimulación policlonal; y también observamos niveles más altos de IL-17A circulante en plasma en comparación con los controles euploides. Este fenotipo está asociado a un estado de activación exacerbado posiblemente polarizado hacia un perfil Th17. En la actualidad, el rol de las células que expresan IL-17 en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes es bien conocido, particularmente en las enfermedades autoinmunes caracterizadas por altos niveles de señalización de IFN-I, como en Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y la dermatomiositis (Ambrosi, Espinosa, & Wahren-herlenius, 2012). Además, se ha planteado la hipótesis de que cuando los IFN-I actúan en conjunto con la IL-17 pueden sostener y amplificar las respuestas autoinmunes e inflamatorias (Ambrosi et al., 2012; Axtell, Raman, & Steinman, 2011a, 2011b; Pawaria et al., 2019), lo que los convierte en una combinación peligrosa en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. Esto podría explicar el aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes observadas en personas con T21 (Anwar et al., 1998; Ivarsson et al., 1997; Kinik et al., 2006; Lavigne et al., 2017; Madan et al., 2006; Marild et al., 2013; Schepis et al., 2002).

Por otro lado, como mencionamos anteriormente, nuestros hallazgos demostraron que personas con SD poseen un mayor número de células CD4+ Treg, y a pesar de que no se encontraron cambios en las subpoblaciones de células CD4+ Treg, determinamos que personas con T21 poseen células CD4+ Treg efectoras con niveles más altos de expresión de Foxp3 comparado con sus controles típicos, sin detectar otros cambios en el fenotipo de esta población. Es de destacar, que al evaluar los perfiles de expresión génica de las células CD4+ Treg en personas con T21, obtuvimos resultados similares, donde el transcriptoma solo se veía afectado por la presencia de una copia extra del chr21 y los genes codificados en él comparado con sus controles euploides. En otras palabras, las células CD4+ Tregs en personas con SD no exhiben diferencias significativas en la expresión de genes asociados con la firma molecular de la Treg con respecto a los controles euploides, por lo que podemos concluir que la T21 no genera cambios fenotípicos en la población de células CD4+ Treg. Es interesante recalcar, que

cuando evaluamos la funcionalidad de esta población mediante la realización de ensayos de supresión de *criss-cross*, las células CD4+ Treg trisómicas eran perfectamente capaces de suprimir las células CD8+ y CD4+ Tconv de ambos orígenes, del mismo modo que lo hacen las células T CD4+ Treg disómicas. Sin embargo, tanto las células efectoras CD8+ T como CD4+ Tconv de personas con SD fueron resistentes a la supresión mediada por Treg, independientemente del cariotipo de la célula Treg utilizadas en el ensayo de supresión. Este mismo fenómeno ha sido descrito en diferentes enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo I (Ihantola et al., 2018; Lawson et al., 2008), LES (Venigalla et al., 2008), enfermedad del ojo seco (Venigalla et al., 2008) e incluso durante algunas enfermedades infecciosas crónicas (por ejemplo, tuberculosis) (Venigalla et al., 2008). Los mecanismos que conducen a la resistencia de la supresión de las células T efectoras en SD son desconocidos, pero son claramente dignos de una investigación futura. Es importante destacar, como ha sido demostrado que la exposición continua a varias citocinas que se encuentran elevadas en personas con SD, como IL-6 y TNF (Sullivan et al., 2017), promueven la resistencia de las células T a la supresión mediada por células Treg (Mercadante & Lorenz, 2016). A su vez, la fosforilación de STAT3 inducida por señalización a través del TCR, o mediante la señalización de IL-6 y TNF, y la consiguiente activación de la vía AKT, parecen mediar estos efectos (Goodman, Young, McCormick, Cooper, & Levine, 2015; Ihantola et al., 2018; Wehrens et al., 2011). Este podría ser el caso en personas con SD, que exhiben niveles más altos de IL-6, TNF y otras citocinas inflamatorias en plasma, como se ha reportado en las interferonopatías monogénicas de Tipo I y otras afecciones autoinflamatorias (Boniface et al., 2007; Rostami et al., 2012; Szodoray, Alex, Brun, Centola, & Jonsson, 2004; Takanohashi et al., 2013). Además, las células efectoras CD8+ y CD4+ Tconv de personas con SD tienen una mayor tasa de proliferación tras la estimulación con anti-CD3/CD28 en comparación con los controles típicos y producen mayores niveles de moléculas efectoras, como GZMB, IFN- γ y TNF, lo que podría explicar esta resistencia de las células T efectoras a ser suprimida por mecanismos de control fisiológicos mediados por las células CD4+ Treg. Nuestros resultados indican que las células efectoras son refractarias a la supresión, posiblemente debido a la hiperrespuesta generada al activarse. Esto se condice con los resultados de ARNseq de los leucocitos totales, que revelaron firmas de expresión génica consistentes con un aumento en la activación de las vías de señalización de CD3 y CD28.

LA TRISOMIA 21 AMPLIFICA LA SEÑALIZACIÓN DE INTERFERONES TIPO I

Dado a que nuestros resultados, señalan al IFN-I como uno de los causantes de generar las alteraciones observadas en la homeostasis de células T en personas con

SD, nos centramos en estudiar las vías de señalización desreguladas por la T21, A través del análisis del ARNseq de leucocitos totales y células T, observamos que la T21 conduce a una activación consistente de la señalización de IFN-I. A su vez, el análisis de ARNseq reveló una correlación positiva entre el *score* de la vía de señalización de IFN, con el *score* de las vías de señalización de CD3/CD28 y la expresión de T-bet y EOMES. Se ha demostrado que el IFN- α potencia la expresión de IFN- γ e IL-10 inducida mediante la activación del TCR en células T CD4⁺ CD45RA⁺ en cultivos de sangre entera (Corre et al., 2013). A su vez los IFN-I son necesarios para generar una respuesta de células T CD4⁺ funcionales, debido a que ratones IFNAR^{-/-} tienen respuestas primarias defectuosas a los estímulos combinados de polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) y CD40 (Kurche, Haluszczak, McWilliams, Sanchez, & Kedl, 2012). Es por esto, que nuestros resultados indican que una hiperrespuesta de IFN-I podría inducir una mayor activación de las células T en personas con SD.

La activación de la señalización de IFN en las células de personas con T21 podría explicarse por el hecho de que cuatro de los seis receptores de toda la familia de IFN, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR2 e IL10RB (subunidades de los receptores para cada clase de IFN-I, -II y -III), se encuentran codificados en el chr21. Al evaluar la expresión de la proteína de superficie IFNAR1 por CyTOF, observamos una clara sobreexpresión del receptor en el compartimiento de las células T en personas con T21, como así una hiperreactividad a la estimulación con IFN- α en los tres subconjuntos de células T (CD8⁺, CD4⁺ Tconv y Treg) comparado con sus controles típicos, lo que podría tener un gran impacto en la conformación del compartimiento de células T en estos individuos. A su vez, nuestros hallazgos indican que ya basalmente las distintas subpoblaciones de células T presentan activadas las vías de IFN-I.

Se ha reportado que los niños con SD, en edades muy tempranas sufren infecciones como el virus sincitial respiratorio (VSR) y la neumonía pulmonar (Ram & Chinen, 2011), debido a la disminución en el *output* de células T desde timo. Esto podría generar una inducción y posteriormente una estimulación no enteramente controlada de IFN-I. Otro desencadenante alternativo de la respuesta de IFN-I en estos individuos que presentan altos niveles basales de IFN, podría ser la microbiota, la cual es importante para controlar la función inmunitaria de nuestro organismo (Abt et al., 2012). Es probable que estos estímulos provoquen una respuesta de IFN-I que se exagera a través del aumento de los niveles de receptores de IFNAR en las células inmunes, promoviendo el estado de hiperactivación observado y haciendo que las células T efectoras sean difíciles de restringir por mecanismos fisiológicos como la supresión mediada por Treg.

Cabe destacar, que al evaluar la función del eje IFN-I / IFNAR en la biología de las células T en personas con SD, determinamos que IFN- α disminuye la capacidad

proliferativa de células CD4+ Tconv, y genera un notable incremento en la producción de IL-10 y GzmB comparado con sus controles euploides. A su vez, disminuye la función supresora de células CD4+ Treg, de manera similar a reportes que han demostrado este mismo fenómeno en controles típicos (Gangaplara et al., 2018; Gigante et al., 2008; Pace et al., 2010; Pacella et al., 2016). El efecto regulador de la actividad supresora de las células Treg ha sido atribuido a la capacidad del IFN- α de disminuir el nivel de cAMP intracelular, por activar la fosfodiesterasa 4 a través de MEK / ERK (PDE4) (Bacher et al., 2013), disminuyendo así la función supresora de células Treg humanas. Por lo que, en personas con SD las concentraciones elevadas de IFN- α modularían la respuesta de las células Treg, disminuyendo su función supresora, lo que promovería aún más el desarrollo de condiciones autoinmunes. Es por esto que es de suma importancia continuar con esta investigación para comprender el rol del aumento de las respuestas de IFN-I en la T21 para proporcionar nuevas herramientas para promover la salud de las personas con SD.

Por lo tanto, podemos concluir que nuestros resultados nos permitieron reforzar la hipótesis de que la inhibición de la señalización de IFN podría ser una estrategia terapéutica en personas con SD, particularmente para aquellas que poseen condiciones autoinmunes mediadas por células T, las cuales son altamente frecuentes en esta población. La señalización de IFN-I puede inhibirse mediante varias estrategias, incluyendo los inhibidores de moléculas pequeñas de las quinasas JAK que están aprobadas para el tratamiento de afecciones autoinmunes como la artritis reumatoide (Schwartz et al., 2017). Recientemente, nuestros colaboradores han informado los beneficios profundos del inhibidor de JAK1-3, el citrato de tofacitinib (Xeljanz®) para el tratamiento de la alopecia areata en individuos con SD (comunicación personal del Dr. Joaquín Espinosa). Se sabe que alopecia areata es inducida por una respuesta de células T CD8+ exacerbada que ataca el folículo piloso (Xing et al., 2014). Nuestros resultados demuestran que el estado hiperactivo del subconjunto de células T CD8+ podrían explicar su mayor prevalencia en personas con SD. Es sumamente alentador el hecho de que un paciente con SD que padecía alopecia areata y que concurría al Linda Crnic inició tratamiento con tofacitinib durante casi cuatro años sin efectos secundarios, y experimentó un nuevo crecimiento del cabello en áreas del cuero cabelludo que fueron resistentes a otros tratamientos durante más de 15 años. Creemos que estos resultados justifican una investigación exhaustiva de los posibles beneficios terapéuticos multidimensionales de las estrategias anti-IFN-I en personas con SD y que además podrían arrojar luz sobre mecanismos etiopatogénicos de muchas enfermedades que también afectan a la población típica.

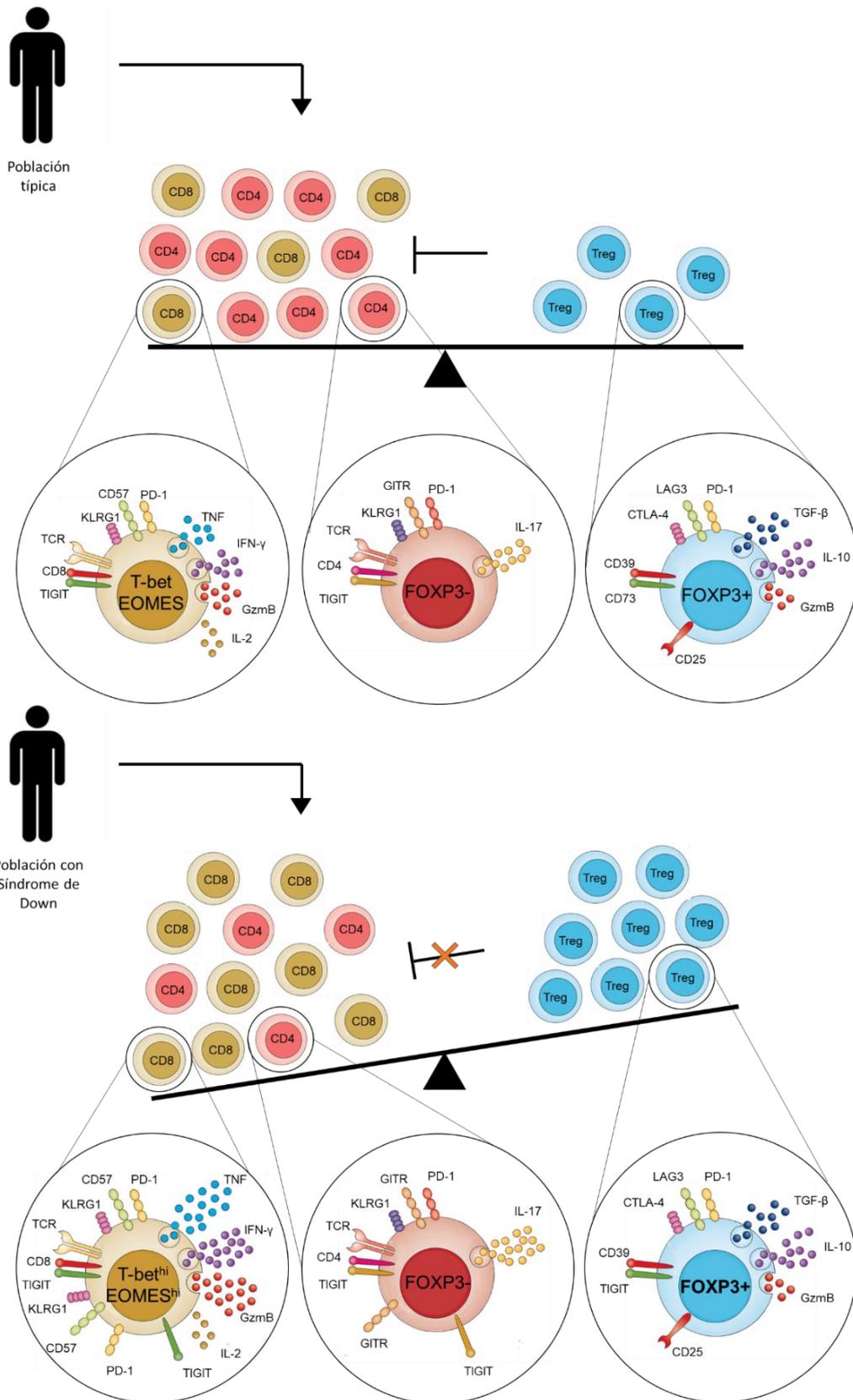
OBSERVACIONES FINALES

En este trabajo de tesis hemos descrito el impacto de la Trisomía 21 sobre el compartimiento de células T periféricas. Al caracterizar exhaustivamente y con tecnología multidimensional el compartimiento de células T periféricas en individuos adultos con SD, hemos identificado múltiples alteraciones que pueden explicar su alta susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes, como un fenotipo efector hiperactivado en las células T CD8+, acompañado por un perfil Th17 en las células CD4+ Tconv, lo cual genera resistencia a la supresión mediada por células CD4+ Treg.

Por otro lado, determinamos una sobreexpresión de la subunidad IFNAR1 en el compartimiento de células T de personas con SD y luego de la estimulación con IFN- α identificamos una superinducción de la señalización de JAK/STAT; esto se correlacionó positivamente con una fuerte activación de las células T en estos individuos.

En conjunto, estos resultados revelan nuevos aspectos del sistema inmunológico de los adultos con T21, además de asemejarse a la inmunosenescencia hecho ya descrito hace muchos años; las múltiples alteraciones y los cambios en la distribución de células T observadas se asimilan a aspectos observados en las infecciones virales crónicas y en afecciones autoinmunes, en donde la hipersensibilidad marcada al IFN-I pareciera jugar un rol funcional. Nuestros resultados profundizan la comprensión de los mecanismos inmunológicos subyacentes en las diversas patologías prevalentes en los individuos con SD, principalmente las enfermedades autoinmunes, como así también nos permiten proponer nuevas hipótesis para explicar la baja susceptibilidad al desarrollo de tumores sólidos en estos individuos. Todos estos datos abren nuevas vías de investigación para la mejor comprensión de estas patologías que adolecen tanto la población con SD como las personas típicas y proporcionan el sustento para la investigación y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas anti-IFN-I en personas con SD.

RESUMEN GRAFICO



Resumen gráfico: **Impacto de la trisomía 21 sobre el compartimento de células T circulantes.** Panorama de las alteraciones en el compartimento de células T generadas por la Trisomía 21, los cuales pueden explicar su alta susceptibilidad a desarrollar ciertas enfermedades.

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Para la preparación del medio de cultivo completo se utilizó medio de cultivo RPMI 1640, penicilina/streptavidina, sodio piruvato, MEM aminoácidos no esenciales de marca Corning (Fisher, US), mientras que La L-glutamina (Glutamax) y el suero fetal bovino (inactivado por calor) fueron provistos por Gibco (Thermo Fisher, US).

Para el buffer FACS (*fluorescence-activated cell sorter*) utilizamos PBS 1x y HEPES (GIBCO, Thermo Fisher, US), agua destilada ultra pura libre de DNasa/ARNasa y EDTA (0,5M) pH=8 de marca Invitrogen (Thermo Fisher, US) y penicilina/streptavidina.

Para realizar la purificación de células de sangre periférica y los ensayos *in vitro* se utilizó buffer de lisis (BD Pharm Lyse, BD Biosciences, US) y Ficoll Hypaque (GE healthcare, US). Para procesar las muestras para realizar CyTOF se utilizó Agua MilliQ con bajo contenido en metales, buffer de lisis 1X *Phosflow Lyse/fix buffer* (BD Biosciences, US), buffer de tinción celular *Cell staining buffer* de Maxpar (Fluidigm, US) y medio de congelación para criopreservar las células CryoStor CS10 (STEM CELL technologies).

El azul de tripán, la albúmina sérica bovina, los ésteres de forbol (PMA) y la ionomicina fueron comprados en Sigma-Aldrich Chemical Co (US). El *cocktail* inhibidor del transporte de proteína se compró en eBioscience (US), mientras que el recombinante humano de IFN- α utilizada proviene de PBL Assay Science (US).

Los buffers *Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent*, y también, el buffer *Permeabilization buffer concentrate* (FOXP3 Staining Buffer Set) fueron adquiridos en la empresa eBioscience (Thermo Fisher, US).

MUESTRAS CLÍNICAS

Todos los donantes se inscribieron en un protocolo de estudio aprobado por la Junta de Revisión Institucional Múltiple de Colorado, conocido como Proyecto Trisomía humano del Instituto Crnic (*Crnic Institute's Human Trisomy Project*, COMIRB # 15-2170, www.trisome.org). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres o tutores de cada participante, y se obtuvo el consentimiento de los participantes mayores de 7 años que tenían capacidad cognitiva para aprobar. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las directrices y regulaciones de COMIRB.

Todas las muestras fueron recolectadas a través del protocolo del Proyecto Trisomía Humano y se utilizaron adultos sanos para evitar cualquier observación que pudiera derivarse de defectos tempranos en el desarrollo del sistema inmune. Para las muestras de sangre de 9 individuos con SD y 14 controles (Cohorte 1), 12 individuos con SD y 19 controles (Cohorte 2) y 10 individuos con SD y 10 controles (Cohorte 3), las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron de sangre periférica humana a partir de muestras de sangre recién extraídas mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare). Las subpoblaciones de linfocitos se aislaron utilizando un *cell sorter* MoFlo XDP 70 (Beckman Coulter). La pureza de las células aisladas fue siempre >95%. Además, en las muestras de sangre de 29 individuos con SD y 29 controles (Cohorte 4), 10 individuos con SD y 9 controles (Cohorte 5), los componentes de sangre fueron separados a partir de una centrifugación y el plasma de las distintas muestras fue congelado a -80°C, para posteriormente medir los niveles de proteínas, en estas mismas muestras las células totales fueron purificadas mediante buffer de lisis para realizar el ARNseq y evaluar su transcriptoma, respectivamente. Por último, las muestras de sangre de 8 individuos con SD y 8 controles (Cohorte 6), fueron estimuladas ex vivo y posteriormente se realizó la fijación de las células y lisis de los glóbulos rojos con un buffer de lisis especial para CyTOF. La información de las cohortes se encuentra en las tablas 1-5.

Tabla 1. Cohortes 1-2 empleadas para la caracterización del compartimiento de células T, Figuras I 1-9.				
Características clínicas y demográficas	Cohorte 1		Cohorte 2	
	D21 (controles típicos), n = 14	T21 (síndrome de Down), n= 9	D21 (controles típicos), n = 14	T21 (síndrome de Down), n= 12
Edad media-- Años (Rango)	33.1 (23.8-40.9)	26.4 (20.5-38.1)	27.9 (20.1-36)	28.3 (22.5-34.7)
Género, número (%)				
Hombre	6 (42.9%)	2 (22.2%)	4 (28.6%)	3 (25.0%)
Mujer	8 (57.1%)	7 (77.8%)	10 (71.4%)	9 (75.0%)
Diagnóstico oficial para síndrome de Down-- número (%)				
Trisomía completa del chr21	N/A	9 (100%)	N/A	7 (58.3%)
Trisomía parcial del chr21	N/A	0 (0.0%)	N/A	0 (0.0%)
Trisomía mosaico del chr21	N/A	0 (0.0%)	N/A	0 (0.0%)
No especificado	N/A	0 (0.0%)	N/A	5 (41.7%)
Institucionalizado	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Historia médica-- número (%)				
Obesidad (IMC >30)	0/14 (0.0%)	2/9 (22.2%)	2/14 (14.3%)	5/12 (41.7%)
Defectos congénitos del corazón (CHD)	0/14 (0.0%)	4/9 (44.4%)	0/14 (0.0%)	5/12 (41.7%)

Condiciones autoinmunes de la piel (alopecia areata, dermatitis atópica/eczema, vitiligo and psoriasis)	0/14 (0.0%)	1/9 (11.1%)	1/14 (7.1%)	1/12 (8.3%)
Diabetes tipo I	1/14 (7.1%)	0/9 (0.0%)	1/14 (7.1%)	0/12 (0.0%)
Enfermedad celiaca	0/14 (0.0%)	2/9 (22.2%)	1/14 (7.1%)	1/12 (8.3%)
Enfermedad de Alzheimer	0/14 (0.0%)	0/9 (0.0%)	0/14 (0.0%)	0/12 (0.0%)
Tuberculosis latente	0/14 (0.0%)	0/9 (0.0%)	0/14 (0.0%)	0/12 (0.0%)
Antecedentes de leucemia linfoblástica aguda	0/14 (0.0%)	0/9 (0.0%)	0/14 (0.0%)	2/12 (16.7%)
Disfunción tiroidea (hipo e hipertiroidea)	0/14 (0.0%)	5/9 (55.6%)	1/14 (7.1%)	8/12 (66.7%)
Apnea obstructiva del sueño	0/14 (0.0%)	2/9 (22.2%)	0/14 (0.0%)	3/12 (25.0%)
"Uso de medicamentos "según sea necesario-- número (%)	9 (64.3%)	8 (88.9%)	5/14 (35.7%)	2/12 (16.7%)

Tabla 2. Cohorte 4 empleada para la determinación de IL-17a en plasma, Figura I 9.

Características clínicas y demográficas	D21 (Controles típicos), n = 20	T21 (síndrome de Down), n=20
Edad media-- Años (Rango)	28.9 (9.2-41.6)	27.5 (10.8-42.9)
Género, número (%)		
Hombre	12 (60.0%)	12 (60.0%)
Mujer	8 (40.0%)	8 (40.0%)
Diagnóstico oficial para síndrome de Down-- número (%)		
Trisomía completa del chr21	N/A	16/20 (80.0%)
Trisomía parcial del chr21	N/A	0/29 (0.0%)
Trisomía mosaico del chr21	N/A	0/20 (0.0%)
No especificado	N/A	4/20 (20.0%)
Institucionalizado	0/20 (0.0%)	0/20 (0.0%)
Historia médica-- número (%)		
Obesidad (IMC >30)	0/20 (0.0%)	7/20 (35.0%)
Defectos congénitos del corazón (CHD)	0/20 (0.0%)	12/20 (60.0%)
Condiciones autoinmunes de la piel (alopecia areata, dermatitis atópica/eczema, vitiligo and psoriasis)	0/20 (0.0%)	7/20 (35.0%)
Diabetes tipo I	2/20 (10.0%)	0/20 (0.0%)
Enfermedad celiaca	0/20 (0.0%)	5/20 (25.0%)
Enfermedad de Alzheimer	0/20 (0.0%)	2/20 (10.0%)
Tuberculosis latente	1/20 (5.0%)	0/20 (0.0%)
Antecedentes de leucemia linfoblástica aguda	0/20 (0.0%)	0/20 (0.0%)
Disfunción tiroidea (hipo e hipertiroidea)	0/20 (0.0%)	16/20 (80.0%)
Apnea obstructiva del sueño	0/20 (0.0%)	11/20 (55.0%)
"Uso de medicamentos "según sea necesario-- número (%)	11/20 (55.0%)	16/20 (80.0%)

Tabla 3. Cohorte 3 empleada para los ensayos de supresión cruzada, Figuras I 10-12.				
Características clínicas y demográficas	Cohorte "Ensayo autólogo"		Cohorte "Ensayo Criss-Cross"	
	D21 (controles típicos), n = 9	T21 (síndrome de Down), n= 7	D21 (controles típicos), n=10	T21 (síndrome de Down), n=10
Edad media-- Años (Rango)	33.1 (23.8-40.9)	26.4 (20.5-38.1)	27.4 (20.1-32.8)	27.9 (22.5-34.7)
Género, número (%)				
Hombre	5 (55.6%)	2 (28.6%)	3 (30.0%)	3 (30.0%)
Mujer	4 (44.4%)	5 (71.4%)	7 (70.0%)	7 (70.0%)
Diagnóstico oficial para síndrome de Down-- número (%)				
Trisomía completa del chr21	N/A	7 (100%)	N/A	5/10 (50.0%)
Trisomía parcial del chr21	N/A	0 (0.0%)	N/A	0/10 (0.0%)
Trisomía mosaico del chr21	N/A	0 (0.0%)	N/A	0/10 (0.0%)
No especificado	N/A	0 (0.0%)	N/A	5/10 (50.0%)
Institucionalizado	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0/10 (0.0%)	0/10 (0.0%)
Historia médica-- número (%)				
Obesidad (IMC >30)	0/9 (0.0%)	2/7 (28.6%)	1/10 (10.0%)	3/10 (30.0%)
Defectos congénitos del corazón (CHD)	0/9 (0.0%)	4/7 (57.1%)	0/10 (0.0%)	4/10 (40.0%)
Condiciones autoinmunes de la piel (alopecia areata, dermatitis atópica/eczema, vitíligo and psoriasis)	0/9 (0.0%)	1/7 (14.3%)	1/10 (10.0%)	2/10 (20.0%)
Diabetes tipo I	1/9(11.1%)	0/7 (0.0%)	1/14 (7.1%)	0/12 (0.0%)
Enfermedad celiaca	0/9 (0.0%)	2/7 (28.6%)	1/14 (7.1%)	1/12 (8.3%)
Enfermedad de Alzheimer	0/19(0.0%)	0/7 (0.0%)	0/14 (0.0%)	0/12 (0.0%)
Tuberculosis latente	0/9 (0.0%)	0/7 (0.0%)	0/14 (0.0%)	0/12 (0.0%)
Antecedentes de leucemia linfoblástica aguda	0/14 (0.0%)	0/7 (0.0%)	0/14 (0.0%)	2/12 (16.7%)
Disfunción tiroidea (hipo e hipertiroidea)	0/14 (0.0%)	5/7 (71.4%)	1/14 (7.1%)	8/12 (66.7%)
Apnea obstructiva del sueño	0/14 (0.0%)	2/7 (28.6%)	0/14 (0.0%)	3/12 (25.0%)
"Uso de medicamentos "según sea necesario-- número (%)	9 (100%)	7 (100%)	5/14 (35.7%)	2/12 (16.7%)

Tabla 4. Cohorte 5 empleada para el análisis de ARNseq de leucocitos totales, Figura II 1-2

Características clínicas y demográficas	D21 (controles típicos), n = 9	T21 (síndrome de Down), n=10
Edad media-- Años (Rango)	25.8 (9.2-41.6)	25.64 (10.8-41.2)
Género, número (%)		
Hombre	5 (55.6%)	5 (50.0%)
Mujer	4 (44.4%)	5 (50.0%)
Diagnóstico oficial para síndrome de Down-- número (%)		
Trisomía completa del chr21	N/A	8/10 (80.0%)
Trisomía parcial del chr21	N/A	
Trisomía mosaico del chr21	N/A	
No especificado	N/A	2/10 (20.0%)
Institucionalizado	0/9 (0.0%)	0/10 (0.0%)
Historio medica-- número (%)		
Obesidad (IMC >30)	1/9 (11.1%)	3/10 (30.0%)
Defectos congénitos del corazón (CHD)	0/9 (0.0%)	4/10 (40.0%)
Condiciones autoinmunes de la piel (alopecia areata, dermatitis atópica/eczema, vitiligo and psoriasis)	0/9 (0.0%)	2/10 (20.0%)
Diabetes tipo I	1/9 (11.1%)	0/10 (0.0%)
Enfermedad celiaca	0/9 (0.0%)	0/10 (0.0%)
Enfermedad de Alzheimer	0/9 (0.0%)	0/10 (0.0%)
Tuberculosis latente	0/9 (0.0%)	0/10 (0.0%)
Antecedentes de leucemia linfoblástica aguda	0/9 (0.0%)	0/10 (0.0%)
Disfunción tiroidea (hipo e hipertiroidea)	0/9 (0.0%)	7/10 (70.0%)
Apnea obstructiva del sueño	0/9 (0.0%)	5/10 (50.0%)
"Uso de medicamentos "según sea necesario-- número (%)	7/9 (77.8%)	8/10 (80.0%)

Tabla 5. Cohorte 6 empleada para la caracterización de la señalización de IFN por CyTOF, Figura II 3-5.

Características clínicas y demográficas	D21 (controles típicos), n = 8	T21 (síndrome de Down), n=8
Edad media-- Años (Rango)	25.5 (20.6-46.6)	28.1 (20.5-46.7)
Género, número (%)		
Hombre	4/8 (50%)	3/8 (37.5%)
Mujer	4/8 (50%)	5/8 (62.5%)
Diagnóstico oficial para síndrome de Down-- número (%)		
Trisomía completa del chr21	N/A	6/8 (75%)
Trisomía parcial del chr21	N/A	0/8 (0%)
Trisomía mosaico del chr21	N/A	0/8 (0%)
No especificado	N/A	2/8 (25%)
Institucionalizado	0/8 (0%)	0/8 (0%)
Historio medica-- número (%)		

Obesidad (IMC >30)	1/8 (12.5%)	3/8 (37.5%)
Defectos congénitos del corazón (CHD)	0/8 (0%)	4/8 (50%)
Condiciones autoinmunes de la piel (alopecia areata, dermatitis atópica/eczema, vitiligo and psoriasis)	1/8 (12.5%)	3/8 (37.5%)
Diabetes tipo I	0/8 (0%)	0/8 (0%)
Enfermedad celiaca	0/8 (0%)	2/8 (25%)
Enfermedad de Alzheimer	0/8 (0%)	2/8 (25%)
Tuberculosis latente	1/8 (12.5%)	0/8 (0%)
Antecedentes de leucemia linfoblástica aguda	0/8 (0%)	5/8 (62.5%)
Disfunción tiroidea (hipo e hipertiroidea)	1/8 (12.5%)	5/8 (62.5%)
Apnea obstructiva del sueño	0/8 (0%)	1/8 (12.5%)
"Uso de medicamentos "según sea necesario-- número (%)	4/8 (50%)	7/8 (87.5%)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se obtuvo sangre periférica con el objetivo de poder separar el plasma, una capa de glóbulos blancos y glóbulos rojos (RBCs). El plasma y los RBCs fueron almacenados inmediatamente y los glóbulos blancos fueron procesados para la clasificación mediante FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) de las distintas poblaciones celulares y, por otro lado, para realización de ensayos funcionales.

Separación de los componentes de la sangre

La separación de los componentes de las muestras de sangre fue llevada a cabo colocando la muestra extraída en tubos con EDTA. Se procedió a medir el volumen contenido en los tubos y se realizó un conteo sanguíneo completo utilizando un analizador hematológico (AcT 10). Posteriormente, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 700xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. En este punto, la sangre se encontraba claramente separada en tres capas distintas: plasma en la parte superior, la capa de glóbulos blancos el medio y las RBCs en la parte inferior. Subsiguientemente, el plasma fue retirado de todos los tubos, fue colocado en un nuevo recipiente, donde se realizó una centrifugación adicional a 2200xg por 15 minutos a 4°C para eliminar el debris remanente. Luego, el plasma restante junto con la capa de glóbulos blancos fue aspirada (aproximadamente 1-2mL de un tubo de 10mL) utilizando una pipeta de calibre ancho, combinando todas las capas de células en un mismo recipiente.

Se realizaron alícuotas de 1mL de las RBCs, las cuales fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. Luego de finalizada la

centrifugación del plasma de 15 minutos, múltiples alícuotas de 1mL, y se almacenaron a -80°C.

Una vez combinadas las capas de glóbulos blancos de todos los tubos se procedió a la purificación de estas células eliminando las RBCs de dos maneras:

Purificación de glóbulos blancos utilizando buffer de lisis:

Por cada 1mL de capa de glóbulos blancos, se utilizaron alícuotas de 5mL de buffer de lisis 1X a temperatura ambiente. Por ejemplo, para lisar las RBCs de una capa de glóbulos blancos de 8mL se requieren 40mL de buffer de lisis 1X. Una vez que el volumen fue calculado, se colocaron los glóbulos blancos en los tubos que contenían el buffer de lisis 1X, se mezclaron suavemente por inversión durante 5 minutos. Posteriormente, fueron centrifugados a 500xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de verificar que haya un sedimento celular en el fondo del tubo, se descartó el sobrenadante lentamente sin perturbar el sedimento y se realizó una segunda lisis. Luego, los pellets de glóbulos blancos fueron lavados agregando buffer FACS, para eliminar el buffer de lisis residual, fueron centrifugados a 500xg durante 5 minutos y el sobrenadante fue descartado lentamente sin perturbar el sedimento. Se realizó nuevamente el paso de lavado. Posteriormente, las células fueron contadas utilizando un contador Countess II FL (Life technologies) y la suspensión celular fue preparada para el procedimiento de tinción.

Purificación de PBMCs utilizando un gradiente de densidad (ficoll hypaque):

Luego de haber extraído el plasma, se agregó PBS 1X a los tubos que contenían la capa de glóbulos blancos junto con las RBCs para volver al volumen de sangre inicial y se mezclaron por inversión. Para realizar el enriquecimiento de PBMCs tubos ACCUSPIN, 50 ml de capacidad (#A2055) fueron utilizados para colocar 15mL ficoll hypaque-1,077 a temperatura ambiente. Inicialmente, los tubos fueron centrifugados a 800xg durante 30 segundos a temperatura ambiente, para que el ficoll hypaque-1,077 se encuentre por debajo de la cámara separadora. Posteriormente, las muestras de sangre fueron agregadas en la cámara superior de cada tubo ACCUSPIN (se usaron 15-30mL de muestra de sangre para tubos de 50mL) y los tubos fueron centrifugados a 1000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante la centrifugación se fueron formando varias capas, el sedimento que compuesto principalmente por granulocitos y eritrocitos que ha migrado a través del gradiente de densidad que es mayor al del ficoll hypaque-1,077, por encima de estas dos capas, se observa una interfaz opalescente que son las PBMCs purificadas. La interfaz opaca fue transferida a un nuevo tubo, donde las células fueron lavadas para eliminar restos de ficoll hypaque-1,077 y fueron

centrifugadas a 250xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, las células fueron contadas y la suspensión celular fue preparada para el procedimiento de tinción.

TECNICAS GENERALES

Citometría de flujo

Citometría de flujo tinción de viabilidad

La tinción de viabilidad es esencial para realizar un experimento de citometría de flujo. Las células muertas pueden comprometer la integridad de los datos por anticuerpos que no se unen específicamente; por lo tanto, es esencial que las células muertas sean excluidas del análisis. Para ello, se utilizó el *LIVE/DEAD Fixable Aqua dead cell Stain Kit*, donde los colorantes de viabilidad tiñen con brillantez las células con membranas comprometidas y se entrecruzan covalentemente a proteínas celulares, marcando irreversiblemente las células muertas de todas las especies. Esto permite que las muestras se sometan a procedimientos de crioconservación, fijación y permeabilización sin la pérdida de intensidad de tinción por parte de las células muertas, asegurando que puedan excluirse del análisis posterior y mejorando así la calidad de los datos. Una vez reconstituido el vial del colorante vital con 50uL de DMSO, se incubaron las suspensiones celulares utilizando una dilución 1/500 de este colorante diluido en PBS 1X (libre de proteínas) durante 30 min a 2-8°C. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1X y centrifugadas por 5 minutos a 500xg. Luego, se procedió con la marcación de superficie detallada siguientemente.

Citometría de flujo de superficie

Para el estudio de la expresión de marcadores de superficie y caracterización del compartimiento de células T, se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD127, anti-CD45RA, anti-CCR7, anti-CD39 anti-CD57, anti-KLRG1, anti-PD1, anti-CD272, anti-GITR, anti-ICOS, anti-TIGIT, anti-LAP1, anti-CD14 y anti-CD19. En todos los casos las suspensiones de células obtenidas de muestras de sangre periférica fueron incubadas por 30 minutos a 2-8°C con una mezcla de los diferentes anticuerpos, luego de la tinción de viabilidad mencionada anteriormente, utilizando sus respectivas diluciones en buffer para citometría (Buffer FACS). Posteriormente las células fueron lavadas, centrifugadas por 5 minutos a 500xg y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo YETI *cell analyzer* (capaz de detectar 2 parámetros ópticos y 18 parámetros de fluorescencia) y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.). Todos los anticuerpos se detallan en la tabla 6.

Citometría de flujo intracelular

Para la tinción de citocinas, proteínas intracelulares y factores de transcripción, las PBMCs fueron estimuladas con PMA (50ng/ml), Ionomicina (1 µg/ml) y el cocktail inhibidor del transporte de proteína (1/500) durante 4 horas en placas de cultivo de 96 reservorios, fondo redondo, colocando en cada reservorio aproximadamente 1×10^6 células en 200 µL finales de RPMI completo (10% SFB, 1/100 Glutamina, 1/100 penicilina/streptavidina, 1/100 Sodio piruvato, 1/100 MEM Aminoácidos no esenciales). Luego de esta incubación, las células fueron lavadas con buffer FACS y se comenzó con la marcación para citometría de flujo de superficie como se describió anteriormente. Luego las células fueron fijadas en 50µL de buffer de fijación 1x (*eBioscience Fixation/Permeabilization buffer*) durante 1h a 4°C. Posteriormente, fueron lavadas e incubadas en 50µL de buffer de permeabilización 1x (*eBioscience Permeabilization buffer*) conteniendo los anticuerpos de marca intracelular correspondiente a cada cocktail diseñado: anti-Foxp3, anti- Helios, anti-CTLA-4, anti-GzmB, anti-IL-17A, anti-IFN-γ, anti-Ki67, anti-Tbet y anti-EOMES por 30min a 4°C. Por último, las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer de citometría para su adquisición en el citómetro de flujo. Todos los anticuerpos se detallan en la tabla 6.

Tabla 6: Anticuerpos empleados en citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Especificidad	Isotipo	#Catálogo	Compañía
Aqua LIVE/DEAD	BV500	N/A	Todas las especies	N/A	L4957	Thermo Fisher Scientific
CD3	BV785	OKT3	Humano	IgG2a k	317329	Biologend
CD8	BUV395	RPA-T8	Humano	IgG1 k	563796	BD Biosciences
CD4	APCCy7	SK3	Humano	IgG1 k	344615	Biologend
CD25	PE	3G10	Humano	IgG1	130-101-428	Miltenyi Biotec
CD127	A700	A019D5	Humano	IgG1 k	351343	Biologend
CD45RA	PECy5	HI100	Humano	IgG2b k	15-0458-41	eBioscience
CCR7	BV421	G043H7	Humano	IgG2a k	353223	Biologend
CD57	PE-CF594	NK-1	Humano	IgM k	562488	BD Biosciences
CD39	BV711	TU66	Humano	IgG2b k	563680	BD Biosciences

KLRG1	FITC	SA231A2	Humano	IgG2a k	367713	Biolegend
PD-1	PECy7	EH12.2H7	Humano	IgG1 k	329917	Biolegend
GITR	PE	DT5D3	Humano	IgG1	130-099-088	Miltenyi
ICOS	FITC	ISA-3	Humano	IgG1 k	11-9948-41	ebioscience
TIGIT	PECy7	MBSA43	Humano	IgG2a k	25-9500-41	ebioscience
FOXP3	Efluor450	236A/E7	Humano	IgG1 k	48-4777-42	eBioscience
HELIOS	APC	22F6	Humano	IgG	137221	Biolegend
CTLA-4	PE-CF594	BNI3	Humano	IgG1 κ	562742	BD Biosciences
GRANZIMA B	PE-CF594	GB11	Humano	IgG1 κ	562462	BD Biosciences
IL-17A	BV711	BL168	Humano	IgG1 κ	512327	Ozyme
IFN-γ	FITC	4S.B3	Humano	IgG1 κ	502505	Biolegend
LAP-1	PECy7	FNLAP	Humano	IgG1 κ	25-9829-42	eBioscience
Ki-67	PE	16A8	Humano	IgG2a k	652403	Biolegend
T-bet	PECy7	EBio4b10 (4B10)	Humano	IgG1 κ	25-5825-82	eBioscience
PD-1	PE-CF594	EH12.1	Humano	IgG1 κ	565024	BD Biosciences
CD272	APC	MIH26	Humano	IgG2a k	344510	Biolegend
TNF alpha	BV605	MAB11	Humano	IgG1 κ	502936	Biolegend
CD57	APC	NK-1	Humano	IgM k	560845	BD Biosciences
IFN-γ	BV711	4S.B3	Humano	IgG1 κ	502540	Biolegend
Eomes	PerCP-eFluor 710	WD1928	Humano	IgG1 κ	46-4877-42	eBioscience
CellTrace Violet	CellTrace Violet	N/A	N/A anti all Species	N/A	C34858	Thermo Fisher Scientific
Fix	eFluor 660 Fix Viability	N/A	All Species	N/A	65-0864-14	eBioscience
CD14	FITC	61D3	Humano	IgG1 k	11-0149-42	Biolegend
CD19	APC	HIB19	Humano	IgG1 k	302211	Biolegend

Citometría de masa (CyTOF)

Preparación de la muestra

A partir de un tubo de sangre periférica por individuo (10 ml), las muestras fueron divididas en alícuotas de 0,5mL, para las siguientes condiciones:

- Muestras T0 (3-7 tubos): Tiempo 0, directamente ex vivo, no estimulado.
- Muestras T30 (1-2 tubos): Tiempo 30 para fosforilación / señalización: no estimulado y estimulado con 10000U/mL de IFN- α .

Se comenzó con el proceso de las muestras T30, donde a 0,5mL de sangre completa se le agregaron 20uL de medio RPMI 1640 (como control, no estimulado) o IFN- α (estimulado), las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C. Mientras tanto, se comenzó con el preparado del buffer de fijación/lisis 1X (BD pharma), el cual fija al mismo tiempo que lisa las RBCs. Una vez transcurridos estos 30 minutos de estimulación de las muestras T30, 10mL del buffer de lisis fueron agregados a las muestras T0 y T30 y fueron incubadas por 15 minutos a 37°C. Las muestras fueron centrifugadas a 400xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas en 1mL de PBS 1X frío, y luego se las llevó a un volumen final de 10mL con PBS 1X, las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 400xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Seguidamente, las muestras se resuspendieron en 1mL de medio *Cell Staining* 1X frío y se transfirieron a un tubo etiquetado de 1,5mL. Las muestras fueron centrifugadas a 400xg durante 5 minutos a 4°C, con cuidado se descartó el sobrenadante dejando un remanente de 50uL de medio *Cell Staining* y las muestras fueron almacenadas -80°C.

Tinción de anticuerpos para citometría de masa (*barcoding*, superficie, intracelular y señalización)

Las muestras individuales fueron marcadas con una combinación única de isótopos de Paladio (Pd), lo que denomina código de barra (*Barcode*). Para ello, las muestras fijadas se descongelaron, y lavaron con buffer de tinción celular de BD Fluidigm. Luego las muestras se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se lavaron dos veces con 1mL de buffer de permeabilización de código de barra (*Barcode Perm Buffer*). Posteriormente, cada muestra fue resuspendida para ser marcada con un código de barras completo en 800uL de *Barcode Perm buffer*. Seguidamente, las muestras se resuspendieron con la combinación de los códigos de barra preparada en 100uL de *Barcode Perm buffer* y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, las células fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante y se lavaron dos veces con 2mL de buffer de tinción celular (*Cell Staining*

Buffer). Por último, las muestras fueron resuspendidas en 50uL de buffer de tinción y fueron colocadas en un mismo tubo, para proceder a la tinción de superficie.

Para el estudio de la expresión de marcadores y caracterización del compartimiento celular en sangre periférica, se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con diferentes isotopos: anti-CD45, anti-CD19, anti-CD123, anti-CD4, anti-IgD, anti-CD11c, anti-CD127, anti-CD66, anti-CD14, anti-CD7, anti-CD3, anti-PD1, anti-IFNGR2, anti-IFNAR1, anti-CD80, anti-CD8 α , anti-CD34, anti-CD45RO, anti-CD27, anti-CD25, anti-CD20, anti-HLA-DR, anti-CD56 and anti-CD16 (Tabla 7).

Una vez que las muestras fueron resuspendidas en 50uL de buffer de tinción, y colocadas en un mismo tubo, una solución 2X fue preparada, en 50uL por muestra de buffer de tinción, conteniendo todos los anticuerpos en sus respectivas diluciones y las muestras fueron incubadas durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas con buffer de tinción y centrifugadas a 500g. durante 5 minutos a 2-8°C. Luego dos lavados fueron realizados con buffer de permeabilización 1x (*eBioscience, Foxp3 Permeabilization buffer*) y las células fueron resuspendidas en 50uL por muestra de buffer de permeabilización 1x, agregando 50uL por muestra de una suspensión 2X de buffer de permeabilización 1x conteniendo los anticuerpos intracelulares (anti-Col1 y anti-Foxp3) (Tabla 7), las muestras fueron incubadas 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con buffer de tinción, y se las resuspendió en 1mL de buffer de tinción. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas en 1mL de una solución fresca a una dilución 1:50000 de los intercaladores de ADN 191 / 193Ir (Fluidigm); las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C. Por último, las células se lavaron dos veces con buffer de tinción y dos veces con *MaxPar Water* (Fluidigm) y fueron analizadas por el citómetro de masa Helios, Fluidigm.

Tabla 7: Panel de Caracterización CyTOF		
Proteína	Clon	Metal
CD45	HI30	89Y
Col1	5D8-G9	141Pr
CD19	HIB19	142Nd
CD123	6H6	143Nd
CD4	RPA-T4	145Nd
IgD	IA6-2	146Nd
CD11c	Bu15	147Sm
CD127	A019D5	149S
CD66a/c/d/e	B1.1/CD66	150Nd

CD14	M5EU	151Eu
CD7	CD7-6B7	153Eu
CD3	UCHT1	154Sm
CD279/PD1	EH12.2H7	155Gd
IFNRG2	Polyclonal	156Gd
Foxp3	259D/C7	159Tb
IFNAR1	EP899Y	160Gb
CD80	2D10.4	161Dy
CD8alpha	RPA-T8	162Dy
CD34	581	163Dy
CD45RO	UCHL1	164Dy
CD27	L128	167Er
CD25	2A3	169Tm
CD20	2H7	171Yb
GzmB		173Yb
HLA-DR	L243	174Yb
CD56	N901	176Yb
CD16	3G8	209Bi

Para evaluar las vías de señalización activadas luego de la estimulación con IFN- α se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes isotopos: anti-CD45, anti-CD66, anti-Col1, anti-CD19, anti-CD123, anti-plkBalpha, anti-CD4, anti-IgD, anti-CD11c, anti-pSTAT4, anti-CD127, anti-CD1c, anti-CD14, anti-pERK1/2, anti-CD7, anti-CD3, anti-PD1, anti-IFNRG2, anti-pEIF2S1, anti-pSTAT3, anti-Foxp3, anti-IFNAR1, anti-CD80, anti-CD8alpha, anti-CD45RO, anti-pSTAT5, anti-p4E-BP1, anti-CD27, anti-pSTAT6, anti-pSTAT2, anti CD25, anti-CD20, anti-CD38, anti-pSTAT1, anti-HLA-DR, anti-pS6, anti-CD56, anti-CD16 (Tabla 7-8).

Una vez descongeladas las muestras se les agregó 50uL de buffer de tinción, y luego al igual que en el ítem anterior, todas las muestras fueron trasvasadas a un único recipiente, donde se realizó la tinción de superficie. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con 5mL de buffer de tinción, fueron centrifugadas a 500xg. durante 5 minutos a 4°C, se les agregaron 10mL de 1X *TFP Fix/perm buffer de BD Pharmingen Transcription Factor Phospho buffer set* y las muestras fueron incubadas durante 50 minutos a 4°C. Luego, se realizaron dos lavados con 1X *TFP Perm/Wash buffer de BD Pharmingen* (las células se centrifugaron a 750g por 5 minutos a 4°C), 5mL de *Perm buffer III de BD Pharmingen* fueron agregados y se incubaron las células en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, dos lavados fueron realizadas con *TFP Perm/Wash*

buffer y se agregaron 50uL por muestra de una suspensión 2X utilizando una solución 1X de *TFP Perm/wash buffer* conteniendo los anticuerpos intracelulares. Las muestras fueron incubadas durante 45 minutos a 4°C. Luego, se lavaron y se realizó la tinción de las células con el intercalador de ADN 191 / 193Ir utilizando el mismo protocolo explicado anteriormente. Por último, las células fueron lavadas dos veces con *buffer* de tinción, dos veces con *MaxPar Water* (Fluidigm) y fueron analizadas por el citómetro de masa Helios, Fluidigm.

Tabla 8: Panel de Señalización CyTOF		
Proteína	Clon	Metal
CD45	HI30	89Y
CD66a/c/d/e	B1.1/CD66	150Nd
Co11	5D8-G9	141Pr
CD19	HIB19	142Nd
CD123	6H6	143Nd
IKBalph	L35A5	144Nd
CD4	RPA-T4	145Nd
IgD	IA6-2	146Nd
CD11c	Bu15	147Sm
pSTAT4 [Y693]	38	148Nd
CD127	A019D5	149S
CD1c		150Nd
CD14	M5EU	151Eu
pERK1/2 [t202/Y204]	D13.14.4E	152Sm
CD7	CD7-6B7	153Eu
CD3	UCHT1	154Sm
CD279/PD1	EH12.2H7	155Gd
IFNGR2	Polyclonal	156Gd
pEIF2S1 [S51]	E90	157Gd
pSTAT3 [Y705]	4/P-STAT3	158Gd
Foxp3	259D/C7	159Tb
IFNAR1	EP899Y	160Gb
CD80	2D10.4	161Dy
CD8alpha	RPA-T8	162Dy
CD34	581	163Dy
CD45RO	UCHL1	164Dy
pSTAT5 [pY694]	Clone47	165Er
p4E-BP1 [Thr37/46]	236B4	166Er
CD27	L128	167Er

pSTAT6 [Y641]	18	168Er
CD25	2A3	169Tm
pSTAT2 [Y690]	D3P2P	170Er
CD20	2H7	171Yb
CD38	HIT2	172Yb
pSTAT1 [Y701]	58D6	173Yb
HLA-DR	L243	174Yb
pS6 [S235/S2]	N7-548	175Lu
CD56	N901	176Yb
CD16	3G8	209Bi

Separación celular (*cell sorting*)

Para el estudio funcional y transcriptómico de las diferentes poblaciones celulares presentes, las PBMCs fueron marcadas utilizando los protocolos previamente descritos, con anticuerpos monoclonales anti-CD14-FITC, anti-CD56, anti-CD19 APC, anti-CD8-PECy7, anti-CD4 APCCy7, anti-CD25, anti-CD127 para ensayos funcionales y con anti-CD45, anti-CD16, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25 y anti-CD127 para análisis transcriptómico, durante 30 minutos a 4°C en buffer FACS. Luego de la incubación, las células fueron lavadas, resuspendidas en buffer FACS y purificadas por *cell sorter* en un Citómetro de Flujo MoFlo XDP70 y Astrios EQ.

Extracción ARN

Una vez que las células Treg y Tconv fueron purificadas mediante FACS, se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 350uL de una solución de buffer de lisis RLT plus (Qiagen) y Beta-mercaptoetanol (BME) (10 ml de BME: 1 ml de RLT plus) para luego realizar la extracción de ARN. Las células lisadas fueron almacenadas inmediatamente a -80°C y el ARN se extrajo más tarde utilizando el kit de ADN / ARN / proteína AllPrep (Qiagen 80004).

Las células lisadas fueron colocadas en una columna de centrifugación AllPrep ADN dentro de un tubo de recolección de 2 ml y fueron centrifugadas durante 30 segundos a 8000xg (10,000 rpm), las columnas fueron guardadas para realizar posteriormente la extracción de ADN.

A la suspensión obtenida de la centrifugación se le agregó 250uL de etanol 96-100%, se mezcló por inversión y se la transfirió a una columna de centrifugación para extraer el ARN dentro de un tubo de recolección de 2 ml y se centrifugaron durante 15 segundos a 8000xg (10,000 rpm). El sobrenadante fue guardado para posteriormente

realizar la extracción de proteína. Luego, se colocó la columna de centrifugado para extracción de ARN en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, se agregaron 700uL del buffer RW1 y se centrifugaron durante 15 segundos a 8000xg (10,000 rpm), el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, dos lavados fueron realizados donde se agregaron 500uL de buffer RPE a la columna, se centrifugaron durante 15 segundos a 8000xg (10,000 rpm) y nuevamente, se descartó el sobrenadante. Una centrifugación fue realizada, a máxima velocidad por 1 minuto para eliminar restos de buffer. Por último, la columna de centrifugado para extracción de ARN fue colocada en un nuevo tubo de recolección de 2mL y se agregaron 20µL de agua libre de ARNasa directamente a la membrana de la columna, se centrifugaron durante 1 minuto a 8000xg (10,000 rpm) para eluir el ARN. Como el rendimiento del ARN de las células Treg esperado fue menor a 30ug, repetimos nuevamente el último paso para obtener una mayor concentración de ARN. La calidad del ARN fue determinada por BioAnalyzer (Agilent) y cuantificada por Qubit. (Life Technologies). Se usaron muestras con un RIN de 7 o más y un mínimo de 36 ng y 700ng de ARN total proveniente de células Treg y Tconv respectivamente, para la preparación y secuenciación de la biblioteca.

Análisis ARNseq

Realizamos ARN-seq a partir de células Treg humanas de individuos T21 y D21, de un panel de 6 mujeres entre 20-40 años de edad, utilizando el kit de *SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA* (Clontech) seguido del kit Nextera® XT (Illumina) para crear las bibliotecas que fueron secuenciadas en el HiSeq 2500.

Para el ARNseq de las células totales, las muestras se procesaron utilizando un protocolo descrito anteriormente (Sullivan et al., 2016b). Las células totales se criopreservaron en medios de congelación CryoStor CS10 a una concentración de $\sim 10 \times 10^6$ células/ml. Posteriormente, las células fueron descongeladas de manera rápida a 37°C e inmediatamente se añadieron a 9mL de medio RPMI completo, luego se centrifugaron a 500g durante 5 minutos y se descartó el medio. Las células se resuspendieron en 600µL de RLT Plus (Qiagen) y Beta-mercaptoetanol (BME) (10 µL de BME: 1 ml de RLT Plus). El ARN se extrajo utilizando el protocolo nombrado previamente y la calidad del ARN fue determinada por Agilent 2200 TapeStation y cuantificada por Qubit (Life Technologies). De igual manera que con el ARNseq de las células Treg, las muestras con RIN de >6.8 y un mínimo de 1 µg se enviaron a Novogene para la preparación de la biblioteca y secuenciación de extremo pareado (Illumina).

Para ambos ARNseq, el análisis de la complejidad de la biblioteca y la alta calidad de la secuencia por base en todas las lecturas (es decir, $q > 30$) fue realizado

utilizando el software FastQC (v0.11.2). Las bases de baja calidad ($q < 10$) fueron recortadas del extremo 3' de las lecturas y lecturas cortas (< 30 nt después del recorte) y las secuencias del adaptador fueron eliminadas utilizando la herramienta *fastqc-mcf* de *ea-utils*. Las fuentes comunes de contaminación de secuencia como micoplasma, mitocondrias y ARN ribosomal se identificaron y fueron eliminadas mediante la pantalla FASTQ (v0.4.4). Las lecturas se alinearon con GRCh37 / hg19 utilizando TopHat2 (v2.0.13, -b2-sensitive -keep-fasta-order -no-coverage-search -max-multihits 10 -library-type fr-firststrand) (D. Kim et al., 2013). Las lecturas mapeadas de alta calidad (MAPQ > 10) fueron filtradas con SAMtools (v0.1.19) (H. Li et al., 2009). Las lecturas fueron ordenadas con Picardtools (SortSAM) y duplicados marcados (MarkDuplicates). El control de calidad de las lecturas finales se realizó con RSeQC (v2.6) (L. Wang, Wang, & Li, 2012). Los recuentos de genes se obtuvieron utilizando HTSeq (v0.6.1, -stranded=reverse -minqual=10 -type=exón -idattr=gene -mode= intersection-nonempty, GTF-ftp://igenome:G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Homo_sapiens/UCSC/hg19/Homo_sapiens_UCSC_hg19.tar.gz) (Anders, Pyl, & Huber, 2015). La expresión diferencial fue determinada utilizando DESeq2 (v1.6.3) y R (3.10) (Love, Huber, & Anders, 2014). Los diagramas de Volcán y Manhattan fueron realizados utilizando la biblioteca de trazado de Python 'matplotlib' (<http://matplotlib.org>).

Ensayo MSD (*Meso Scale Discovery*)

El *Meso Scale Discovery* V-PLEX 29-PLEX para medir citocinas de humanos y la matriz U-PLEX se combinaron para detectar 38 citocinas en plasma de 40 individuos (20 D21 y 20 T21). Inicialmente se agregaron 20uL del diluyente a cada pocillo en una placa de 96 pocillos, las cuales se encuentran sensibilizadas con los anticuerpos de captura, posteriormente se agregaron 20uL de las muestras y los controles en los diferentes pocillos y se dejó incubando con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X + 0,05% Tween-20. Luego se agregaron 25uL del anticuerpo de detección en cada pocillo y se dejó incubando 2 horas a temperatura ambiente. Por último, se realizaron los lavados, se agregaron 150uL de buffer de lectura a cada pocillo de la placa y analizamos la placa en el SECTOR® *Imager*. Estos datos se transformaron logarítmicamente y se usó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (KS) para identificar las proteínas que se expresaron significativamente diferentes en personas con y sin SD. La corrección de múltiples hipótesis se realizó utilizando el método de Benjamini-Hochberg.

CULTIVO CELULAR

Ensayo de proliferación

Para evaluar la capacidad proliferativa de células T CD8+ y CD4+ Tconv (CD4+ CD25low CD127high), inicialmente estas células fueron aisladas a partir de PBMCs utilizando un *cell sorter* MoFlo XDP 70, posteriormente, se realizó la marcación con un colorante de proliferación. Para ello, una vez centrifugadas las células fueron resuspendidas en PBS 1X (libre de suero, ya que interfiere en la tinción) a una concentración final de 20×10^6 células/mL. En un tubo separado, se agregó una cantidad igual de PBS, donde se colocó el colorante de proliferación (*CellTrace Violet Proliferation Dye*) a una concentración de 10uM (siendo esta una solución 2X, concentración final 5uM). Mientras se agitaba suavemente el tubo conteniendo las células, el colorante de proliferación diluido fue agregado y luego, las células fueron incubadas en una estufa a 37°C durante 8-10 minutos. Inmediatamente después de la incubación, se agregó el medio RPMI completo precalentado a la suspensión celular (el suero frena la reacción del colorante, es por ello que se agrega al menos 5 veces el volumen total de la célula). Se continuó incubando a 37°C durante 5-10 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron y se las resuspendió en medio RPMI completo. Las células fueron contadas y llevadas a una concentración de 20000 células /mL. Luego, se cultivaron 50uL de la suspensión de células ya marcadas con el colorante de proliferación (10000 células por pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo redondo, previamente recubiertas con 0,5 mg/mL de anti-CD3 (Invitrogen) en PBS 1X para la activación de las células. Luego agregamos 50uL de anti-CD28 (Invitrogen) 1 mg/mL en RPMI, también para la activación celular. Dependiendo de la condición a evaluar, en algunos casos a los pocillos se les agregaron 100uL de medio RPMI completo conteniendo 10000U/mL de IFN- α para la condición estimulada y 100uL de medio RPMI completo para la condición no estimulada (control). Por último, las células fueron incubadas durante 5 días a 37°C y posteriormente la capacidad proliferativa fue evaluada utilizando FlowJo (Treestar Inc, US) basado en la división de *CellTrace Violet*.

Ensayo de microsupresión

Para el ensayo de microsupresión *in vitro*, células CD4+ Tconv (CD14- CD19- CD8- CD4 + CD25low CD127high), CD4+ Treg (CD14- CD19- CD8- CD4 + CD25high CD127low) y CD8+ (CD14- CD19- CD8- CD25- CD257-) se aislaron a partir de PBMC usando un *cell sorter* MoFlo XDP 70. Se usaron células CD4+Tconv y células T CD8+ como células T efectoras (Teff, respondedoras) y se marcaron con el colorante de proliferación *Cell Tracer Violet* (5uM). Las células respondedoras (1×10^4) y las diferentes concentraciones de células CD4+ Treg (1:8 - relación Treg: Teff 1:1) se cultivaron en

placas de 96 pocillos de fondo redondo, previamente recubiertas con 0,5 mg/mL de anti-CD3 (Invitrogen) en PBS 1X, y luego se agregó 100 uL de anti-CD28 (Invitrogen) 1 mg/mL en RPMI durante 5 días. La supresión se calculó como se describió anteriormente (Mcmurphy & Levings, 2012). Brevemente, las células fueron adquiridas por Yeti (Bio-Rad), y el índice de división de las células respondedoras se analizó utilizando FlowJo (Treestar Inc, US) basado en la división de *CellTrace Violet*. Luego se calculó la supresión con la fórmula %Supresión = $100 - (DITreg / DICtrl) \times 100\%$ (DITreg representa el índice de división de las células respondedoras con Tregs, y DICtrl representa el índice de división de las células respondedoras activadas sin Tregs).

Ensayo de microsupresión (utilizando Treg provenientes de PBMCs congeladas)

Protocolo de descongelamiento (día 1)

Inicialmente se colocaron 9mL medio RPMI completo en un tubo de 15mL (un tubo de 15mL por cada criovial con PBMCs), precalentado en un baño a 37°C por unos 15 min. Posteriormente, se descongelan rápidamente las PBMCs criopreservadas colocándolas en un baño de agua a 37°C (Comenzar con 20 millones o más de células para cada muestra para obtener el número correcto de Tregs). Luego, las células fueron agregadas a los tubos que contenían el medio RPMI completo y fueron centrifugadas durante 5 min a 1400rpm a temperatura ambiente. Una vez descartado el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en medio RPMI completo dejando 1 millón de células/mL (en este momento las células fueron filtradas de ser necesario, para liberarnos de debris celular) colocando 3 millones de células por pocillo en una placa de 6 pocillos (es decir, colocar 3mL de la suspensión celular por pocillo), las cuales fueron incubadas durante toda la noche (es necesario revisar las células 4 horas después de haberlas incubado a 37°C para asegurarnos de que no hay células residuales, muerte o aglomeración celular, de ser las células eran filtradas nuevamente y re-plaquear las células).

Purificación de células Treg y respondedoras a través de la clasificación FACS (día 2)

Una vez preparada la suspensión celular obtenida del día 1, se obtuvieron las poblaciones celulares de CD4+ Treg (CD4+ CD25high CD127low) y CD4+ Tconv respondedoras (CD4+ CD25low CD127high) a través de la clasificación FACS.

-Para cultivar las células CD4+ Treg, se incubó previamente una placa de 96 pocillos con fondo redondo con anti-CD3 de grado funcional (Invitrogen) a 0.5ug / mL (diluido en PBS, 200 uL / pocillo) durante al menos 1 hora a 37°C. Luego se lavaron los pocillos 2 veces con PBS 1X y luego se colocaron las células Tregs aproximadamente 100000 células / pocillo en 100uL de medio RPMI completo. Agregando posteriormente, 100uL

de una solución 2X de medio RPMI completo conteniendo 1ug / ml de anti-CD28 (Invitrogen), 200 UI/mL de IL-2 (R&D System, 202-IL) y 10000U/mL de IFN- α (dependiendo de la condición) a cada pocillo. Las células fueron incubadas durante 3 días.

-Para cultivar las células CD4+ Tconv respondedoras, se incubaron con una dosis baja de IL-2 (20 UI) y también fueron incubadas durante 3 días.

En caso de utilizar un donante diferente, fue necesario asegurarse de tener la sangre para su análisis el día 5.

Experimento alogénico, aislamiento de células respondedoras a través de la clasificación FACS (día 5)

Una vez obtenida la sangre periférica de un donante sano (HD), la misma fue procesada utilizando los protocolos descritos previamente para aislar PBMCs y posteriormente, se obtuvieron las poblaciones celulares CD4+ Tconv respondedoras (CD4+ CD25^{low}CD127^{high}) a través de la clasificación FACS. Luego, las células fueron contadas y se realizó la tinción con el marcador de proliferación (*CellTracer Violet*) descrito previamente en ensayos de proliferación.

Configuración del ensayo de microsupresión

Una vez que las poblaciones celulares fueron contadas (Treg y Tconv con el marcador de proliferación), las mismas fueron resuspendidas en medio RPMI completo en las siguientes concentraciones:

-Tregs: 2000 células por 50uL

-Células T respondedoras: 2000 células por 50uL

Al igual que para el ensayo de supresión las células CD4+ Tconv alogénicas fueron marcadas con el colorante de proliferación Cell Tracer Violet (5uM) y fueron cocultivadas con células CD4+ Treg a concentraciones variables en una placa de 96 pocillos fondo redondo (2000 células CD4+ Tconv por pocillo) en presencia de perlas CD3/CD28 (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28) en una relación 1/20, 1 perla por cada 20 células. Por último, se agregaron a cada pocillo 100uL de medio RPMI completo conteniendo 10000U /mL de IFN- α para la condición estimulada y 100uL de medio RPMI completo para la condición no estimulada (control). Por lo que cada pocillo debe tener 50uL de células Tregs (excepto la condición sin Treg), 50uL de células respondedoras y 100uL de medio RPMI completo con o sin 10000U /mL de IFN- α .

Las células se incubaron durante 3 días a 37°C y se realizó la marcación de células con CD4, CD25, CD127 y factor de viabilidad para evaluar la proliferación celular mediante el colorante de proliferación. A su vez, otros marcadores fueron agregados para evaluar activación y funcionalidad como IFN- γ , IL-10, IL-2 y GzmB. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo YETI cell analyzer (capaz de detectar 2 parámetros ópticos y 18 parámetros de fluorescencia) y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

ANALISIS ESTADISTICO

El manejo de datos, análisis y representación gráfica fueron realizados con Prism 7.0 (GraphPad Software). La significancia estadística fue calculada con análisis de 2 colas utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, Sidak o Tukey según corresponda para 1 o 2 vías ANOVA y Test T de Student no apareado, mientras que para los ensayos de proliferación y supresión donde se utilizaron datos apareados se empleó el test RM dos vías ANOVA - valores coincidentes en la misma fila utilizando una prueba de comparación múltiple de Sidak y Dunnett respectivamente. La correlación entre los parámetros inmunológicos se realizó mediante el análisis de correlación de Pearson aplicando regresión lineal con líneas de ajuste del 95% de confianza. Los gráficos de torta de coexpresión se compararon entre sí utilizando 10,000 permutaciones calculadas con el software SPICE 5.2. Los graficos radiales se realizaron y compararon utilizando R. Los gráficos muestran muestras individuales, y las muestras se son graficadas como la media con o sin barras de error que muestran el s.e.m. La significancia se estableció en un valor de p menor de 0,05 y se representó como *p<0,05; **p<0,01; ***p<0.001 y ****p,0.0001.

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abt, M. C., Osborne, L. C., Monticelli, L. A., Doering, T. A., Alenghat, T., Sonnenberg, G. F., ... Artis, D. (2012). Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity*, 37(1), 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.011>
- Agarwal, S. S., Blumberg, B. S., Gerstley, B. J., London, W. T., Sutnick, A. I., & Loeb, L. A. (1970). DNA polymerase activity as an index of lymphocyte stimulation: studies in Down's syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 49(1), 161–169. <https://doi.org/10.1172/JCI1106215>
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. a, Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., ... Dc, W. (2009). Tumor antigen – specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired Tumor antigen – specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537–1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>
- Akbar, A. N., & Henson, S. M. (2011). Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nature Publishing Group*, 11(4), 289–295. <https://doi.org/10.1038/nri2959>
- Alexander, M., Petri, H., Ding, Y., Wandel, C., Khwaja, O., & Foskett, N. (2016). Morbidity and medication in a large population of individuals with Down syndrome compared to the general population. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 58(3), 246–254. <https://doi.org/10.1111/dmnc.12868>
- Allan, S. E., Crome, S. Q., Crellin, N. K., Passerini, L., Steiner, T. S., Bacchetta, R., ... Levings, M. K. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International Immunology*, 19(4), 345–354. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm014>
- Ambrosi, A., Espinosa, A., & Wahren-herlenius, M. (2012). Th17 Review Series IL-17 : A new actor in IFN-driven systemic autoimmune. *European Journal of Immunology*, 2274–2284. <https://doi.org/10.1002/eji.201242653>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Anwar, A., Walker, J., & Frier, B. (1998). Type 1 diabetes mellitus and Down's syndrome: prevalence, management and diabetic complications. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 15(2), 160–163. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199802\)15:2<160::AID-DIA537>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199802)15:2<160::AID-DIA537>3.0.CO;2-J)
- Appay, V., Sauce, D., & Prelog, M. (2010). The role of the thymus in immunosenescence : lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging*, 2(2), 78–81.
- Asim, A., Kumar, A., Muthuswamy, S., Jain, S., & Agarwal, S. (2015). “down syndrome: An insight of the disease.” *Journal of Biomedical Science*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0138-y>
- Axtell, R. C., Raman, C., & Steinman, L. (2011a). Interferon-β exacerbates Th17-mediated inflammatory disease. *Trends in Immunology*, 32(6). <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.03.008>

- Axtell, R. C., Raman, C., & Steinman, L. (2011b). Type I Interferons : Beneficial in Th1 and Detrimental in Th17 Autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8296-5>
- Bacher, N., Raker, V., Hofmann, C., Graulich, E., Schwenk, M., Baumgrass, R., ... Steinbrink, K. (2013). Interferon- α suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer Research*, 73(18), 5647–5656. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3788>
- Baechler, E. C., Batliwalla, F. M., Karypis, G., Gaffney, P. M., Ortmann, W. A., Espe, K. J., ... Behrenstil, T. W. (2016). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Ballegaard, V., Brændstrup, P., Pedersen, K. K., Kirkby, N., Stryhn, A., Ryder, L. P., ... Nielsen, S. D. (2018). Cytomegalovirus-specific T-cells are associated with immune senescence , but not with systemic inflammation , in people living with HIV. *Scientific Reports*, (February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21347-4>
- Banerjee, A., Gordon, S. M., Intlekofer, A. M., Paley, M. A., Mooney, E. C., Lindsten, T., ... Reiner, S. L. (2015). Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8 + T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002042>
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., ... Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(February), 1–6. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Barkin, M., Weston, V. V. L., Humbert, J. R., & Maire, V. (1979). PHAGOCYtic FUNCTION IN DOWN SYNDROME —. *Journal of Intellectual Disability Research*, 243–250.
- Barrena, M. J., Echaniz, P., Garcia- Serrano, C., & Cuadrado, E. (1993). Imbalance of the CD4+Subpopulations Expressing CD45RA and CD29 Antigens in the Peripheral Blood of Adults and Children with Down Syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*, 38(4), 323–326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1993.tb01733.x>
- Becattini, S., Latorre, D., Mele, F., Gregorio, C. De, Cassotta, A., Kelderman, S., ... Sallusto, F. (2015). Functional heterogeneity of human memory CD4+ T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science*, 1–12.
- Belot, A., Jeziorski, E., Duffy, D., Bessis, D., Khoudour, N., & Caballero, C. M. (2016). Efficacy of the Janus Kinase 1/2 Inhibitor Ruxolitinib in the Treatment of Vasculopathy Associated with TMEM173-Activating Mutations in three children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.015>
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., ... Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, 10(1), 29–37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>
- Blanco, P. (2013). Induction of Dendritic Cell Differentiation by IFN- α in Systemic Lupus Erythematosus. *Science*, 1540(2001). <https://doi.org/10.1126/science.1064890>
- Blanco, P., Pitard, V., & Taupin, J. (2005). Increase in Activated CD8+ T Lymphocytes Expressing Perforin and Granzyme B Correlates With Disease Activity in Patients

- With Systemic Lupus Erythematosus. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 52(1), 201–211. <https://doi.org/10.1002/art.20745>
- Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., & Lo, C. (2013). Review The Hallmarks of Aging. *Cell*, (Figure 1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Bloemers, B. L. P., Bleek, G. M. Van, Kimpen, J. L. L., & Bont, L. (2010). Distinct Abnormalities in the Innate Immune System of Children with Down Syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 156(5), 804–809.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.12.006>
- Bloemers, B. L. P., Bont, L., de Weger, R. A., Otto, S. A., Borghans, J. A., & Tesselaar, K. (2011). Decreased Thymic Output Accounts for Decreased Naive T Cell Numbers in Children with Down Syndrome. *The Journal of Immunology*, 186(7), 4500–4507. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001700>
- Bloemers, B. L. P., Broers, C. J. M., Bont, L., Weijerman, M. E., Gemke, R. J. B. J., & Furth, A. M. Van. (2010). Increased risk of respiratory tract infections in children with Down syndrome : the consequence of an altered immune system. *Microbes and Infection*, 12(11), 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.007>
- Boettler, T., Panther, E., Bengsch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H. C., Blum, H. E., & Thimme, R. (2006). Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8+ T Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology*, 80(7), 3532–3540. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3532>
- Boni, C., Fisticaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Vincenzo, P. Di, Giuberti, T., ... Ferrari, C. (2007). Characterization of Hepatitis B Virus (HBV) -Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *Journal of Virology*, 81(8), 4215–4225. <https://doi.org/10.1128/JVI.02844-06>
- Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F. X., ... Morel, F. (2007). A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 150(3), 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03511.x>
- Boyton, R. J., & Altmann, D. M. (2002). Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends in Immunology*, 23(11), 526–529.
- Bras, S. Le, & Geha, R. S. (2006). IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs Find the latest version : IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1473–1475. <https://doi.org/10.1172/JCI28880.in>
- Brenchley, J. M., Karandikar, N. J., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Crotty, L. E., ... Koup, R. A. (2003). Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8 T cells. *Blood*, 101(7), 2711–2720. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2103>. Supported
- Briggs, T. A., Rice, G. I., Daly, S., Urquhart, J., Gornall, H., Bader-meunier, B., ... Elkon, K. B. (2011). Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature. *Nature Genetics*, 43(2), 127–132. <https://doi.org/10.1038/ng.748>
- Buggert, M., Tauriainen, J., Yamamoto, T., Frederiksen, J., Ivarsson, M. A., Michaëlsson, J., ... Karlsson, A. C. (2014). T-bet and Eomes Are Differentially Linked to the Exhausted Phenotype of CD8+ T Cells in HIV Infection. *PLoS Pathogens*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004251>

- Burgio, G., Ugazio, A. G., Nespoli, L., Marcioni, A. F., Pasquali, A. M., & F., B. (1975). Derangements of Immunoglobulin Levels, Phytohemagglutinin Responsiveness and T and B Cell Markers in Down's Syndrome At Different Ages. *European Journal of Immunology*, 5(9), 600–603.
- Cao, J., Gollapudi, S., Sharma, E. H., Jia, Z., & Gupta, S. (2010). Age-related alterations of gene expression patterns in human CD8+ T cells. *Aging Cell*, (October 2009), 19–31. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00534.x>
- Caridade, M., Graca, L., & Ribeiro, R. M. (2013). Mechanisms underlying CD4 + Treg immune regulation in the adult: from experiments to models. *Frontiers in Immunology*, 4(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00378>
- Carta, M. G., Serra, P., A., G., E., M., M.C., H., G.S., D. G., ... B., C. (2002). Chemokines and pro-inflammatory cytokines in Down's syndrome: An early marker for Alzheimer-type dementia? *Psychotherapy and Psychosomatics*, 71(4), 233–236. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1159/000063649>
- Chang, X., Gao, J. X., Jiang, Q., Wen, J., Seifers, N., Su, L., ... Liu, Y. (2005). The Scurfy mutation of FoxP3 in the thymus stroma leads to defective thymopoiesis. *Journal Experimental Medicine*, 202(8). <https://doi.org/10.1084/jem.20050157>
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R. M., Liang, Y., Kas, A., & Rudensky, A. Y. (2009). CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a stat3-dependent manner. *Science*, 326(5955), 986–991. <https://doi.org/10.1126/science.1172702>
- Chen, K., Liu, J., & Cao, X. (2017). Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.008>
- Chen, Z., Laurence, A., & Shea, J. J. O. (2007). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in Immunology*, 19, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.015>
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R. I., Martinez, G. J., Rawal, S., ... Dong, C. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature Medicine*, 17(8), 983–988. <https://doi.org/10.1038/nm.2426>
- Consortium, T. F.-G. A. (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring. *Nature Genetics*.
- Corre, B., Perrier, J., El Khouri, M., Cerboni, S., Pellegrini, S., & Michel, F. (2013). Type I interferon potentiates T-cell receptor mediated induction of IL-10-producing CD4+T cells. *European Journal of Immunology*, 43(10), 2730–2740. <https://doi.org/10.1002/eji.201242977>
- Cossarizza, A., Monti, D., Montagnani, G., Ortolani, C., Masi, M., Zannotti, M., & Franceschi, C. (1990). Precocious aging of the immune system in Down syndrome: Alteration of B lymphocytes, T-lymphocyte subsets, and cells with natural killer markers. *American Journal of Medical Genetics*, 7, 213–218. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320370743>
- Cossarizza, B. A., Ortolani, C., Forti, E., Montagnani, G., Paganelli, R., Zannotti, M., ... Franceschi, C. (1991). Age-Related Expansion of Functionally Inefficient Cells With Markers of Natural Killer Activity in Down's Syndrome. *Blood*.
- Crawford, A., Angelosanto, J. M., Kao, C., Doering, T. A., Odorizzi, P. M., Barnett, B. E., & Wherry, E. J. (2014). Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection. *Immunity*, 40(2), 289–302.

- <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.005>
- Crouse, J., Kalinke, U., & Oxenius, A. (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nature Reviews Immunology*, 15(4), 231–242. <https://doi.org/10.1038/nri3806>
- Crow, Y. J. (2011). Type I interferonopathies : a novel set of inborn errors of immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1238, 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06220.x>
- Crow, Y. J., & Manel, N. (2015). Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nature Reviews Immunology*, 15(7), 429–440. <https://doi.org/10.1038/nri3850>
- Cuadrado, E., & Barrena, M. J. (1996). Immune dysfunction in Down's syndrome: Primary immune deficiency or early senescence of the immune system? *Clinical Immunology and Immunopathology*, 78(3), 209–214. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.0031>
- Czesnikiewicz-guzik, M., Lee, W., Cui, D., Hiruma, Y., Lamar, D. L., Yang, Z., ... Goronzy, J. J. (2008). T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clinical Immunology*, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.12.002>
- D'Alise, A. M., Auyeung, V., Feuerer, M., Nishio, J., Fontenot, J., Benoist, C., & Mathis, D. (2008). The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 19857–19862. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810713105>
- Das, A., Hoare, M., Davies, N., Lopes, A. R., Dunn, C., Kennedy, P. T. F., ... Maini, M. K. (2008). Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(9), 2111–2124. <https://doi.org/10.1084/jem.20072076>
- De Hingh, Y. C. M., Van Der Vossen, P. W., Gemen, E. F. A., Mulder, A. B., Hop, W. C. J., Brus, F., & De Vries, E. (2005). Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with Down syndrome. *Journal of Pediatrics*, 147(6), 744–747. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.07.022>
- De Obaldia, M. E., & Bhandoola, A. (2015). Transcriptional Regulation of Innate and Adaptive Lymphocyte Lineages. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 607–642. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112032>
- Decman, V., Laidlaw, B. J., Dimenna, L. J., Mozdzanowska, K., Erikson, J., Ertl, C. J., ... Wherry, E. J. (2015). Cell-Intrinsic Defects in the Proliferative Response of Antiviral Memory CD8 T Cells in Aged Mice upon Secondary Infection. *Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902063>
- Dhamne, C., Chung, Y., Alousi, A. M., Cooper, L. J. N., & Tran, D. Q. (2013). Peripheral and thymic Foxp3+ regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. *Frontiers in Immunology*, 4(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00253>
- Diamond, M. S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G. P., Archambault, J. M., ... Schreiber, R. D. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 1989–2003. <https://doi.org/10.1084/jem.20101158>
- Dikopoulos, N., Bertoletti, A., Kroger, A., Hauser, H., Schirmbeck, R., & Reimann, J. (2005). Type I IFN Negatively Regulates CD8+ T Cell Responses through IL-10-Producing CD4+ T Regulatory 1 Cells. *The Journal of Immunology*, 174(1), 99–109. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.99>

- Doering, T. A., Crawford, A., Angelosanto, J. M., Paley, M. A., Ziegler, C. G., & Wherry, E. J. (2012). Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity*, *37*(6), 1130–1144. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.021>
- Dolfi, D. V., Mansfield, K. D., Polley, A. M., Doyle, S. A., Freeman, G. J., Pircher, H., ... Wherry, E. J. (2013). Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans. *Journal of Leukocyte Biology*, *93*(6), 825–836. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912438>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 330–336. <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., & Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*, *22*(3), 329–341. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.016>
- Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C., ... Zarour, H. M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen – specific CD8 + T cell dysfunction in melanoma patients. *Journal Experimental Medicine*, *207*(10), 2175–2186. <https://doi.org/10.1084/jem.20100637>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., & Santoro, A. (2018). Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4>
- Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., & Gajewski, T. F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8α+ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(10), 2005–2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20101159>
- Gangaplara, A., Martens, C., Dahlstrom, E., Metidji, A., Gokhale, S., Glass, D. D., ... Shevach, E. M. (2018). Type I interferon signaling attenuates regulatory T cell function in viral infection and in the tumor microenvironment. *PLoS Pathogens*, 1–27.
- Ganguly, D. (2018). Do Type I Interferons Link Systemic Autoimmunities and Metabolic Syndrome in a Pathogenetic Continuum? *Trends in Immunology*, *39*(1), 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.001>
- Gao, Y., Tang, J., Chen, W., Li, Q., Nie, J., Lin, F., ... Li, B. (2015). Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(25), E3246–E3254. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421463112>
- Gassen, S. Van, Callebaut, B., Helden, M. J. Van, Lambrecht, B. N., Demeester, P., Dhaene, T., & Saey, Y. (2015). FlowSOM: Using Self-Organizing Maps for Visualization and Interpretation of Cytometry Data, 1–10. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22625>
- Geginat, J., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, *101*(11), 4260–4266. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3577>. Supported
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature*

- Reviews Immunology*, 2(5), 309–322. <https://doi.org/10.1038/nri798>
- Gigante, M., Mandic, M., Wesa, A. K., Cavalcanti, E., Dambrosio, M., Mancini, V., ... Ranieri, E. (2008). Interferon-alpha (IFN- α)-conditioned DC preferentially stimulate type-1 and limit treg-type in vitro T-cell responses from RCC patients. *Journal of Immunotherapy*, 31(3), 254–262. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318167b023>
- Gil, M. P., Ploquin, M. J. Y., Watford, W. T., Lee, S. H., Kim, K., Wang, X., ... Biron, C. A. (2012). Regulating type 1 IFN effects in CD8 T cells during viral infections: Changing STAT4 and STAT1 expression for function. *Blood*, 120(18), 3718–3728. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-428672>
- Gilks, C., Bear, S., Grimes, H., & Tschlis, P. (1993). Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 13(3), 1759.
- Giménez-barcons, M., Casteràs, A., Pilar, M., Porta, E., Correa, P. A., Marín, A., ... Mari, A. (2016). Autoimmune Predisposition in Down Syndrome May Result from a Partial Central Tolerance Failure due to Insufficient Intrathymic Expression of AIRE and Peipheral Antigens. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400223>
- Goodman, W. A., Young, A. B., McCormick, T. S., Cooper, K. D., & Levine, A. D. (2015). Stat3 Phosphorylation Mediates Resistance of Primary Human T Cells to Regulatory T Cell Suppression. *The Journal of Immunology*, 85(0 1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>.The
- Gornalusse, G. G., Mummidi, S., Gaitan, A. A., Jimenez, F., Ramsuran, V., Picton, A., ... Ahuja, S. K. (2015). Epigenetic mechanisms, T-cell activation, and CCR5 genetics interact to regulate T-cell expression of CCR5, the major HIV-1 coreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), E4762–E4771. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423228112>
- Gray, J. I., Westerhof, L. M., & MacLeod, M. K. L. (2018). The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. *Immunology*, 154(4), 574–581. <https://doi.org/10.1111/imm.12929>
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). THE B7 FAMILY REVISITED. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611>
- Guazzarotti, L. (2009). T lymphocyte maturation is impaired in healthy young individuals carrying trisomy 21 (Down syndrome). *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities*. <https://doi.org/10.1352/2009.114>
- Hadaschik, E. N., Wei, X., Leiss, H., Heckmann, B., Niederreiter, B., Steiner, G., ... Stummvoll, G. H. (2015). Regulatory T cell-deficient scurfy mice develop systemic autoimmune features resembling lupus-like disease. *Arthritis Research & Therapy*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0538-0>
- Halle, S., Halle, O., & Förster, R. (2017). Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends in Immunology*, 38(6), 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.002>
- Hartley, D., Blumenthal, T., Carrillo, M., Dipaolo, G., Esralew, L., Gardiner, K., ... Whitten, M. (2014). Down syndrome and Alzheimer ' s disease : Common pathways , common goals. *Alzheimer's & Dementia*, (December), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.007>

- Hasle, H., Friedman, J. M., Olsen, J. H., & Rasmussen, S. A. (2016). Low risk of solid tumors in persons with Down syndrome. *Genetics in Medicine*, *18*(11), 1151–1157. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.23>
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Review Senescence in Health and Disease. *Cell*, *169*(6), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- Heesch, K., Raczkowski, F., Schumacher, V., Hünemörder, S., Panzer, U., & Mittrücker, H. W. (2014). The function of the chemokine receptor CXCR6 in the T cell response of mice against *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097701>
- Henson, S. M., & Akbar, A. N. (2009). KLRG1-more than a marker for T cell senescence. *Age*, *31*(4), 285–291. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9100-9>
- Henson, S. M., Franzese, O., Macaulay, R., Libri, V., Azevedo, R. I., Kiani-alikhan, S., ... Akbar, A. N. (2015). KLRG1 signaling induces defective Akt (ser 473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8 α T cells. *Blood*, *113*(26), 1–3. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199588>.The
- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., & Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical Cancer Research*, *17*(9), 2619–2627. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1114>
- Hoji, A., Connolly, N. C., Buchanan, W. G., & Rinaldo, C. R. (2007). CD27 and CD57 Expression Reveals Atypical Differentiation of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, *14*(1), 74–80. <https://doi.org/10.1128/CI.00250-06>
- Hori, S. (2011). Regulatory T cell plasticity: Beyond the controversies. *Trends in Immunology*, *32*(7), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.004>
- Ibegbu, C. C., Xu, Y.-X., Harris, W., Maggio, D., Miller, J. D., & Kourtis, A. P. (2005). Expression of Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 on Antigen-Specific Human CD8 α T Lymphocytes during Active, Latent, and Resolved Infection and its Relation with CD57. *The Journal of Immunology*, *174*(10), 6088–6094. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6088>
- Ichman, D. O. D. R., Ruener, N. O. G., Ape, G. E. R. D. P., & Aters, A. N. W. (2002). Memory CD8 + T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine*, 379–385.
- Ihantola, E.-L., Viisanen, T., Gazali, A. M., Näntö-Salonen, K., Juutilainen, A., Moilanen, L., ... Kinnunen, T. (2018). Effector T Cell Resistance to Suppression and STAT3 Signaling during the Development of Human Type 1 Diabetes. *The Journal of Immunology*, *ji1701199*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701199>
- lii, W. H. W., Levine, B. L., & Becker, K. G. (2005). Gene expression characteristics of CD28 null memory phenotype CD8 α T cells and its implication in T-cell aging. *Immunological Reviews*, *205*, 190–206.
- Intlekofer, A. M., Takemoto, N., Kao, C., Banerjee, A., Schambach, F., Northrop, J. K., ... Reiner, S. L. (2007). Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8 α T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(9), 2015–2021. <https://doi.org/10.1084/jem.20070841>
- Intlekofer, A. M., Takemoto, N., Wherry, E. J., Longworth, S. A., Northrup, J. T., Palanivel, V. R., ... Reiner, S. L. (2005). Effector and memory CD8 + T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature Immunology*, *6*(12).

<https://doi.org/10.1038/ni1268>

- Ivarsson, S.-A., Ericsson, U.-B., Gustafsson, J., Forslund, M., Vegfors, P., & AnnerCn, G. (1997). The impact of thyroid autoimmunity in children and adolescents with Down syndrome. *Acta Paediatr*, 1065–1067.
- Izumi, Y., Sugiyama, S., Shinozuka, O., Yamazaki, T., Ohyama, T., & Ishikawa, I. (1989). Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *Journal of Periodontology*, 60(5), 238–242. <https://doi.org/10.1902/jop.1989.60.5.238>
- Jakubiuk-tomaszuk, A., Sobaniec, W., Rusak, M., Poskrobko, E., Nedzi, A., Olchowik, B., & Galicka, A. (2015). Decrease of interleukin (IL) 17A gene expression in leucocytes and in the amount of IL-17A protein in CD4 + T cells in children with Down Syndrome. *Pharmacological Reports*, 67, 1130–1134. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.04.008>
- Jochanan, S. T., Ch, D., Altman, M., Handzel, Z., Czernobilsky, B., & Studies, S. (1979). Thymic Deficiency in Down's Syndrome. *Pediatrics*, 63(1).
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Joshi, A. Y., Abraham, R. S., Snyder, M. R., & Boyce, T. G. (2011). Immune evaluation and vaccine responses in Down syndrome: Evidence of immunodeficiency? *Vaccine*, 29(31), 5040–5046. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.060>
- Joshi, N. S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H. K., Urso, D. R., Hagman, J., ... Kaech, S. M. (2007). Article Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8 + T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity*, (August), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.010>
- Joshi, N. S., Cui, W., Dominguez, C. X., Chen, J. H., Hand, T. W., & Kaech, S. M. (2011). Increased Numbers of Preexisting Memory CD8 T Cells and Decreased T-bet Expression Can Restrain Terminal Differentiation of Secondary Effector and Memory CD8 T Cells. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002145>
- Joshi, S., Kaur, S., Kroczyńska, B., & Plataniias, L. C. (2010). Mechanisms of mRNA translation of interferon stimulated genes. *Cytokine*, 52(1–2), 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.03.019>
- Kaech, S. M., & Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 12(11), 749–761. <https://doi.org/10.1038/nri3307>
- Kanangat, S., Blair, P., Reddy, R., Deheshia, M., Godfrey, V., Rouse, B. T., & Wilkinson, E. (1996). Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *European Journal of Immunology*, 26(1), 161–165. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260125>
- Kaur, S., Sassano, A., Dolniak, B., Joshi, S., Majchrzak-Kita, B., Baker, D. P., ... Plataniias, L. C. (2008). Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4808–4813. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710907105>
- Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J. A., Sinclair, A. J., ... Moss, P. A. H. (2002). Cytomegalovirus Seropositivity Drives the CD8 T Cell Repertoire Toward Greater Clonality in Healthy Elderly Individuals. *The Journal of Immunology*,

- 169(4), 1984–1992. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.4.1984>
- Kim, D., Perteza, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). Comment on “ TopHat2 : accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions , deletions and gene fusions ” by Kim et al . Comment on “ TopHat2 : accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions , deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 0–9. <https://doi.org/10.1101/000851>
- Kim, J. M., Rasmussen, J. P., & Rudensky, A. Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature Immunology*, 8(2), 191–197. <https://doi.org/10.1038/ni1428>
- Kinik, S. T., Özçay, F., & Varan, B. (2006). Type I diabetes mellitus , Hashimoto ’ s thyroiditis and celiac disease in an adolescent with Down syndrome. *Pediatrics International*, 433–435. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2006.02238.x>
- Kis-Toth, K., Comte, D., Karampetsou, M. P., Kytтарыs, V. C., Kannan, L., Terhorst, C., & Tsokos, G. C. (2017). The selective loss of SLAMF4+ CD8+ T cells contributes to the decreased cytotoxic cell activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*, 68(1), 164–173. <https://doi.org/10.1002/art.39410>.The
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don’t see). *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 377–391. <https://doi.org/10.1038/nri3667>
- Kmieciak, M., Gowda, M., Graham, L., Godder, K., Bear, H. D., Marincola, F. M., & Manjili, M. H. (2009). Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *Journal of Translational Medicine*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-89>
- Kobbe, C. Von. (2018). Cellular senescence : a view throughout organismal life. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2879-8>
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature Immunology*, 10(6), 595–602. <https://doi.org/10.1038/ni.1731>
- König, N., Fiehn, C., Wolf, C., Schuster, M., Costa, E. C., Tüngler, V., ... Lee-kirsch, M. A. (2017). Familial chilblain lupus due to a gain-of-function mutation in STING. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 468–472. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209841>
- Krämer, A., Green, J., Pollard, J., & Tugendreich, S. (2014). Causal Analysis Approaches in Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Supplementary Material). *Bioinformatics*.
- Krieg, C., Han, P., Stone, R., Goularte, O. D., & Kaye, J. (2005). Functional Analysis of B and T Lymphocyte Attenuator Engagement on CD4+ and CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6420–6427. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6420>
- Kurche, J. S., Haluszczak, C., McWilliams, J. A., Sanchez, P. J., & Kedl, R. M. (2012). Type I IFN-Dependent T Cell Activation Is Mediated by IFN-Dependent Dendritic Cell OX40 Ligand Expression and Is Independent of T Cell IFNR Expression. *The Journal of Immunology*, 188(2), 585–593. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102550>
- Kusters, M. A. A., Verstegen, R. H. J., Gemen, E. F. A., & De Vries, E. (2009). Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: A review. *Clinical*

- and Experimental Immunology*, 156(2), 189–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03890.x>
- Lanna, A., Coutavas, E., Seidel, J., Akbar, A. N., Rustin, M. H. A., Levati, L., ... Henson, S. M. (2013). IFN- α Inhibits Telomerase in Human CD8+ T Cells by Both hTERT Downregulation and Induction of p38 MAPK Signaling. *The Journal of Immunology*, 191(7), 3744–3752. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301409>
- Larocca, L. M., Lauriola, L., Ranelletti, F., Piantelli, M., Maggiano, N., Ricci, R., ... Cuore, S. (1990). Morphological and Immunohistochemical Study of Down Syndrome Thymus. *American Journal of Medical Genetics Supplement*, 230, 225–230.
- Larocca, L. M., Piantelli, M., Valitutti, S., Castellino, F., Maggiano, N., & Musiani, P. (1988). Alterations in Thymocyte Subpopulations in Down ' s Syndrome. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 186, 175–186.
- Latta, M., Mohan, K., & Issekutz, T. B. (2007). CXCR6 is expressed on T cells in both T helper type 1 (Th1) inflammation and allergen-induced Th2 lung inflammation but is only a weak mediator of chemotaxis. *Immunology*, 121(4), 555–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02603.x>
- Lausch, E., Janecke, A., Bros, M., Trojandt, S., Alanay, Y., Laet, C. De, ... Superti-furga, A. (2011). Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia , cerebral calcifications and autoimmunity. *Nature Genetics*, 43(2). <https://doi.org/10.1038/ng.749>
- Lavigne, J., Sharr, C., Elsharkawi, I., Davidson, E., Florez, J. C., Berrier, K., ... Skotko, B. G. (2017). Thyroid dysfunction in patients with Down syndrome : Results from a multi-institutional registry study. *Acta Paediatr*, (February), 1–7. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38219>
- Lawson, J. M., Tremble, J., Dayan, C., Beyan, H., Leslie, R. D. G., Peakman, M., & Tree, T. I. M. (2008). Increased resistance to CD4+ CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*, 154(3), 353–359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03810.x>
- Lee-kirsch, M. A. (2017). The Type I Interferonopathies. *Annual Review of Medicine*, (October 2016), 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-104506>
- Lee-kirsch, M. A., Gong, M., Schulz, H., Ru, F., Stein, A., Pfeiffer, C., ... Linne, M. (2006). Familial Chilblain Lupus , a Monogenic Form of Cutaneous Lupus Erythematosus , Maps to Chromosome 3p. *The American Journal of Human Genetics*, 79(October), 731–737.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, X., & von Boehmer, H. (2011). Notch Signaling in T-Cell Development and T-ALL. *ISRN Hematology*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.5402/2011/921706>
- Lili, Y., Yi, W., Ji, Y., Yue, S., Weimin, S., & Ming, L. (2012). Global activation of CD8+cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized Vitiligo. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037513>
- Ling, K. H., Hewitt, C. A., Tan, K. L., Cheah, P. S., Vidyadaran, S., Lai, M. I., ... Scott, H. S. (2014). Functional transcriptome analysis of the postnatal brain of the Ts1Cje mouse model for Down syndrome reveals global disruption of interferon-related molecular networks. *BMC Genomics*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471->

2164-15-624

- Livingstone, M., Sikström, K., Robert, P. A., Uzé, G., Larsson, O., & Pellegrini, S. P. (2015). Assessment of mTOR-Dependent translational regulation of interferon stimulated genes. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133482>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- MacDonald, K. G., Han, J. M., Himmel, M. E., Huang, Q., Kan, B., Campbell, A. I. M., ... Levings, M. K. (2013). Helios+ and Helios- Cells Coexist within the Natural FOXP3+ T Regulatory Cell Subset in Humans. *The Journal of Immunology*, *190*(9), 4440–4441. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1390019>
- Madan, V., Williams, J., & Lear, J. T. (2006). Dermatological manifestations of Down ' s syndrome. *Clinical Dermatology*, 623–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2006.02164.x>
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M., & Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European Journal of Immunology*, *43*(11), 2797–2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>
- Marild, K., Stephansson, O., Grahnquist, L., Cnattingius, S., Soderman, G., & Ludvigsson, J. F. (2013). Down Syndrome Is Associated with Elevated Risk of Celiac Disease : A Nationwide Case-Control Study. *The Journal of Pediatrics*. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.12.087>
- Masopust, D., & Schenkel, J. M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, *13*(5), 309–320. <https://doi.org/10.1038/nri3442>
- Mcelhaney, J. E., & Effros, R. B. (2009). Immunosenescence : what does it mean to health outcomes in older adults ? *Current Opinion in Immunology*, 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.023>
- Mckinney, E. F., Lee, J. C., Jayne, D. R. W., Lyons, P. A., & Smith, K. G. C. (2015). T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature14468>
- McLane, L. M., Banerjee, P. P., Cosma, G. L., Makedonas, G., Wherry, E. J., Orange, J. S., & Betts, M. R. (2013). Differential Localization of T-bet and Eomes in CD8 T Cell Memory Populations. *The Journal of Immunology*, *190*(7), 3207–3215. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201556>
- Mcmurphy, A. N., & Levings, M. K. (2012). Suppression assays with human T regulatory cells: A technical guide. *European Journal of Immunology*, *42*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1002/eji.201141651>
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, *15*(2), 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- Mercadante, E. R., & Lorenz, U. M. (2016). Breaking free of control: How conventional T cells overcome regulatory T cell suppression. *Frontiers in Immunology*, *7*(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00193>
- Miossec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*. <https://doi.org/10.1038/nrd3794>

- Miyara, M., & Sakaguchi, S. (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in Molecular Medicine*, 13(3). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.01.003>
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., ... Gorocho, G. (2009). Resource Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4 + T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*, 899–911. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019>
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., ... Sakaguchi, S. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*, 30(6), 899–911. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019>
- Montagna, D., Maccario, R., Ugazio, A. G., Nespoli, L., Pedroni, E., Faggiano, P., & Burgio, G. R. (1988). Cell-mediated cytotoxicity in down syndrome: impairment of allogeneic mixed lymphocyte reaction, NK and NK-like activities. *European Journal of Pediatrics*, 148(1), 53–57. <https://doi.org/10.1007/BF00441815>
- Morikawa, H., & Sakaguchi, S. (2014). Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: From a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological Reviews*, 259(1), 192–205. <https://doi.org/10.1111/imr.12174>
- Mukherjee, S., Schaller, M. A., Neupane, R., Kunkel, S. L., & Lukacs, N. W. (2009). Regulation of T Cell Activation by Notch Ligand, DLL4, Promotes IL-17 Production and Rorc Activation. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7381–7388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804322>
- Murooka, T. T., Rahbar, R., Plataniias, L. C., & Fish, E. N. (2010). translation through mTOR / 4E-BP1 CCL5-mediated T-cell chemotaxis involves the initiation of mRNA translation through mTOR / 4E-BP1, 111(10), 4892–4901. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-125039>
- Murphy, M., & Epstein, L. B. (1992). Down syndrome (DS) peripheral blood contains phenotypically mature CD3+TCR α , β +cells but abnormal proportions of TCR α , β +, TCR γ , δ +, and CD4+CD45RA+cells: Evidence for an inefficient release of mature T cells by the DS thymus. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 62(2), 245–251. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(92\)90079-4](https://doi.org/10.1016/0090-1229(92)90079-4)
- Murphy, M., Friend, D., Pike-Nobile, L., & Epstein, L. (1992). Tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma expression in human thymus. Localization and overexpression in Down syndrome (trisomy 21). *Journal of Immunology*, 149(7).
- Murphy, M., Lempert, M. J., & Epstein, L. B. (1990). Decreased Level of T Cell Receptor Expression by Down Syndrome (Wisomy 21) Thymocytes. *American Journal of Medical Genetics Supplement*, 237, 6–9.
- Newby, B. N., Brusko, T. M., Zou2, B., Atkinson, M. A., Clare-Salzler, M., & Mathews, C. E. (2017). Type 1 Interferons Potentiate Human CD8+ T Cell Cytotoxicity Through a STAT4 and Granzyme B Dependent Pathway. *Diabetes*, (352), 1–43.
- Nocera, D. A., Roselli, E., Araya, P., Nuñez, N. G., Weiss, S., Jablonska, J., ... Maccioni, M. (2016). In Vivo Visualizing the IFN- β Response Required for Tumor Growth Control in a Therapeutic Model of Polyadenylic-Polyuridylic Acid Administration. *The Journal of Immunology*, 196(6), 2860–2869. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501044>
- Nowicka, M., Krieg, C., Hartmann, F. J., Robinson, M. D., Weber, L. M., Guglietta, S., ...

- Cancer, F. H. (2018). CyTOF workflow : Differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status :, 1–59. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11622.1>
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., ... Dong, C. (2008). Article Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1 , 2 , or 17 Cell Lineages. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.009>
- Nurmi, T., Huttunen, K., Lassila, O., Henttonen, M., Sakkinen, A., Liisa Linna, S., & Anja, T. (1982). Natural killer cell function in trisomy-21 (Down ' s syndrome). *Clinical and Experimental Immunology*, 21, 735–741.
- Nurmi, T., Leinonen, M., Haiva, V. M., Tiilikainen, A., & Kouvalainen, K. (1982). Antibody response to pneumococcal vaccine in patients with trisomy-21 (Down's syndrome). *Clin Exp Immunol*, 48(2), 485–490.
- Ortega, C., Ferna, S., Romero, P., Molina, I. J., Moreno, J., & Santamarí, M. (2009). IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(August), 435–443. <https://doi.org/10.1189/jlb.0109046>
- Pace, L., Vitale, S., Dettori, B., Palombi, C., La Sorsa, V., Belardelli, F., ... Doria, G. (2010). APC Activation by IFN- Decreases Regulatory T Cell and Enhances Th Cell Functions. *The Journal of Immunology*, 184(11), 5969–5979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900526>
- Pacella, I., Timperi, E., Accapezzato, D., Martire, C., Labbadia, G., Cavallari, E. N., ... Piconese, S. (2016). IFN- α promotes rapid human Treg contraction and late Th1-like Treg decrease. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(3), 613–623. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A0415-140R>
- Paley, M. A. (2012). Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science*, 1220. <https://doi.org/10.1126/science.1229620>
- Parker, B. S., Rautela, J., & Hertzog, P. J. (2016). Antitumour actions of interferons: Implications for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(3), 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.14>
- Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in Immunology*, 36(4), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>
- Pawaria, S., Ramani, K., Maers, K., Liu, Y., Kane, L. P., Levesque, M. C., & Biswas, P. S. (2019). Complement Component C5a Permits the Coexistence of Pathogenic Th17 Cells and Type I IFN in Lupus. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401322>
- Pearce, E. L., Martins, A., Krawczyk, C. M., Hutchins, A. S., Zediak, V. P., Mao, C., ... Reiner, S. L. (2014). Control of Effector CD8+ T Cell Factor Eomesodermin. *Science*, 1041(2003). <https://doi.org/10.1126/science.1090148>
- Pellegrini, F. P., Marinoni, M., Frangione, V., Tedeschi, A., Gandini, V., Ciglia, F., ... Nespoli, L. (2012). Down syndrome, autoimmunity and T regulatory cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 169(3), 238–243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04610.x>
- Petrelli, A., Mokry, M., Wijk, F. Van, Petrelli, A., Mijnheer, G., Konijnenburg, D. P. H. Van, ... Giovannone, B. (2018). PD-1 + CD8 + T cells are clonally expanding effectors in

- human chronic inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(10), 4669–4681. <https://doi.org/10.1172/JCI96107>
- Petrovas, C., Casazza, J. P., Brenchley, J. M., Price, D. A., Gostick, E., Adams, W. C., ... Koup, R. A. (2006). PD-1 is a regulator of virus-specific CD8 + T cell survival in HIV infection. *Journal Experimental Medicine*, 203(10), 2281–2292. <https://doi.org/10.1084/jem.20061496>
- Pinkse, G. G. M., Tysma, O. H. M., Bergen, C. A. M., Kester, M. G. D., Ossendorp, F., Veelen, P. A. Van, ... Roep, B. O. (2005). Autoreactive CD8 T cells associated with β cell destruction in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), 18425–18430.
- Pipkin, M. E., Sacks, J. A., Cruz-guilloty, F., Lichtenheld, M. G., Bevan, M. J., & Rao, A. (2010). Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity*, 32(1), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.012>
- Prelog, M., Keller, M., Geiger, R., Brandstätter, A., Würzner, R., Schweigmann, U., ... Grubeck-loebenstein, B. (2009). Thymectomy in early childhood : Significant T cell compartment in later life. *Clinical Immunology*, 130(2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.023>
- Ram, G., & Chinen, J. (2011). Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, 164(1), 9–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04335.x>
- Roat, E., Prada, N., Lugli, E., Nasi, M., Ferraresi, R., Troiano, L., ... Cossarizza, A. (2008). Homeostatic cytokines and expansion of regulatory T cells accompany thymic impairment in children with Down syndrome. *Rejuvenation Research*, 11(3), 573–83. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0648>
- Roederer, M., Nozzi, J. L., & Nason, M. C. (2010). SPICE : Exploration and Analysis of Post-Cytometric Complex Multivariate Datasets. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21015>
- Roselli, E., Araya, P., Núñez, N., Gatti, G., Graziano, F., Sedlik, C., ... Maccioni, M. (2019). TLR3 Activation of Intratumoral CD103+ Dendritic Cells Modifies the Tumor Infiltrate Conferring Anti-Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*.
- Rostami, M. N., Douraghi, M., Mohammadi, A. M., & Nikmanesh, B. (2012). Altered serum pro-inflammatory cytokines in children with Down's syndrome. *European Cytokine Network*, 23(2), 64–67. <https://doi.org/10.1684/ecn.2012.0307>
- Rudensky, a Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev*, 241(1), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x>
- Rutishauser, R. L., & Kaech, S. M. (2010). Generating diversity: Transcriptional regulation of effector and memory CD8+T-cell differentiation. *Immunological Reviews*, 235(1), 219–233. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00901.x>
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
- Samarajiwa, S. A., Forster, S., Auchetl, K., & Hertzog, P. J. (2009). INTERFEROME: The database of interferon regulated genes. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 852–857. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn732>
- Sanchez-Guajardo, V., Tanchot, C., O'Malley, J. T., Kaplan, M. H., Garcia, S., & Freitas,

- A. A. (2007). Agonist-driven development of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells requires a second signal mediated by Stat6. *The Journal of Immunology*, 178(12), 7550–7556. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.10.011> [pii]
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J. C., ... Farber, D. L. (2013). Resource Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. *Immunity*, 38(1), 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.020>
- Sato, T., Thorlacius, H., Johnston, B., Staton, T. L., Xiang, W., Littman, D. R., & Butcher, E. C. (2005). Role for CXCR6 in Recruitment of Activated CD8+ Lymphocytes to Inflamed Liver. *The Journal of Immunology*, 174(1), 277–283. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.277>
- Sauce, D., Sidi, D., Appay, V., Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., ... Appay, V. (2009). Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood Find the latest version : Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(10), 3070–3078. <https://doi.org/10.1172/JCI39269.3070>
- Schepis, C., Barone, C., Siragusa, M., Pettinato, R., & Romano, C. (2002). An Updated Survey on Skin Conditions in Down Syndrome. *Clinical and Laboratory Investigation*, 234–238. <https://doi.org/10.1159/000065859>
- Schneider, A., Rieck, M., Sanda, S., Pihoker, C., Greenbaum, C., & Buckner, J. H. (2008). The Effector T Cells of Diabetic Subjects Are Resistant to Regulation via CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 181(10), 7350–7355. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7350>
- Schoch, J., Rohrer, T. R., Kaestner, M., Abdul-Khaliq, H., Gortner, L., Sester, U., ... Schmidt, T. (2017). Quantitative, Phenotypical, and Functional Characterization of Cellular Immunity in Children and Adolescents with Down Syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 215(10), 1619–1628. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix168>
- Schwartz, D. M., Kanno, Y., Villarino, A., Ward, M., Gadina, M., & O'Shea, J. J. (2017). JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12), 843–862. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.201>
- Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., & Berezkin, G. V. (2015). Theories of Aging : An Ever-Evolving Field. *Acta Naturae*, 7(24), 9–18.
- Serrano-villar, S., Sainz, T., Lee, S. A., Hunt, P. W., Sinclair, E., Shacklett, B. L., ... Deeks, S. G. (2014). HIV-Infected Individuals with Low CD4 / CD8 Ratio despite Effective Antiretroviral Therapy Exhibit Altered T Cell Subsets , Heightened CD8 + T Cell Activation , and Increased Risk of Non-AIDS Morbidity and Mortality. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004078>
- Shevach, E. M. (2009). Review Mechanisms of Foxp3 + T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity*, 30(5), 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>
- Shin, H., Blackburn, S. D., Blattman, J. N., & Wherry, E. J. (2007). Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *Journal Experimental Medicine*, 204(4), 941–949. <https://doi.org/10.1084/jem.20061937>
- Snell, L. M., & Brooks, D. G. (2015). ScienceDirect New insights into type I interferon and the immunopathogenesis of persistent viral infections. *Current Opinion in*

- Immunology*, 34, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.03.002>
- Stewart, C., Metheny, H., Iida, N., Smith, L., Hanson, M., Steinhagen, F., ... Trinchieri, G. (2013). Interferon-dependent IL-10 production by Tregs limits tumor Th17 inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI65180>. Squibb
- Suarez-Ramirez, J. E., Tarrío, M. L., Kim, K., Demers, D. A., & Biron, C. A. (2014). CD8 T cells in innate immune responses: Using STAT4-Dependent but antigen-independent pathways to gamma interferon during viral infection. *MBio*, 5(5), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01978-14>
- Sullivan, K. D., Evans, D., Pandey, A., Hraha, T. H., Smith, K. P., Markham, N., ... Blumenthal, T. (2017). Trisomy 21 causes changes in the circulating proteome indicative of chronic autoinflammation. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13858-3>
- Sullivan, K. D., Lewis, H. C., Hill, A. A., Pandey, A., Jackson, L. P., Cabral, J. M., ... Espinosa, J. M. (2016a). Trisomy 21 consistently activates the interferon response. *ELife*, 5(JULY), 3–5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16220>
- Sullivan, K. D., Lewis, H. C., Hill, A. A., Pandey, A., Jackson, L. P., Cabral, J. M., ... Espinosa, J. M. (2016b). Trisomy 21 consistently activates the interferon response. *ELife*, 5(JULY). <https://doi.org/10.7554/eLife.16220>
- Szodoray, P., Alex, P., Brun, J. G., Centola, M., & Jonsson, R. (2004). Circulating cytokines in primary Sjögren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59(6), 592–599. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01432.x>
- Tabarkiewicz, J., Pogoda, K., & Karczmarczyk, A. (2015). The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(6), 435–449. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0344-z>
- Takanohashi, A., Prust, M., Wang, J., Gordish-Dressman, H., Bloom, M., Rice, G. I., ... Vanderver, A. (2013). Elevation of proinflammatory cytokines in patients with Aicardi-Goutieres syndrome. *Neurology*, 80(11), 997–1002. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182872694>;
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2016). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Nature Publishing Group*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>
- Thome, J. J. C., Yudanin, N., Ohmura, Y., Kubota, M., Grinshpun, B., Sathaliyawala, T., ... Farber, D. L. (2014). Spatial map of human t cell compartmentalization and maintenance over decades of life. *Cell*, 159(4), 814–828. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.026>
- Tran, D. Q., Ramsey, H., & Shevach, E. M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naïve human CD4 + FOXP3 – T cells by T cell receptor stimulation is TGFβ-dependent but does not confer a regulatory phenotype Running title: TGFβ-dependent induction of FOXP3 in human T cells, 110(8), 2983–2991. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094656>
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., ... Sekaly, R. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8 + T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine*, 12(10), 1198–1202. <https://doi.org/10.1038/nm1482>
- Troca-Marín, J. A., Casañas, J. J., Benito, I., & Montesinos, M. L. (2014). The Akt-mTOR pathway in Down's syndrome: the potential use of rapamycin/rapalogs for treating

- cognitive deficits. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 13(1), 34–40. <https://doi.org/10.2174/18715273113126660184>
- Tu, W., & Rao, S. (2016). Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence : Aging and Cytomegalovirus Infection. *Frontiers in Microbiology*, 7(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02111>
- Ugazio, a G., Maccario, R., Notarangelo, L. D., & Burgio, G. R. (1990). Immunology of Down syndrome: a review. *American Journal of Medical Genetics. Supplement*, 7, 204–12. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320370742>
- Urban, S. L., Berg, L. J., & Welsh, R. M. (2016). Type 1 interferon licenses naïve CD8 T cells to mediate anti-viral cytotoxicity. *Virology*, 493, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.005>
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G., ... Emilia, R. (2006). PD-1 Expression in Acute Hepatitis C Virus (HCV) Infection Is Associated with HCV-Specific CD8 Exhaustion. *Journal of Virology*, 80(22), 11398–11403. <https://doi.org/10.1128/JVI.01177-06>
- Venigalla, R. K. C., Tretter, T., Krienke, S., Max, R., Eckstein, V., Blank, N., ... Lorenz, H. M. (2008). Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127-/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 58(7), 2120–2130. <https://doi.org/10.1002/art.23556>
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(july). <https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Vogelzang, A., Mcguire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R., & King, C. (2010). Article A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity*, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.001>
- Waite, J. C., & Skokos, D. (2012). Th17 Response and Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Inflammation*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/819467>
- Walford, R. L. (1963). The Immunologic Theory of Aging. *The Gerontologist*, 1962–1964.
- Wang, C., Singer, M., & Anderson, A. C. (2017). Molecular Dissection of CD8+T-Cell Dysfunction. *Trends in Immunology*, 38(8), 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.008>
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I. H., Huizinga, T. W. J., & Toes, R. E. M. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+T cells. *European Journal of Immunology*, 37(1), 129–138. <https://doi.org/10.1002/eji.200636435>
- Wang, L., Wang, S., & Li, W. (2012). BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE Sequence analysis RSeQC : quality control of RNA-seq experiments, 28(16), 2184–2185. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts356>
- Wang, Y., Swiecki, M., Cella, M., Alber, G., Schreiber, R. D., Gilfillan, S., & Colonna, M. (2012). Timing and Magnitude of Type I Interferon Responses by Distinct Sensors Impact CD8 T Cell Exhaustion and Chronic Viral Infection. *Cell Host and Microbe*, 11(6), 631–642. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.003>
- Waugh, K. A., Pandey, A., Jordan, K., Khanal, S., Butcher, E., Araya, P., ... Espinosa, J. M. (n.d.). Single-cell mass-cytometry reveals global immune remodeling with multi-lineage hypersensitivity to Type I Interferon in Down syndrome. *Journal of*

Clinical Investigation.

- Webster, B., Assil, S., & Dreux, M. (2016). Cell-cell sensing of viral infection by pDCs. *Journal of Virology*, (September). <https://doi.org/10.1128/JVI.01692-16>
- Weerd, N. A. De, & Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors — distribution and regulation. *Immunology and Cell Biology*, 90(5), 483–491. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.9>
- Wehrens, E. J., Mijnheer, G., Duurland, C. L., Klein, M., Meerding, J., Van Loosdregt, J., ... Van Wijk, F. (2011). Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood*, 118(13), 3538–3548. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-328187>
- Weyand, C. M., & Goronzy, J. (2016). Aging of the Immune System Mechanisms and Therapeutic Targets. *Annals of the American Thoracic Society*, 13(December). <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201602-095AW>
- Wherry, E. J., Barber, D. L., Kaech, S. M., Blattman, J. N., & Ahmed, R. (2004). Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-krishna, K., Most, R. Van Der, & Ahmed, R. (2003). Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 77(8), 4911–4927. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4911>
- Wherry, E. J., Ha, S., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., & Kalia, V. (2007). Correction Molecular Signature of CD8 + T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity*, 006(October), 2007. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.006>
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 486–499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- Wills, M. R., Okecha, G., Weekes, M. P., Gandhi, M. K., Sissons, P. J. G., & Carmichael, A. J. (2002). Identification of Naive or Antigen-Experienced Human CD8+ T Cells by Expression of Costimulation and Chemokine Receptors: Analysis of the Human Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cell Response. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5455–5464. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5455>
- Wu, X., Zhang, H., Xing, Q., Cui, J., Li, J., Li, Y., ... Wang, S. (2014). PD-1(+) CD8(+) T cells are exhausted in tumours and functional in draining lymph nodes of colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 111(7), 1391–1399. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.416>
- Xing, L., Dai, Z., Jabbari, A., Cerise, J. E., Higgins, C. A., Gong, W., ... Clynes, R. (2014). Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nature Medicine*, (August), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nm.3645>
- Xu, W., & Larbi, A. (2017). Markers of T Cell Senescence in Humans, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18081742>
- Yang, J., Sundrud, M. S., Skepner, J., & Yamagata, T. (2014). Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.07.006>
- Yi, J. S., Cox, M. A., & Zajac, A. J. (2010). T-cell exhaustion : characteristics , causes and conversion. *Immunology*, 2, 474–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x>

- Zeng, H., Yang, K., Cloer, C., Neale, G., Vogel, P., & Chi, H. (2013). mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish Treg-cell function. *Nature*, *499*(7459), 485–490. <https://doi.org/10.1038/nature12297>
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, *35*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zhang, Y., Che, M., Yuan, J., Yu, Y., Cao, C., Qin, X.-Y., & Cheng, Y. (2017). Aberrations in circulating inflammatory cytokine levels in patients with Down syndrome: a meta-analysis. *Oncotarget*, *8*(48), 84489–84496. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21060>
- Zhou, L., Chong, M. M. W., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, *30*(5), 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells : fates , functions , and faults. *Blood*, *112*(5), 1557–1570. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>.BLOOD
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
- Zúñiga-Pflücker, J. C. (2004). T-cell development made simple. *Nature Reviews. Immunology*, *4*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1038/nri1257>

CAPÍTULO 7: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

2019 En revisión. Trisomy 21 disrupts the peripheral T cell compartment toward a state associated with autoimmunity and chronic inflammation.

Autores: Araya P, Waugh K, Sullivan K, Nuñez N, Roselli E, Smith K, Granrath RE, Rachubinski AL, Butcher ET, Minter R, Tuttle KD, Bruno TC, Maccioni M y Espinosa JM.

En revisión. TLR3 Activation of Intratumoral CD103+ Dendritic Cells Modifies the Tumor Infiltrate Conferring Anti-Tumor Immunity

Autores: Roselli E, Araya P, Núñez N, Gatti G, Graziano F, Sedlik C, Benaroch P, Piaggio E, and Maccioni M.

2017. Downregulation of adaptor protein MyD88 compromises the angiogenic potential of B16 murine melanoma.

Autores: Trucco L, Roselli E, Araya P, Nuñez NG, Mena HA, Bocco JL, Negrotto S and Maccioni M.

Revista: PLoS ONE 2017 Jun 29:

2015. In Vivo Visualizing the IFN- β Response Required for Tumor Growth Control in a Therapeutic Model of Polyadenylic-Polyuridylic Acid Administration.

Autores: Nocera DA, Roselli E, Araya P, Nuñez NG, Lienenklaus S, Jablonska J, Weiss S, Gatti G, Brinkmann MM, Kröger A, Morón G, Maccioni M

Revista: J Immunol. 2016 Mar 15; 196(6):2860-9

PRESENTACIONES A CONGRESOS

2018. LXVI ANNUAL MEETING OF THE ARGENTINE SOCIETY OF IMMUNOLOGY (SAI), MAR DEL PLATA, ARGENTINA.

- TRISOMY 21 DISRUPTS T CELL HOMEOSTASIS WITH IMPAIRED TREG SUPPRESSION AND ENHANCED CYTOTOXICITY. Authors: Paula Araya, Emiliano Roselli, Nicolas G. Nuñez, Katherine Waugh, Kathryn Tuttle, Eric Butcher, Keith Smith, Kelly Sullivan, Joaquin Espinosa and Mariana Maccioni.

2017. REUNION CONJUNTA DE SOCIEDADES DE BIOCENCIA. LXV ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA, CAPITAL FEDERAL-BUENOS AIRES, ARGENTINA.

-REGULATORY T CELLS DYSFUNCTION IN INDIVIDUALS WITH TRISOMY 21.
Autores: Paula Araya, Emiliano Roselli, Nicolas G. Nuñez, Katherine Waugh, Keith Smith, Joaquin Espinosa and Mariana Maccioni.

-TRISOMY 21 CAUSES GLOBAL CHANGES IN GENE EXPRESSION IN REGULATORY T CELLS. Autores: **Paula Araya**, Katherine Waugh, Emiliano Roselli, Nicolas G. Nuñez, Kelly D. Sullivan, Ahwan Pandey, Keith Smith, Mariana Maccioni and Joaquin M. Espinosa.

-CHARACTERIZATION OF THE NEWLY DEVELOPED TLR3-GFP MICE: NOVEL REPORTER MICE FOR STUDYING THE EXPRESSION OF TLR3. Autores: Emiliano Roselli, **Paula Araya**, Nicolas Gonzalo Nuñez, Cinthia Stempin, Jovan Nokolic, Philippe Benaroch, Eliane Piaggio, Mariana Maccioni.

-IMMUNOTHERAPY BASED ON THE TLR3 LIGAND POLY A:U MODIFIES THE TUMOUR-ASSOCIATED MYELOID COMPARTMENT UPREGULATING PDL1 SPECIFICALLY ON MHCII- MONOCYTES ON A TYPE I IFN-DEPENDANT MANNER. Autores: Emiliano Roselli, **Paula Araya**, Nicolas Gonzalo Nuñez, Cinthia Stempin, Jovan Nokolic, Philippe Benaroch, Eliane Piaggio, Mariana Maccioni.

2ND INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE T21RS JUNE 7-11, 2017 / CHICAGO, ILLINOIS, USA.

-EXTENSIVE PERTURBATION OF THE IMMUNE SYSTEM AMONG INDIVIDUALS WITH TRISOMY 21. Autores: Katherine A Waugh, Ahwan Pandey, Tiana A DiMasi, Keith Smith, Dmitry Baturin, Angela L Rachubinski, Juana Marmolejo, Kelly D Sullivan, Eric Butcher, **Paula Araya**, Mariana Maccioni, Christogher C Porter, Elena W Hsieh and Joaquin M Espinosa.

2016. SIMPOSIO INTERNACIONAL PROGRAMA RAICES RED DE CIENTÍFICOS ARGENTNOS EN EL NORESTE DE EE.UU. "GANANDO LA GUERRA CONTRA EL CÁNCER".

-CHARACTERIZATION OF THE *IFO* MICE (TREG^{IFNAR-/-FOXP3GFP/GFP}): AN INVALUABLE TOOL FOR STUDYING THE EFFECT OF TYPE I IFN (IFN-I) ON TREG BIOLOGY

Autores: **P. Araya**, E. Roselli, D. A. Nocera, N. G. Nuñez, L. Trucco, M. Maccioni.

-TLR3 LIGAND POLY A:U MODIFIES THE COMPOSITION OF THE TUMOUR-INFILTRATING MYELOID COMPARTMENT TOWARDS AN ANTI-TUMOUR PHENOTYPE

Authors: **E. Roselli**, P. Araya, D.A.Nocera, N.G. Nuñez, L. Trucco, M. Maccioni.

2015. LXIII ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA, CAPITAL FEDERAL-BUENOS AIRES, ARGENTINA.

-CHARACTERIZATION OF THE *IFO* MICE (TREG^{IFNAR-/-FOXP3GFP/GFP}): AN INVALUABLE TOOL FOR STUDYING THE EFFECT OF TYPE I IFN (IFN-I) ON TREG BIOLOGY

Autores: **P. Araya**, E. Roselli, D. A. Nocera, N. G. Nuñez, L. Trucco, M. Maccioni.

-TLR3 LIGAND POLY A:U MODIFIES THE COMPOSITION OF THE TUMOUR-INFILTRATING MYELOID COMPARTMENT TOWARDS AN ANTI-TUMOUR PHENOTYPE

Autores: **E. Roselli**, P. Araya, D.A.Nocera, N.G. Nuñez, L. Trucco, M. Maccioni.

-CELL-INTRINSIC ROLE OF MYD88 ADAPTOR PROTEIN IN MURINE MELANOMA CELLS

Authors: L. Trucco; E. Roselli; P. Araya; Maccioni, Mariana.

2014. LXII ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA, MAR DEL PLATA, BUENOS AIRES, ARGENTINA.

-Type I IFNs signals on host cells modify the pattern of Treg infiltration in B16 melanoma tumors.

Authors: **P. Araya**, D. A. Nocera, E. Roselli, G. Gatti, N. G. Nuñez, M. Maccioni.

-Doxorubicin-treated cancer cells release HMGB1 when dying that can modify the expression of angiogenic factors in a MyD88 dependant and independent way.

Autores E. Roselli, **P. Araya**, D.A.Nocera, G.Gatti, N.G. Nuñez, M. Maccioni.

-IFN- β -derived tumor cells induces the expression of IL27 on DCs and TLR3 activation decrease pro-tumorigenic factors on tumor cells.

Authors: Gatti G, Nocera D.A., Roselli E., **Araya P**, Giraudo C., Maccioni M.

2013. LXI ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA, LOS COCOS, CÓRDOBA, ARGENTINA.

-Chimeric tumors: a new experimental strategy to evaluate the influence of MyD88 signaling pathway in tumor development *in vivo*.

Autores: **P. Araya**, N. Nuñez, D.A.Nocera, E. Roselli, M. Maccioni.

-Doxorubicin-treated cancer cells release HMGB1 that can modify the expression of VEGF and Angiopoietin I in an autocrine way via MyD88.

Autores: E. Roselli, D.A.Nocera, G.Gatti, N. Nuñez, **P. Araya**, M. Maccioni.

-Host type I IFN signals are required for the antitumor immune response elicited by the therapeutically administered TLR3 ligand Poly AU.

Autores: D. Nocera; N. Nuñez; G. Gatti, E. Roselli; **P. Araya**; E. Zacca; G. Morón; M. Maccioni.

-Poly I:C treatment of tumors cells promote the secretion of soluble factors that improve the differentiation of APCs with a better allostimulatory function.

Autores: Gatti G.; Nocera D.; Roselli E., **Araya P.**, Giraudo C.