



UNC

Universidad
Nacional
de Córdoba

CONICET



Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

CIBICI-CONICET.

Departamento de Bioquímica Clínica.

Facultad de Ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**“CÉLULAS T REGULATORIAS
EN RATONES CON DIFERENTE
SUSCEPTIBILIDAD
AL DESARROLLO DE ENFERMEDADES
AUTOINMUNES”**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Bioquímica Gloria Janet Godoy

Córdoba, Argentina 2019

Directora de Tesis:

Virginia Elena Rivero

Comisión Asesora:

Dra. Cristina Maldonado

Dra. Carolina L. Montes

Dr. Gustavo A. Nores

El presente trabajo de tesis fue financiado gracias al apoyo económico obtenido a través de becas y subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC).

A Dios,
mis padres,
al amor de mi vida...

AGRADECIMIENTOS

No tengo más que agradecerle a la vida que ha sido, más de una vez, demasiado generosa conmigo por rodearme de personas realmente maravillosas, que me han acompañado durante todos estos años de doctorado. El doctorado fue para mí más que un crecimiento profesional. Aprendí que con paciencia y perseverancia se puede obtener todo lo que quieras. Este camino tuvo sus momentos grises, momentos donde parecía que no había luz en el túnel, pero siempre estuve rodeada de personas que me ayudaron a salir adelante, no solo en lo laboral sino también en lo personal. Si tuviera que enumerar a todas las personas que pasaron por mi vida no me van a alcanzar las páginas, pero de absolutamente todas he aprendido algo y a continuación quiero escribir algunas líneas sobre ellas.

Antes que a nadie quiero agradecerme a mí misma, claro que sí; por todo el esfuerzo y sacrificio que le puse, por tantas horas invertidas, por todo el trabajo que nadie ve atrás de una tesis de doctorado. También quiero pedirme perdón, porque más de una de vez subestimé mis capacidades para alcanzar todo lo que me proponga.

A la universidad pública y gratuita, mi querida UNC-FCQ, que me dio la oportunidad de acceder a una educación de calidad durante 10 años.

A Vicky, por haberme permitido generosamente formar parte de tu grupo, porque confiaste en mí desde el primer momento y me has acompañado durante estos casi 6 años. Gracias por todo el tiempo que invertiste en mi formación, y sobre todo gracias por acompañarme en esta etapa final, en la escritura de la tesis y por bancarme en mis días malos y también en mis días felices.

A todas las personas que me ayudaron en mis primeros pasos en el CIBICI. A Ruben, el primero en lidiar conmigo, por las largas horas de cultivo compartidas. Gracias por darme la libertad de mandarme mocos y hacer como si nada había pasado. A Lauri, gracias por iniciarme en el team de las Treg y por acompañarme mil horas en el citómetro hasta la madrugada.

A Pauli y Pili del citómetro, gracias por aguantarse mis torturantes sorts de 8 horas y poner siempre todo de ustedes para que todos mis experimentos salieran bien.

A mis padres que siempre fueron 100% incondicionales y que me han acompañado toda la vida en todos mis proyectos. ¡Ojalá fuesen eternos, los amo con todo mi corazón! Sin duda no hubiese llegado a conseguir esto sin el apoyo de ustedes y ojalá la vida les devuelva mil veces más de todo lo que me han dado. Mami, gracias por darme una palabra

de aliento cada vez que lo necesité, por tus versículos de la biblia de todos los días, y por tener siempre una solución para todo.

Dicen que todas las personas que pasan por nuestras vidas dejan huellas, y en el CIBICI, especialmente en mi Lab 104 querido encontré mucho más que un lugar de trabajo, me encontré con personas increíbles que siempre las voy a llevar conmigo a donde sea que vaya. En poco tiempo se convirtieron en mi familia a la que quiero tanto. Gracias por todas las horas de experimentos compartidas, por los almuerzos amontonados (¡diganme que voy a hacer sin ustedes!), por los after-lab, mates, tortas y cualquier tipo de evento que implique juntarse a chusmear. A Sole, la proveedora oficial de todos los instaladores que necesites, gracias por el intercambio de miradas a través de la mesada en el momento JUSTO, por tus protocolos, y tu hermosa manera de solucionarme problemas cada vez que hacía una PCR. A Ceci, la primera persona que me habló por el huequito del estante de la mesada que nos separó por muchos años. Por tener siempre una birra disponible, por nuestras charlas profundas de desamores, política, de la vida misma. Y por último GRACIAS a vos y a Mariano por darnos acilo. Sepan que les damos 5 estrellas como alojamiento jaja. A Flor, florcita, florcha, “ameea”, a la que no le funciona el SNAPPP-CHATT. Gracias por haberme acompañado en mis peores y mejores momentos experimentales, por levantarte a las 6 am para hacer mis sorts eternos, por musicalizar mis mañanas con altos temaikenes, por simplemente estar más allá de un experimento. Sos la mejor compañera de grupo y amiga que a una persona le puede tocar! Siempre dispuesta a ayudar. Gracias por tantas risas y carcajadas hasta sentir lágrimas en los ojos. Ojalá la vida te premie de la mejor manera. Y acordate, te voy a estar esperando del otro lado del charco, ¡siempre! A Caro, el bebe viejo del 104, mi querida compañera de grupo, gracias por tantos buffers de lisis, por tu frialdad y acidez para tirar el comentario más acertado para cualquier situación. De vos he aprendido muchísimo, gracias por tenerme tanta paciencia y perdón por arruinar tus salidas bolicheras cada vez que sonaba un tema que escuchábamos en mis experimentos jaja. A Dani la más peque del grupo rivero-motrich, gracias por traer el ORDEN y los rótulos al Rivero team, y perdón por NO tener ni un solo protocolo, prometo en mi próxima vida complacerte. A Coni bed&breakfast, la niña de la peluca colorada, conita gracias por todas tus locuras y tu risa de niña macabra, por nuestras salidas cuando estábamos en la cresta de la ola. Por tener siempre el update de las promos. ¡GRACIAS por habernos bancado por tanto tiempo en tu hogar, vamos a estar siempre muy agradecidos! Ya te dimos 5 estrellas en Airbnb. A Bibi la hiena barrios,

la chica misteriosa, gracias por no tomarte el bondi cuando te lo pedía para que caminemos juntas hasta casa, por nuestras charlas profundas y filosóficas de nuestro futuro, por tus besitos asquerosos en el hombro. A Ivi, mamu de las mamus, la persona más dulce que he conocido! Gracias por nuestras largas charlas, por tus consejos, por tus abrazos eternos, por ser el epicentro de todas nuestras juntadas. A Emi macho, gracias por tu mala onda de siempre, aunque no te fumes que hable mucho y fuerte se que en el fondo me querés. A Pauli, gracias por ser parte de la sección boluda de nuestros experimentos eteeeternos, por tu energía contagiosa, por compartir ese pasillo colapsado y por bancarte mi mal humor. A Lisa, la chica de la sonrisa haarmosa, gracias amiga por haber ocupado mi rol de actriz en todos los videos de tesis, y por detestar a las mismas personas que detesto yo jajaja. A Emi hembra, la más callada del lab, gracias por hacerme safar cada vez que tenía que usar el termociclador Soto. A Sile, mi proveedora oficial de bebida, aunque llegaste un poco tarde al grupo gracias por contagiar tus ganas y tu buena energía. A la nueva progenie, Estefi (aparatus), Lu, Sofi, Vir y Jere, aunque no hemos compartido mucho gracias por la buena onda de siempre.

A Leo, Leonardo y encima “Rodolfo”, el PCRólogo por excelencia, gracias por haberme puesto ese apodo de mierda “glo-glo”. Quiero decirte que ya te superé mi querido “coulter counter”. Gracias por tantas risas, por tu cadena de audios de 6 minutos y por tantas laargas charlas de la vida en el bioterio y en experimentos, por haberme acompañado en mis primeros años de doctorado y porque siempre tenías una solución para mis problemas experimentales (y sino la tenías la buscabas). Perdón por haberme bajado de la cresta de la ola. Sos el mejor compañero de lab y grupo, gracias por bancarme por tantos años!

A Lean, mi hermanito amado, gracias por bancarte tantos años de convivencia desde que cursábamos en la facu hasta mis primeros años de doctorado, fueron los años más lindos de mi vida. Te amo hermanito! A Pauli, the best teacher, gracias por enseñarme tantas cosas en tan corto tiempo, por amoldarte a mis horarios para no que no perdiera la clase. Te quiero cuñada!

A Alfre, María y sus pollitos Meli, Fran y Joaquín (mi cololado), gracias por estar presente siempre! Los adoro!

A mi familia, Sandra, Ana, Blanca, Tía Vila y Tía Alicia, que a pesar de la distancia siempre me han acompañado y alentado a seguir.

A mi nueva familia, Gra, Coco, Vivi y Pablo, que nos bancaron en esta última etapa a más no poder, ¡gracias!

A Sil, más que una amiga la hermana que la vida no me dio, gracias por tantos años de amistad, por escucharme y sobre todo leerme cada vez que te necesité, por ser mi psicóloga personal. Con vos aprendí que la distancia no es un problema. Sabes toooodo lo que te quiero. ¡Como siempre decimos hasta viejitas!

La facu ha sido mi mejor proveedora de amigas, Sil, Dai, Pau, Gime co, Maidi, Meli, Yami, Marite, Vitu y Marulina. Gracias por tantos años de amistad, por tantas risas y por bancarme en todas y alegrarse de mis logros como si fueran suyos! Las quiero muchísimo y las voy a extrañar tanto!

A mi querida flia Runners Cba, Aresu (Casco), Franco (el trueno), Burri y Potri, Mana, Popina, Gazzoni, Lobito (Fari), Nati la tora Tossolini, chiquitito, Lichi, Flor, Debo, Kokiña, Pauli y Agus. Gracias porque más de una vez han sido mi cable a tierra y motivo de reír hasta llorar.

A todos los que nos hicieron un lugarcito en su hogar en los últimos dos meses, Conita, Ceci, Vaqui, Gra y Coco, Mami y Papi. Gracias por acogernos en su casa desinteresadamente y hacernos sentir como en Casa.

Por último, agradecerle al amor de mi vida, Angel mi señor esposo (que fuerte no?), gracias por ser el compañero perfecto, por aguantar todos mis estados de ánimos y sobre todo mi hermoso malhumor, por levantarte conmigo a las 5 am más de una vez para ir al lab. Hoy nos toca volar y crecer, pero sin duda soy una afortunada de poder hacer esto con vos. Gracias por motivarme a seguir cuando parecía que ya no podía. Como siempre te digo a donde sea, pero con vos...TE AMO.

Jan

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
Características generales de células Treg	8
Origen y heterogeneidad de células Treg	10
Regulación del gen Foxp3	14
<i>Estructura del gen FOXP3</i>	14
<i>Mantenimiento del perfil epigenético de una célula Treg</i>	16
<i>Rol de IL-2 en la estabilidad de la expresión de Foxp3</i>	17
<i>Modificación post-traducciona l de Foxp3</i>	20
Inestabilidad y plasticidad de las células Treg	22
Células Treg en enfermedades autoinmunes.....	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos específicos.....	29
RESULTADOS	30
I. Análisis cuantitativo y cualitativo de células Treg en ratones con diferente susceptibilidad a autoinmunidad en condiciones basales	31
<i>Análisis del número y proporción de células Treg en ratones de la cepa NOD, B6 y BALB/c en órganos linfoides en condiciones basales</i>	31
<i>Análisis de subpoblaciones de células Treg en órganos linfoides de ratones NOD, B6 y BALB/c</i>	34
<i>Análisis comparativo de marcadores fenotípicos de células Treg en ratones NOD, B6 y BALB/c</i>	38
II. Estudio de la funcionalidad y activación in vitro de células T regulatorias	43
<i>Análisis de la funcionalidad in vitro de células Treg purificadas</i>	43
<i>Análisis comparativo de la activación in vitro de células Treg purificadas de las cepas NOD, B6 y BALB/c</i>	44
<i>Evaluación del rol de IL-2 en la expresión de Foxp3 en células Treg purificadas de ratones NOD, B6 y BALB/c</i>	47
III. Regulación de la expresión de Foxp3 en células T regulatorias activadas in vitro.....	54
<i>Estudio del rol de la señalización de IL-2 y su receptor en células Treg de ratones NOD, B6 y BALB/c</i>	54
<i>Estudio de la expresión de enzimas involucradas en el mantenimiento de la hipometilación del sitio CNS2 del gen FOXP3 en células Treg de las cepas NOD, B6 y BALB/</i>	58

<i>Inestabilidad de células T regulatorias</i>	60
<i>Estudio de la expresión de proteínas relacionadas a procesos de ubiquitinación y desubiquitinación en células Treg de las cepas NOD, B6 y BALB/C</i>	62
DISCUSIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS	85
Cepas de ratones utilizadas.....	86
Obtención de órganos linfáticos y aislamiento de células mononucleares (CMN)	86
Citometría de flujo de moléculas de superficie e intracelular.	87
- <i>Citometría de Flujo de moléculas de superficie:</i>	87
- <i>Citometría de flujo de moléculas intracelulares.</i>	87
Purificación de células	88
1. <i>Pre-enriquecimiento de Linfocitos T CD4+ con perlas magnéticas:</i>	88
2. <i>Purificación de linfocitos Tconv y células Treg por Cell-sorting:</i>	89
Ensayos de supresión in vitro	89
Activación in vitro de células Treg.....	90
Inducción de células Treg in vitro	90
Evaluación de la vía de señalización de IL-2.....	91
<i>Tinción de STAT5 fosforilado</i>	91
<i>Tinción intracelular de GRAIL, OTUB-1, STUB-1 y USP7 por citometria de flujo</i>	92
qPCR en Tiempo Real.....	93
Análisis estadístico.....	94
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	113
PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES	114
PRESENTACIÓN A CONGRESOS	115

ABREVIATURAS

Treg	Células T regulatorias
LT	Linfocitos T
CD25	Cadena α del receptor de IL-2
NOD	No obesos diabéticos
C57 BL/6	B6
IPEX	Inmunodesregulación, poliendocrinopatía, entoropatía ligada al cromosoma X
CD127	Cadena α del receptor de IL-7
CDs	Células dendríticas
CMH	Complejo mayor de Histocompatibilidad
tTreg	Treg tímicas
pTreg	Treg periféricas
TCR	Receptor de células T
CPA	Células presentadora de Antígeno
iTreg	Treg inducidas <i>in vitro</i>
Nrp-1	Neurofilina-1
CNS1	Secuencia no codificante conservada 1
CNS2	Secuencia no codificante conservada 2
CNS3	Secuencia no codificante conservada 3
TSDR	Región desmetilada específica de Treg
TET	Traslocación diez-once
MBD2	Proteína 2 del dominio de unión a metil-CpG
IL-2	Interleucina-2
R-IL-2	Receptor de IL-2
JAKs	Janus Quinasas
STAT5	Activador de la transcripción 5
SOCS	Proteínas supresoras de la señalización de citoquinas
GRAIL	Gen Relacionado a Anergia en Linfocitos
OTUB-1	Otubaina-1
DUB	Enzima desubicitinante
KATs	Lisina-acetiltransferasas
KDACs	Lisina-deacetilasas
SIRT1	Sirtuina 1
DT1	Diabetes Tipo 1
Idd	Locus de diabetes dependiente de insulina
GLp	Pool de ganglios linfáticos axilares e inguinales
GLm	Ganglios linfáticos mesentéricos
GLpc	Ganglios linfáticos pancreáticos
CMNs	Células mononucleares
vTreg	Treg vírgenes/centrales
emTreg	Treg efectoras/memoria
Tconv	Linfocitos T convencionales
IL-2r	IL-2 recombinante
DNMT1	Metiltransferasa DNA 1
Ubl E3	Ubiquitina ligasa E3
Ub	Ubiquitina
Tef	Célula T efectora

RESUMEN

Las células T regulatorias (Treg), una subpoblación de linfocitos T (LT) CD4⁺, son fundamentales para el mantenimiento de la tolerancia inmune hacia antígenos propios y ejercen múltiples funciones regulatorias y supresoras sobre diferentes poblaciones celulares. Las células Treg expresan constitutivamente el factor de transcripción Foxp3, las moléculas CD25 (cadena α del receptor de IL-2), CTLA-4, GITR, entre otras. Numerosos datos experimentales indican que las células Treg tienen una función impedida o alterada en diferentes enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En el presente trabajo de tesis investigamos si ratones no obesos diabéticos (NOD), una cepa de ratón que desarrolla espontáneamente diversos procesos autoinmunes como diabetes tipo 1, tiroiditis, sialoadenitis y prostatitis con la edad, tienen una falla en las cantidades y/o funcionalidad de esta población celular. Para ello se realizó un estudio comparativo de la población células Treg en ratones NOD, C57BL/6 (B6), y BALB/c de 4-6 semanas de edad, previo a toda manifestación autoinmune reportada en la cepa NOD. Al comparar la proporción y los números absolutos de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ en las diferentes cepas en estudio, se observó que, en condiciones basales, sin estimulación y a edades tempranas, ratones de la cepa NOD mostraron menores cantidades de células Treg y menor expresión de Foxp3 en órganos linfoides secundarios y en timo. En ensayos clásicos de inhibición de la proliferación de LT convencionales, observamos que células Treg de ratones NOD tenían menor capacidad supresora y por ende menor funcionalidad. Las diferencias no sólo fueron observadas en estado basal, sino también luego de la estimulación *in vitro* de las mismas. Tras la estimulación vía TCR en presencia de IL-2, células Treg esplénicas purificadas de ratones NOD mostraron una respuesta débil a IL-2 en comparación a células Treg de ratones B6 y BALB/c, observándose baja expresión de Foxp3, con grados de proliferación menores. Además, luego de la activación *in vitro*, se observó que expresaban bajos niveles de moléculas relacionadas con su función y

activación tales como CD25, LAP-1, CD39, PD-1, PD-L1 y LAG-3. De manera interesante, cuando células Treg fueron cultivadas por tres días con anti-CD3/CD28 en ausencia o presencia de IL-2, células Treg de ratones NOD mostraron ser más dependientes de IL-2 para mantener la expresión de Foxp3, convirtiéndose en células productoras de IFN- γ e IL-17 más fácilmente que células Treg de las demás cepas. En estudios de inducción de pSTAT5, células Treg de ratones NOD mostraron los niveles más bajos de expresión de este factor comparado con células Treg de B6 y BALB/c. Por otra parte, en el presente trabajo reportamos por primera vez que células Treg de ratones NOD exhiben diferencias en la expresión de SOCS3, GRAIL y OTUB-1, factores involucrados en la regulación de la señalización de IL-2. Tanto en condiciones basales como luego de la activación, células Treg de ratones NOD mostraron niveles de expresión más altos de OTUB-1 y niveles más bajos de GRAIL que el resto de las cepas. Por otro lado, en las células Treg de los ratones NOD se observaron diferencias en la expresión de una ubiquitina ligasa E3 y una desubiquitina tales como STUB-1 y USP7, respectivamente, enzimas que se ha demostrado que participan en la degradación proteosomal de la proteína Foxp3. Así, en células Treg de ratones NOD se observó alta expresión de STUB-1 tanto en condiciones basales como después de la estimulación y expresión nula de USP7 en condiciones basales. Por lo tanto, en el presente trabajo reportamos menores cantidades y funcionalidad junto con expresión diferencial de SOCS3, GRAIL/OTUB-1 y STUB1/USP7 en células Treg de ratones NOD, moléculas que afectan la señalización de IL-2 y la estabilidad de Foxp3. Todos estos hallazgos podrían estar relacionados con la insuficiencia de las células Treg para regular la tolerancia a lo propio observada en los ratones de la cepa NOD.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune (SI) está formado por un conjunto de estructuras, tejidos, células y moléculas que tienen como finalidad defendernos de agentes patógenos y procesos biológicos anómalos a través de la identificación y destrucción de éstos. Para llevar a cabo estas funciones, debe distinguir perfectamente entre cuáles son los antígenos presentes en los tejidos propios y cuáles no lo son. Esta capacidad del sistema inmune de distinguir entre los antígenos propios y los no propios es fundamental para que no se produzcan enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes son procesos patológicos donde los mecanismos efectores del sistema inmune específico están dirigidos contra antígenos propios (1). Su desencadenamiento es un proceso muy complejo que involucra la combinación de múltiples factores (genéticos, epigenéticos, hormonales y ambientales). Se ha postulado que estas enfermedades se producen cuando hay fallas en los mecanismos que normalmente mantienen la falta de respuesta a lo propio (2). Las células T regulatorias (Treg) tienen un papel central en autoinmunidad (3). Su función fundamental en los procesos de regulación de respuestas autoinmunes se identificó en ratones en los que la ausencia de células Treg o la eliminación de esta población resultaba en el desarrollo de inflamación severa y autoinmunidad en múltiples órganos (2,3). Posteriormente numerosos estudios en modelos animales mostraron que defectos en las células Treg contribuían al desarrollo de autoinmunidad y que la transferencia adoptiva de células Treg podía revertir estos procesos (4). Además, estudios realizados en seres humanos demostraron también la presencia de células con fenotipo similar a las células Treg murinas en sangre periférica, capaces de suprimir *in vitro* la proliferación de linfocitos T (5,6). La descripción de individuos con el síndrome IPEX (Inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X), quienes carecen de células Treg y sufren de inflamación severa y autoinmunidad, remarcó la importancia de esta población para controlar procesos autoinmunes tanto en modelos animales, como en la enfermedad humana (2–4).

En individuos con IPEX la completa ausencia de células Treg evidencia claramente que un número inadecuado conduce a autoinmunidad. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con enfermedades autoinmunes se observan reducciones modestas o cantidades similares a las detectadas en individuos sin enfermedades autoinmunes (2–4). Avances obtenidos en los últimos años han demostrado la existencia de múltiples subtipos de células Treg, como así también se han descrito diversos factores que influyen la funcionalidad y estabilidad de esta población en sitios de inflamación (2–4). La posibilidad de expandir *in vivo* y/o amplificar *in vitro* esta población para luego

transferirla terapéuticamente estimula a profundizar en el estudio de posibles fallas o factores que afectan su estabilidad, especialmente en pacientes con predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes.

En el presente trabajo de tesis, nos proponemos profundizar en el estudio de las características cuantitativas, cualitativas, funcionales y de estabilidad en células Treg provenientes de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad.

Características generales de células Treg

Las células Treg fueron descubiertas hace más de 20 años y son desde ese momento un tópico de intensa investigación en inmunología (4). Las dudas iniciales acerca de su existencia se disiparon cuando en el año 2003 se descubrió el factor específico de linaje Foxp3, factor esencial que estabiliza el perfil genético o firma genética de una célula Treg; y cuya pérdida o menor expresión aminora de manera importante las funciones supresoras de esta población celular (4). Las células Treg en ratones y seres humanos se caracterizan por la alta expresión de CD25 (cadena α de alta afinidad del receptor de IL-2) y la expresión constitutiva del factor de transcripción Foxp3, el cual es requerido para su desarrollo, función y estabilidad, siendo entonces definidas como células CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ (5,6). En seres humanos, la ausencia de expresión de la cadena α del receptor de IL-7 (CD127) es también usada como un marcador complementario a CD25 para una identificación más precisa, y por lo tanto, las células Treg en humanos pueden identificarse como células CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} (5, 6).

En general estas células ejercen sus funciones a través de mecanismos de contacto célula-célula que involucran receptores específicos de superficie y a través de la liberación de mediadores solubles, mecanismos que probablemente dependen del microambiente donde se encuentran cumpliendo su función y de la población a ser controlada (6–9) (Figura 1). Así, los mecanismos de supresión de las células Treg pueden ser incluidos en 4 grupos (8):

- **Secreción de citoquinas supresoras o anti-inflamatorias**, tales como IL-10, TGF- β , IL-35 y anferegulina, que producen arresto del ciclo celular.
- **Citólisis**, mediante la secreción de granzimas (A y B) y perforinas que producen la apoptosis de la célula blanco.

- **Disrupción metabólica de la célula T efectora blanco**, mediante: consumo local de IL-2 (factor de supervivencia crucial para TE) a través del receptor de alta afinidad CD25 expresado en las células Treg; y la conversión de ATP extracelular a adenosina mediante la acción de las ectoenzimas CD39 y CD73. Estos mecanismos llevan a la apoptosis de las células efectoras o favorecen un estado inmaduro de las células dendríticas (CDs).
- **Inhibición por contacto**, a través de la expresión de moléculas co-inhibitorias como CTLA-4, LAG3 y otras, las cuales pueden modular la actividad (maduración y/o activación) de CDs, disminuyendo la expresión de CD80/CD86 o CMH II en éstas. CTLA-4 además, es capaz de inducir la expresión deIDO en estas células, enzima que cataboliza el triptófano liberando productos pro-apoptóticos (4).

Existe consenso en el hecho de que no hay una vía única por la cual las células Treg median sus funciones de supresión y se cree que las células Treg tendrían la

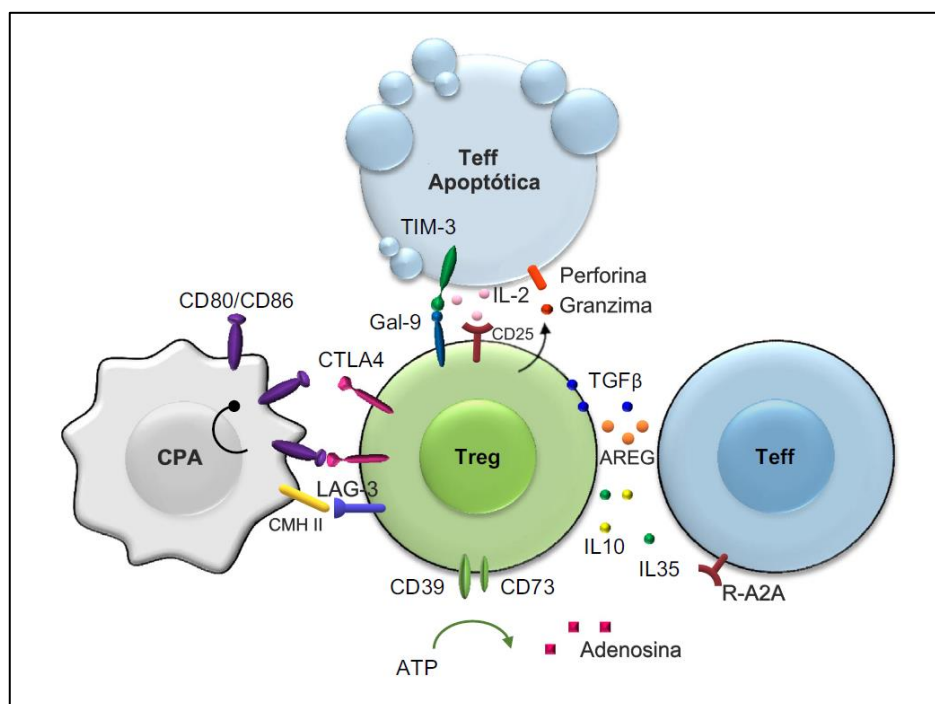


Figura 1: Mecanismos de supresión mediados por las Treg. Representación de los diversos mecanismos regulatorios ejercidos por las Treg centrados en cuatro modos de acción básicos: **a)** La secreción de citoquinas inhibitorias que incluyen IL-10, IL-35, anfirogulina (AREG) y el factor de crecimiento transformante- β (TGF β). **b)** La citólisis incluye mecanismos de eliminación dependientes de granzima A, granzima B y perforina. **c)** La interrupción metabólica incluye apoptosis mediada por la privación de IL-2 dependiente de CD25, inmunosupresión mediada por adenosina y el receptor 2A de adenosina (R-A2A). **d)** La inhibición por contacto incluye la expresión de receptores inhibitorios como CTLA-4 (se une a CD80/86) y LAG-3 (se une con alta afinidad al CMH clase II) por parte de las células Treg. La unión de CTLA-4 a CD80/86 también puede inducir la expresión de la molécula inmunosupresora IDO en las células dendríticas (CD). *Adaptado de (4)*

posibilidad de elegir el mecanismo o vía más adecuada para cada situación particular, o incluso usar varios mecanismos al mismo tiempo (4–6).

Con respecto al fenotipo de las células Treg, se ha demostrado que estas células pueden presentar en su superficie una gran variedad de moléculas que participan en su desarrollo y en los diferentes mecanismos de función supresora (6). Así, las células Treg se caracterizan por la expresión constitutiva de CD25, CTLA-4, GITR, la expresión variable de las ectoenzimas CD39 y CD73; expresión de moléculas inhibitorias tales como LAG-3, TIM-3, PD-1 y su ligando PDL-1 y TIGIT (4,6,10–14). Se ha demostrado además la expresión de citoquinas supresoras como IL-10 y LAP-1 en células Treg, así como también expresión de receptores de *homing* como CCR6, CXCR3, CCR4, CCR8, CCR5 y otros, implicados en la llegada de células Treg a diferentes entornos inmunológicos (15). Es importante aclarar que ninguna de estas moléculas es de expresión específica para células Treg ya que las mismas son también expresadas por LT activados. Se ha descrito que el incremento en los niveles de expresión de receptores de *homing* resulta en un estado de activación de las células Treg que promueve su función supresora *in vitro* e *in vivo*, y que puede ser gatillado en condiciones homeostáticas o bajo diferentes contextos inflamatorios (6,10–14).

Origen y heterogeneidad de células Treg

Se ha demostrado que existe una heterogeneidad considerable entre las células Treg Foxp3⁺ con distintos subtipos en diferentes tejidos y que exhiben distintas capacidades funcionales (4,9,16). En base a su origen las células Treg pueden ser clasificadas en dos grupos: Treg tímicas (tTreg) y Treg periféricas (pTreg) (4)(Figura 2). Las células tTreg (antes conocidas como células Treg naturales o nTreg), son generadas en el timo como un linaje separado a partir de timocitos simple positivos (SP) CD4⁺ CD8⁻ y se ha demostrado que durante el desarrollo en timo emerge un patrón epigenético en esta población que permite la transcripción estable de Foxp3 y el compromiso de linaje a célula Treg (17). La expresión de Foxp3 en esta población es inducida a través de una fuerte señal vía el receptor de células T (TCR), luego del reconocimiento del complejo antígeno propio-CMH (presente en las células presentadoras de antígeno (CPA) tímicas con una avidéz relativamente alta y en presencia de IL-2 (18). Por lo tanto, se postula que las células tTreg expresan un repertorio de TCR hacia antígenos propios, y son particularmente importantes en la prevención del desarrollo de autoinmunidad (19).

Por el contrario, en tejidos periféricos las pTreg se desarrollan a partir de LT CD4⁺ vírgenes (Figura 2). En ésta población la inducción de Foxp3 se da luego del encuentro con el antígeno, una fuerte señalización vía TCR, una óptima co-estimulación y la presencia de factores apropiados tales como IL-2, altas cantidades de TGF-β y ácido retinoico (20). Las pTreg se acumulan mayormente en sitios de barrera como intestino, sitio donde hay abundante expresión de TGF-β, y también en la placenta materna (21,22). Se ha postulado que las pTreg serían particularmente importantes en el establecimiento de la tolerancia contra las bacterias comensales, los alimentos, los alérgenos y antígenos del feto en una madre embarazada (23,24). A partir de diferentes estudios se ha postulado que la mayoría de las células Treg circulantes se originan en timo mientras que las pTreg

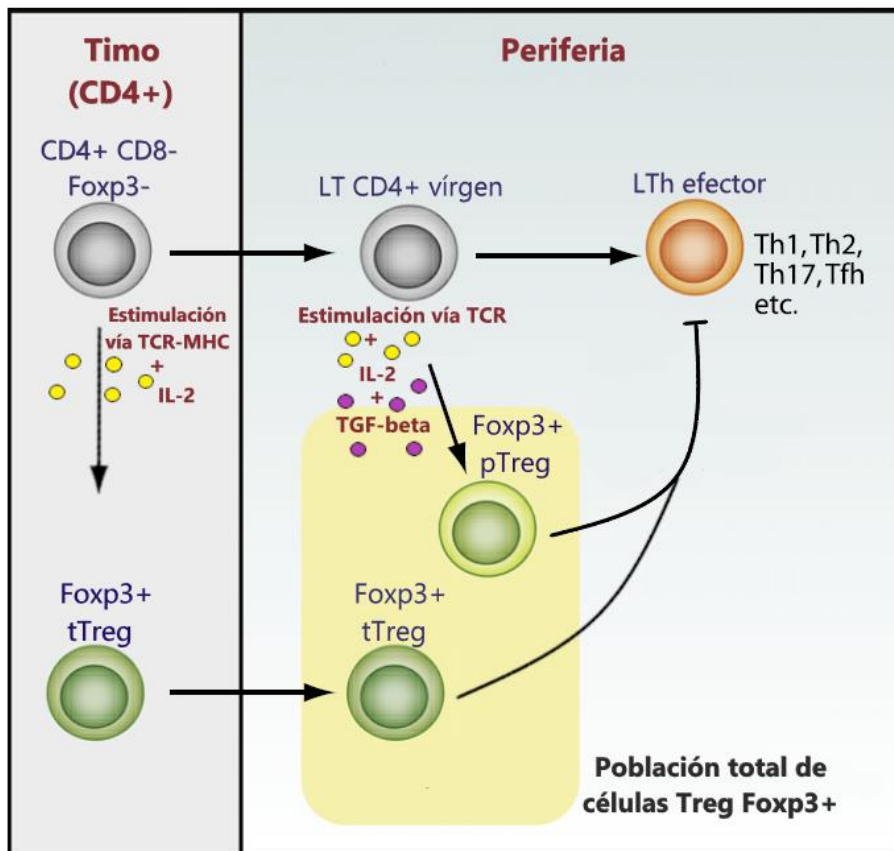


Figura 2: Diferenciación de células tTreg y pTreg. Las células Treg tímicas (tTreg) se diferencian en el timo a partir de timocitos CD4⁺ CD8⁻ (SP) en presencia de una estimulación fuerte a través del receptor de célula T (TCR) con antígenos presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de células epiteliales tímicas o CDs, una coestimulación mediante la interacción de CD28 y CD80/CD86, y la señalización de IL-2 a través de su receptor de alta afinidad CD25. Estas células migran a los tejidos periféricos donde son capaces de suprimir las respuestas de células efectoras. Las células Treg periféricas (pTreg) se diferencian en los órganos y tejidos linfoides secundarios a partir de linfocitos T (LT) CD4⁺ vírgenes bajo la estimulación antigénica en condiciones tolerogénicas, con una co-estimulación subóptima, y en presencia de IL-2 y TGF-β. La población total de células Treg Foxp3⁺ Treg comprende células tTreg y pTreg. Es muy probable que las células tTreg y pTreg difieran en su repertorio de TCR ya que las pTreg derivan de LT CD4⁺ vírgenes maduros en periferia. *Adaptado de (21).*

componen solo un pequeño porcentaje del total de las células Treg encontradas en periferia (22).

Las células Treg también pueden ser generadas *in vitro* a partir de LT CD4⁺ vírgenes en presencia de IL-2 y TGF- β , y se las denomina células Treg inducidas *in vitro* (iTreg) (20,24). Las iTreg pueden expresar niveles considerables de Foxp3, pero generalmente carecen de gran parte de la programación epigenética de su contraparte de células tTreg, lo que se traduce en un fenotipo menos estable y con menor capacidad regulatoria (25).

Actualmente, no se conoce de forma fehaciente si las células Treg con orígenes diferentes son requeridas en distintos contextos biológicos o si presentan funciones biológicas redundantes(21). Numerosas investigaciones han buscado marcadores fenotípicos que permitan distinguir a las poblaciones tTreg y pTreg (26), y se ha propuesto que la expresión del factor de transcripción Helios junto con Foxp3 serían marcadores útiles para distinguir las debido a la expresión preferencial de Helios en las células Treg de origen tímico (27). Otros autores sugieren que el receptor de superficie Neurofilina-1 (Nrp-1) también podría ser utilizado como marcador específico para distinguir estas poblaciones sugiriendo que las células Treg Nrp-1 positivas serían de origen tímico (18,19). Helios es expresado por el 70-80% de las células Treg en tejidos linfoides periféricos y entre un 50-60% de las células Treg presentes en mucosas; mientras que Nrp-1 es expresada por el 85% de las células Treg en periferia (21,28–30). Algunos autores indican que la expresión concomitante de Helios y Nrp-1 podría servir para identificar tTreg (28), sin embargo, el uso de estos marcadores aún es discutido.

En los últimos años los datos bibliográficos han demostrado que la población de células Treg en periferia es muy heterogénea, no solo por el sitio de generación (tTreg/pTreg) sino también por sus propiedades funcionales (4). De la misma manera que en LT CD4 convencionales, las células Treg pueden ser subdivididas en una subpoblación *virgen/central/reposo* y en una subpoblación de *memoria/efectora/activada* (31). Estas dos subpoblaciones en ratón se diferencian en la expresión de CD44 y CD62L (L-selectina)(31,32). La subpoblación de células *Treg virgen/central* constituye la mayoría de las células Treg presentes en órganos linfáticos y en sangre, y se caracteriza por expresar el receptor de quimiocina CCR7 y el receptor de adhesión CD62L, los cuales las dirigen al tejido linfoide (descriptas como CD62^{hi} CD44^{low} CCR7⁺) (33,34). Una menor fracción de células Treg Foxp3⁺ presentes en órganos linfáticos y en sangre, corresponde

a la subpoblación de células Treg *efectora/activada*, y tienen un fenotipo de superficie similar a las células T CD4⁺ efectoras o activadas: CCR7^{low} CD62L^{low} CD44^{hi} KLRG1⁺ CD103⁺ (32,35,36). Se cree que las células Treg con este perfil han encontrado antígenos más recientemente que las células Treg vírgenes/centrales y muestran una migración incrementada hacia los tejidos no linfoides gracias a la elevada expresión de CD103 en esta población (37). Además, se ha demostrado que la diferenciación de célula Treg virgen a memoria/efectora se asocia con la regulación positiva de mediadores supresores claves como son CTLA-4, GILT, CD39 y otros. (32–37).

Las células Treg también pueden ser encontradas en tejidos periféricos no linfoides como tejido adiposo, mucosa intestinal y piel, aún bajo condiciones no inflamatorias (38). Este subtipo denominado como células Treg *residentes de tejidos* se comunican directamente con células inmunes y células específicas de tejido para regular la inmunidad, la inflamación y la homeostasis tisular (15,37,38). Ejemplos de células Treg residentes de tejido son las células Treg del tejido adiposo visceral y las residentes de intestino (38). Las células Treg *residentes de tejido adiposo visceral* se caracterizan por la expresión del factor de transcripción PPAR- γ , el cual es crucial para el desarrollo y acumulación de este subtipo de células Treg en ese sitio. Se ha postulado que este subtipo participaría en el metabolismo, obesidad, y preservando la sensibilidad a la insulina (39). En intestino y más precisamente en colon también se ha descrito un subtipo de células Treg *residentes de tejido* que expresan FFAR2 y es principalmente productor de IL-10 (40). Este subtipo muestra una fuerte asociación con la microbiota intestinal manteniendo la homeostasis inmune de la barrera intestinal (32,40). Es posible que todos estos subtipos de células Treg se encuentren diferencialmente implicados en distintos microambientes.

Sumando complejidad a la población de células Treg, más recientemente se describió la polarización funcional de estas células de acuerdo con el tipo de inflamación presente (41–43). Así, durante esta especialización, diferentes señales inflamatorias inducen en las células Treg la expresión del factor de transcripción maestro asociado al perfil de respuesta que deben controlar. Por ejemplo, para limitar la inflamación tipo 1, las células Treg aumentan la expresión de T-bet, el factor de transcripción característico de LTh1, en respuesta a IFN- γ y/o IL-27 producidos por el microambiente inflamatorio (41–43). Esta expresión de T-bet en células Treg dirige un programa transcripcional determinado, que se caracteriza por la expresión concomitante del receptor de quimiocinas CXCR3, entre otras moléculas (15,41,42). De esta forma, la especialización

funcional de las células Treg en contextos inflamatorios modifica las propiedades migratorias y homeostáticas de estas células, permitiendo que ejerzan un control efectivo de las respuestas inflamatorias (15).

Regulación del gen *Foxp3*

Estructura del gen FOXP3

La expresión estable de *Foxp3* se logra mediante múltiples mecanismos genéticos y epigenéticos que representan el escenario genético coordinado requerido para mantener la función de una célula Treg (9,17). El gen *Foxp3* fue identificado por primera vez como un gen defectuoso en la cepa de ratones *Scurfy* (44), cuya mutación en *Foxp3* resultaba en células Treg que carecían de función supresora y eran incapaces de restringir la hiperactivación de células T y la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de estas (5,45,46). En humanos, la mutación del gen *Foxp3* conduce a IPEX (47,48). Los pacientes con este defecto genético desarrollan una serie de inmunopatologías en los primeros meses de vida, como dermatitis, enteropatía, diabetes, trastornos de la tiroides y anemia.

El gen de *Foxp3* mapea en el cromosoma X e incluye 11 exones con un alto grado de conservación entre seres humanos y ratón (46,47). En respuesta a estimulación vía TCR y co-estimulación, varios factores de transcripción (NFAT, AP-1, FOXO1, FOXO3 y CREB-ATF1) se unen y activan el promotor de *Foxp3* (49,50). Se ha demostrado que la transcripción en este locus depende en gran medida de la contribución de tres *secuencias no codificantes conservadas* (*CNS1*, *CNS2* y *CNS3*) que sirven como sitios de unión para múltiples factores y son fundamentales para la iniciación y mantenimiento de la transcripción de *Foxp3* (51) (Figura 3).

La región **CNS1**, situada intrónicamente, es particularmente clave para la inducción de la expresión de *Foxp3* en pTreg y es únicamente indispensable para activar la expresión de FOXP3 en respuesta a señalización vía SMAD3 inducida por TGF β (49,52). Ratones con deficiencia de *CNS1* exhiben una población pTreg defectuosa y no logran mantener la tolerancia inmune en sitios de barrera como intestino, sin embargo, los mismos no desarrollan autoinmunidad (53). La región **CNS2** (conocida también como región desmetilada específica de células Treg o TSDR), es fundamental para mantener una expresión sostenida de *Foxp3* en tTreg luego de salir a periferia, y por lo tanto es la región más relevante para la estabilidad del fenotipo de una célula Treg (9). La región *CNS2* está

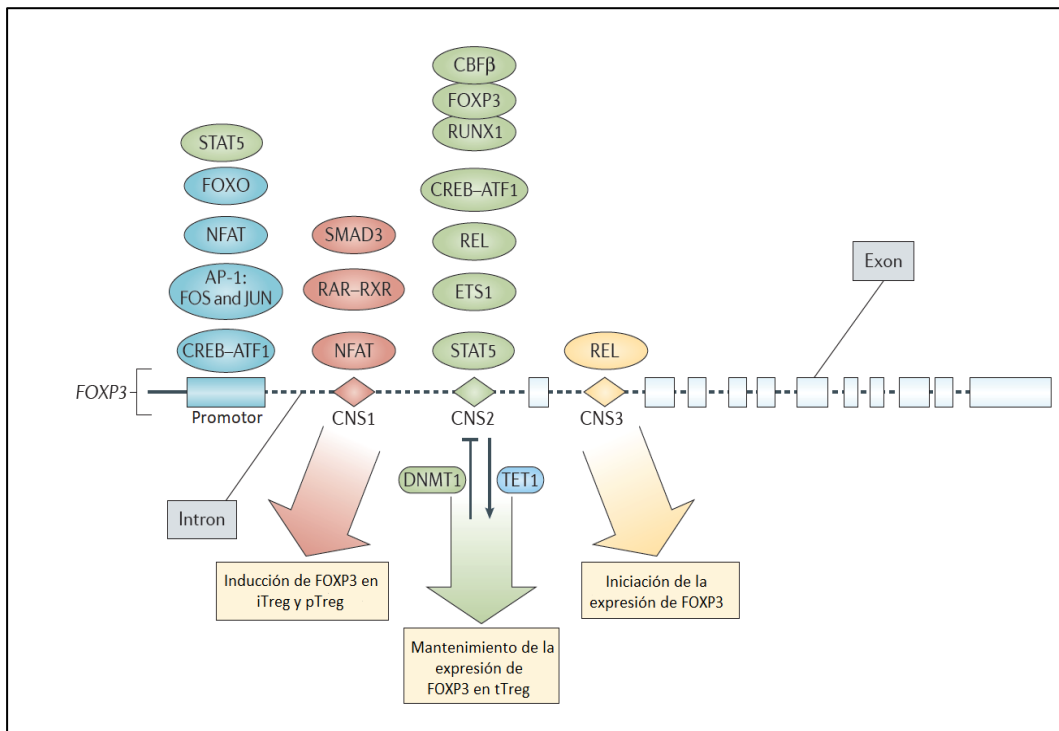


Figura 3: Control de la expresión de Foxp3 por factores de transcripción y elementos regulatorios dentro del locus del gen FOXP3. La figura muestra los elementos codificantes y no codificantes caracterizados del gen que codifica para FOXP3 junto con los factores de transcripción que se han reportado que activan la transcripción del gen y sus sitios de interacción. Los factores de transcripción que se unen al promotor, la secuencia conservada no codificante 1 (CNS1), las regiones CNS2 y CNS3 de FOXP3 se muestran en azul, rojo, verde y amarillo, respectivamente. También se muestra la enzima metilasa DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) y la enzima de desmetilación diez- once translocación 1 (TET1), que influyen en el estado transcripcional inactivo y activo de la región CNS2, respectivamente. ATF1, factor de transcripción 1 activador; CBFβ, subunidad β del factor de unión al núcleo; CREB, proteína de unión a elemento sensible a AMPc; FOXO, proteína O forkhead box; iTreg, células Treg inducidas *in vitro*; NFAT, factor nuclear de células T activadas; pTreg, Treg inducidas en periferia; RUNX1, factor de transcripción relacionado con Runt 1; STAT5, activador de transcripción y transductor de señal 5; tTreg, Treg derivadas de timo. Adaptado de (9).

ubicada dentro del primer intrón de *Foxp3* y es rica en motivos CpG que se vuelven ampliamente hipometilados durante el desarrollo de tTreg, mientras que es totalmente metilada en células T activadas ($CD4^+ Foxp3^-$) (54). Los motivos CpG desmetilados en CNS2 y otros elementos reguladores en el gen FOXP3, permiten la unión de varios factores de transcripción como REL, CREB-ATF1, RUNX1-CBFβ, ETS1 y STAT5, así como el propio *Foxp3* (51), manteniendo activa la transcripción de *Foxp3* en la progenie de células Treg divididas (49,55,56). El mantenimiento de este estado epigenético en CNS2 permite la expresión estable de *Foxp3* por células tTreg en una variedad de condiciones, incluida la inflamación de los tejidos. En iTreg, que son menos estables que tTreg y pTreg en términos de su expresión de *Foxp3* y actividad supresora, se ha observado que esta región está solo parcialmente desmetilada (57).

Por último, la región **CNS3** se encuentra entre el exón 1 y el exón 2 de Foxp3, y promueve la acumulación de modificaciones permisivas de histonas en el promotor Foxp3, siendo un sitio indispensable para iniciar la expresión de Foxp3, pero no necesaria para su mantenimiento (51).

Mantenimiento del perfil epigenético de una célula Treg

Se ha reportado que la desmetilación del sitio CNS2 ocurre dentro del timo durante las etapas de desarrollo y se logra a través de un proceso de oxidación de ADN activo que incluye la familia de las enzimas *translocación diez-once* (TET), proceso en el que también participa la proteína MBD2 (proteína 2 del dominio de unión a metil-CpG) la cual se une a CNS2 y recluta a varias desmetilasas TET (54,57–60) (Figura 3). Las proteínas TET (Tet1, Tet2 y Tet3) son dioxigenasas dependientes de Fe²⁺ y de 2-oxoglutarato que oxidan 5-metilcitosinas en productos intermedios, como 5-hidroximetilcitosina; 5-formylcytosine, y 5-carboxilcitosina (61). Por el contrario, la enzima *metiltransferasa DNA 1* (DNMT1), promueve eventos de metilación en CNS2 y contrarresta la programación epigenética responsable de la actividad de tTreg (60,62) (Figura 3). El silenciamiento, inhibición o deficiencia genética de DNMT1 lleva a una hipometilación global acompañada por elevada expresión de Foxp3, aun en células no-Treg (62). Sorprendentemente, a pesar de la asociación negativa entre DNMT1 y estabilidad en células Treg, la expresión de esta enzima es necesaria para mantener la función de una célula Treg, por lo que seguramente una expresión apropiada en células Treg sería particularmente importante para su estabilidad (62). Resultados recientes indican que IL-6 activa la metilación dependiente de DNMT1 en CNS2 (60), mientras que la exposición a vitamina C o IL-2 moviliza enzimas TET y favorece el mantenimiento de hipometilación en CNS2 (63,64). Además, se ha demostrado que la ablación de la función de MBD2 en ratones resulta en la reducción del número de células Treg y en menor actividad supresora y se postula que esto es debido a una falla para mantener la hipometilación de CNS2 en células Treg deficientes de MBD2 luego de salir de timo a periferia (58). De la misma manera, ratones deficientes en TET2 y TET3 pierden las marcas epigenéticas en CNS2 y CNS1 y con ello pierden la estabilidad en la expresión de Foxp3 (59). Aunque la participación e importancia de las enzimas TET y DNMT1 para mantener la expresión de Foxp3 ha sido descrita, aún no se ha investigado si existe expresión diferencial de estas enzimas en células Treg de individuos susceptibles a enfermedades autoinmunes.

Rol de IL-2 en la estabilidad de la expresión de Foxp3

Interleucina-2 (IL-2) es una citoquina producida principalmente por LT activados y ejerce su actividad biológica a través de su unión al receptor de IL-2 (R-IL-2) de alta afinidad. El R-IL-2 se compone de 3 subunidades: la cadena α (R α IL-2, también conocida como CD25), la cadena β (R β IL-2, también conocida como CD122) y la cadena γ del receptor de citoquina común (γ_c , también conocida como CD132); cada una de las cuales contribuye a la unión de IL-2 (65). Se cree que en ausencia de IL-2, estas subunidades no son preensambladas en la superficie de las células que expresan el R-IL2. La unión de IL-2 al R α -IL-2 (CD25) conduce a la asociación de esta subunidad con el R β IL-2 y la γ_c para formar un heterodímero estable, lo cual luego lleva a la iniciación de la señal de transducción (65). Como se mencionó con anterioridad, una característica fenotípica fundamental que define a una célula Treg es la expresión de CD25 (R α IL-2). Aunque ellas no producen IL-2, son altamente dependientes de IL-2 para su desarrollo, estabilidad y supervivencia (66,67). La señalización a través del R-IL-2 lleva a la activación de STAT5 que tiene acciones sobre el promotor de Foxp3 y la región CNS2, contribuyendo así con la estabilidad de esta población (68). En la señalización de IL-2 y de su receptor participan diferentes factores. El estímulo con IL-2 inicia una cascada intracelular con la activación de las Janus Quinasas (JAKs) JAK1-JAK3 (asociadas a R β IL-2 y a la γ_c , respectivamente) quienes una vez activadas, fosforilan los residuos tirosina de la cola citoplasmática del R β IL-2, de la cadena γ_c y las propias moléculas JAK (68). Esto amplifica la asociación de estas tirosinas quinasas e induce la asociación del transductor de señales y activador de la transcripción 5 (STAT5), con la cola citoplásmica del R β IL-2. Los residuos tirosina en STAT5 también son fosforilados, lo que lleva a la dimerización de STAT5 y su translocación al núcleo donde regula la transcripción de diferentes genes, entre ellos Foxp3 (Figura 4). Se ha reportado que ratones deficientes en STAT5 o JAK3, poseen menor frecuencia de células Treg, mientras que la expresión elevada de STAT5 o JAK3 rescata a las células Treg de la deprivación de IL-2 (69) (Figura 4).

La importancia de regular el inicio, la duración y la intensidad de las señales de STAT5 es remarcada por la diversidad de condiciones patológicas que surgen de la interrupción o la activación aberrante de esta vía de señalización (70). Las vías de JAK/STAT están, por lo tanto, bajo una regulación estricta por parte de varias proteínas citoplásmicas que incluyen PIAS (inhibidores de la proteína del STAT activado), SHP-1 (SH2 que contiene fosfatasa 1), SHIP-2 y proteínas supresoras de la señalización de

citoquinas (SOCS). La señalización de JAK/STAT5 induce la expresión de SOCS3, un regulador negativo de esta cascada que no solo limita la duración de la señalización de IL-2 permitiendo a la célula volver a su estado basal y evitar la sobreactividad sino que también es importante para mantener la especificidad de la señalización de la citoquina (71) (Figura 4). Se ha propuesto que SOCS3 puede inhibir la señalización JAK/STAT de dos maneras. En primer lugar, SOCS3 es capaz de inhibir directamente la actividad catalítica de JAK1 o JAK2 mientras permanece unido al R-IL2 (72). En segundo lugar,

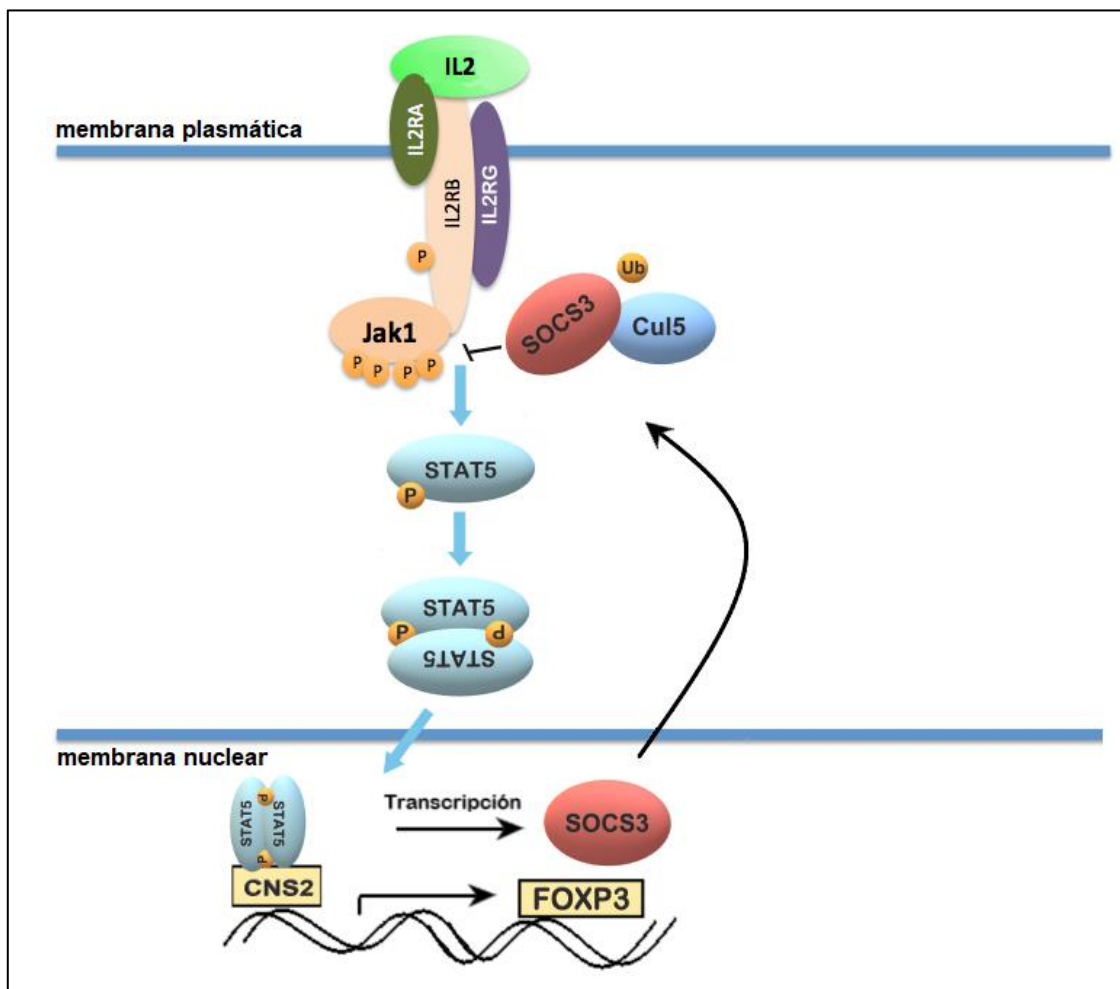


Figura 4: Regulación de la vía de señalización JAK1/ STAT5. La unión de IL-2 a su receptor específico CD25 (cadena α del receptor de IL-2) activa a las Janus Quinasas (JAKs) asociadas que luego fosforilan tirosinas del dominio intracelular del receptor. Estos nuevos residuos de tirosina fosforilados en el receptor reclutan a STAT5, el cual normalmente reside en el citoplasma en un estado inactivo. Sin embargo, una vez unido al receptor, son activados por pJAK1-pJAK3, dimeriza y se traslada al núcleo donde inician la transcripción de los genes que responden a las citoquinas. SOCS3 (proteína supresora de la señalización de citoquinas 3) es una de las proteínas cuya expresión está regulada positivamente por STAT5 y que luego retroalimenta la cascada de señalización, inhibiendo así la señalización iniciada por IL-2 y permitiendo que la célula vuelva a su estado basal. Esto es logrado debido a que SOCS3 interactúa específicamente con Cullin5 (Cul5) formando un complejo E3-SOCS3, proceso necesario para que éste último adquiera actividad catalítica y degrade a pJAK1. **IL2RA** (cadena alfa del receptor de IL-2), **IL2RB** (cadena beta del receptor de IL-2), **IL-2RG** (cadena gamma del receptor de IL-2), **Ub** (Ubiquitina).

SOCS3 reclutaría las elonginas B/C y Cullin5 para generar una ubiquitina ligasa E3 (UbL E3) que ubiquitina tanto a JAK como al R-IL2 que los dirige hacia la degradación proteosomal (72,73). SOCS3 se expresa de forma constitutiva en LT CD4⁺vírgenes (74), mientras que las células Treg son deficientes en la expresión de la proteína SOCS3 y se ha demostrado que la sobreexpresión *in vitro* de SOCS3 en células Treg disminuye su proliferación, expresión de Foxp3 y función supresora, lo que sugiere que el eje SOCS3/IL-2 desempeña un papel fundamental en el control de los niveles fisiológicos de células Treg (75). De manera interesante, aún no se ha investigado si existen alteraciones en el eje SOCS3/IL-2 en individuos con susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes.

El equilibrio entre la ubiquitinación y la desubiquitinación de muchas proteínas celulares es aceptado como un mecanismo importante para el mantenimiento de la falta de respuesta de LT y la prevención de la autoinmunidad (76). De manera similar a la modificación postraduccional de proteínas de señalización inducida por la fosforilación, la ubiquitinación es un proceso reversible y conservado evolutivamente, importante en la señalización y funciona mediante la unión covalente de las cadenas de monoubiquitina o poliubiquitina a las proteínas blanco para regular su estabilidad, actividad y localización. La ubiquitinación postraduccional puede dar lugar a una degradación proteolítica, así como a resultados no proteolíticos que regulan una amplia gama de funciones celulares críticas, incluida la transcripción de genes y el tráfico de proteínas (77). El proceso de ubiquitinación requiere que la enzima E1 active la ubiquitina (Ub), una enzima E2 que actúe como transferasa y una ligasa E3 que transfiere la Ub a la proteína blanco (78).

Se ha demostrado que miembros de la familia de las Ub ligasas E3 son importantes mediadores moleculares de la anergia de LT (estado de falta de respuesta en LT CD4 inducido tras la activación en ausencia de señales coestimuladoras) y la tolerancia periférica (79–81). Entre ellos, el Gen Relacionado a Anergia en Linfocitos (GRAIL) desempeña un papel funcional importante en la anergia de los LT (82,83). Se ha demostrado que, a diferencia de LT convencionales, las células Treg expresan GRAIL constitutivamente y que su ARN se observa 10 veces incrementado en comparación con los niveles observados en LT convencionales (84). Además, se ha reportado que la expresión forzada de GRAIL en LT es suficiente para la conversión de estas células a un fenotipo regulatorio, aun en ausencia de Foxp3 (83,84). Por otra parte, ratones deficientes en GRAIL fueron resistentes a la inducción de tolerancia inmune y mostraron una mayor

susceptibilidad a enfermedades autoinmunes que los ratones de normales (85). El análisis de las poblaciones de células Treg en ratones deficientes en GRAIL mostró que células Treg deficientes en GRAIL tenían una función supresora reducida, asociada con el aumento de la expresión génica relacionada con las células Th17 (85). Este proceso postraduccional es una reacción reversible en la que la eliminación de los enlaces de Ub está mediada por un proceso igualmente complejo de “desubicitinación”. GRAIL es regulado por dos isoformas de la proteasa Otubaina-1 (OTUB1) (86,87). OTUB1 es una enzima desubicitinante (DUB), la cual se une a GRAIL junto con otra DUB, formando un complejo trimolecular que da como resultado final la degradación de GRAIL por el proteosoma 26S (82). GRAIL y OTUB1 han sido reportadas con importantes roles en anergia de LT convencionales, aunque su función y la regulación de la señalización de IL-2 en células Treg se encuentra poco estudiada. En cuanto a la posible expresión diferencial de GRAIL y OTUB1 en individuos con susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes poco se ha investigado.

Modificación post-traduccional de Foxp3

La expresión y actividad de Foxp3 son también reguladas a nivel proteína. Se han descrito tres modificaciones post-traduccionales de la proteína Foxp3: **acetilación**, **fosforilación** y **ubiquitinación** que afectan la estabilidad y la capacidad de unión de Foxp3 al ADN.

La **acetilación de Foxp3** es requerida para su expresión óptima y control inmune por parte de las Treg (7,88). La acetilación de residuos de lisina por lisina-acetiltransferasas (KATs) produce cambios que estabilizan a Foxp3, evitando su degradación vía proteosoma, mejorando su capacidad de unión al DNA y con ello su función (88,89). Se ha demostrado que Foxp3 interacciona con las KATs TIP60 y p300, aumentando su estabilidad (90). La inhibición o eliminación de p300 en células Treg afecta negativamente su función, mientras que la eliminación de TIP60 en células Treg genera una disminución marcada de los niveles de expresión de Foxp3 y conduce a patologías autoinmunes (90). Citoquinas tales como IL-6, a través de STAT3, inhiben la acetilación de Foxp3 y por lo tanto disminuyen su expresión; mientras que TGF β la favorece aumentando la actividad y/o estabilidad de Foxp3 (91,92). Por el extremo contrario, las lisina-deacetilasas (KDACs) que remueven grupos acetilos afectan la expresión de Foxp3 negativamente (9,88,89). Sirtuina 1 (SIRT1) es una KDAC clase II y

se ha observado que su expresión es inversamente proporcional a Foxp3 durante la diferenciación de iTreg *in vitro* (93). Además, la expresión forzada de SIRT1 en células Treg no sólo lleva a desacetilación de Foxp3, sino que gatilla la rápida poliubiquitinación de Foxp3 y su degradación vía proteosoma (93). La delección específica de SIRT1 en células Treg resulta en una incrementada expresión de Foxp3 y actividad supresora (94).

Otra modificación post-traducciona es la **fosforilación** en residuos de serina y treonina por varias quinasas, como PIM-1, PIM-2 y CDK2 (9,95–97). CDK2 es activada por la señalización vía TCR y fosforila a Foxp3 en el dominio N terminal, afectando negativamente su expresión/función (97). Por otro lado, células Treg deficientes en CDK2 tienen mayor funcionalidad (97,98). PIM2, otra quinasa que fosforila Foxp3 en la porción N terminal, interfiere con la expresión de genes asociados a células Treg y su inhibición incrementa la capacidad supresora de células Treg.

Finalmente, la **ubiquitinación** de residuos lisina es otra modificación post-traducciona por la que Foxp3 sufre degradación proteosoma, afectando su expresión y la estabilidad del fenotipo de células Treg (9,77,99). La ubiquitinación de proteínas, como previamente se mencionó, es un proceso estrechamente regulado por las ligasas E1, E2 y E3 que, en un complejo, catalizan la adición de una Ub inicial a los residuos de lisina de la proteína diana que, después de las adiciones posteriores, forma una cadena de poli-Ub. Las cadenas de Ub marcan una proteína para la degradación por el proteosoma 26S (99). Se ha observado que los estímulos inflamatorios resultan en la degradación de Foxp3 en proteosomas mediada por una UbL E3 activada por señales de estrés denominada STUB1 (100). La expresión de STUB1 se incrementa bajo distintas condiciones *in vitro* (incluyendo IL-1 β , IL-6, TNF- α , LPS y shock de calor), resultando en la poliubiquitinación de Foxp3 y la pérdida de proteína en proteosoma (100). Además, la sobreexpresión de STUB1 disminuye la capacidad funcional de células Treg *in vitro* e *in vivo* y da lugar a células ex-Treg con características Th1 (98).

La desubiquitinación de proteínas es también un proceso estrechamente regulado por enzimas DUBs, las cuales catalizan la eliminación de Ub de sustratos proteicos específicos, que en algunos casos evita la degradación de las proteínas aumentando sus niveles de expresión (9,98). La enzima DUB USP7 es expresada por células Treg e interactúa con Foxp3 para catalizar su desubiquitinación (101). Bajo condiciones inflamatorias USP7 es regulada negativamente en las células Treg, lo cual facilita la degradación de Foxp3 e inhibición de su función supresora (93,102). Estudios recientes han demostrado que la eliminación condicional de USP7 en células Treg de ratones

conduce al desarrollo de autoinmunidad letal con una disminución importante del número de células Treg en órganos linfoides y un fenotipo con características Th1 *in vitro* e *in vivo* (101,102). En conjunto, estos reportes sugieren que la estabilidad de Foxp3 y función de células Treg son reguladas a nivel proteínico por numerosos mecanismos. De manera interesante, aún no se ha investigado si existen alteraciones o expresión diferencial de distintos componentes involucrados en la acetilación, fosforilación y ubiquitinación en células Treg de individuos con susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes.

Inestabilidad y plasticidad de las células Treg

La expresión de Foxp3 y su estabilidad son cruciales para el mantenimiento de la función de células Treg (103). La **inestabilidad** de células tTreg ha sido estudiada exhaustivamente bajo condiciones basales o inflamatorias para determinar cómo ésta afecta el desarrollo y resolución de autoinmunidad (104–106). La pérdida de Foxp3 se ha observado *in vitro* en células tTreg y también luego de la transferencia adoptiva de células Treg a huéspedes linfopénicos (107,108). Se han descrito modelos en los que mediante una proteína reportera fluorescente amarilla se puede seguir a células que alguna vez expresaron Foxp3 (*ex-Foxp3*) (100). En ellos se observó que en condiciones homeostáticas una pequeña proporción de células Treg, aparentemente estables, pierde la expresión de Foxp3 y adquiere un fenotipo de memoria/efectora con diferentes niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ e IL-17 (7,109). Estas células *ex-Foxp3* son capaces de inducir autoinmunidad en modelos de transferencia adoptiva y consisten en una población mixta, sobre la base de su nivel de hipometilación en CNS2, lo que sugeriría que no todas las células *ex-Foxp3* en este modelo fueron una vez células tTreg *bonafide* (109). En otro modelo genético de ratón, se ha demostrado que la mayoría de las tTreg en el bazo y los ganglios linfáticos son relativamente estables en condiciones homeostáticas; sin embargo, al privar a las células de IL-2 o bloquear el R-IL-2 (110), se observa una expresión de Foxp3 sustancialmente disminuida en tTreg y una pequeña población la pierde completamente, sin producir citoquinas inflamatorias. Estos resultados sugieren algún grado de inestabilidad bajo ciertas condiciones del microambiente (109). Debido a que en células Treg aisladas en sitios inflamatorios y células Treg de sangre periférica de pacientes con enfermedades autoinmunes se observan menores niveles de expresión de Foxp3, se requiere de más estudios para identificar los mecanismos y las consecuencias de la disminución de Foxp3 a largo plazo. Mientras que la re-metilación de CNS2 podría ser en parte responsable de la disminución de Foxp3,

también es posible que las modificaciones post-traduccionales antes mencionadas, estén involucradas en la generación de las células *ex-Foxp3*.

La **plasticidad** es una propiedad inherente a todas las células inmunes, que les permite adaptar su fenotipo y función al microambiente cambiante y a señales de “daño” extracelulares. Así, no es sorprendente que las células Treg posean cierto grado de plasticidad (111). Las células Treg tienen la capacidad de adquirir características específicas del tipo de respuesta inmune que controlan, que es impulsada principalmente por factores de transcripción “maestros” y su expresión es regulada por señales del microambiente (4). Las células Treg adquieren expresión del factor de transcripción T-bet para contener la inflamación Th1 durante una infección (42,111); IRF4 y STAT3 para inhibir respuestas Th2 y Th17 respectivamente (112,113). Mientras esta característica de plasticidad parece ser ventajosa y beneficiosa para el resultado de la respuesta inmune, se ha observado una plasticidad aberrante en células Treg en varias enfermedades autoinmunes, con células Treg que expresan citoquinas proinflamatorias adquiriendo un fenotipo similar a LTh con disminución de su función, pero manteniendo la expresión de Foxp3 (114–117). Paradójicamente, estas células Treg similares a LTh utilizan los mismos factores de transcripción usados por las células Treg para inhibir tipos de respuestas inmunes específicas y en la mayoría de los casos, tienen la región CNS2 desmetilada en el locus Foxp3, lo que sugiere que su fenotipo podría ser reversible (4,111). Las investigaciones actuales están centradas en comprender las vías de señalización que impulsan esta plasticidad en enfermedades autoinmunes para aprovecharlas en el tratamiento de enfermedades humanas.

Células Treg en enfermedades autoinmunes

Tal y como se mencionó antes, las células Treg representan una subpoblación de LT fundamental capaz de promover la autotolerancia y balancear procesos inflamatorios exacerbados (2–4,7). Se cree que la deficiencia o disfunción de las células Treg es fundamental para la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes; y por lo tanto es probable que las anomalías funcionales o fenotípicas, el balance relativo entre las células Treg y las células T efectoras (Tef) o los elementos en el microambiente inflamatorio, sean los responsables del fracaso de las células Treg para imponer la tolerancia en estos escenarios (118). Si bien algunos estudios iniciales afirmaron que los pacientes con algunas enfermedades autoinmunes tenían un porcentaje reducido e incluso número absoluto reducido de células Treg en sangre periférica, otros estudios reportaron valores

similares a los hallados en individuos normales (109). Actualmente existe consenso de que en circulación los pacientes con enfermedades autoinmunes tienen números normales de células Treg (109). Además de deficiencias numéricas se han reportado defectos funcionales en prácticamente todas las enfermedades autoinmunes conocidas, como Lupus Eritematoso Sistémico (119–121), Esclerosis múltiple (122,123), Diabetes mellitus tipo 1 (DT1) (124–126), Artritis Reumatoidea (127,128), enfermedad tiroidea autoinmune (129,130), psoriasis (131,132) y enfermedad inflamatoria intestinal (133). Un defecto en los números de células Treg en órganos diana también sería posible, pero difícil de evaluar en el humano (134). Numerosos datos experimentales en pacientes con enfermedades autoinmunes indican que las células Treg podrían tener una función impedida e incluso que las mismas podrían convertirse en células efectoras en respuesta a la inflamación (4,118,135).

Se han propuesto diferentes razones por la que una célula Treg podría tener su función supresora defectuosa en enfermedades autoinmunes (Figura 5) (4):

1. Microambiente: la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 por parte de CPA puede proporcionar una potente señal co-estimuladora para la expansión de las células Tef y hacer que las mismas sean resistentes a la supresión. IL-6 también puede actuar sobre las células Treg y revertir su función supresora o resultar en su conversión a células Th17.

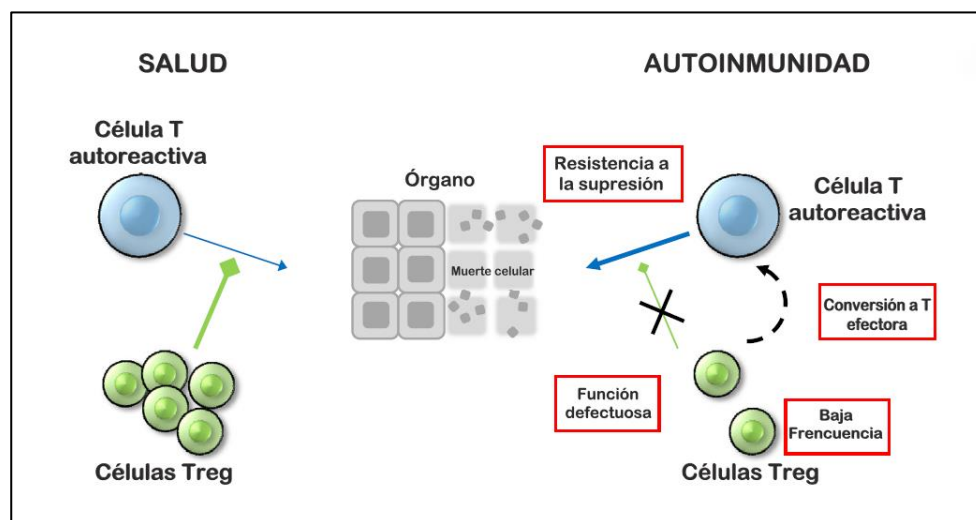


Figura 5: Defectos de células Treg en autoinmunidad. En la salud, las células Treg mantienen la tolerancia al ejercer la supresión de las células T efectoras. En enfermedades autoinmunes específica de órgano, las células Treg no pueden suprimir las células T efectoras autorreactivas, lo que lleva a la muerte de las células diana. Las razones reportadas para esto incluyen números inadecuados de células Treg, capacidad de supresión defectuosa, conversión de células Treg en células efectoras y resistencia de células T efectoras a la supresión mediada por una célula Treg.

2. Resistencia intrínseca de la célula Tef a la supresión.
3. Defectos intrínsecos de células Treg que incluyen generación defectuosa, sobrevida, estabilidad o repertorio de TCR alterado, o bien; defectos específicos en alguno de los mecanismos de supresión propuestos mediados por las células Treg

El estudio de las células Treg en autoinmunidad ha sido facilitado en gran manera gracias a la existencia de modelos murinos para muchas enfermedades autoinmunes. En diferentes modelos experimentales de autoinmunidad, se ha demostrado claramente que las células Treg influyen en el desarrollo y la progresión de la enfermedad (7,134). La mayoría de los datos obtenidos por ejemplo en pacientes con DT1 son de sangre periférica, debido a la imposibilidad de obtener muestras de páncreas, por lo que se desconoce si las células Treg desempeñan un papel activo en la limitación de la destrucción de las células β o tienen un fenotipo alterado en los islotes durante el curso de la enfermedad. Por lo tanto, los modelos de ratón de DT1 se han empleado para investigar la progresión de la enfermedad en el microentorno del islote (136). El modelo más utilizado para DT1 es el modelo de ratón NOD, una cepa identificada en Japón hace más de 35 años en una colonia consanguínea (137); y se ha convertido en una herramienta valiosa para diseccionar la patogenia de la DT1.

Los ratones NOD desarrollan espontáneamente diabetes autoinmune a partir de ~10 semanas de edad en las hembras y con una incidencia creciente con el tiempo hasta 25 semanas (138). Tanto el inicio como la progresión de la diabetes se retrasan en los ratones NOD machos, lo que podría deberse a diferencias en el microbioma intestinal entre hembras y machos como consecuencia de diferencias hormonales (139). Otros factores ambientales, incluidas las condiciones de vivienda y la dieta, también pueden afectar el desarrollo de la diabetes autoinmune (138). Análisis genéticos han identificado locus genéticos de susceptibilidad en ratones NOD que se conocen como *locus de diabetes dependiente de insulina (Idd)*. Se han identificado más de 40 *locus Idd* y tanto en ratones NOD como en humanos, el factor genético más importante que contribuye a la susceptibilidad de DT1 es el CMH, conocido como *Idd1* en ratones (IDDM1 en humanos) (140,141). La región *Idd3* contiene genes que codifican para IL-2 e IL-21 (142) y se ha demostrado que ratones B6 que expresen *Idd3* derivado de ratones NOD poseen niveles reducidos de IL-2 (143,144). Entre los *locus Idd* que se asocian a susceptibilidad en diabetes también se encuentran aquellos que codifican para insulina y CTLA-4, todas

moléculas que se han propuesto como contribuyentes al quiebre de la tolerancia central y/o periférica (136,138,143,145).

Es importante remarcar que la cepa de ratones NOD es además genéticamente predispuesta a desarrollar con la edad diferentes enfermedades autoinmunes como tiroiditis autoinmune, sialiditis autoinmune, prostatitis autoinmune, etc.; enfermedades que se extienden más allá de la diabetes autoinmune extensamente estudiada en esta cepa (146–149). Se ha sugerido que esta mayor predisposición a desarrollar autoinmunidad podría ser debida al menos en parte a defectos en las células Treg. En este modelo animal se ha reportado que la depleción experimental de células Treg, debido a la deficiencia de *Foxp3* se relaciona con una enfermedad más agresiva y acelerada, mientras que la transferencia de células Treg tiene efectos protectores (150).

Se ha demostrado que, en comparación con las cepas B6, BALB/c y otras, la cepa NOD es más susceptible al desarrollo de tiroiditis inducida por inmunización, prostatitis inducida por inmunización y colitis inducida por administración de dextrano (146,147,151). Curiosamente, en todas las situaciones autoinmunes o inflamatorias en las que esta cepa de ratones muestra una susceptibilidad elevada, se observa un rol patogénico de LTh1 (151–154). Por otro parte, se sabe ampliamente que los ratones B6 y BALB/c expresan diferentes respuestas inmunes en estados normales y patológicos. Estos fenómenos se pueden relacionar con las diferencias inter-cepas en su *background* genético (155). Por ejemplo, ratones B6 son más susceptibles que ratones BALB/c a la inducción experimental de enfermedades autoinmunes órgano específicas tales como miastenia gravis autoinmune experimental (156) y uveítis autoinmune experimental (157). A diferencia de ratones B6, ratones de la cepa BALB/c desarrollan preferencialmente respuestas de tipo Th2 y muestran incrementada susceptibilidad a infecciones parasitarias, alta incidencia al desarrollo de tumores (incluyendo tumores de colon y de glándulas mamarias) (158) y parecen ser resistentes a la inducción de enfermedades autoinmunes comparado a ratones de las cepas NOD y B6 (159). El estudio comparativo entre cepas del número y/o funcionalidad de células Treg podría ayudar a comprender si las diferencias observadas en susceptibilidad a la infección, la tumorigénesis y/o autoinmunidad están relacionadas a este punto. Sería interesante además avanzar en el análisis comparativo de distintas subpoblaciones, capacidad funcional y estabilidad de células Treg en las distintas cepas.

Desde un punto de vista funcional, existen grandes discrepancias entre los antecedentes disponibles hasta el momento y varios grupos han demostrado defectos

leves en ensayos clásicos de funcionalidad *in vitro* de células Treg de NOD, aunque otros estudios no encontraron estos defectos (124,160–163) Se ha demostrado además que las células Foxp3⁺ de la cepa NOD tienen reducida expresión de CD25 (164). En trabajos en los que se analizó la vía de señalización de IL-2 en células Treg de ratones NOD se observó una menor señalización de IL-2 (165–167). Algunos investigadores observaron deficiencias en células Treg en todos los órganos linfoides y a diferentes tiempos en el curso de la diabetes, mientras que otros solo detectaron una caída en los niveles de células Treg en páncreas y ganglios linfáticos pancreáticos al momento del desencadenamiento de la enfermedad (168). Otros autores demostraron igual número y frecuencia de células Treg en la cepa NOD y B6 (136). Otra posibilidad que también ha sido investigada y demostrada es la presencia de células Tef más patogénicas y/o células Tef resistentes a la supresión ejercida por células Treg (163).

A pesar de la gran variedad de estudios realizados en esta cepa de ratón hasta el momento, aún existen numerosos aspectos que permanecen sin abordar y que han sido el foco de estudio del presente de trabajo de tesis. A la luz de los últimos hallazgos y los numerosos factores que participan en la estabilidad de las células Treg y en el mantenimiento de la expresión de Foxp3, es posible que en ratones con susceptibilidad a desarrollar autoinmunidad existan alteraciones en alguno de los mecanismos antes citados. Las respuestas a estas preguntas indudablemente mejorarán el diseño de las opciones terapéuticas específicas de células Treg para pacientes con enfermedades autoinmunes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos expuestos la hipótesis del presente trabajo de tesis es que en la cepa de ratones NOD, una cepa con predisposición al desarrollo de procesos autoinmunes, existen alteraciones en la cantidad y/o funcionalidad de células Treg o en subpoblaciones particulares de células Treg. Postulamos que también existen defectos en la regulación de la señalización del R-IL-2 o alteraciones en la regulación de Foxp3 a nivel transcripcional y/o a nivel proteína; que lleven a la existencia de células Treg menos estables y/o menos funcionales en periferia.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Analizar las características cuantitativas, cualitativas, funcionales y de estabilidad de células Treg provenientes de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad, mediante un estudio comparativo en las cepas NOD, B6 y BALB/c.

Objetivos específicos:

- I. Estudiar si la mayor susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad observada en ratones de la cepa NOD, se relaciona con alteraciones en la cantidad de células Treg o de distintas subpoblaciones de células Treg y/o alteraciones fenotípicas de células Treg presentes en distintos órganos linfáticos.
- II. Evaluar si la mayor susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad observada en ratones de la cepa NOD, se relaciona a alteraciones en la funcionalidad y activación *in vitro* de las células Treg luego de un estímulo vía TCR/co-estímulo en presencia o ausencia de IL-2.
- III. Analizar si la mayor susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad observada en ratones de la cepa NOD, se relaciona a alteraciones en la vía de señalización y regulación del R-IL-2 y/o factores que participan en la regulación de Foxp3 a nivel transcripcional y a nivel proteína.

RESULTADOS

I. Análisis cuantitativo y cualitativo de células Treg en ratones con diferente susceptibilidad a autoinmunidad en condiciones basales

En el presente trabajo de tesis realizamos un estudio comparativo en 3 cepas de ratones tales como NOD, B6 y BALB/c que de acuerdo con bibliografía poseen diferente susceptibilidad a desarrollar autoinmunidad (146,147,151). En todos los análisis realizados en este trabajo de tesis los animales fueron estudiados sin ningún tratamiento previo, es decir, en condiciones basales a la edad de 4-6 semanas para asegurarnos que los ratones de la cepa NOD no tuvieran ningún signo de autoinmunidad, logrando de esta manera que el estudio fuera comparable entre las cepas en estudio.

Análisis del número y proporción de células Treg en ratones de la cepa NOD, B6 y BALB/c en órganos linfoides en condiciones basales

Como primera aproximación a la caracterización de la población de células Treg en las cepas estudiadas, se analizaron muestras obtenidas a partir de diferentes órganos linfoides secundarios tales como bazo, pool de ganglios linfáticos axilares e inguinales (GLp), ganglios linfáticos mesentéricos (GLm), Ganglios linfáticos pancreáticos (GLpc) y placas de Peyer con el fin de determinar la proporción y valor absoluto de células Treg ($CD4^+Foxp3^+CD25^+$) mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura 6, ratones de la cepa NOD mostraron menor proporción de células $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ en bazo, GLp, GLm y GLpc con respecto a la cepa BALB/c; mientras que no se encontraron diferencias entre cepas en las placas de Peyer (Figura 6A y 6B). En GLp y GLpc se observó, además, que ratones de la cepa NOD tenían menor proporción de células Treg comparado a la cepa B6. En análisis comparativos del número total de células Treg en los distintos órganos de las 3 cepas se encontró que ratones de la cepa NOD tenían menor número absoluto de células Treg comparado a la cepa BALB/c en todos los órganos analizados (Figura 6C). En GLpc, ratones NOD mostraron menor número de células Treg incluso con respecto a la cepa B6 (Figura 6C).

Además de estudiar la proporción y los valores absolutos de células Treg, analizamos el nivel de expresión de Foxp3 en las células Treg de las 3 cepas en estudio por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 7A y 7B, células Treg que provenían de ratones de la cepa NOD mostraron menor nivel de expresión de Foxp3 con

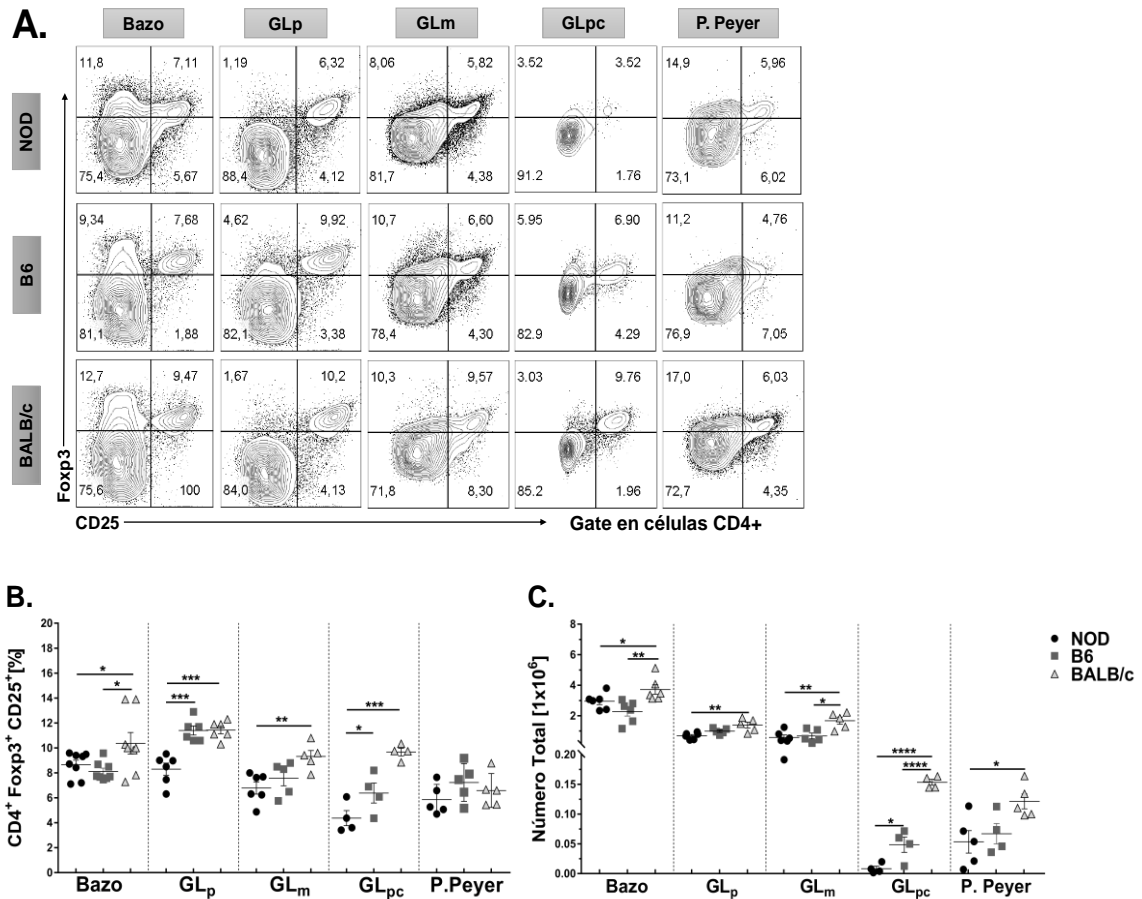


Figura 6: Frecuencia y Número Absoluto de células T regulatorias obtenidas de diferentes órganos linfáticos secundarios de ratones NOD, B6 y BALB/ c. **A).** Gráficos de contorno de citometría de flujo representativos de células mononucleares (CMNs) de bazo, pool de ganglios linfáticos axilares e inguinales (GLp), ganglios linfáticos mesentéricos (GLm), ganglios linfáticos pancreáticos (GLpc) y placas de Peyer (P. Peyer), que muestran la frecuencia de células Treg (Fxp3⁺ CD25⁺). Los valores en los gráficos representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de al menos 4 experimentos independientes con resultados similares. **B-C).** Gráficos que muestran la proporción (**B**) y el número total (**C**) de Treg (CD4⁺ Fxp3⁺ CD25⁺) en los distintos órganos bajo estudio para las 3 cepas, donde cada punto corresponde a una determinación individual. Los datos se muestran como la media ± SEM (error estándar de la media), n= 4-8 según el órgano; y son representativos de al menos 4 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

respecto a la cepa BALB/c en todos los órganos analizados, excepto en GLpc. En GLp se observó menor nivel de expresión de Fxp3 en células Treg de ratones NOD también en comparación a células Treg de ratones B6 (Figura 7B). La expresión de Fxp3 también fue analizada a nivel de ARNm por PCR en tiempo real normalizado a un gen endógeno (Figura 7C). Para ello, el ARN fue extraído a partir de células Treg esplénicas purificadas mediante *cell sorting* como CD4⁺ CD25^{hi}, obteniendo esta población con una pureza >97% (Fxp3⁺). Como se muestra en la Figura 7C, células Treg de ratones de la cepa NOD y B6 presentaron menor expresión de ARN para Fxp3 comparado a la cepa BALB/c.

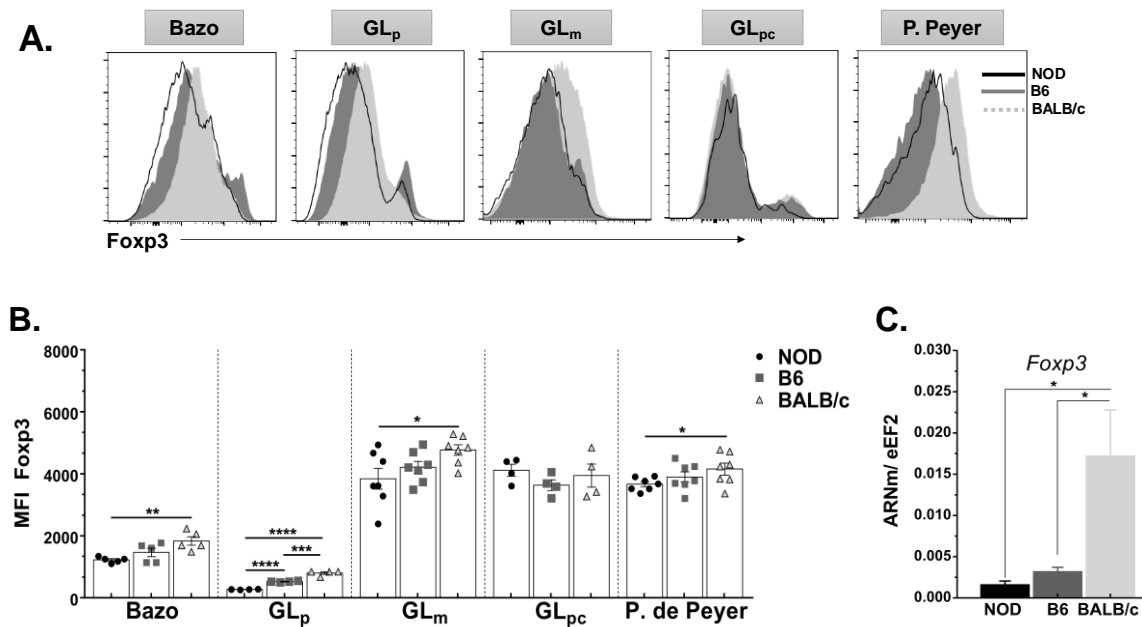


Figura 7: Nivel de expresión de Foxp3 en Treg obtenidas de distintos órganos linfáticos, en ratones de las 3 cepas estudiadas en condiciones basales. **A).** Histogramas de citometría de flujo representativos del nivel de expresión de Foxp3 en células T CD4⁺ viables de bazo, GL_p, GL_m, GL_{pc} y P. de Peyer. El análisis es representativo de al menos 4 experimentos independientes con resultados similares. **B).** Gráfico de barras que muestra los valores de MFI para Foxp3 en la población de células CD4⁺Foxp3⁺ de los órganos analizados en las 3 cepas en estudio, donde cada punto corresponde a una determinación individual. **C).** Expresión de *Foxp3* en Treg purificadas de bazo de las 3 cepas. Los valores representan la expresión relativa de Foxp3 en función a eEF2 (control endógeno) y fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n= 4-7 según el órgano; y son representativos de al menos 4 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

La proporción de células Treg también fue evaluada en Timo, importante órgano linfático primario donde se origina esta población (Figura 8). Ratones de la cepa NOD mostraron menor frecuencia de células Treg CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ en comparación con la cepa BALB/c (Figura 8A y 8B), mientras que el número total de células Treg hallado fue significativamente menor que los hallados para las cepas B6 y BALB/c (Figura 8C). El análisis de la expresión de Foxp3 y CD25 en Timo no mostró diferencias significativas entre las cepas evaluadas (Figura 8 D-F).

Estos resultados demuestran que ratones de la cepa NOD presentan menor número de células Treg y menor expresión de Foxp3 en la mayoría de los órganos linfáticos secundarios analizados.

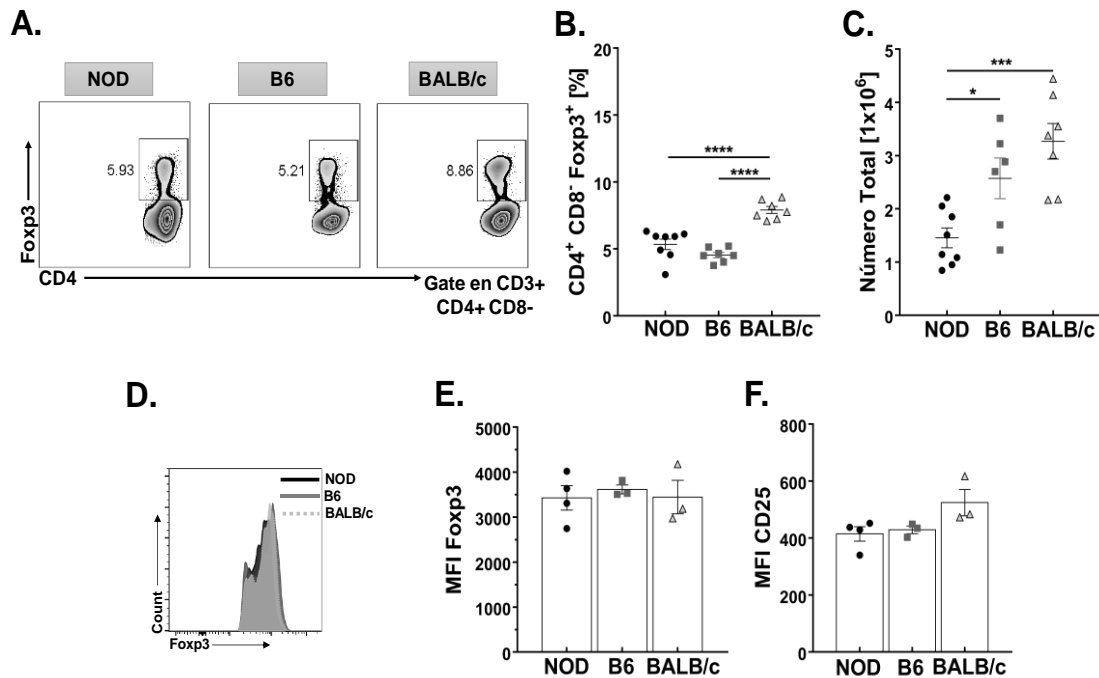


Figura 8: Frecuencia y Número absoluto de células Treg en Timo de ratones NOD, B6 y BALB/c.
A). Gráfico de contorno de citometría de flujo que muestra la frecuencia de células Treg en timo ($CD4^+ Fcpx3^+$). Los valores mostrados en el gráfico representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B-C).** Gráficos que muestran la proporción (**B**) y el número total (**C**) de Treg ($CD4^+ CD8^- Fcpx3^+$) en timo de las distintas cepas de ratones bajo estudio. Cada punto de los gráficos corresponde a una determinación individual. **D).** Histograma de citometría de flujo representativo del nivel de expresión de Fcpx3 en timocitos $CD4^+ CD8^-$ de ratones NOD, B6 y BALB/c. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **E-F).** Gráfico de barras que muestra MFI para Fcpx3 (**E**) y CD25 (**F**) en timocitos $CD4^+ CD8^-$. Los datos se muestran como la media \pm SEM, $n= 4-8$ según la cepa; y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ fueron considerados estadísticamente significativos

Análisis de subpoblaciones de células Treg en órganos linfoides de ratones NOD, B6 y BALB/c

Las células Treg constituye una población sumamente heterogénea, así, es posible encontrar distintos subtipos en diferentes tejidos y exhibiendo capacidades funcionales únicas (4,9,16). Como se mencionó previamente la expresión del factor de transcripción Helios ha sido postulada como un indicador para distinguir células Treg de origen tímico (tTreg) y de las células Treg de origen periférico (pTreg). Con el objetivo de determinar el origen de las células Treg en órganos linfoides periféricos de las diferentes cepas bajo estudio, se realizó una inmunomarcación para evaluar la proporción y número total de células $Fcpx3^+ Helios^+$ (tTreg) y $Fcpx3^+ Helios^-$ (pTreg) (Figura 9). En concordancia con la bibliografía, más del 70% de las células Treg halladas en bazo fueron positivas para Helios, es decir de origen tímico; sin encontrar diferencias significativas entre cepas

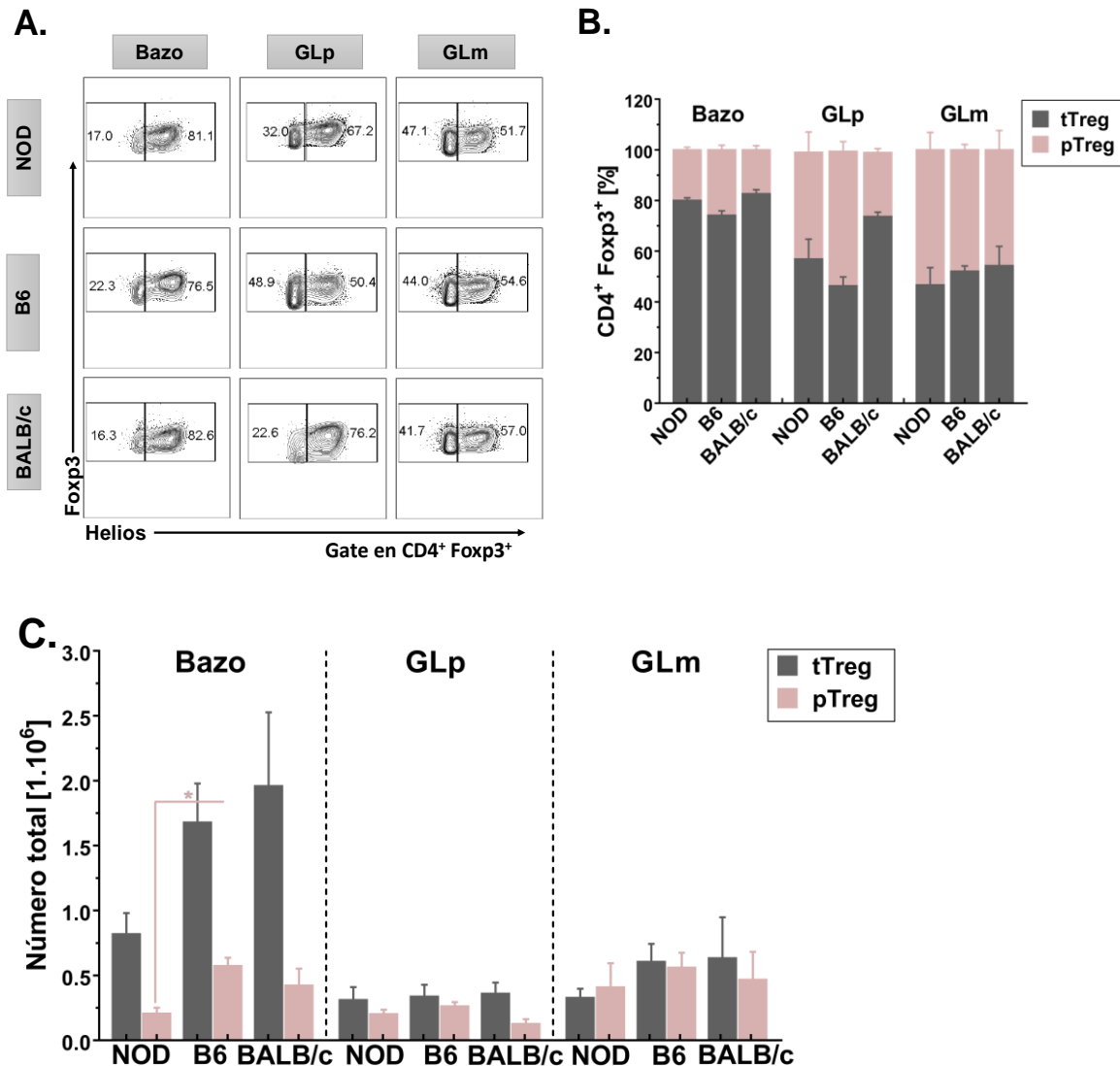


Figura 9: Frecuencia y Número Absoluto de células T regulatorias Helios⁺ (tTreg) y Helios⁻ (pTreg) en órganos linfoides periféricos de ratones NOD, B6 y BALB/c. A). Gráficos de contorno de citometría de flujo que muestran la frecuencia de células Fop3⁺ Helios⁺ y Fop3⁺ Helios⁻ a partir de un gate en la población de células CD4⁺Fop3⁺ de bazo, GLp y GLm. Los valores mostrados en los gráficos representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes. **B).** Gráfico de composición que muestra la proporción de tTreg y pTreg en bazo, GLp y GLm para las 3 cepas bajo estudio. **C)** Gráfico de barras que muestra el número absoluto de tTreg y pTreg en bazo, GLp y GLm de las 3 cepas bajo estudio. Los datos se muestran como la media ± SEM, n= 4; y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valor de * p< 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

(Figura 9A y 9B). Las proporciones de pTreg fueron mayores en los GLm, sitio donde existen niveles elevados de TFG-β e importante inducción de pTreg *in vivo*; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre cepas. En GLp se observó menor proporción de tTreg en la cepa NOD y B6 con respecto a la cepa BALB/c (Figura 9A y 9B). Por último, ratones de la cepa NOD mostraron menor número absoluto de pTreg en bazo con respecto

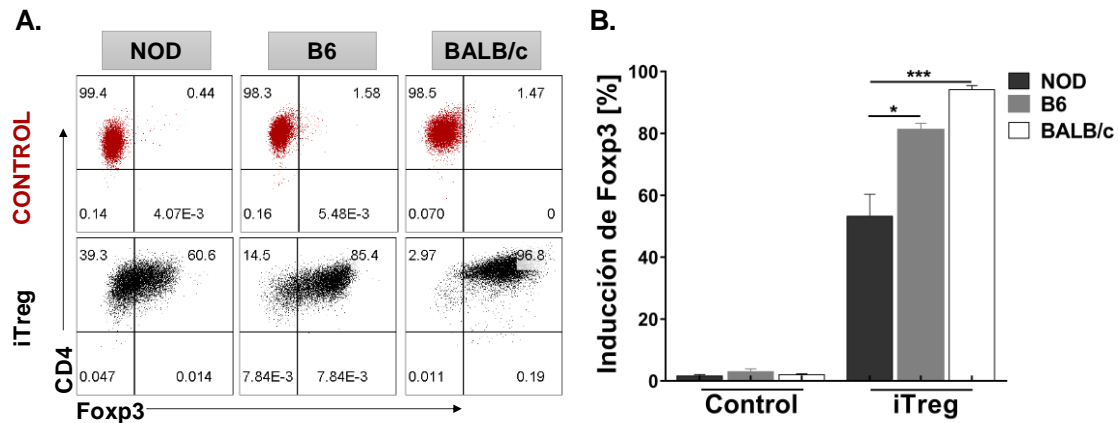


Figura 10: Inducción *in vitro* de células Treg a partir de LT CD4 convencionales vírgenes en las 3 cepas bajo estudio en condiciones basales. LT CD4⁺CD25⁻ vírgenes fueron purificados a partir de CMNs de bazo de ratones de la cepa NOD, B6 y BALB/c mediante perlas magnéticas y posterior *cell sorting*. La población obtenida fue cultivada durante 5 días en presencia de medio condicionado (anti-CD3/CD28 + rTGF- β + rIL-2) (iTreg) o sólo en medio de cultivo (Control) y el porcentaje de inducción de Foxp3 fue determinado mediante citometría de flujo. **A)** Gráficos de puntos de citometría de flujo representativos de la frecuencia de células iTreg (CD4⁺Foxp3⁺) para las 3 cepas luego del cultivo durante 5 días en presencia o no de medio condicionado. El análisis es representativo de al menos 5 experimentos independientes con resultados similares **B)** Gráfico de barras que muestra el porcentaje de inducción de Foxp3 en presencia o no de medio condicionado luego de 5 días de cultivo en las 3 cepas bajo estudio. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos se muestran como la media \pm SEM y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

a la cepa B6, mientras que para el resto de los órganos analizados no se hallaron diferencias relevantes entre cepas en el número total (Figura 9C).

Las células Treg también pueden ser inducidas *in vitro* a partir de LT CD4⁺ vírgenes mediante estimulación vía TCR y el agregado de IL-2 y TGF β (20,24). Estas células Treg han sido denominadas células Treg inducidas *in vitro* o iTreg. Para conocer si la capacidad de inducción *in vitro* de células Foxp3⁺ se encontraba alterada en ratones de la cepa NOD, se purificaron a partir de bazo células CD4⁺CD25⁻ (definidas por bibliografía como LT convencionales con fenotipo virgen) y las mismas fueron incubadas durante 5 días en presencia o no de anticuerpos anti-CD3/CD28 más IL-2 y TGF- β recombinantes (medio condicionado) según se detalló en Materiales y métodos. El análisis de la inducción de Foxp3 se muestra en la Figura 10. Como se puede observar, el estímulo con medio condicionado indujo la expresión de Foxp3 en los cultivos de las 3 cepas en estudio. Sin embargo, cultivos de linfocitos purificados de ratones NOD mostraron menor proporción de células Foxp3⁺ cuando se comparó con los valores hallados en cultivos de las otras cepas (Figura 10B). Al

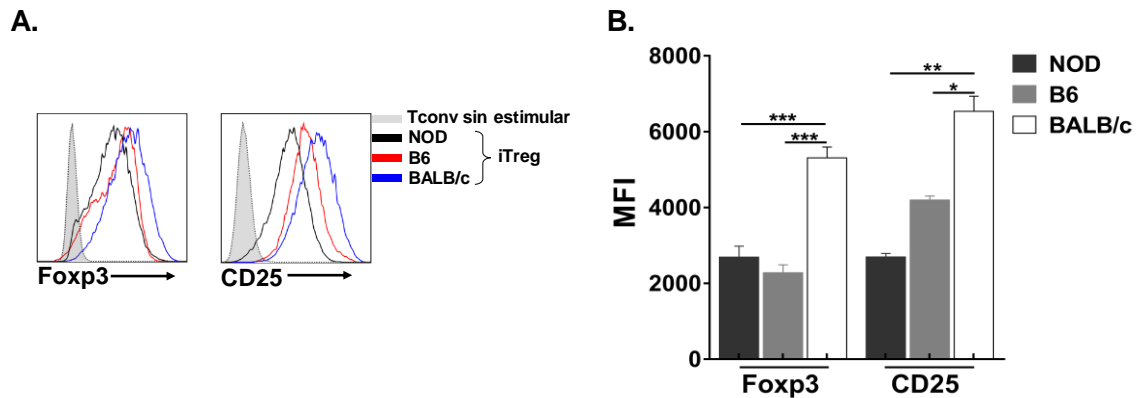


Figura 11: Nivel de expresión de Foxp3 y CD25 en iTreg obtenidas a partir de LT convencionales CD4 vírgenes de ratones NOD, B6 y BALB/c. **A).** Histogramas de citometría de flujo representativos del nivel de expresión de Foxp3 y CD25 en la población de células CD4⁺Foxp3⁺ para las cepas NOD, B6 y BALB/c. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B).** Gráfico de barras con valores de MFI para Foxp3 y CD25 en iTreg de bazo. Los datos se muestran como la media \pm SEM y son representativos de al menos 4 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos

analizar el nivel de expresión de Foxp3 y CD25 en las iTreg de las 3 cepas se observó menor expresión de estas moléculas en iTreg de la cepa NOD con respecto a la cepa BALB/c (Figura 11).

Teniendo en cuenta la heterogeneidad de las células Treg y con el objetivo de analizar si existía alguna diferencia en otros subtipos de células Treg, nos propusimos estudiar la proporción de subtipos de células Treg *virgen/central* (*vTreg*) y de *memoria/efectora* (*emTreg*) en las 3 cepas en estudio por citometría de flujo, usando como marcadores las moléculas de superficie CD62L y CD44 para definir las. Como se puede observar en la Figura 12 en bazo de ratones B6 y BALB/c las *vTreg* (Foxp3⁺CD62L⁺CD44⁻) se encontraban en mayor proporción que las *emTreg* (Foxp3⁺CD62L⁻CD44⁺), mientras que ratones de la cepa NOD mostraban menor proporción de *vTreg* y mayor proporción de *emTreg* con respecto a las otras cepas (p valor $< 0,0001$) (Figura 12A y 12B). Por el contrario, en los GLp y GLm la proporción de estas subpoblaciones de células Treg se encontraban de forma inversa, observándose mayor proporción de *emTreg* que de vírgenes en todas las cepas estudiadas. En GLp la cepa NOD mostró menor proporción de *vTreg* y una mayor proporción de *emTreg* con respecto a la cepa B6 (p valor $< 0,01$), sin encontrar diferencias entre cepas en los GLm.

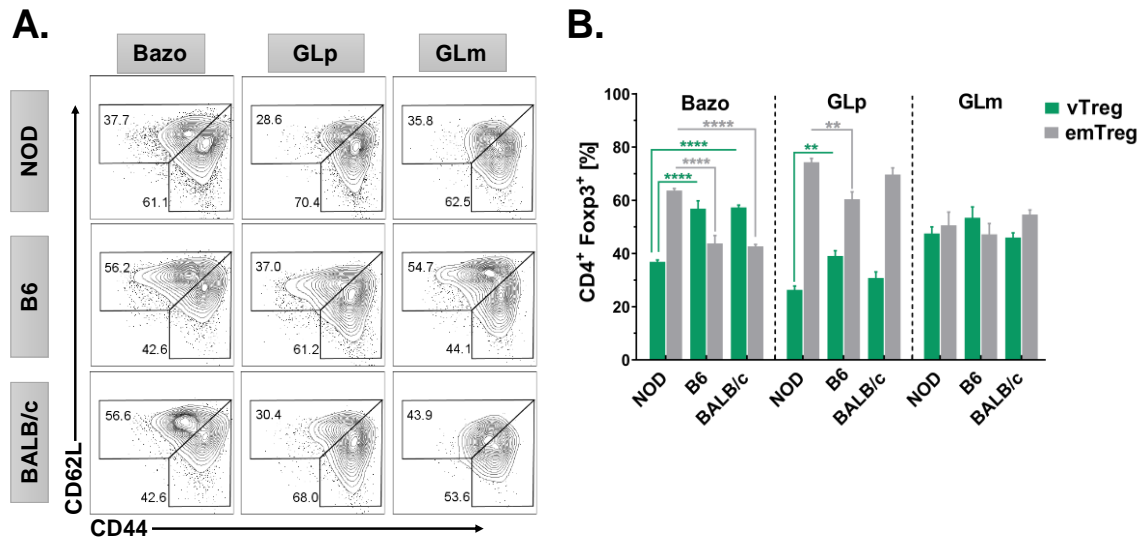


Figura 12: Proporción de subtipos de Treg virgen/central y memoria/efectora en órganos linfoides secundarios de ratones NOD, B6 y BALB/c. **A)** Gráficos de contorno de citometría de flujo representativos que muestran la frecuencia de células Treg Foxp3⁺CD62L⁺CD44⁻ (vTreg) y Foxp3⁺CD62L⁻CD44⁺ (emTreg) en CMNs de bazo, GLp y GLm de ratones de las 3 cepas. Los valores mostrados en los gráficos representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. n= 6. **B).** Gráfico de composición que muestra la proporción de emTreg y vTreg en bazo, GLp y GLm para las 3 cepas bajo estudio. Los datos se muestran como la media± SEM, n=6; y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos. **vTreg:** Treg vírgenes; **emTreg:** Treg memoria/efectora.

Análisis comparativo de marcadores fenotípicos de células Treg en ratones NOD, B6 y BALB/c

Analizamos además si existían diferencias fenotípicas en la población de células Treg en las 3 cepas en estudio. Para ello realizamos un análisis comparativo de la expresión de diferentes moléculas que intervienen en la función efectora de una célula Treg como lo son las moléculas CD25, CTLA-4, GITR, NRP-1, LAP-1, CD73, CD39, PD-1, PDL-1 y TIGIT (Figura 13). El análisis del fenotipo de células Treg esplénicas arrojó menor expresión de CD25 en la cepa NOD con respecto a las demás cepas analizadas, sin hallar diferencias entre cepas en la expresión de CTLA-4, GITR, LAP-1, CD39 y PD-L1; mientras que se observó menor expresión de TIGIT en la cepa BALB/C con respecto a las demás cepas (Figura 13 A-B). En GLp se observó menor expresión de CD25, LAP-1, CD39 y PD-1 en células Treg de la cepa NOD con respecto a las demás cepas y sin diferencias entre cepas en la expresión de CTLA-4, NRP-1, GITR, PD-L1 y TIGIT (Figura 14 A-B). En el caso particular de la ectoenzima CD73, tanto en bazo como en GLp se observó que la cepa B6 presentaba mayor expresión con respecto a las demás cepas (Figura 13B y 14B). Por otro lado, se realizaron análisis comparativos para determinar la frecuencia de células Treg que expresaban las moléculas mencionadas con

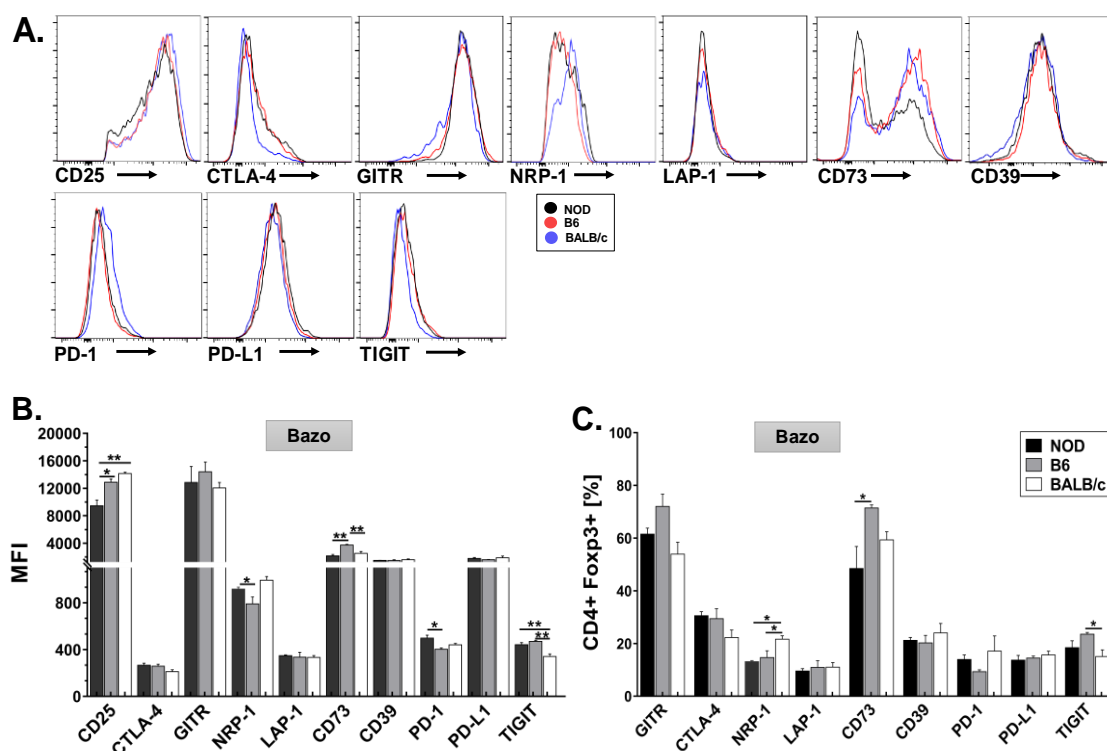


Figura 13. Expresión de moléculas relacionadas a la funcionalidad de una célula T regulatoria en bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c en condiciones basales. **A).** Histogramas de citometría de flujo representativos, que muestran el nivel de expresión de las moléculas CD25, CTLA-4, GITR, NRP-1, LAP-1, CD73, CD39, PD-1, PD-L1 y TIGIT en la población de células CD4⁺ de bazo. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B).** Gráfico de barras que muestra los valores de MFI para las distintas moléculas analizadas en (A) en la población de células CD4⁺Foxp3⁺. **C).** Gráfico de barras que muestra la frecuencia de Treg CTLA-4⁺, GITR⁺, NRP-1⁺, LAP-1⁺, CD73⁺, CD39⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺ y TIGIT⁺ de bazo para las 3 cepas bajo estudio. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3-4 según la cepa; y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

anterioridad en los distintos órganos en estudio (Figura 13C y 14C). El análisis de la proporción de células Treg esplénicas no mostró diferencias relevantes entre cepas observándose solo menor proporción de células Treg Foxp3⁺NRP-1⁺ en la cepa NOD y B6 con respecto a ratones BALB/c (Figura 13C), mientras que en GLp se observó menor frecuencia de células Treg Foxp3⁺NRP-1⁺, Foxp3⁺LAP-1⁺, Foxp3⁺CD39⁺ y Foxp3⁺PD-1⁺ en ratones NOD con respecto a las demás cepas (Figura 13C).

El estudio del fenotipo también fue realizado en las iTreg de las tres cepas y se muestra en la Figura 15. Como se puede observar, luego de 5 días de cultivo en presencia de medio condicionado, iTreg de la cepa NOD mostraron menor expresión de CTLA-4, LAP-1, CD39, PD-L1 y LAG-3 que iTreg de la cepa BALB/c (Figura 15 A-B). Además de expresar marcadores fenotípicos involucrados en la función efectora, se ha descrito que las células Treg también expresan receptores de quimiocinas o *homing*, que están

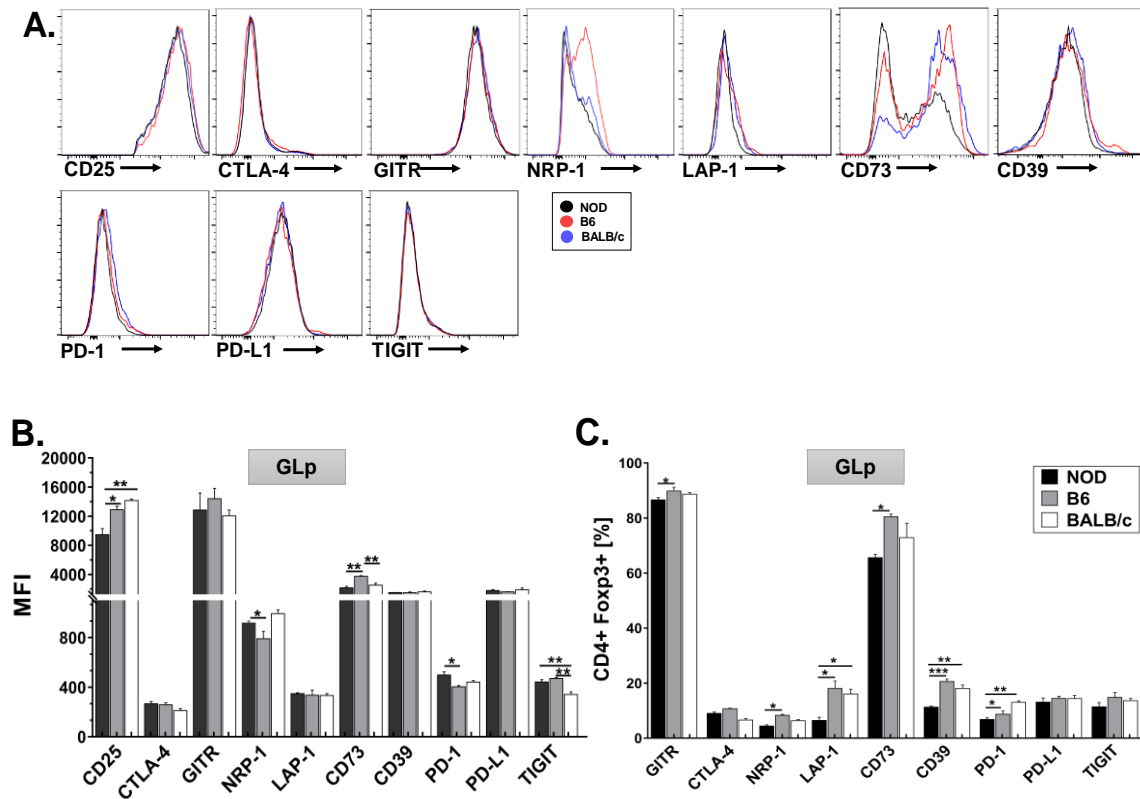


Figura 14. Expresión de moléculas relacionadas a la funcionalidad de una célula T regulatoria en ganglios linfáticos de ratones NOD, B6 y BALB/c en condiciones basales. A). Histogramas de citometría de flujo representativos, que muestran el nivel de expresión de las moléculas CD25, CTLA-4, GITR, NRP-1, LAP-1, CD73, CD39, PD-1, PD-L1 y TIGIT en la población de células CD4⁺ de GLp de las 3 cepas en estudio. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. B). Gráfico de barras que muestra MFI para las distintas moléculas analizadas en (A). C). Gráfico de barras que muestra la frecuencia de Treg CTLA-4⁺, GITR⁺, NRP-1⁺, LAP-1⁺, CD73⁺, CD39⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺ y TIGIT⁺ en GLp para las 3 cepas bajo estudio. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3-4 según la cepa; y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

implicados en el reclutamiento de estas en diferentes entornos inmunológicos (15). Con el propósito de determinar si existía expresión diferencial de receptores de quimiocinas entre las cepas en estudio, se tomaron muestras de bazo y pool de ganglios linfáticos de las tres cepas, y se determinó la expresión de CXCR3, CCR5, CCR6 en células Treg por citometría de flujo. El análisis de la proporción y expresión de CXCR3, CCR5 y CCR6 se muestra en la Figura 16. En la Figura 16A y 16B se puede observar que en bazo no se encontraron diferencias significativas entre cepas en la proporción de células Treg CXCR3⁺, mientras que en GLp ratones de la cepa NOD mostraron menor proporción de células Treg CXCR3⁺ con respecto a las demás cepas. La proporción de células Treg CCR5⁺ en bazo y GLp fue menor en ratones de la cepa de NOD, mientras que no se hallaron diferencias relevantes en la proporción de células Treg CCR6⁺ entre la cepa NOD

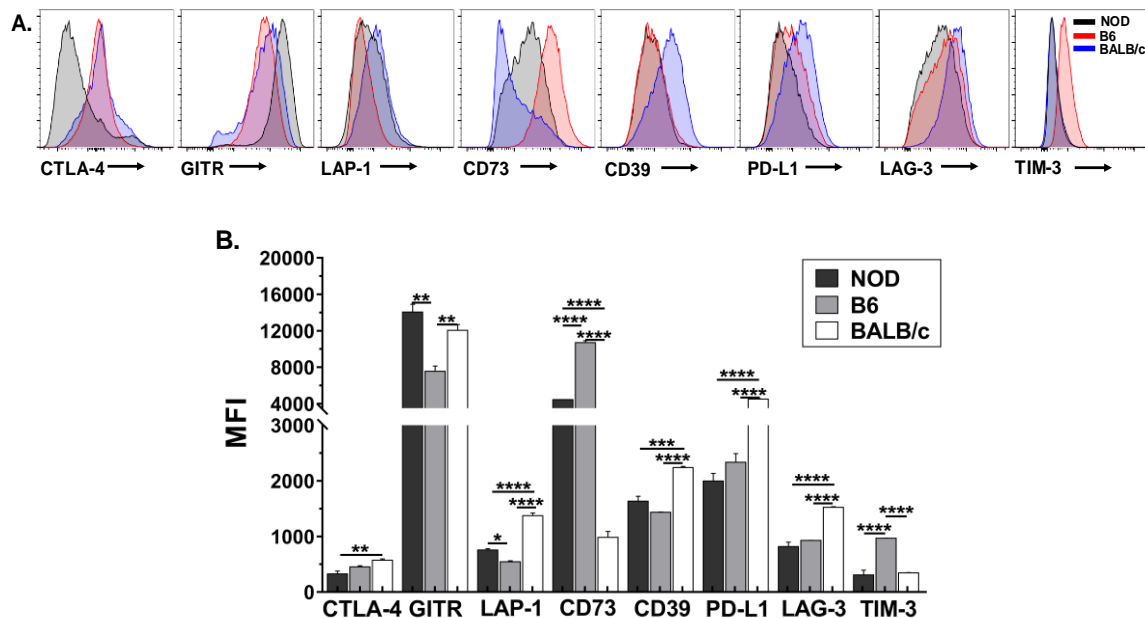


Figura 15. Nivel de expresión de moléculas involucradas en la función en Treg inducidas *in vitro* a partir de linfocitos CD4⁺ vírgenes de ratones NOD, B6 y BALB/c. **A.** Histogramas de citometría de flujo representativos, que muestran el nivel de expresión de las moléculas CTLA-4, GITR, LAP-1, CD73, CD39, PD-L1, LAG-3 y TIM-3 en células iTreg CD4⁺Foxp3⁺ de bazo de las 3 cepas en estudio. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B.** Gráficos de barras que muestran MFI para las distintas moléculas analizadas en (A). Los datos se muestran como la media ± SEM, n=3-4 según la cepa; y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001; **** p< 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

y las demás cepas en estudio en los órganos analizados (Figura 16B). En cuanto a la expresión de estos marcadores, no se hallaron diferencias en el nivel de expresión de CXCR3 en células Treg esplénicas de las cepas en estudio. La expresión de CCR5 y CCR6 fue menor en células Treg esplénicas de ratones NOD. En GLp no se encontraron diferencias entre cepas en la expresión de los distintos receptores analizados (Figura 16C).

En resumen, el análisis de las proporciones, valores absolutos y características fenotípicas de células Treg de ratones NOD en comparación con las células Treg de las cepas B6 y BALB/c nos permite concluir que los ratones NOD tienen:

- ✓ Menor proporción y número absoluto de células Treg en órganos linfoides secundarios y en timo
- ✓ Menor expresión de Foxp3 en células Treg de órganos linfoides secundarios
- ✓ Menor proporción de tTreg en periferia
- ✓ Menores niveles de expresión de CD25 en bazo y GLp
- ✓ Menor frecuencia de células Treg LAP-1⁺, CD39⁺ y PD-1⁺ en GLp

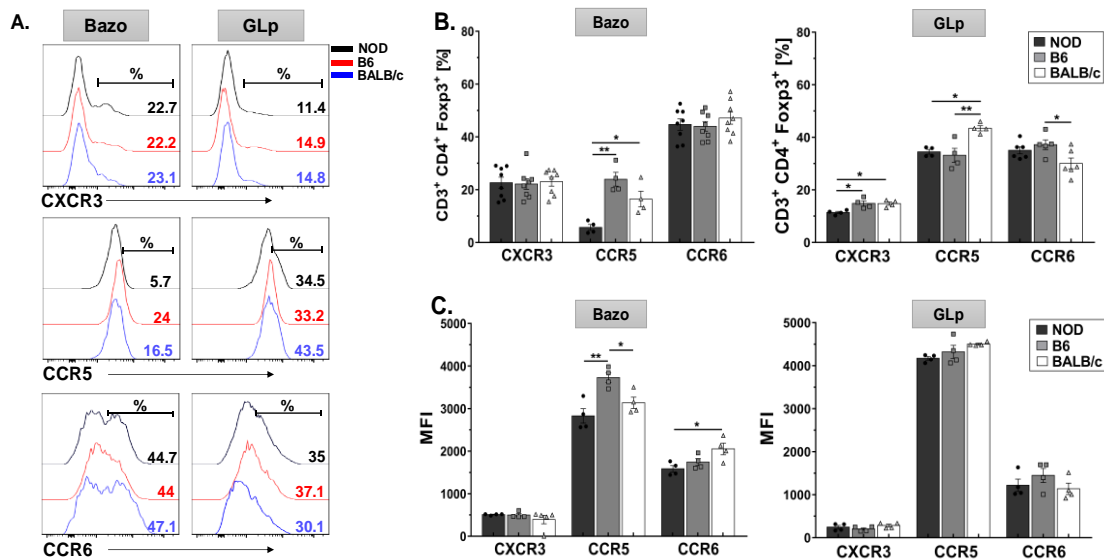


Figura 16: Frecuencia y expresión de receptores de quimiocinas en Treg de órganos linfoides secundarios de ratones NOD, B6 y BALB/c. A). Histogramas de citometria de flujo representativos, que muestran la expresión de CXCR3, CCR5 y CCR6 en células CD4⁺ de bazo y GLp de las 3 cepas en estudio. Los valores en los histogramas representan el promedio de la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. B). Gráficos de barras que muestran la frecuencia de Treg CXCR3⁺, CCR5⁺ y CCR6⁺ en CMNs de bazo (izquierda) y GLp (derecha) para las 3 cepas bajo estudio. C). Gráficos de barras que muestran la MFI para las distintas moléculas analizadas en (B) en la población de células CD4⁺Foxp3⁺. Los datos se muestran como la media ± SEM, n=4-8 según el órgano; y son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de * p<0,05; ** p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos.

- ✓ Menor capacidad de inducir células Treg *in vitro*; las células iTreg inducidas expresan menores niveles de Foxp3, CD25 y otras moléculas inhibitorias tales como CTLA-4, LAP-1, CD39, PD-L1 y LAG-3
- ✓ Menor frecuencia de células Treg CCR5⁺ en bazo y GLp; y menor frecuencia de células Treg CXCR3⁺.

II. Estudio de la funcionalidad y activación *in vitro* de células T regulatorias

Análisis de la funcionalidad in vitro de células Treg purificadas

Luego de haber demostrado menores cantidades de células Treg y menor expresión de diferentes moléculas tales como CD25 y LAP-1 implicadas en mecanismos de supresión en las células Treg de la cepa NOD, nos propusimos estudiar si existían alteraciones en su funcionalidad. Para ello en primer lugar, se realizaron purificaciones de LT convencionales CD4⁺CD25⁻ (Tconv) y de LT CD4⁺CD25^{hi} (Treg) a partir de bazo, mediante perlas magnéticas y posterior *cell sorting* para todas las cepas en estudio. Con las poblaciones de Tconv y células Treg purificadas de cada cepa se realizaron cultivos celulares mezclando diferentes proporciones de linfocitos Tconv y células Treg. Los linfocitos Tconv fueron marcados previamente con CFSE según se describe en materiales y métodos, y se analizó la capacidad de las células Treg de suprimir *in vitro* la proliferación de LTconv. Como se muestra en la Figura 17, a pesar de que las células Treg de todas las cepas fueron capaces de suprimir la proliferación de LTconv, las células

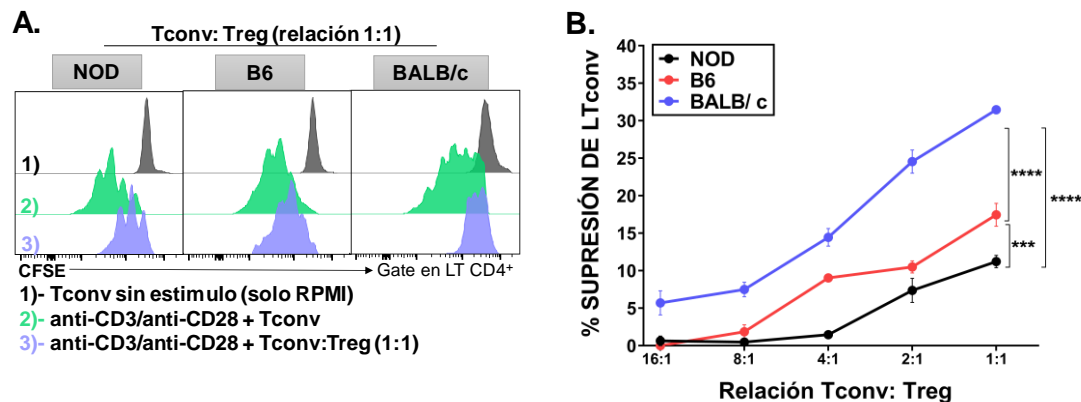


Figura 17: Inhibición de la proliferación *in vitro* de LT CD4⁺CD25⁻ por Treg esplénicas de las tres cepas en estudio. LTconv (CD4⁺CD25⁻) y células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c, se marcaron con CFSE y se co-cultivaron en diferentes relaciones con células Treg, en presencia de anti-CD3 y anti-CD28. Luego de cuatro días, se analizó mediante citometría de flujo la dilución del colorante en los LTconv (CD4⁺) **A**). Histogramas de citometría de flujo que indican el nivel de expresión de CFSE (dilución del colorante) en células CD4⁺ luego de cuatro días de cultivo. El histograma en gris (1) corresponde al control negativo de proliferación de Tconv sin células Treg (sin estimular), en verde (2) Tconv estimuladas y en celeste (3) Tconv estimuladas en presencia de células Treg en una relación 1:1. Los picos representan rondas de división celular. **B**). Gráfico que muestra el porcentaje de supresión de la proliferación de Tconv para las distintas relaciones Tconv: Treg probadas. Para purificar cada población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos para cada relación corresponden a la media \pm SEM obtenida de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. Los valores p fueron calculados utilizando el test ANOVA de dos vías y posterior comparación múltiple de Tukey. Valores de *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Treg de ratones NOD mostraron menor capacidad supresora cuando se comparó con las demás cepas (Figura 17A). El porcentaje de supresión de la proliferación de Tconv fue significativamente mayor para todas las relaciones ensayadas en cultivos de la cepa BALB/c (Figura 17B). Por el contrario, en la cepa B6 se observó supresión a partir de una relación 4:1, mientras que las células Treg de la cepa NOD sólo mostraron capacidad de suprimir la proliferación de Tconv en las relaciones 1:1 y 2:1. Estos resultados demuestran, por lo tanto, una menor capacidad de suprimir la proliferación de Tconv de las células Treg de la cepa NOD.

Análisis comparativo de la activación in vitro de células Treg purificadas de las cepas NOD, B6 y BALB/c

A continuación, analizamos la capacidad de activación de células Treg de las cepas en estudio mediante la evaluación de la expresión de Foxp3 y CD25 por citometría de flujo. Para ello se realizaron purificaciones de células CD4⁺CD25^{hi} esplénicas nuevamente mediante enriquecimiento con perlas magnéticas y posterior purificación por *cell sorting*. Las células así purificadas en el punto de partida mostraron un porcentaje de expresión de Foxp3⁺ >97%. Las células Treg purificadas fueron incubadas con anticuerpos anti-CD3/CD28 en presencia o no de IL-2 recombinante (IL-2r) por 72 horas, luego de las cuales se analizó la frecuencia de células Foxp3⁺CD25⁺ y la expresión de

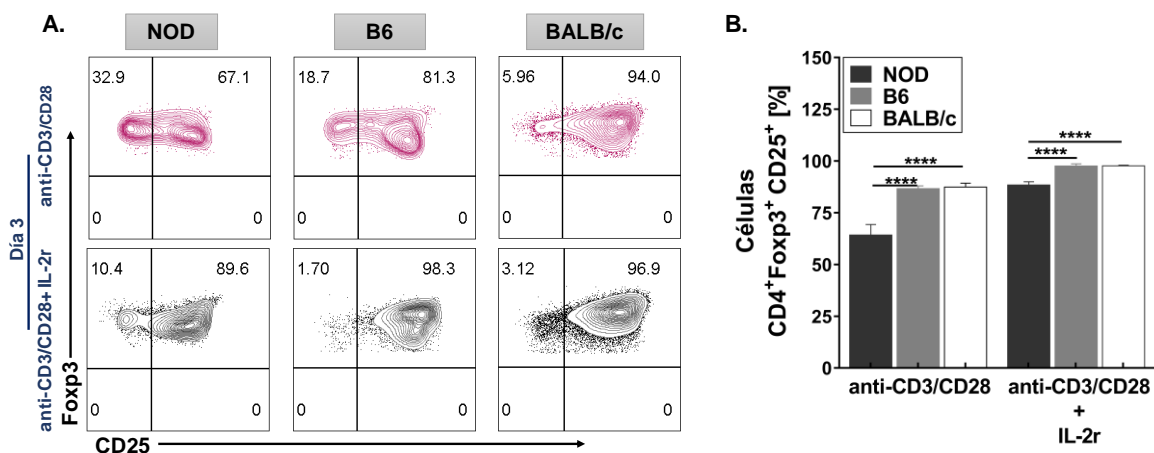


Figura 18: Activación vía TCR+IL-2r de Treg purificadas de las tres cepas bajo estudio. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se cultivaron en presencia de anti-CD3/CD28 con el agregado o no de 200 UI/mL de IL-2 recombinante (IL-2r). Luego de 3 días, se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje células Foxp3⁺ **A**). Gráficos de contorno de citometría de flujo representativos que indican la frecuencia de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺) luego del cultivo por 3 días con anticuerpos anti CD3/CD28 en presencia o no de rIL-2. **B**). Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ en cultivos de las 3 cepas y en las condiciones indicadas. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. En el gráfico se incluye la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes representativos. Valores de *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

diferentes marcadores en las células Treg activadas *in vitro*. Como se puede observar en la Figura 18 el porcentaje de células $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+$ luego de 3 días de cultivo sin el agregado de IL-2r fue significativamente menor en la cepa NOD, mientras que para las células Treg que fueron cultivadas en presencia de anti CD3/CD28+ IL-2r se observaron valores mayores de células $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+$ para todas las cepas (Figura 18 A-B). Luego de estimular *in vitro* durante 3 días las células Treg de la cepa NOD aún en presencia de IL-2r, se observó un porcentaje significativamente menor de células $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+$, sugiriendo que células Treg de la cepa NOD responden menos al estímulo de un importante factor de crecimiento y sobrevivencia como lo es IL-2. Además, el nivel de expresión de Foxp3 y CD25 en las células Treg estimuladas *in vitro* fue significativamente menor en la cepa NOD (Figura 19 A-B), indicando que además de expresar menores niveles de estos marcadores en condiciones basales, luego de ser estimuladas *in vitro* vía TCR en presencia de IL2r, las células Treg de ratones NOD incrementan la expresión de CD25 y Foxp3, pero con valores menores a los observados en las otras cepas (Figura 19B).

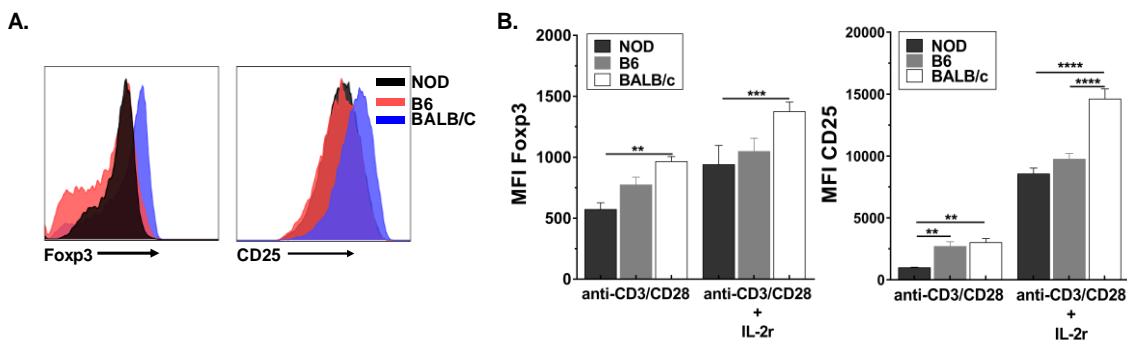


Figura 19: Nivel de expresión de Foxp3 y CD25 luego de la activación vía TCR+IL-2 de células Treg purificadas de las tres cepas bajo estudio. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se cultivaron en presencia de anti-CD3/CD28 con el agregado o no de 200 UI/mL de IL-2r. Luego de 3 días, se analizó mediante citometría de flujo el nivel de expresión de Foxp3 y CD25 en células CD4⁺Foxp3⁺A). Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran la expresión de Foxp3 y CD25 en Treg esplénicas purificadas (CD4⁺CD25^{hi}) de las cepas NOD, B6 y BALB/c luego del estímulo antes indicado. B). Gráficos de barras que muestran los valores de MFI de Foxp3 y CD25 para cada cepa en Treg tras el estímulo antes indicado. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

La expresión de marcadores fenotípicos también fue analizada en células Treg de las tres cepas luego del estímulo *in vitro* de anti-CD3/CD28 + IL-2r (Figura 20). Los resultados obtenidos siguieron la tendencia vista en células Treg sin estimular (condiciones basales), observándose una expresión significativamente menor de GIRT, LAP-1, CD39, LAG-3 y PD-1 en células Treg activadas de la cepa NOD; mientras que bajos niveles de expresión de CTLA-4 se observaron en Treg activadas de todas las cepas (Figura 20A). Es importante notar que tanto para la cepa NOD como para la cepa B6, se observó mayor expresión de TIM-3 comparado a la cepa BALB/c, una molécula inhibitoria que participa en el control de procesos inmunes donde predominan respuestas de tipo Th1 (14). Además, la expresión de la ectoenzima CD73, al igual que en condiciones basales, fue mayor para la cepa B6 con respecto al resto de las cepas. De un

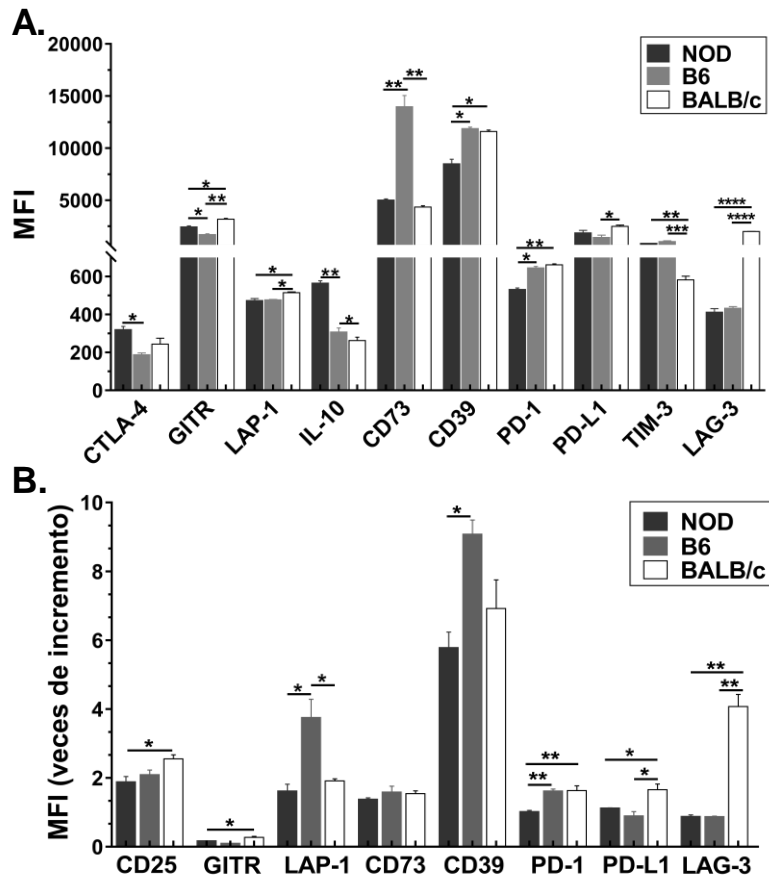


Figura 20: Expresión de marcadores fenotípicos de una célula T regulatoria luego de la activación *in vitro* con anti CD3/CD28 + IL-2r. Células Treg purificadas (CD4⁺Foxp3⁺) de bazo de las tres cepas y estimuladas con 200 UI/mL de IL-2r durante 72 horas. **(A)** Gráfico de barras que muestran los valores de MFI en Treg Foxp3⁺ para las distintas moléculas inhibitorias analizadas. **(B)** Veces de incremento de valores de MFI en Treg estimuladas relativo a valores presentes en Treg no estimuladas en estado basal. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001; ****p< 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

análisis global de las células Treg estimuladas *in vitro* de las tres cepas se puede concluir que, células Treg de la cepa NOD exhiben menores niveles de expresión para la mayoría de los marcadores analizados, todos ellos involucrados en la funcionalidad de una célula Treg. (Figura 20A). Un análisis de las veces de incremento de la expresión (MFI) para estos marcadores en células Treg estimuladas respecto a células Treg en estado basal también fue realizado. Observamos 2 veces de incremento en la expresión de CD25 para ratones NOD y B6, mientras que este valor fue mayor para células Treg de la cepa BALB/c (Figura 20 B). El nivel de expresión de GIRT no mostró mayores cambios entre células Treg estimuladas y no estimuladas, aunque nuevamente el incremento fue menor en la cepa NOD. La expresión de LAP-1 incrementó 2 veces en células Treg estimuladas de la cepa NOD y BALB/c, observándose un aumento de 4 veces para la cepa B6. La expresión de CD73 mostró un aumento de dos veces en las células Treg estimuladas de las 3 cepas, mientras que la expresión de CD39 mostró un incremento de 6, 7 y 9 veces en células Treg estimuladas de las cepas NOD, BALB/c y B6, respectivamente (Figura 20B). Con relación a la expresión de PD1 y PD-L1 se observaron incrementos mayores en células Treg estimuladas de las cepas B6 y BALB/c respecto a la cepa NOD. Finalmente, el nivel de expresión de LAG-3 incrementó en las células Treg estimuladas de las 3 cepas, observándose mayores valores en células Treg de la cepa BALB/c. Estos resultados en conjunto muestran que luego de activar las células Treg en presencia de IL-2, las células Treg de ratones NOD no logran aumentar CD25 ni otras moléculas involucradas en mecanismos efectores en la misma magnitud que las demás cepas.

Evaluación del rol de IL-2 en la expresión de Foxp3 en células Treg purificadas de ratones NOD, B6 y BALB/c

Para profundizar en el hallazgo de la menor frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ encontrada luego de la activación *in vitro* en la cepa NOD y teniendo en cuenta que IL-2 es un importante factor de crecimiento que activa la proliferación de una célula Treg, analizamos además la capacidad proliferativa de las células Treg purificadas luego de ser estimuladas *in vitro* con anti CD3/CD28 + IL2r por citometría de flujo. Para ello utilizamos como marcador de proliferación celular la expresión de la proteína nuclear Ki67. Como se puede observar en la Figura 21A y 21B, las células Treg de ratones NOD mostraron menor capacidad proliferativa que el resto de las cepas tras el estímulo aún en presencia de IL-2r, lo cual fue evidenciado por una menor proporción de

linfocitos $CD4^+Foxp3^+Ki67^+$. La disminución de la capacidad proliferativa en células Treg de la cepa NOD fue aún más pronunciada cuando IL-2r no estaba presente en el medio (Figura 21B). Mientras que células Treg de ratones de la cepa BALB/c mostraban mayor proliferación, células Treg purificadas de la cepa B6 mostraron proliferación intermedia con respecto a las demás cepas en estudio. Además, las células Treg purificadas de la cepa NOD y activadas en presencia de IL-2r mostraron menor nivel de expresión de Ki67 en células $CD4^+Foxp3^+$, sugiriendo que las células Treg de ratones

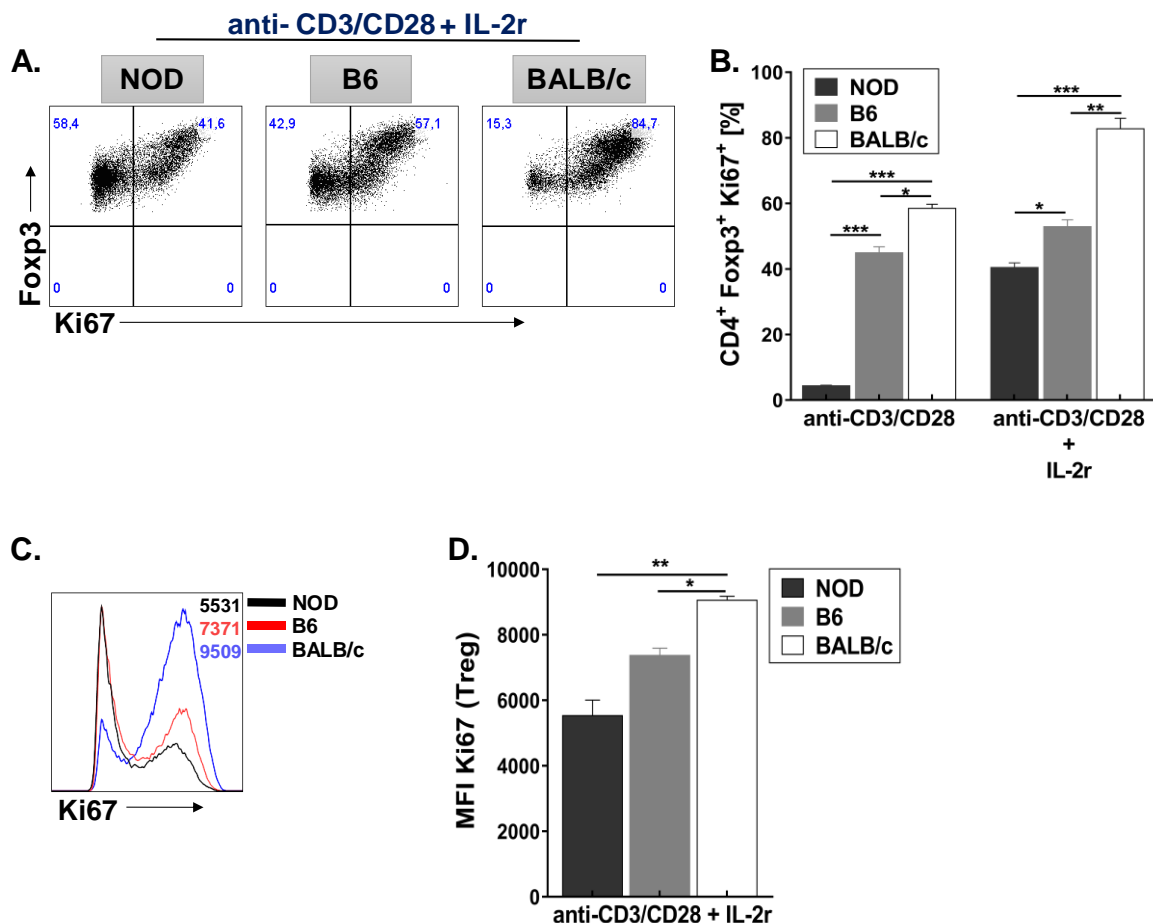


Figura 21: Capacidad proliferativa de Treg purificadas de las tres cepas en estudio luego del estímulo vía TCR+IL-2. Células Treg ($CD4^+CD25^{hi}$) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se cultivaron en presencia de anti-CD3/CD28 con el agregado o no de 200 UI/mL de IL-2r. Luego de 3 días, se analizó mediante citometría de flujo la capacidad proliferativa de las Treg a través de la expresión de la molécula Ki67. **A).** Gráficos de puntos de citometría de flujo representativos que muestran los valores de frecuencia de células Treg $Foxp3^+Ki67^+$ luego del cultivo durante 3 días con anticuerpos anti CD3/CD28 + IL2r para las cepas NOD, B6 y BALB/c. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B).** Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células $Foxp3^+Ki67^+$ en cultivos de las tres cepas y en las condiciones indicadas. **C).** Histograma representativo de la expresión de Ki67 en linfocitos $CD4^+Foxp3^+$ activados. **D).** Gráfico de barras de valores de MFI para Ki67 en Treg tras la activación para cada cepa. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

NOD proliferan menos frente al estímulo (Figura 21C y 21D). A continuación, analizamos la expresión de Foxp3 en cultivos similares en los que agregamos dosis crecientes de IL-2r. En la Figura 22 se muestra como varía la expresión de Foxp3 (en términos de intensidad de fluorescencia media) para cada cepa en células Treg purificadas luego de ser estimuladas con diferentes dosis de IL-2r. Como se puede observar, a mayores concentraciones de IL-2 en el medio, aumenta la expresión de Foxp3 en células Treg de todas las cepas de manera dosis dependiente (Figura 22 A-B). Sin embargo, en comparación con las otras cepas, células Treg de ratones NOD mostraron un nivel de expresión de Foxp3 significativamente menor (Figura 22B). Es importante destacar que a pesar de que el aumento de expresión de Foxp3 no alcance los niveles observados en

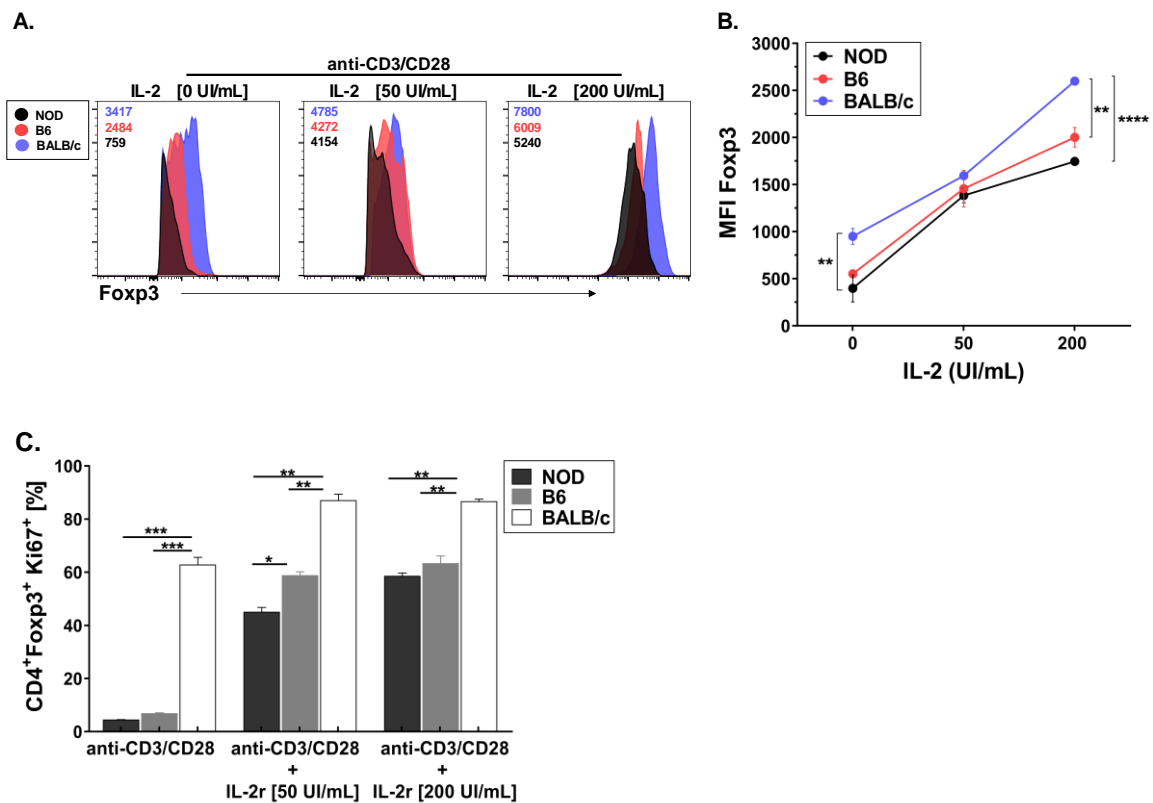


Figura 22: Expresión de Foxp3 en Treg purificadas de las tres cepas luego del estímulo vía TCR en presencia de diferentes dosis de IL-2. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se cultivaron en presencia de anti-CD3/CD28 con el agregado de distintas dosis de IL-2r. Luego de 3 días, se analizó mediante citometría de flujo el nivel de expresión de Foxp3. **A).** Histogramas de citometría de flujo representativos del nivel de expresión de Foxp3 en Treg purificadas estimuladas en presencia de diferentes dosis de IL-2r (0, 50 y 200 UI/ml). El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados muy similares. **B).** Gráfico que muestra valores de MFI para Foxp3 en Treg purificadas de las tres cepas y estimuladas con diferentes dosis de IL2. **C).** Gráfico de barras que indica los valores de frecuencia de células Treg CD4⁺Foxp3⁺Ki67⁺ para cada cepa tras el estímulo con dosis crecientes de IL-2r. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos mostrados corresponden a la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Los valores p fueron calculados utilizando el test ANOVA de dos vías y posterior comparación múltiple de Tukey. Valores de **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

células Treg de las demás cepas, parece ser imprescindible que haya IL-2 presente para células Treg de la cepa NOD, ya que al comparar el nivel inicial de expresión del que se parte entre cepas, el agregado de sólo 50 UI/mL al medio modifica de manera importante la expresión de este factor en células Treg de la cepa NOD (Figura 22B). La proliferación de células Treg también se vio aumentada con el agregado de diferentes dosis de IL-2r, evidenciado por el aumento de la proporción de células CD4⁺Foxp3⁺Ki67⁺ en todas las cepas bajo estudio (Figura 22C), aunque nuevamente, ratones de la cepa NOD mostraron menor frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺Ki67⁺ (<60%) con respecto al resto de las cepas. En conclusión, tras el agregado de IL-2r, células Treg de la cepa NOD responden siempre con una menor respuesta proliferativa y menor expresión de Foxp3 para las dosis usadas.

Un hallazgo interesante fue la aparición de células que ya no expresaban Foxp3 (“*Ex-Treg*”) a los 3 días de cultivo. Como se puede observar en la Figura 23, luego de realizar la purificación correspondiente para cada cepa, las células Treg obtenidas mostraron valores mayores al 97% para Foxp3 para la cepa NOD, B6 y BALB/c (Figura 23A y 23B). Luego de 3 días de cultivo sin la presencia de IL-2r en el medio, el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺ disminuyó significativamente para todas las cepas respecto del día 0, aunque para la cepa NOD ese porcentaje fue aún mucho menor con respecto a lo hallado para la cepa B6 (53%) y BALB/c (66,4%). Además, células Treg de la cepa NOD que aún continuaban expresando Foxp3 cultivadas en esas condiciones, mostraron una disminución significativa de la expresión de este factor de transcripción con respecto al valor expresado al día cero (Figura 23C). En el caso de células Treg de las cepas B6 y BALB/c luego del cultivo por tres días en ausencia de IL2, lograron mantener los niveles de expresión de Foxp3 (Figura 23 C). De manera interesante, las células Treg de la cepa BALB/c cultivadas en presencia de IL-2r luego de 3 días mantuvieron altos porcentajes de células Foxp3⁺ (Figura 23B) y mostraron un aumento significativo del nivel de expresión para este factor de transcripción con respecto a las demás cepas (Figura 23C) e incluso con respecto al día inicial (Día 0 post- sorting). Sin embargo, ratones NOD y B6 disminuyeron el porcentaje de células que expresaban Foxp3 de manera significativa luego del cultivo con IL-2r (74,6% y 65,9%, respectivamente) con un aumento de la expresión de Foxp3 con respecto al día 0, aunque menor a los valores hallados para la cepa BALB/c. En conjunto, estos resultados demuestran que luego de ser estimuladas *in vitro*, una fracción de células Treg deja de expresar Foxp3 en cultivo, siendo esa fracción mayor para la cepa NOD. Además, nuestros resultados sugieren que el agregado de IL-2r

parece ser esencial para mantener una expresión estable de Foxp3, especialmente en la cepa NOD.

A partir de los datos analizados hasta aquí surgieron varias cuestiones a responder, y de ellas la más importante fue entender a qué se debía la marcada disminución de células que expresaban Foxp3 en células Treg purificadas de la cepa NOD en comparación a las

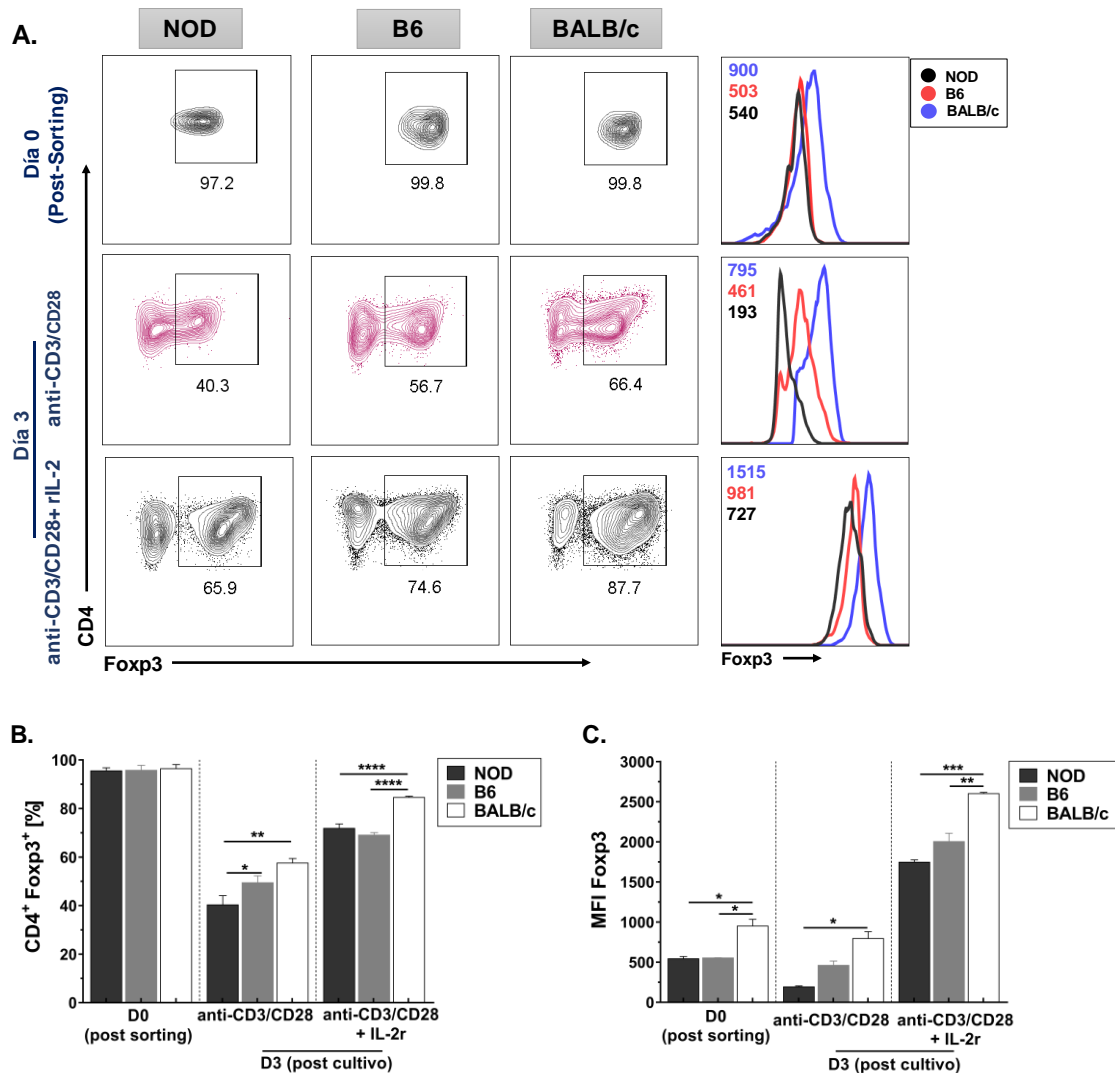


Figura 23: Pérdida de células Foxp3⁺ en cultivos estimulados vía TCR en presencia o ausencia de IL-2. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se cultivaron en presencia de anti-CD3/CD28+ 200 UI/mL de IL-2 recombinante (IL-2r). Luego de 3 días, se analizó mediante citometría de flujo la frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ y el nivel de expresión de Foxp3. **A).** Gráficos de contorno de citometría de flujo que muestra los valores de frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ en el día 0 y en el día 3 luego del cultivo en presencia o ausencia de IL-2r. A la derecha de la figura se observan histogramas de citometría de flujo representativos que muestran el nivel de expresión de Foxp3 para cada condición y día de cultivo de las 3 cepas. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B-C).** Gráficos de barras que muestran los valores de frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ (**B**) y la intensidad de fluorescencia media (MFI) para Foxp3 (**C**) para las 3 cepas y en las condiciones indicadas. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001; ****p< 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

demás cepas luego de estimularlas *in vitro* incluso en presencia de la citoquina IL-2. Para ello, lo siguiente fue determinar si la pérdida de células F_{oxp3}⁺ en los cultivos estaba relacionada con la muerte celular o apoptosis. En la Figura 24 se muestra el análisis de la expresión de la proteína Bcl-2 (proteína anti- apoptótica) en células Treg purificadas y estimuladas *in vitro* en presencia o no de IL-2r. Como se puede observar, células Treg de las tres cepas inmediatamente luego de ser purificadas (día 0 post-sorting) mostraron expresión, prácticamente en su totalidad, de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (>90% de células CD4⁺F_{oxp3}⁺Bcl-2⁺) (Figura 24 A y 24B). Tras el estímulo con anti- CD3/CD28 luego de 3 días de cultivo, se observó menor frecuencia de células CD4⁺F_{oxp3}⁺Bcl-2⁺ para todas las cepas, aunque células Treg de ratones NOD mostraron valores significativamente menores que las demás cepas. Por otra parte, luego de ser estimuladas por 3 días en presencia de IL-2r casi la totalidad de las células Treg fueron Bcl-2⁺ para las 3 cepas en estudio sugiriendo que la pérdida de expresión de F_{oxp3} en células Treg de la cepa NOD estimuladas vía TCR se debería a que están sufriendo procesos de muerte celular, pero no así en presencia de IL-2r. Estos resultados demuestran por lo tanto una fuerte dependencia de IL-2 en células Treg de todas las cepas, efecto que parece ser mayor en células Treg de la cepa NOD.

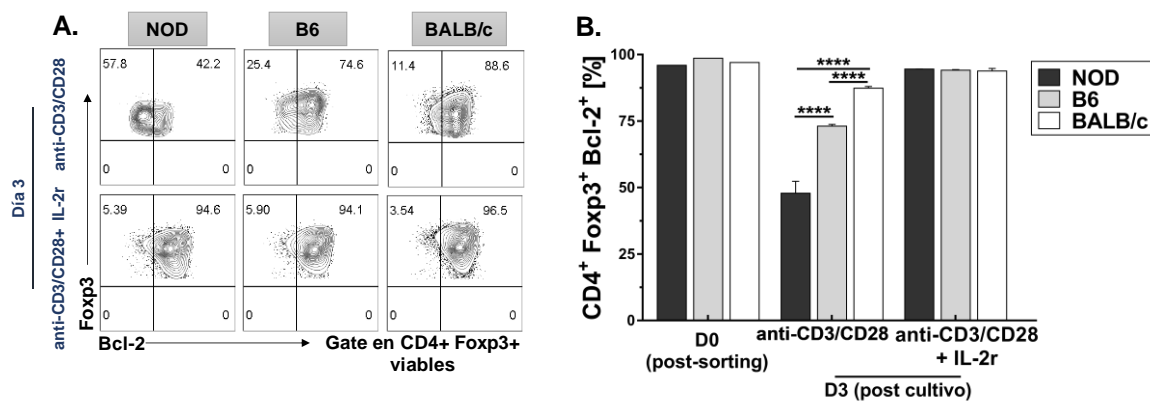


Figura 24: Expresión de Bcl-2 en células T regulatorias purificadas a partir de bazo de las tres cepas tras el estímulo vía TCR en presencia o no de IL-2r. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se cultivaron en presencia de anti-CD3/CD28 con el agregado de 200 UI/mL de IL-2r. Luego de 3 días, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de Bcl-2 en Treg CD4⁺F_{oxp3}⁺ luego de excluir del análisis las células muertas mediante el uso de una sonda de viabilidad para células fijadas (LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead cell stain Kit). **A).** Gráficos de contorno de citometría de flujo representativos que muestra la frecuencia de células CD4⁺F_{oxp3}⁺Bcl-2⁺ luego del cultivo de tres días. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B).** Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células F_{oxp3}⁺Bcl-2⁺ en cultivos de las tres cepas y en las condiciones indicadas. En el gráfico se incluye la frecuencia de células Treg CD4⁺F_{oxp3}⁺Bcl-2⁺ obtenidas luego de la purificación (Día 0 post-sorting). Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de ***p< 0,001; ****p< 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

En resumen, el análisis de la funcionalidad y de la activación *in vitro* de células Treg purificadas de las tres cepas nos permite concluir que células Treg de ratones de la cepa NOD tienen:

- ✓ Menor capacidad para suprimir la proliferación de LT CD4 convencionales, es decir, son células Treg menos funcionales.
- ✓ Menor nivel de activación al ser estimuladas *in vitro* con anti CD3/CD28+IL2r (menor expresión de las moléculas Foxp3, CD25, GIRT, LAP-1, CD39, PD1 y LAG-3).
- ✓ Menor capacidad proliferativa al ser estimuladas *in vitro* con anti CD3/CD28 con o sin IL-2r presente en el medio.
- ✓ Aumento de expresión de Foxp3 y proliferación de manera dosis dependiente frente al agregado de IL-2r, aunque en comparación con otras cepas, las células Treg de la cepa NOD poseen menor nivel de expresión de Foxp3 y menor proliferación al ser estimuladas *in vitro* con anti-CD3/CD28 para todas las concentraciones de IL-2r evaluadas.
- ✓ Mayor dependencia de IL-2 para sostener la expresión de Foxp3 y la viabilidad celular.

III. Regulación de la expresión de Foxp3 en células T regulatorias activadas *in vitro*

Estudio del rol de la señalización de IL-2 y su receptor en células Treg de ratones NOD, B6 y BALB/c

Datos bibliográficos indican que la vía de señalización de IL-2/R-IL-2/JAK1-3/STAT5 está involucrada en la iniciación y el mantenimiento de la expresión de Foxp3 en células Treg (9)(Figura 3). Se sabe que IL-2 puede afectar la regulación de Foxp3 a través de la unión de STAT5 fosforilado (pSTAT5) al sitio promotor de Foxp3 y a la región CNS2, proceso indispensable para la estabilidad de esta población celular (9). Se conoce además que las células Treg utilizan la vía de señalización IL-2 más eficientemente que las células Tconv y que ratones deficientes en la vía de señalización de IL-2 presentan una profunda disminución en tTreg y pTreg (9). Con estos antecedentes quisimos investigar si las células Treg de ratones NOD tenían alteraciones en esta vía analizando la capacidad de inducir STAT5p luego de la activación *in vitro* con IL-2r. Como se puede observar en la Figura 25 a los 30 min del agregado de una dosis elevada de IL-2 (200 UI/mL), las células Treg de ratones NOD mostraron menor proporción de células CD4⁺Foxp3⁺pSTAT5⁺ en comparación con células Treg de las otras cepas (Figura 25A). Un análisis de la cinética de células CD4⁺Foxp3⁺pSTAT5⁺ luego del estímulo mostró que la mayor frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺pSTAT5⁺ se observaba a los 30 min post estímulo, con una caída y valores similares a la condición basal (sin IL-2) a los 60 minutos (Figura 25B). Al realizar un análisis comparativo, observamos que células Treg de ratones NOD mostraron menor frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺pSTAT5⁺ luego de 30 min de estímulo con IL-2. El nivel de expresión de pSTAT5 (MFI) en células Treg purificadas de las 3 cepas a distintos tiempos post estímulo mostró un comportamiento similar a lo hallado para la frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺pSTAT5⁺ (Figura 26A y 26B). A los 30 min se observó el pico máximo de inducción de pSTAT5 y una pendiente de caída similar entre las cepas a los 60 min post estímulo con IL-2r siendo para todos los tiempos ensayados significativamente menor el nivel de expresión de pSTAT5 en células Treg de la cepa NOD comparado a las demás cepas. La inducción de pSTAT5 fue evaluada también en Tconv purificadas (Figura 26C y 26D) y para las condiciones ensayadas no se observaron diferencias entre la condición basal (sin IL-2r) y la condición estimulada, en concordancia con lo descripto en bibliografía.

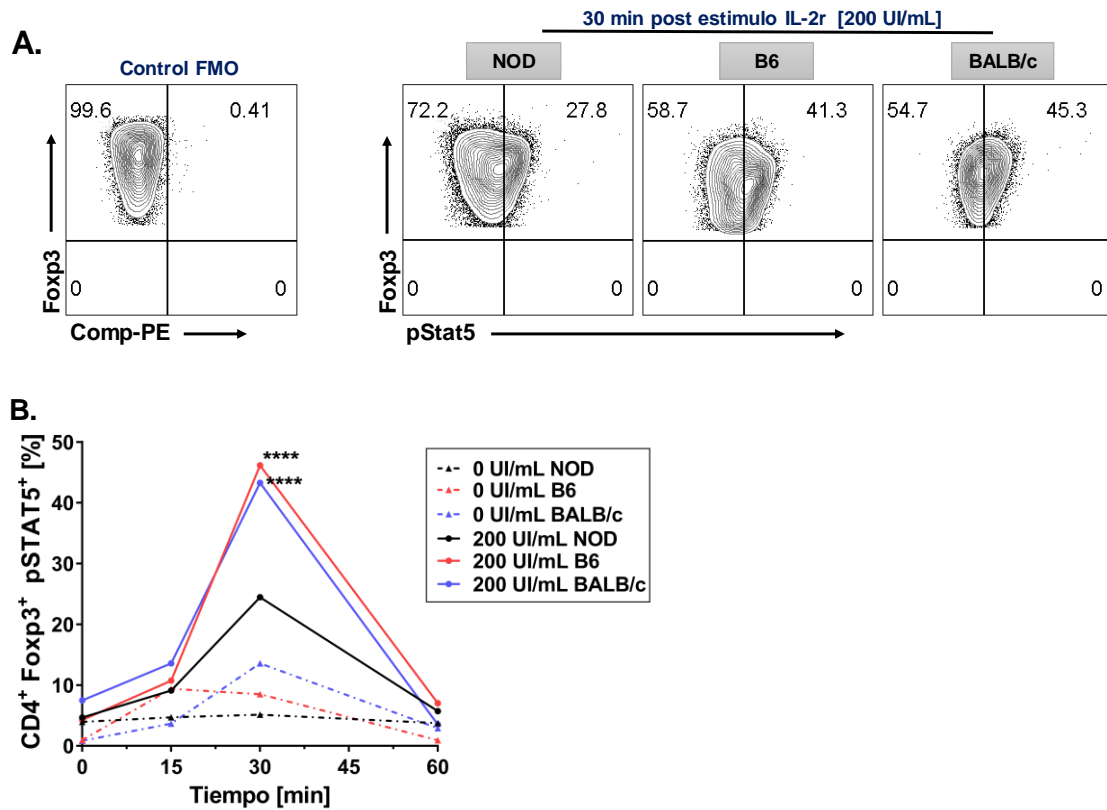


Figura 25: Inducción y degradación de pSTAT5 luego del agregado de IL-2r en Treg purificadas de las 3 cepas. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se estimularon o no con 200 UI/mL de IL-2r a distintos tiempos (0, 15, 30 y 60 min). Pasado el tiempo correspondiente se evaluó por citometría de flujo la fosforilación de STAT5. Las células muertas fueron excluidas del análisis. **A).** Gráficos de contorno de citometría de flujo que representan la frecuencia de células Treg CD4⁺Fxp3⁺pSTAT5⁺ para cada cepa luego de 30 minutos de estímulo con IL-2r. A la izquierda del panel se muestra el control FMO correspondiente al marcador en estudio. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B).** Gráfico que muestra el porcentaje de células CD4⁺Fxp3⁺ pSTAT5⁺ para los distintos tiempos evaluados post estímulo con (línea completa) o sin (línea punteada) IL-2r para cada cepa en estudio. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Los valores p fueron calculados utilizando el test ANOVA de dos vías y posterior comparación múltiple de Tukey Valores de ****p< 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Como se mencionó previamente la vía de señalización de IL-2 tiene una regulación compleja en la que participan diferentes factores como SOCS3 (regulador negativo de pJAK1) (Figura 4). Con el fin de profundizar el estudio de la vía de señalización de IL-2, la expresión de este regulador fue evaluada a nivel de ARNm por PCR en tiempo real normalizado a un gen endógeno en condiciones basales en células Treg purificadas de bazo. También analizamos la expresión ARNm de la UbL E3 GRIL y su regulador OTUB-1 en células Treg purificadas sin estímulo (Figura 27A). De manera interesante se encontró alta expresión de SOCS3 y OTUB-1 en células Treg purificadas de la cepa NOD, mientras que para GRIL se observó menor expresión en células Treg

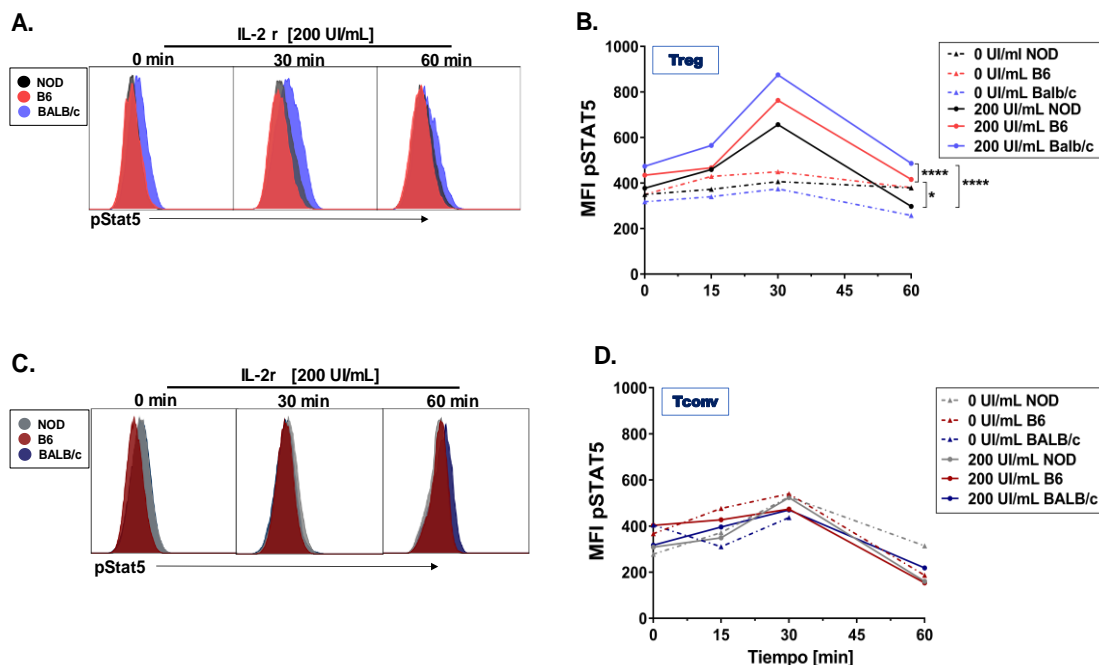


Figura 26: Evolución de la fosforilación pSTAT5 en el tiempo en Treg y Tconv purificadas luego del agregado de IL-2r en las 3 cepas bajo estudio. Células Treg ($CD4^+CD25^{hi}$) y Tconv ($CD4^+CD25^+$) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se estimularon o no con 200 UI/mL de IL-2r a distintos tiempos (0, 15, 30 y 60 min). Pasado el tiempo correspondiente se evaluó la expresión de pSTAT5 por citometría de flujo. Las células muertas fueron excluidas del análisis. En la figura se muestra a la izquierda, histogramas de citometría de flujo que muestran el nivel de expresión de pSTAT5 en Treg (A) y Tconv (C) purificadas a los tiempos evaluados post agregado de IL-2r para cada cepa en estudio. A la derecha de la figura se muestran gráficos que muestra la variación de MFI de pSTAT5 en el tiempo en Treg (B) y Tconv (D) luego del estímulo con (líneas completas) o sin (líneas punteadas) IL-2r. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Para purificar cada población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Los valores p fueron calculados utilizando el test ANOVA de dos vías y posterior comparación múltiple de Tukey. Valores de $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

de las cepas NOD y B6 con respecto a la cepa BALB/c (Figura 27A). La expresión de GRAIL y OTUB-1 también fue analizada a nivel proteína en células Treg sin estimular (Figura 27B y 27C). Como control positivo se utilizó una línea celular HEK-293 (células embrionarias de riñón humano 293), que expresa constitutivamente GRAIL y OTUB-1, además de incluir un control de isotipo para el análisis. Como se observa en la Figura 27B y 27C, en condiciones basales existe una baja expresión de GRAIL en la cepa NOD con respecto a las demás cepas, mientras que en el caso de OTUB-1, se observó un patrón inverso, con mayor expresión para la cepa NOD y un bajo nivel de expresión para la cepa BALB/c (Figura 27B y 27C).

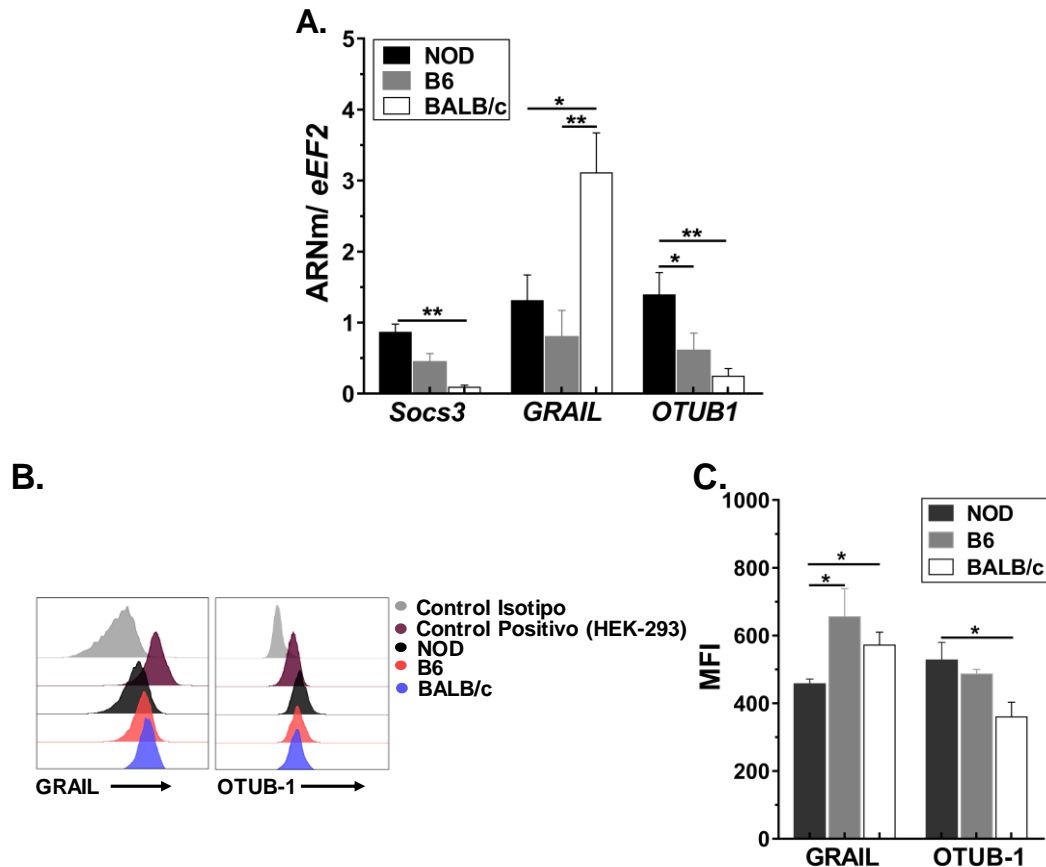


Figura 27: Nivel de expresión de GRAIL, Otubaina-1 y SOCS3 en células Treg purificadas sin estimular de las tres cepas bajo estudio. Células Treg ($CD4^+CD25^{hi}$) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y la expresión de GRAIL y Otubain-1 (OTUB-1) fue evaluada mediante citometría de flujo y PCR en tiempo real. La expresión de SOCS3 solo fue evaluada a nivel de ARNm. **A.** Expresión de *Socs3*, *OTUB-1* y *GRAIL* en Treg purificadas de bazo de las 3 cepas. Los valores representan la expresión relativa de *Socs3* y *OTUB1* en función a *eEF2* (control endógeno) y de *GRAIL* en función a *18S* (control endógeno) y fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. **B.** Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran la expresión de las proteínas GRAIL y OTUB-1 en Treg purificadas sin estimular de las tres cepas. Se incluye además control de isotipo y como control positivo línea celular HEK-293. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes. **C.** Gráfico de barras que muestra los valores del nivel de expresión (MFI) de GRAIL y OTUB-1 en Treg purificadas de ratones NOD, B6 y BALB/c y sin estimular. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Analizamos también la expresión de GRAIL y OTUB-1 luego de 30 minutos del estímulo con IL-2r y evidenciamos muy baja proporción de células Treg GRAIL⁺ en ratones NOD con respecto a las demás cepas, mientras que la proporción de células Treg OTUB-1⁺ mostró un comportamiento inverso al hallado para GRAIL, observándose altas proporciones de células Treg OTUB-1⁺ para la cepa NOD y B6 con respecto a la cepa BALB/c (Figura 28A y 28B). El análisis de los niveles de expresión de estos reguladores (MFI), arrojó datos similares a lo hallado para la frecuencia de células Treg GRAIL⁺ y OTUB-1⁺, observándose menor expresión de GRAIL en células Treg estimuladas de la

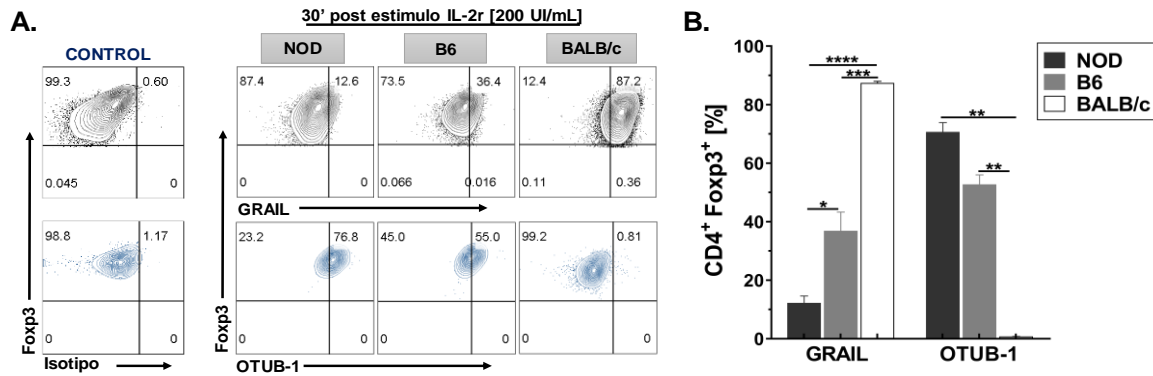


Figura 28: Frecuencia de células Treg GRAIL⁺ y OTUB-1⁺ tras el estímulo *in vitro* con IL-2r en las tres cepas. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se estimularon *in vitro* con 200 UI/mL de IL-2 recombinante (IL-2r) durante 30 minutos. Pasado el tiempo se evaluó por citometría de flujo la frecuencia de células Treg GRAIL⁺ y OTUB-1⁺ para cada cepa. Las células muertas fueron excluidas del análisis. **A).** Gráficos de contorno de citometría de flujo representativos que muestran los valores de frecuencia de células Treg CD4⁺Fxp3⁺GRAIL⁺ y CD4⁺Fxp3⁺OTUB-1⁺ para cada cepa estudiada. A la izquierda de la figura se muestra el control de isotipo para marcador. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B).** Gráfico de barras que muestran los valores en porcentaje de la frecuencia de células Treg CD4⁺Fxp3⁺GRAIL⁺ y CD4⁺Fxp3⁺OTUB-1⁺ para cada cepa estudiada. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

cepa NOD y B6 con respecto a la cepa BALB/c (Figura 29 A-B); mientras que la expresión hallada para OTUB-1 fue mayor en células Treg de la cepa NOD y B6 con respecto a la cepa BALB/c (Figura 29B). En resumen, estos datos demuestran que células Treg de la cepa NOD no solo tienen menor expresión de pSTAT5, sino también una mayor expresión de ARNm de SOCS3 acompañado de una alta expresión de OTUB-1 (regulador negativo de GRAIL) y una baja expresión de GRAIL con respecto a la cepa BALB/c; que podrían dar cuenta de la alteración de la vía de señalización de IL-2 en esta cepa de ratón.

Estudio de la expresión de enzimas involucradas en el mantenimiento de la hipometilación del sitio CNS2 del gen FOXP3 en células Treg de las cepas NOD, B6 y BALB/C

La expresión de Fxp3 y su estabilidad son cruciales para el mantenimiento de la función de células Treg (103). Como anteriormente se expuso, la región **CNS2** es fundamental para mantener una expresión sostenida de FOXP3 en tTreg luego de salir a periferia, y por lo tanto es la región más relevante para la estabilidad del fenotipo de una célula Treg (9). Se ha reportado que la desmetilación del sitio CNS2 es un proceso clave que ocurre dentro del timo y se logra a través de un proceso de oxidación de ADN activo que incluye

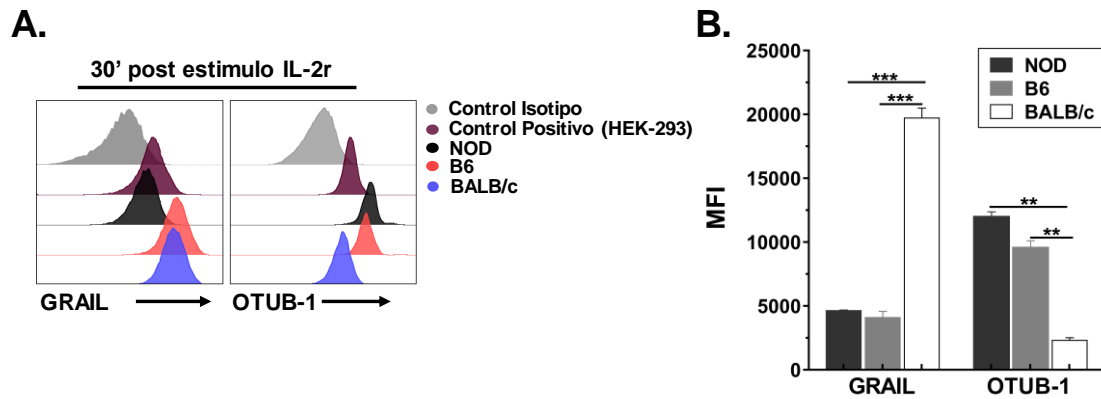


Figura 29: Expresión de GRAIL y Otubaina-1 en Treg purificadas tras el estímulo *in vitro* con IL-2r en las tres cepas en estudio. Células Treg ($CD4^+CD25^{hi}$) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y se estimularon *in vitro* con 200 UI/mL de IL-2r durante 30 minutos. Pasado el tiempo se evaluó por citometría de flujo la expresión de GRAIL y Otubain-1 (OTUB-1). **A).** Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran la expresión de GRAIL y OTUB-1 en Treg purificadas de las 3 cepas tras el estímulo con IL-2r por 30 min. Se incluye además control de isotipo y como control positivo la línea celular HEK-293. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes. **B).** Gráfico de barras que muestra los valores del nivel de expresión (MFI) de GRAIL y OTUB-1 en Treg purificadas de ratones NOD, B6 y BALB/c luego del estímulo con IL-2r. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

a la familia de las enzimas *translocación diez-once* (*TET*). Mientras que las enzimas TET favorecen el mantenimiento de la hipometilación, la enzima *metiltransferasa DNA 1* (*DNMT1*), promueve eventos de metilación en CNS2 y contrarresta la programación epigenética responsable de la actividad de tTreg (9). Nos propusimos entonces investigar la expresión de las enzimas TET y DNMT1, en células Treg purificadas de las 3 cepas. Para ello, células Treg $CD4^+CD25^{hi}$ fueron purificadas de bazo de las tres cepas bajo estudio por métodos ya descriptos, obteniendo una pureza $>97\%$ para esta población. El ARN fue extraído como se describe en la sección de materiales y métodos; y mediante PCR en tiempo real se determinó la expresión de las enzimas *Tet1*, *Tet2*, *Tet3* y *DNMT1* normalizadas a un gen endógeno (eEF2). La expresión hallada para cada enzima se muestra en la Figura 30. *Tet1* y *Tet3* solo fue detectada en células Treg de la cepa B6 por el método utilizado, mientras que *Tet2* mostró una baja expresión en células Treg de la cepa NOD con respecto a las demás cepas. Para el caso de la enzima *DNMT1* no se hallaron niveles detectables de ARNm para ninguna de las cepas por el método usado. La baja expresión de *Tet2* y la ausencia de expresión de *Tet1* y *Tet3* en células Treg de ratones NOD podría sugerir un pobre estado de hipometilación del sitio CNS2, que podría

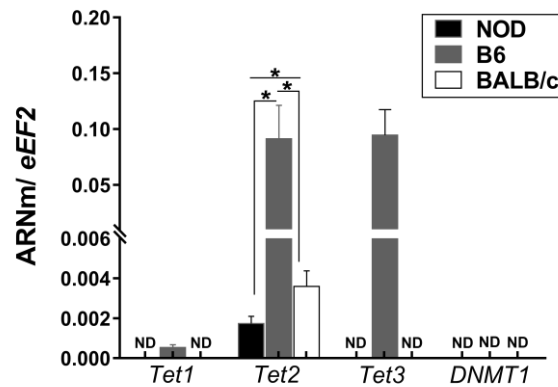


Figura 30: Expresión de enzimas *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, y *DNMT1* en Treg purificadas de la cepa NOD, B6 y BALB/C. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y la expresión de *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, y *DNMT1* fue evaluada mediante PCR en tiempo real. En la figura se muestra gráfico de barras con valores que representan la expresión relativa de *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, y *DNMT1* en función a *eEF2* (control endógeno) y fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Valores de * $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. **ND:** No detectable.

estar relacionado con la baja expresión de Foxp3 en condiciones basales y la inestabilidad para mantener la expresión de Foxp3 luego de ser estimuladas *in vitro* en esta cepa.

Inestabilidad de células T regulatorias

Los resultados presentados hasta aquí indican que ratones de la cepa NOD presentan células Treg con alteraciones en más de una vía involucrada en el mantenimiento de la expresión de Foxp3, evento indispensable para la estabilidad de esta población. Datos bibliográficos recientes demuestran que, en condiciones homeostáticas, una pequeña proporción de células Treg pierde la expresión de Foxp3 y adquiere un fenotipo de memoria/efectora con diferentes niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IFN- γ e IL-17 (4,9). Debido a que en nuestros ensayos hallamos una importante fracción de células que perdían la expresión de Foxp3 luego de tres días de cultivo en presencia de IL-2r (Figura 23), lo siguiente fue determinar si aquellas células que ya no expresaban Foxp3 (ex-Treg) estaban produciendo citoquinas de tipo inflamatorio. En experimentos donde células Treg CD4⁺CD25^{hi} (>97% Foxp3⁺) purificadas de bazo de ratones de todas las cepas fueron estimuladas por tres días con anticuerpos anti-CD3/CD28 e IL-2r, se determinó mediante citometría de flujo intracelular si aquellas células tanto Foxp3⁻ como Foxp3⁺ estaban produciendo citoquinas de tipo proinflamatorias como IFN- γ e IL-17 (Figura 31). Luego de 3 días de cultivo en

presencia de IL-2r, ratones de la cepa NOD mostraron un perfil mixto de células CD4⁺Foxp3⁻ productoras de citoquinas IFN- γ e IL-17, siendo la proporción de estas significativamente mayor (~3%) que para las demás cepas. De manera interesante, un porcentaje significativo de células Treg incubadas en las mismas condiciones y que aún expresaban Foxp3, también producían citoquinas proinflamatorias, observándose un porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺IFN- γ ⁺ significativamente mayor en ratones NOD comparado a las demás cepas (Figura 31). En resumen, estos resultados sugieren que

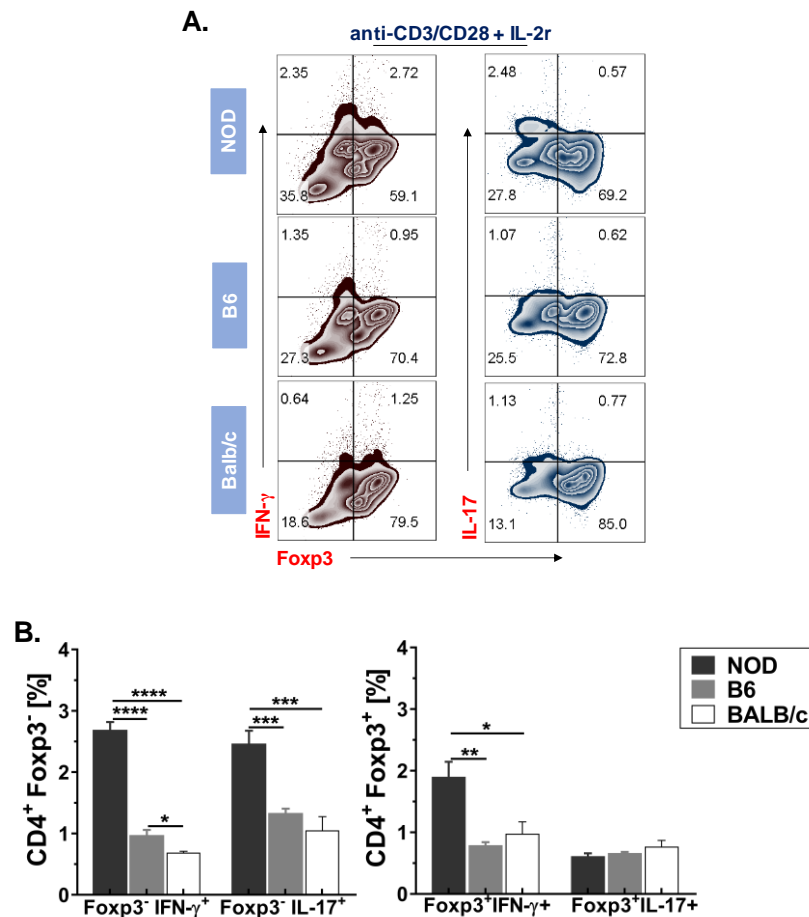


Figura 31: Producción de IFN- γ e IL-17 por células CD4⁺Foxp3⁻ (Ex-Treg) luego de tres días de estímulo in vitro con anti-CD3/CD28 e IL-2r. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y fueron estimuladas in vitro con anti-CD3/CD28 en presencia de 200 UI/mL de IL-2r durante tres días. Pasado el tiempo de incubación se determinó el porcentaje de células productoras de IFN- γ e IL-17 mediante citometría de flujo intracelular. Células muertas fueron excluidas del análisis **A**). Gráficos de densidad de citometría de flujo representativos que muestran los valores de la frecuencia de células ex-Treg (CD4⁺Foxp3⁻) y Treg (CD4⁺Foxp3⁺) IFN- γ ⁺ e IL-17⁺ para cada cepa luego de tres días de estímulo con IL-2r. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B**). Gráficos de barras que muestra el porcentaje de células ex-Treg (CD4⁺Foxp3⁻) y Treg (CD4⁺Foxp3⁺) IFN- γ ⁺ e IL-17⁺ para cada cepa en estudio luego del estímulo con IL-2r. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos mostrados corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001; ****p< 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos

células Treg de ratones de la cepa NOD no solo pierden expresión de Foxp3, sino que además se convierten en células productoras de citoquinas proinflamatorias.

Estudio de la expresión de proteínas relacionadas a procesos de ubiquitinación y desubiquitinación en células Treg de las cepas NOD, B6 y BALB/C

Reportes recientes han demostrado que Foxp3 puede sufrir modificaciones post-traduccionales tales como la ubiquitinación, proceso en el que Foxp3 sufre degradación proteosomall, afectando su expresión y la estabilidad del fenotipo células Treg y que además podría estar involucrada en la generación de las células *ex-Foxp3* (3, 8). En este sentido se ha demostrado que bajo estímulos inflamatorios la expresión de la UbL E3 STUB-1 se incrementa, resultando en la poli-ubiquitinación de Foxp3 y la pérdida de proteína dependiente del proteosoma. Este proceso es reversible y puede ser contrarrestado por la acción de una enzima DUB que preserva los niveles de Foxp3 y es conocida como USP7 (8). Bajo condiciones inflamatorias USP7 es regulada negativamente en las células Treg, lo cual facilita la degradación de Foxp3 e inhibición de su función supresora. Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, el siguiente objetivo fue determinar que ocurría con la expresión de STUB-1 y USP7 en células Treg en estado basal y luego de la activación vía TCR con o sin IL-2r. En la Figura 32 se muestra la expresión de STUB-1 y USP7 en células Treg antes y después de ser estimuladas *in vitro*. La expresión de STUB-1 y USP7 en células Treg al día inicial (condiciones basales) mostró una relación inversa entre las diferentes cepas, observándose alta expresión para STUB-1 y casi nula expresión para USP7 en células Treg de ratones NOD con respecto a las demás cepas (Figura 32A-B). La expresión de estas enzimas también fue determinada a nivel de ARNm en células Treg de todas las cepas en estado basal mediante PCR en tiempo real (Figura 32C). Una alta expresión del ARNm de *Stub1* fue detectada en células Treg de ratones NOD, mientras que bajos niveles e indetectables fueron observados en células Treg de la cepa B6 y BALB/c, respectivamente. Altos niveles de expresión del ARNm de *USP7* fueron encontrados para todas las cepas con respecto a la expresión observada para *Stub1*, sin embargo, células

Treg purificadas de la cepa BALB/c mostraron los niveles de expresión más altos para *USP7* (Figura 32C).

Luego de tres días de estímulo en ausencia de IL-2r, el nivel de expresión de STUB-1 en células Treg de la cepa NOD se mantuvo con respecto al día inicial, aunque

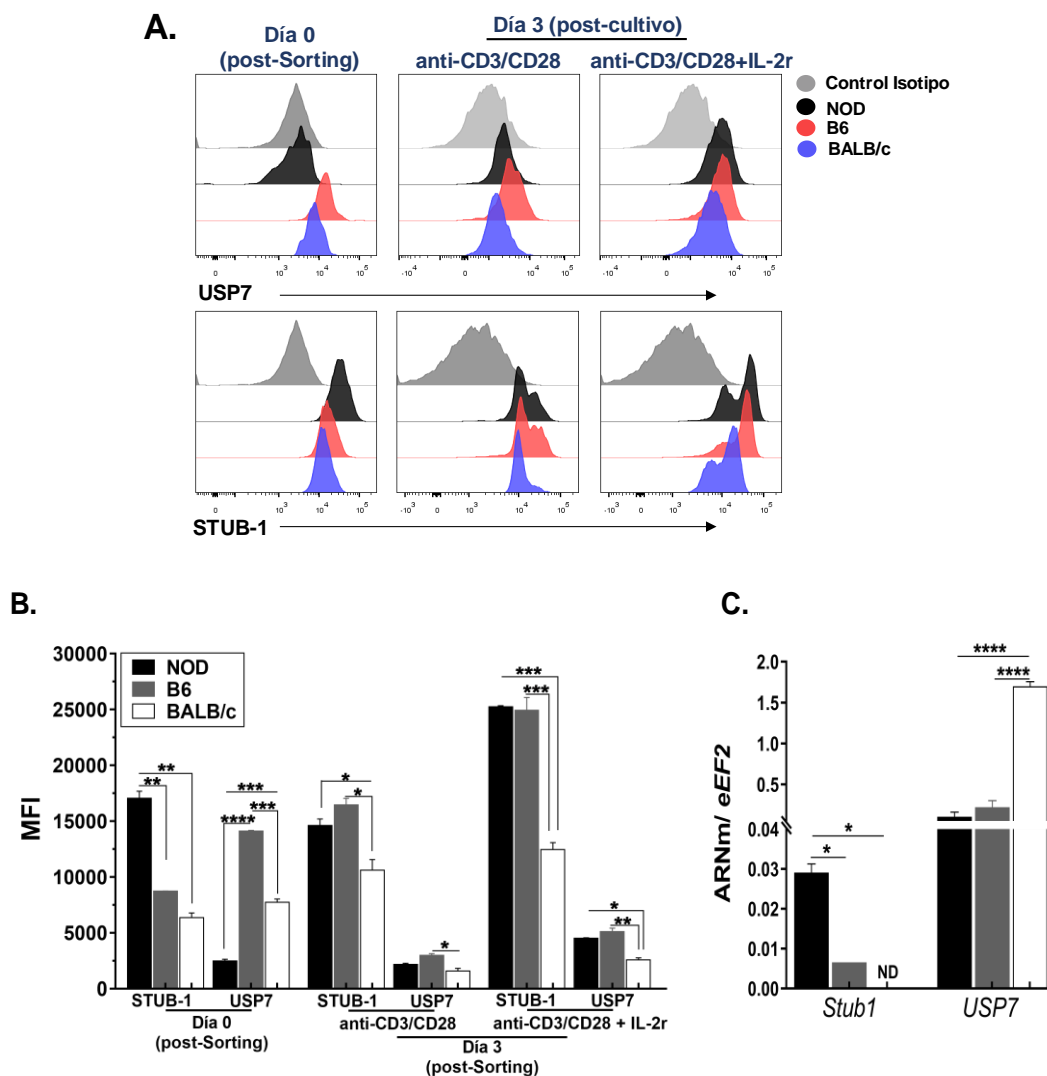


Figura 32: Expresión de STUB1 y USP7 en células Treg sin estimular y luego de la estimulación in vitro con anti-CD3/CD28 e IL-2r. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y la expresión de STUB-1 y USP7 fue evaluada mediante citometría de flujo y PCR en tiempo real. **A).** Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran la expresión de STUB-1 y USP7 en Treg purificadas de las tres cepas sin estimular (Día 0 post-sorting) y en Treg estimuladas con anti-CD3/CD28 en presencia o no de IL-2r luego de 3 días de cultivo. Se incluye además control de isotipo. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes. **B).** Gráfico de barras que muestra los valores del nivel de expresión (MFI) de STUB-1 y USP7 en Treg purificadas de ratones NOD, B6 y BALB/c para las condiciones antes indicadas. **C).** Expresión de *Stub1* y *USP7* en Treg purificadas de bazo de las 3 cepas. Los valores representan la expresión relativa de *Stub1* y *USP7* en función a eEF2 (control endógeno) y fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

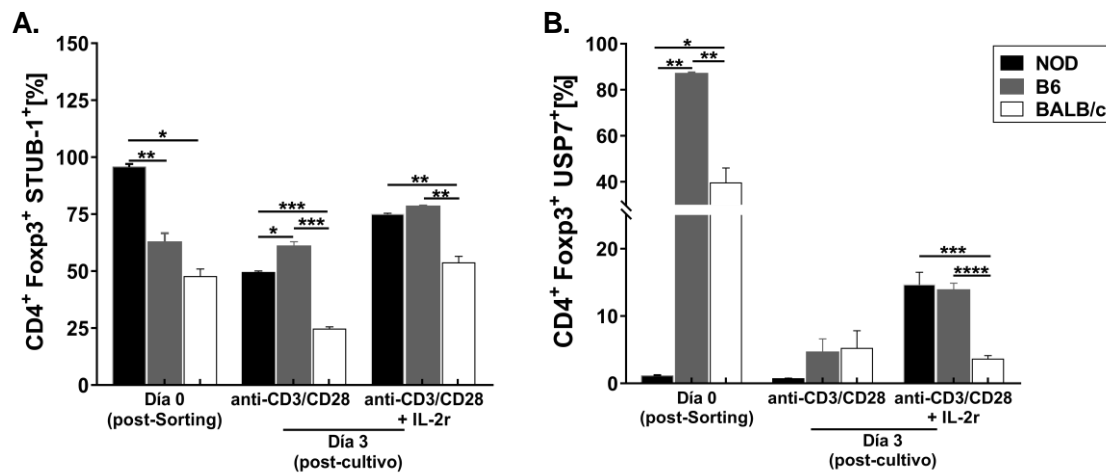


Figura 33: Proporción de células T regulatorias Foxp3⁺STUB-1⁺ y Foxp3⁺USP7⁺ en células Treg sin estimular y luego de la estimulación in vitro con anti-CD3/CD28 e IL-2r. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y la frecuencia de células Treg STUB-1⁺ y USP7⁺ fue evaluada mediante citometría de flujo **A**). Gráfico de barras que muestra los valores de frecuencia de Treg STUB-1⁺ de ratones NOD, B6 y BALB/c para las condiciones indicadas. **B**). Gráfico de barras que muestra los valores de frecuencia de Treg USP7⁺ de ratones NOD, B6 y BALB/c para las condiciones indicadas. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

siempre mayor que el nivel de expresión observado para células Treg de la cepa BALB/c. Es importante destacar que tanto células Treg de las cepas B6 como células Treg de la cepa BALB/c mostraron un aumento en la expresión de STUB-1 con respecto a la expresión hallada en el día 0, y casi nula expresión de USP7 (Figura 32B). Aquellas células Treg que fueron estimuladas durante tres días en presencia de IL-2r, mostraron un incremento significativo en el nivel de expresión de STUB-1 con respecto a las demás condiciones, pero significativamente mayor en células Treg de la cepa NOD y B6. En presencia de IL-2r, la expresión de USP7 en células Treg de todas las cepas disminuyó con respecto al día inicial, aunque esta disminución fue menor para células Treg de la cepa BALB/c. Análisis de la frecuencia de células Treg CD4⁺Foxp3⁺STUB-1⁺ y CD4⁺Foxp3⁺USP7⁺ arrojaron resultados similares. Ratones de la cepa NOD mostraron mayor proporción de células Treg CD4⁺Foxp3⁺STUB-1⁺ para todas las condiciones con respecto a ratones de la cepa BALB/c (Figura 33A), mientras que la proporción de células Treg CD4⁺Foxp3⁺USP7⁺ fue muy baja para la cepa NOD en el día inicial y aumentó luego de 3 días de cultivo en presencia de IL-2 con respecto a la cepa BALB/c (Figura 33B). Se podría hipotetizar que el aumento de USP7 en células Treg de la cepa NOD no fue suficiente para contrarrestar la alta expresión de la enzima ubicuitinante STUB-1, y la degradación de Foxp3. En resumen, estos datos sugieren que células Treg de ratones NOD podrían estar sufriendo

degradación proteosomal de Foxp3 mediante STUB-1 con la consecuente pérdida de expresión de este factor de transcripción imprescindible para la estabilidad de la población.

En contraste con el rol positivo de la señalización de IL-2 en la estabilización de la expresión de Foxp3, las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IFN- γ comprometen de manera severa la expresión de Foxp3 incluso en presencia de cantidades óptimas de IL-2 (8). Teniendo en cuenta que bajo condiciones inflamatorias la expresión de STUB-1 es incrementada y que USP7 es regulada negativamente (8), lo siguiente fue investigar si en presencia de citoquinas proinflamatorias la expresión de Foxp3, STUB-1 y USP7 se veía afectada en células Treg de todas las cepas (Figura 34A-B). Como se observa en la Figura 34 y en concordancia con reportes bibliográficos, luego del cultivo con citoquinas

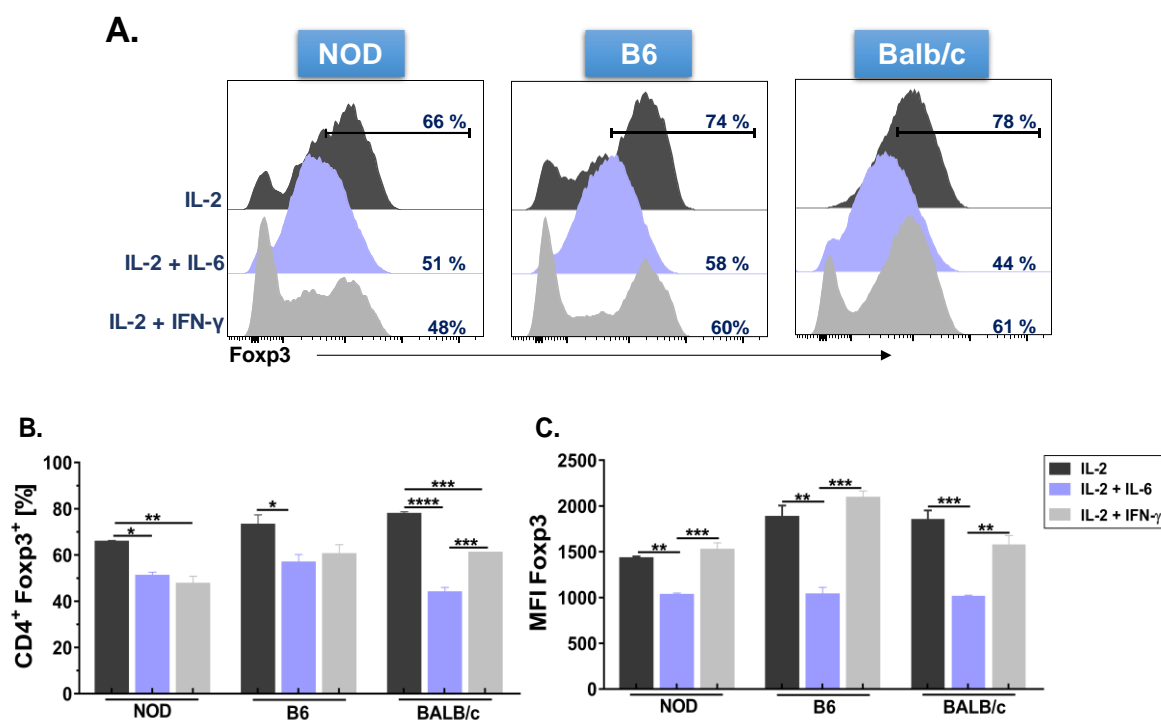


Figura 34: Estabilidad de la expresión de Foxp3 luego del agregado de citoquinas proinflamatorias. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y fueron estimuladas *in vitro* con anti-CD3/CD28 en presencia de IL-2, IL-6 e IFN- γ recombinantes durante tres días. Pasado el tiempo de cultivo se determinó la frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ y la expresión de Foxp3 en términos de MFI para todas las condiciones evaluadas mediante citometría de flujo intracelular. Células muertas fueron excluidas del análisis **A**). Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran la expresión de Foxp3 para cada cepa luego de tres días de estímulo bajo las condiciones indicadas. Los valores en los gráficos corresponden a la media de la frecuencia de células Treg CD4⁺Foxp3⁺. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B**). Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ para cada cepa en estudio y en las condiciones indicadas. **C**). Gráfico de barras que muestra la expresión de Foxp3 (MFI) en Treg de las 3 cepas en estudio y en las condiciones indicadas. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

proinflamatorias la proporción de células Treg Foxp3⁺ disminuyó significativamente para todas las cepas. En ratones de la cepa NOD la disminución de la proporción de células Treg Foxp3⁺ fue significativa en presencia de ambas citoquinas proinflamatorias, siendo aún mayor en cultivos donde se adicionó IFN- γ con respecto a la condición donde solo había IL-2 en el medio (Figura 34A y 34B). En ratones B6 la proporción de células Treg Foxp3⁺ sólo se vio disminuida en presencia de IL-6, mientras que en presencia de IFN- γ la pérdida de Foxp3 no fue significativa con respecto a células Treg cultivadas solo con IL-2. Por último, en células Treg de ratones de la cepa BALB/c la proporción de células

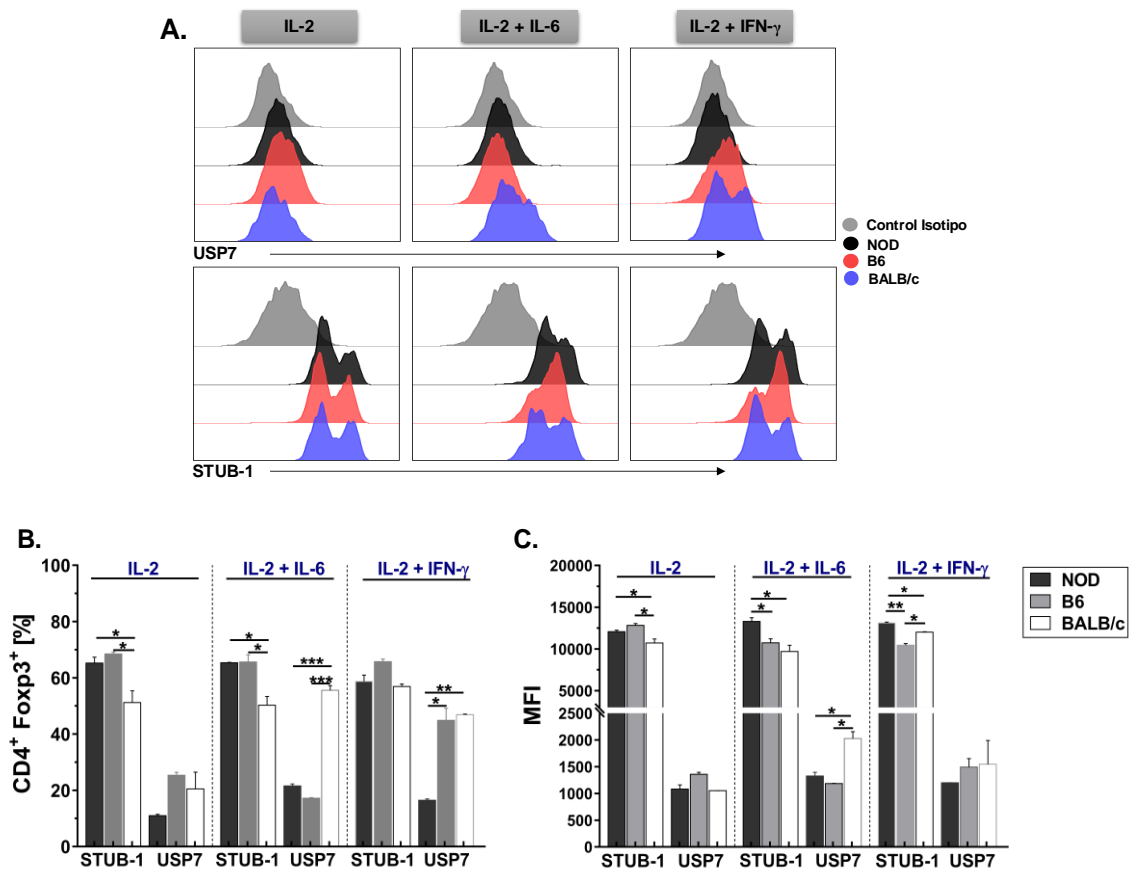


Figura 35: Expresión de STUB-1 y USP7 en Treg estimuladas *in vitro* en presencia de citoquinas proinflamatorias. Células Treg (CD4⁺CD25^{hi}) se purificaron de bazo de ratones NOD, B6 y BALB/c y fueron estimuladas *in vitro* con anti-CD3/CD28 en presencia de IL-2, IL-6 e IFN- γ recombinantes durante tres días. Pasado el tiempo de cultivo se determinó la expresión de STUB-1 y USP7 en Treg para las condiciones antes indicadas mediante citometría de flujo intracelular. Células muertas fueron excluidas del análisis **A**). Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran el nivel de expresión para STUB-1 y USP7 en células Treg para cada cepa luego de tres días de estímulo bajo las condiciones indicadas. El análisis es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares. **B**). Gráfico de barras que muestra el porcentaje de células Treg CD4⁺Foxp3⁺STUB-1⁺ y CD4⁺Foxp3⁺USP7⁺ para cada cepa en estudio y en las condiciones indicadas. **C**). Gráfico de barras que muestra la expresión (MFI) de STUB-1 y USP7 en Treg de las 3 cepas en estudio y en las condiciones indicadas. Para purificar la población celular se partió de un conjunto de 12 animales por cepa. Los datos corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes con resultados similares. Valores de *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Treg Foxp3⁺ también fue significativamente menor en presencia de IL-6 e IFN- γ con respecto a la condición donde las células Treg solo fueron estimuladas con IL-2r, aunque la disminución fue más pronunciada en presencia de IL-6 (Figura 34A y 34B). En cuanto al nivel de expresión de Foxp3 de células Treg estimuladas en presencia de citoquinas inflamatorias, solo se vieron cambios en la condición donde IL-6 fue agregada, observándose una disminución de expresión de Foxp3 similar en todas las cepas (Figura 34C). Para investigar si la inestabilidad en la expresión de Foxp3 además estaba relacionada con el incremento de la UbL E3 STUB-1 y/o disminución de la expresión de USP7, realizamos estimulaciones de células Treg purificadas en las condiciones *in vitro* antes mencionadas y la expresión de STUB-1 y USP7 fue determinada mediante citometría de flujo intracelular (Figura 35). La proporción de células Treg CD4⁺Foxp3⁺STUB-1⁺ fue similar entre las distintas condiciones para todas las cepas, aunque siempre menor en ratones de la cepa BALB/c. De manera interesante, la proporción de células Treg CD4⁺Foxp3⁺USP7⁺ fue significativamente menor en ratones NOD con respecto a la cepa BALB/c en las condición donde la citoquina proinflamatoria IL-6 fue agregada, y significativamente menor con respecto a las demás cepas en la condición donde se agregó IFN- γ (Figura 35A y 35B). Cuando se analizó el nivel de expresión de STUB-1 y USP7, se observó mayor expresión de STUB-1 en células Treg de ratones NOD para todas las condiciones evaluadas; mientras que prácticamente nulos niveles de expresión de USP7 fueron encontrados en células Treg estimuladas con IL-6 de ratones NOD y B6 con respecto a la cepa BALB/c (Figura 35C). Analizando en conjunto, estos resultados demuestran que células Treg de ratones NOD, B6 y BALB/c son inestables en presencia de citoquinas proinflamatorias ya que una fracción de células deja de expresar Foxp3, y este evento no se relaciona a cambios en la expresión de STUB-1 y USP-7.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tercer y última parte del trabajo de tesis nos permiten concluir que células Treg de la cepa NOD en comparación con células Treg de las cepas B6 y BALB/c muestran:

- ✓ Menor proporción de células Treg Foxp3⁺pSTAT5⁺ luego del estímulo con IL-2.
- ✓ Menor nivel de expresión de pSTAT5 luego del estímulo con IL-2.
- ✓ Mayor expresión de SOCS3, OTUB-1 con respecto a células Treg de ratones BALB/c y menor de GRAIL en estado basal con respecto a las demás cepas.

- ✓ Menor expresión de GRAIL y mayor de OTUB-1 luego del estímulo vía TCR+IL-2
- ✓ Menor expresión de Tet2, enzima involucrada en la hipometilación de CNS2.
- ✓ Pérdida de expresión de Foxp3 junto con facilidad para comenzar a expresar IFN- γ e IL-17.
- ✓ Alta expresión de STUB-1 y nula expresión de USP7 en condiciones basales y luego del estímulo vía TCR+IL-2.
- ✓ Inestabilidad en presencia de IFN- γ e IL-6.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que ratones de la cepa NOD poseen una serie de alteraciones que los conducen a tener no solo menor número de Células Treg, si no también Células Treg menos funcionales, con baja respuesta a IL-2 y una regulación de la vía de señalización de IL-2/R-IL-2 disfuncional. Nuestros hallazgos demuestran que los ratones NOD poseen células Treg inestables (aun en presencia de IL-2), y que la pérdida de expresión de Foxp3 podría estar relacionada a alteraciones en la señalización de IL-2 junto con alteraciones en la relación de STUB-1/USP7 que conduzcan a mayor degradación de Foxp3 aun en condiciones no inflamatorias. Estas alteraciones en conjunto podrían contribuir a la baja cantidad y calidad de células Treg observada en esta cepa, lo cual podría ser una de las razones por la que los ratones NOD no logran controlar las respuestas efectoras y como consecuencia son más susceptibles al desarrollo de Enfermedades Autoinmunes.

DISCUSIÓN

Durante este trabajo de tesis se realizó un estudio comparativo y exhaustivo de la población de células Treg en tres cepas de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad, analizando sus principales características fenotípicas y funcionales en estado basal y luego de la activación *in vitro*. Los resultados aquí expuestos demuestran que las células Treg de ratones NOD no solo se encuentran en bajas proporciones y con una baja expresión de Foxp3 en órganos linfoides con respecto a las demás cepas analizadas, sino que además tienen una pobre respuesta de activación frente a un estímulo de proliferación importante para esta población como lo es la citoquina IL-2. Asimismo, hemos demostrado que células Treg de ratones NOD pierden estabilidad en la expresión de Foxp3 luego de ser cultivadas *in vitro*.

Nuestros resultados demuestran que ratones de la cepa NOD poseen no solo menor frecuencia y número absoluto de células Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) en Bazo, GLp, GLpc y GLm con respecto a la cepa BALB/c sino también que expresan en menor medida Foxp3. En muchos de los parámetros analizados las mayores diferencias fueron observadas entre células Treg de ratones NOD y BALB/c, mientras que para muchos aspectos las células Treg de ratones NOD y B6 no mostraron diferencias importantes. Al respecto, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigadores en los que no encontraron diferencias en la frecuencia de células Treg entre ratones NOD y B6 (163,169). Los resultados obtenidos en este punto también se corresponden con reportes previos de otro grupo de investigadores en donde demuestran que ratones de la cepa B6 poseen una proporción y número absoluto considerablemente más bajo de células Treg en órganos linfoides periféricos (bazo, ganglios linfáticos inguinales, axilares y mesentéricos) en comparación con la cepa de ratones BALB/c (170,171). Por otro lado, se ha descrito que ratones NOD exhiben una disminución del número de células Treg y menor nivel de expresión de Foxp3 con el avance de la edad (172) y con el tiempo las células Tef patogénicas se vuelven resistentes a la supresión en los islotes pancreáticos (162,173). Algunas de las discrepancias podrían ser debidas al uso de diferentes marcadores para identificar esta población, en particular porque muchos estudios fueron realizados basándose en la expresión de CD25 y no en Foxp3. Otra posibilidad para comprender la discrepancia acerca de las cantidades y funcionalidad de células Treg en la cepa NOD podría deberse a la edad de los animales usados en los estudios, razón por la cual en la presente tesis se utilizaron ratones de 4-6 semanas, que nos asegura que los mismos no presentan aun infiltración en páncreas y/o otros tejidos.

La mayoría de las células Treg que se encuentran en periferia son originadas en timo y una deficiencia en la generación de tTreg se asocia con la incapacidad de mantener la tolerancia periférica hacia antígenos propios (5). En estudios previos se ha reportado que la producción tímica y la exportación de tTreg no es diferente entre ratones de la cepa NOD y cepas no autoinmunes (174). Además, en estudios más recientes se ha reportado que en ratones NOD el compartimento de tTreg tiene una diversidad de TCR defectuosa o reducida a pesar de tener una celularidad normal en timo (175,176). En esos estudios se demostró que ese fenotipo es atribuible a perturbaciones en las etapas tempranas y tardías del desarrollo de timocitos, lo cual contribuiría al desarrollo de autoinmunidad en esta cepa de ratón. En nuestros experimentos solo fue evaluada la frecuencia y el número absoluto de células Treg en timo y no, por ejemplo, la diversidad del repertorio de esas tTreg o la exportación tímica de las mismas por lo que no podemos concluir nada al respecto. A pesar de encontrar menor número de células Treg en timo de ratones NOD con respecto a las demás cepas, un hallazgo llamativo fue que la expresión de Foxp3 en células Treg tímicas fue similar para todas las cepas, por lo que podemos hipotetizar que la pérdida en la expresión de Foxp3 ocurre una vez que las células Treg salen a periferia.

La mayoría de las células Treg se desarrollan en el timo (tTreg), pero una proporción de células Treg Foxp3⁺ se genera en la periferia (pTreg) a partir de células T CD4⁺Foxp3⁻ (linfocitos T vírgenes maduros). Cabe destacar que al evaluar la cantidad de células Treg mediante marcaciones con CD4, CD25 y Foxp3 intracelular no es posible distinguir si se trata de tTreg o pTreg (49,177). En el año 2010, Thornton y col. reportaron que Helios, un miembro de la familia Ikaros, se expresa en células tTreg y que podría usarse como marcador para distinguir entre células tTreg y pTreg (27). Otros dos grupos, informaron que Nrp1, un receptor de la semaforina III, podría usarse también como marcador para las células tTreg en ciertas condiciones (29,30). Previamente también se reportó que Nrp1 podría ser propuesto como marcador para células Treg de ratón pero no para células Treg humanas; y que es expresada en estadios tardíos del desarrollo comparados a Helios y Foxp3 (178,179). A la fecha existe bastante discrepancia en cuánto a cuál sería el marcador más adecuado para distinguir estas poblaciones. En trabajos previos se ha demostrado que en timo no todas las células Treg Foxp3⁺ de ratones no manipulados de las cepas CD-1, NOD y B6 expresan Nrp1, demostrando que la frecuencia de células Helios⁺ fue más alta que células Nrp1⁺ en la población de células Treg CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ de timo (28). Por todo lo expuesto, en el presente trabajo de tesis

utilizamos el marcador Helios para analizar las poblaciones tTreg y pTreg en ratones NOD, B6 y BALB/c. En nuestros resultados no encontramos diferencias significativas en las poblaciones tTreg y pTreg en bazo y GLm entre cepas, excepto en los GLp donde ratones de la cepa NOD mostraron una baja y alta proporción de tTreg y pTreg, respectivamente, comparado a las demás cepas. Aunque se postula que las tTreg tendrían mayor implicancia en el control de respuestas contra lo propio y las pTreg participarían más en las respuestas en mucosas y placenta, nuestros resultados no mostraron grandes diferencias en los niveles de tTreg en ratones NOD y un análisis más profundo de las especificidades de estas subpoblaciones sería necesario para avanzar en este aspecto. Un dato interesante, recientemente reportado es que ratones NOD CNS1 deficientes, que no pueden generar pTreg, poseen menor frecuencia de células Treg en periferia y mayor riesgo de diabetes demostrando así que las pTreg también contribuyen al control de diabetes autoinmune en ratones NOD (180).

Las células Treg también pueden ser generadas *in vitro* (iTreg) en presencia de TFG- β e IL-2 a partir de LT CD4⁺ vírgenes activados tal y como ocurre *in vivo* en tejidos periféricos, induciendo no solo la expresión de Foxp3 sino también algunas características tales como su propiedad supresora (181,182). Como se mencionó previamente, el fenotipo de las células Treg inducidas de esta manera es inestable (25)(24,25), y no son supresoras en todos los ensayos, adquiriendo solo un segmento de la firma transcripcional de una célula Treg (25). A pesar de ello y con la intención de obtener una aproximación a lo que ocurriría *in vivo*, en nuestro trabajo de tesis la inducción de iTreg fue realizada en las 3 cepas a partir de LT CD4 vírgenes purificados de bazo; y para nuestra sorpresa el porcentaje de inducción de células CD4⁺Foxp3⁺ fue menor en ratones NOD e incluso con una baja expresión de Foxp3, CD25, CTLA-4, LAP-1, CD39, PD-1, PDL-1 y LAG-3 con respecto a las demás cepas. Si bien se ha demostrado que células iTreg no son estables en el tiempo, estos resultados nos permiten inferir la baja capacidad que tendría un linfocito T CD4⁺ de inducir Foxp3 en la periferia en los ratones NOD, propensos a desarrollar autoinmunidad con la edad. En tal sentido, sería importante estudiar la estabilidad de expresión de Foxp3 en células iTreg cultivadas de las tres cepas por un tiempo mayor al evaluado en nuestros experimentos y además estudiar si esas células son funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*.

Recientemente la amplia gama de propiedades funcionales de las células Treg ha sido asociada con su heterogeneidad fenotípica, tales como su localización (15) y su

estado de activación, que definen su ubicación anatómica y homeostasis. Así en periferia se puede encontrar una población de células Treg “centrales/virgenes” (vTreg), que tiene características circulatorias similares a las células T CD4⁺ vírgenes convencionales y una población de células Treg “efectoras/memoria” (emTreg), que serían continuamente activadas por antígenos propios. Estas dos subpoblaciones en ratón pueden ser distinguidas por la expresión diferencial de CD44 y CD62L (L-selectina) (32). Se ha reportado que las emTreg probablemente estén involucradas en la inmunoregulación y protección de enfermedades autoinmunes (133); y que además el repertorio del TCR de este subtipo es diferente al de las vTreg y las células Tef (31). Por otra parte, Szanya y col. demostraron que las células Treg CD62L^{high} (que además expresan altos niveles de CCR7, que les permite migrar a órganos linfoides) retrasan el desarrollo de diabetes *in vivo* en ratones NOD (184). Dado los antecedentes antes mencionados, en la presente tesis se decidió evaluar la proporción de los subtipos de vTreg y emTreg en órganos linfoides secundarios de todas las cepas en estudio. Como resultado, hallamos una baja proporción de vTreg y una alta proporción de emTreg en bazo y GLp de ratones NOD concordantes con los resultados obtenidos por otros grupos de investigadores en los que hallaron una disminución de la frecuencia de vTreg (184,185) y una aumentada frecuencia de emTreg comparado a la cepa B6 (167). Nuestros resultados sugieren por lo tanto que probablemente ratones NOD no solo tienen más células emTreg que estuvieron en contacto con autoantígenos sino también menor cantidad de vTreg capaces de migrar a órganos linfoides.

Si bien no hay consenso en cuanto a si existen o no deficiencias en el número de células Treg en ratones NOD, lo que sí es aceptado, es una disminución de la función de las células Treg, observación que se desprende de estudios de transferencia adoptiva y ensayos *in vitro* donde se evalúa la actividad supresora (185,186). Los mecanismos que podrían contribuir a una función comprometida de las células Treg en periferia en ratones NOD son múltiples tales como: una disminución del TFG-β activo unido a la membrana relacionada con la edad (187), una insuficiencia de IL-2 (143) y resistencia a la regulación de las células T CD4 convencionales (163). Por otro lado, varios investigadores han demostrado un defecto funcional en células Treg aisladas de individuos con DT1 (188). Estos estudios evaluaron el impacto de las células Treg CD4⁺ CD25⁺ en las células T CD4⁺ respondedoras autólogas después de una activación inespecífica. Aunque los resultados han sido variados, la mayoría de estos estudios mostraron una disminución en

el grado de inhibición mediada por células Treg (124–126). Al respecto, nuestros resultados están de acuerdo con lo ya previamente reportado tanto en el modelo de ratón como en humanos. En ensayos de inhibición de la proliferación de LT CD4 convencionales se obtuvo una baja actividad supresora en células Treg de ratones NOD comparado a las demás cepas; siendo células Treg de la cepa BALB/c altamente supresoras. Además, los resultados aquí obtenidos reproducen los datos reportados por otro grupo de investigadores donde postulan que ratones de la cepa BALB/c no solo tienen mayor frecuencia de células T CD4⁺CD25⁺ que ratones de la cepa B6, sino que además tienen células Treg con mayor capacidad de suprimir la proliferación Tconv (170). Teniendo en cuenta que los mecanismos de supresión utilizados por una célula Treg son múltiples, los defectos que podrían dar una función alterada por ende también lo son. En el presente trabajo analizamos la expresión de moléculas relacionadas con la función supresora de una célula Treg en fresco y luego de ser purificadas y activadas *in vitro* con anti-CD3/CD28 e IL-2 durante 3 días. En condiciones basales, células Treg de bazo de ratones NOD expresaron bajos niveles de CD25 comparado al resto de las cepas; mientras que en GLp una baja expresión de NRP-1, LAP-1, CD39 y PD-1 fue encontrada en células Treg de ratones NOD, incluido bajos niveles de expresión de CD25. En ensayos donde las células Treg fueron purificadas y estimuladas se encontraron diferencias marcadas entre cepas en la expresión de moléculas relacionadas a funcionalidad. Así, células Treg esplénicas purificadas de ratones NOD mostraron un estado de activación disminuido, observándose una expresión significativamente menor de GIRT, LAP-1, CD39, LAG-3 y PD-1. La baja expresión de CD25 observada en células Treg de ratones NOD también podría afectar su funcionalidad, ya que el consumo de IL-2 para células Tef es otro mecanismo descrito en esta población (4). En conjunto estos resultados nos permiten hipotetizar que la funcionalidad defectuosa de células Treg de ratones NOD podría estar asociada a una menor expresión de las moléculas antes mencionadas. Por otra parte, en ratones NOD estos hallazgos sugieren además que el inicio de autoinmunidad podría estar asociado no sólo con una reducción en el número de células Treg, sino también en su función.

Un aspecto interesante para tener en cuenta es que, en los cultivos clásicos de supresión, se evalúa tanto la capacidad de células Treg de suprimir, como la posible resistencia a ser suprimido por parte de las células Tef con un resultado global de una disminución en la proliferación de la célula Tef. En el presente trabajo de tesis al realizar

tanto ensayos clásicos de inhibición de la proliferación de LT, como el análisis del incremento de marcadores asociados a funcionalidad tras la activación de células Treg purificadas, podemos asegurar que la funcionalidad de células Treg se encuentra disminuida en la cepa NOD. Ciertamente, estudios realizados en ratones NOD han demostrado tanto disminución dependiente de la edad en la función de las células Treg como aumento recíproco en la resistencia de las células Tef a la regulación (162,185,186).

Como ya se ha mencionado, normalmente las células Treg tienen una expresión abundante de CD25 (R α IL-2) pero son incapaces de producir IL-2. Las células Treg expresan constitutivamente el R-IL-2 trimérico de alta afinidad (que consiste en R α IL-2, R β IL-2 y la cadena γ_c) para responder a IL-2 producida por LT efectores y, en algunos casos, por células dendríticas (65). IL-2 a través de su interacción con R-IL-2 controla múltiples actividades críticas en las células Treg (65,189,190). La señalización de IL-2 se ha asociado con el desarrollo de células Treg, la homeostasis y la función. Se ha visto que la señalización del R-IL-2 tiene una función esencial, no redundante para el desarrollo de células tTreg en timo, promoviendo la maduración de células inmaduras CD4⁺CD25^{lo}Foxp3^{lo} en células Treg funcionales (189–192). Por otro lado, IL-2 también contribuye a la homeostasis de células Treg (193), en parte al proporcionar señales de supervivencia a las células Treg CD62L^{hi} centrales o en reposo (33) y al sustentar el desarrollo de células Treg Klrp1⁺ de corta duración, diferenciadas terminalmente (194). También se ha propuesto que en ausencia de IL-2, las células Treg no pueden sobrevivir o expandir sus números en el timo y en la periferia (110,195–197). Otros estudios han sugerido que la IL-2 se requiere directamente para la función de las células Treg, y en su ausencia, las células Treg no pueden suprimir la proliferación de LT (67,198). Finalmente, la identidad y su función supresora de células Treg son impuestas por IL-2 a través de la regulación directa de la expresión de Foxp3 (190). Esta propiedad también influye en el desarrollo células Treg inducidas en periferia a partir de LT convencionales (20,199).

Se ha reportado que ratones deficientes en IL-2 o en alguno de los componentes del R-IL-2 (R α IL-2 o R β IL-2), sucumben a un síndrome linfoproliferativo autoinmune agresivo (65,191). IL-2 y el factor de transcripción STAT5, un blanco clave cascada abajo de las quinasas JAK asociadas con el R-IL-2, son indispensables para inducir la expresión de Foxp3 y la diferenciación de las células Treg en el timo (190,191,196,197,200). Estudios de asociación de genoma han revelado una asociación significativa entre DT1 y

los genes de $R\alpha$ -IL2, PTPN2 e IL-2 de la vía de señalización de IL-2 (201). Notablemente, las células Treg aisladas de individuos con DT1 mostraron una señalización de IL-2 significativamente disminuida (202). Los alelos de riesgo asociados a DT1 tanto de $R\alpha$ -IL2 como de PTPN2 contribuyen a este defecto en la señalización (203,204). Sin embargo, se ha demostrado que estos dos loci no dan cuenta de todos los defectos observables y se cree que contribuirían con loci adicionales (205). Al igual que en los seres humanos, en el modelo de ratón NOD usado ampliamente para el estudio de DT1, un defecto genético en la vía de la IL-2 contribuye a la susceptibilidad de la DT1(143). El desarrollo de la enfermedad en ratones NOD es complejo y poligénico (138,206). El mayor componente genético de la enfermedad son los genes relacionados al CMH, llamado *Idd1* (diabetes insulino-dependiente 1) (140,141) y el locus de riesgo “diabetes insulino-dependiente 3” (*Idd3*) (142), situado en el cromosoma 3 de ratón que contiene los genes de *Il2* e *Il21*. Ratones que portan la porción *Idd3* tienen menores niveles de IL-2 y se ha demostrado que ratones NOD en los que la región *Idd3* deriva de ratones B6 tienen mayores niveles de IL-2 y una reducción en la aparición de diabetes (144).

En el presente trabajo de tesis estudiamos también la cascada de señalización de IL-2 y su receptor. Teniendo en cuenta que IL-2 es un factor de crecimiento que no solo induce la proliferación de las células Treg sino también que impacta directamente en la estabilidad de expresión de Foxp3; en nuestros experimentos evaluamos como se modificaba la expresión de Foxp3 frente a distintas dosis de IL-2r. Demostramos que células Treg de todas las cepas tenían un comportamiento dosis-respuesta frente al agregado de dosis crecientes de IL-2r, incrementando la expresión de Foxp3, aunque las células Treg de ratones NOD lo hacían con niveles significativamente menores. Las células Treg de ratones NOD proliferaron menos en respuesta a IL-2 y en ausencia de esta citoquina una importante fracción de células dejó de expresar Bcl2, lo que indicaría que son mucho más dependientes de IL-2 como factor de supervivencia. Resultados similares han sido obtenidos en pacientes con DT1 en los que células Treg incubadas en presencia de IL-2r por 4 días mantienen menos la expresión de Foxp3 y el porcentaje de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ decae considerablemente con respecto a pacientes controles (202).

En estudios previos se ha demostrado que la unión de IL-2 a CD25 y la señalización posterior de STAT5 es esencial para la supervivencia de las células Treg Foxp3⁺ en la periferia (190,196,207). Además, IL-2 es uno de los inductores más potentes de la expresión de CD25 y Bcl-2 en las células T (208), por lo que la pérdida de CD25 y

Bcl-2 sugiere una deficiencia de IL-2. Al respecto, se ha demostrado que células Treg en ratones NOD tienen disminuida expresión de Bcl2 y CD25 principalmente en los islotes inflamados. Esto podría ser debido a los niveles disminuidos de IL-2 en los islotes (172). Estudios previos han demostrado que tanto en ratones de la cepa NOD como en pacientes con DT1, células Treg presentan una señalización de IL-2 reducida, con niveles de fosforilación de pSTAT5 reducidos (167,202). En nuestros experimentos observamos bajos niveles de fosforilación de pSTAT5 en células Treg de ratones NOD comparado no solo a ratones de la cepa B6 como ya había sido reportado (167), sino también con ratones BALB/c, siendo los niveles más altos de pSTAT5 observados en células Treg de BALB/c. A través del uso de ratones transgénicos para STAT5, se ha demostrado que la sobreexpresión de STAT5 aumenta dramáticamente el número de células Treg en comparación con ratones wild type (209). Por lo tanto, es razonable plantear que el aumento de STAT5 por el agregado exógeno de IL-2, representa una herramienta para potenciar las células Treg.

SOCS3 es un inhibidor de la señalización del eje IL-2/JAK1/STAT (72,210). Las células Treg basales o activadas, a diferencia de los LT vírgenes y activados (211), expresan bajos o nulos niveles de proteína SOCS3. Se ha demostrado que la sobreexpresión *in vitro* de SOCS3 en células Treg disminuye su proliferación, la expresión de Foxp3 y su función supresora (75). Existe evidencia de que las proteínas SOCS, especialmente SOCS1 y SOCS3, están implicadas en la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes (71). En pacientes con DT1 Gylvin y col. (212) revelaron que una mutación en la región promotora de SOCS3 influye en la sensibilidad a la insulina pacientes con DT1 y podría estar implicado en la patogénesis de la enfermedad. En el presente trabajo reportamos por primera vez que células Treg de ratones NOD sin estimular exhiben altos niveles de ARNm de SOCS3, sugiriendo que la retroalimentación negativa que ejerce SOCS3 podría ser la causa de la reducida señalización de IL-2 con la consecuente respuesta sobre la expresión de Foxp3.

En los último años se ha reportado que GRAIL (*Rnf128*), una UbL E3 relacionada a inducción de anergia en LT (83,213,214) es expresada en células Treg y se asocia con su actividad reguladora (84). En los modelos murinos, la deficiencia de GRAIL se ha asociado con resistencia a la inducción de tolerancia en enfermedades autoinmunes (85). Asimismo, GRAIL es regulado por una DUB denominada OTUB-1 la cual facilita la degradación de GRAIL (87), de manera que el análisis de la relación GRAIL/OTUB-1

es importante para estudiar su función. El mecanismo por el que GRAIL es inducido fue descrito por Lin y col (86), quienes demostraron que en las células T CD4 vírgenes, la pérdida de GRAIL se controlaba mecánicamente a través de una vía que implicaba la coestimulación de CD28 y la producción de IL-2/señalización del R-IL-2 (86). En particular, la señalización del R-IL-2 conduce a la activación de Akt y mTOR, la traducción de OTUB-1 y la posterior degradación de GRAIL que permite la proliferación de los LT. En ausencia de coestimulación (CTLA4-Ig), bloqueo del R-IL-2 (anti-IL-2) o tratamiento con rapamicina, OTUB-1 no se traduce y la expresión de GRAIL se mantiene, dando como resultado la falta de proliferación de LT CD4. Aunque la participación de GRAIL/OTUB-1 se ha descrito durante la activación de LT convencionales, su función y/o posible acción en células Treg es menos conocida. Se ha reportado que pacientes con Lupus tienen niveles disminuidos de GRAIL en células T CD4⁺, defecto que se correlacionó con una cantidad reducida de células Treg en la periferia de estos pacientes (215). Por otro lado, en LT CD4⁺ provenientes de nódulos pancreáticos de ratones NOD, se reportó una expresión disminuida del ARNm de GRAIL (86) comparado a ratones transgénicos NOD.B10 (H-2b) resistentes al desarrollo de la enfermedad. Nuestros resultados demuestran que células Treg de ratones NOD en condiciones basales presentan diferencias en la expresión de GRAIL/OTUB-1. Si bien los niveles de GRAIL se vieron aumentados luego del agregado de IL-2, su expresión fue menor en comparación a las demás cepas en estudio con un importante aumento de la expresión de OTUB-1. Debido a que GRAIL es una E3 Ub es interesante indagar en sus posibles sustratos. Se ha demostrado que GRAIL está involucrado en la degradación del complejo TCR-CD3 presente tanto en LTconv como en células Treg (85). Además, se ha descrito que GRAIL regula la expresión de CD40L en LT CD4 y se ha demostrado que la interacción CD40/CD40L participa en la regulación de la homeostasis de células Treg (216,217). Además, se ha demostrado que GRAIL ubiquitina y degrada CD83 en LT CD4, molécula esencial para la diferenciación de células Treg (218). De manera interesante, se ha sugerido que GRAIL podría afectar la actividad de SOCS3 obstruyendo así la degradación de pJAK1 y afectando de esta manera negativamente la señalización de IL-2 (219,220). Los resultados de la presente tesis doctoral muestran niveles disminuidos de GRAIL y aumentados de SOCS3/OTUB-1 junto con menor respuesta en la señalización de IL-2 en células Treg de ratones NOD, sería interesante analizar los efectos de inhibidores de GRAIL, OTUB-1, SOCS3 en la estabilidad de células Treg.

La estabilidad de la expresión de *Foxp3* se asocia con la hipometilación del ADN en CNS2 (69). Aunque en el presente trabajo no analizamos específicamente este aspecto, estudios que comparan la proporción de CpG metilado en el locus *FOXP3* en células Treg de ratones NOD, B6, CBA, NZW y BALB/c han mostrado patrones similares para todas las cepas (221), lo que sugiere que la inestabilidad en la expresión de *Foxp3* en células Treg de ratones NOD no sería consecuencia de estas alteraciones epigenéticas. En este trabajo de tesis analizamos la expresión de enzimas *Tet* y *DNMT1* que participan en los procesos de metilación y demetilación y describimos menor expresión de la enzima *Tet2* y niveles indetectables de *Tet1* y *DNMT1* en células Treg de ratones NOD. Nair y col (60), describieron que las proteínas Tet desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento y la generación de la hipometilación del sitio CNS2. Los autores encontraron que estas proteínas (en especial *Tet2*) son reclutadas por IL-2 y protegen los motivos CpG del sitio CNS2 de la re-metilación mediada por las enzimas DNMT1, lo cual previene la pérdida de expresión de *Foxp3* bajo condiciones inflamatorias, resultando en la expresión estable de *Foxp3* en células Treg. Sería interesante analizar la expresión de estas enzimas luego del estímulo con IL-2 o en presencia de citoquinas inflamatorias para investigar si al igual que en estado basal, las células Treg de ratones NOD expresan menor expresión de enzimas que mantienen la hipometilación de CNS2 luego de la activación.

Debido a que la expresión de *Foxp3* es directamente asociada con su capacidad supresora (222), en los últimos años e incluso hasta el presente un tema que ha causado mucha controversia es si las células Treg *Foxp3*⁺ pueden perder la expresión de *Foxp3*, perder función supresora, y convertirse en células Tef *Foxp3*⁻ convencionales (223). La capacidad de citoquinas como IL-1, IL-6 e IL-12 para regular negativamente la expresión de *Foxp3* y convertir las células Treg en células efectoras proinflamatorias sugiere que las células Treg retienen cierta plasticidad funcional (223). Al respecto, se ha demostrado que incluso las células Treg del timo pueden convertirse en un fenotipo de células Th17 tras la estimulación con anti-CD3/CD28 e IL-6, lo que demuestra un alto grado de plasticidad (224). Varios estudios independientes en los que las células Treg *Foxp3*⁺ fueron transferidas de forma adoptiva a ratones linfopénicos demostraron que del 10%-50% de las células transferidas perdieron la expresión de *Foxp3* (105,107,225). Para determinar si una parte de las células Treg se convierte en un fenotipo efector, dos grupos generaron ratones diseñados para rastrear el destino de las células *Foxp3*⁺ *in vivo*. En

estos sistemas, los ratones condicionales Foxp3 GFP-CRE se cruzaron con ratones reporteros ROSA26, por lo tanto, en estos animales, las células que expresan transitoriamente Foxp3 están marcadas permanentemente, y sus propiedades fenotípicas y funcionales pueden examinarse espacial y temporalmente. Usando este sistema, Zhou y col. (109), observaron que una parte de las células CD4⁺Foxp3⁺ disminuía la expresión de Foxp3 adquiriendo la capacidad de producir citoquinas efectoras como IFN- γ , incluso en ausencia de cualquier manipulación experimental. Además, usando el modelo de DT1 en ratones NOD, los autores observaron que la generación de estas "células ex Treg" aumentaba en los islotes pancreáticos durante la progresión de la DT1 (109). Esas células ex Treg presentaban un fenotipo memoria efector y producían citoquinas patogénicas. En base a estas observaciones los autores proponen que la inestabilidad de Foxp3 puede conducir a la generación de células T de memoria-efectoras patogénicas que promueven la patología autoinmune. En otro estudio se demostró que durante la infección con una cepa letal de *Toxoplasma gondii*, las células Treg pueden perder la expresión de Foxp3 y adquirir características efectoras de Th1 (226). Sin embargo, en contraste a esto, utilizando un sistema de ratones reporteros similar para monitorear la estabilidad de las células Treg, el grupo de Rudensky demostró que solo una pequeña población perdía la expresión de Foxp3, demostrando que la expresión de Foxp3 era notablemente estable incluso en entornos inflamatorios (106). Además, Miyao y col. (227) demostraron que las células Treg Foxp3⁺ podrían regular de forma transitoria la expresión de Foxp3, recuperándose rápidamente junto con la capacidad supresora tras la activación. Las discrepancias en estos estudios pueden deberse a diferencias en los sistemas inflamatorios utilizados para examinar la estabilidad de las células Treg *in vivo*, o a diferencias sutiles en la forma en que se construyeron los ratones reporteros. En conjunto, estos estudios sugieren que los entornos inflamatorios altamente polarizados pueden subvertir la función de las células Treg al convertirlas en células T efectoras Foxp3⁻ *in vivo*, y son consistentes con un análisis epigenético que demuestra que los locus que codifican los factores de transcripción claves y las citoquinas asociadas con Th1, Th2 y las células Th17 no se reprimen completamente en las células Treg (228).

En el presente trabajo reportamos que luego de estimular *in vitro* células Treg purificadas durante tres días, una fracción de células pierde la expresión de Foxp3 aun en presencia de IL-2, siendo esa fracción de células CD4⁺Foxp3⁻ ex-Treg mayor en ratones de la cepa NOD (>20%). Si bien no podemos afirmar de manera fehaciente que esas

células antes fueron Foxp3⁺ debido a que no disponemos del sistema necesario para monitorearlas, demostramos que aquellas células CD4⁺Foxp3⁻ además eran productoras de citoquinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ e IL-17, siendo el porcentaje de células Foxp3⁻ IFN- γ ⁺ e IL-17⁺ significativamente mayor en ratones NOD (~3%) comparado a las demás cepas en estudio. La posible contaminación de células Foxp3⁻ en nuestros cultivos debe también tenerse en cuenta, ya que en las purificaciones partimos de células CD4⁺CD25⁺(>97% Foxp3⁺) para las 3 cepas, y existe la posibilidad de que algunas ex Treg presentes en estos cultivos pertenecieran al 3% de células Foxp3⁻ presente desde el día cero. Sin embargo, los ratones NOD mostraron una mayor proporción tanto de células Foxp3⁺IFN- γ ⁺/IL-17⁺ como de Foxp3⁻IFN- γ ⁺/IL-17⁺ tras 3 días de activación, sugiriendo que las células Treg de NOD tienen mayor facilidad para expresar citoquinas inflamatorias.

La expresión de proteínas en las células se puede regular tanto por la producción de proteínas como por la tasa de degradación. Gran parte de la proteólisis regulada en células eucariotas está catalizada por el sistema ubiquitina-proteosoma (229). Las cadenas de Ub unidas covalentemente de cuatro o más Ub, marcan una proteína para la degradación por el proteosoma 26S (230). La ubiquitinación de proteínas es un proceso fuertemente regulado y modulado por las ligasas E1, E2 y E3 que, en un complejo, catalizan la adición de Ub a los residuos de lisina de la proteína diana (77,231). La desubiquitinación de proteínas es un proceso igualmente bien regulado y modulado por una gran familia de enzimas desubiquitinantes (DUB) (77). Las DUB catalizan la eliminación de la Ub de sustratos de proteínas específicas, evitando así la degradación de las proteínas, lo que resulta en un aumento de la expresión de la proteína diana (232). Diferentes grupos han demostrado previamente que Foxp3 puede ser poliubiquitinada, sin embargo la regulación de este proceso y sus moduladores todavía no han sido elucidados (93,100,101). Se ha descrito, que los estímulos inflamatorios dan como resultado la degradación dependiente de proteosoma de Foxp3 mediada por la ubiquitinasa STUB1, que se une a Foxp3 y promueve su ubiquitinación ligada a Lys4848 (100). La sobreexpresión de STUB1 elimina la capacidad supresora de las células Treg *in vitro* e *in vivo* y confiere a las células Treg un fenotipo con similitudes con la de la subpoblación de LT Th1; esto plantea la cuestión de si el fenotipo de las células Treg similar a las células Tef en este contexto es un estadio intermedio en camino a la inestabilidad y la pérdida de la expresión de la proteína Foxp3. En contraste, la enzima desubiquitinante

USP7 tiene una alta expresión en las células Treg y está asociada con Foxp3 en el núcleo (101), donde regula el recambio de Foxp3. En condiciones inflamatorias, esta enzima disminuye su expresión, lo que facilita la degradación de Foxp3 (88). Wang y col (102), demostraron que, la eliminación condicional de USP7 en células Treg conduce a una autoinmunidad letal con un número reducido de células Treg en la periferia que muestran un fenotipo aberrante tipo Th1 tanto *in vitro* e *in vivo*. Otro grupo de investigadores estableció que la expresión ectópica de la DUB USP7 específicamente disminuyó la poliubiquitinación de Foxp3, dando como resultado un aumento de la expresión de la proteína (101). Por el contrario, en el mismo estudio se demostró que la eliminación de USP7 resultó en una disminución de la proteína de Foxp3. Además, en estos estudios los autores demostraron que la función de las células Treg disminuyó notablemente cuando se eliminó USP7 o cuando se inhibió la actividad DUB tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, la manipulación de la ubiquitinación de Foxp3 proporciona un mecanismo molecular para asegurar un rápido control temporal de la expresión de Foxp3 en las células T.

En el presente trabajo de tesis hemos reportado por primera vez la expresión diferencial de enzimas que participan en procesos de modificación post-traducciona l de la proteína Foxp3, demostrando que células Treg de ratones NOD tienen alta expresión de STUB-1 y una muy baja expresión de USP7 a nivel proteína y a nivel de ARNm en condiciones basales con respecto a las otras cepas. Teniendo en cuenta que la expresión de estas enzimas es modificada bajo ambientes inflamatorios (tales como IL-6), nuestros datos sugieren que quizás en condiciones basales células Treg NOD podrían estar expuestas a un ambiente inflamatorio que lleva a la degradación de Foxp3 en periferia con la consecuente disminución de la expresión de Foxp3, con respecto a otras cepas no autoinmunes. Cuando células Treg purificadas de todas las cepas fueron estimuladas durante 3 días en presencia de IL-2r, una mayor expresión de STUB-1 y proporción de células Treg STUB-1⁺ fue encontrado en ratones NOD. En conclusión, en el presente trabajo, el mantenimiento de la expresión de Foxp3 en cultivo fue significativamente menor en las células Treg de los ratones NOD en comparación con los ratones B6 y BALB/c, lo cual podría estar asociado a un equilibrio desfavorable de la expresión de estas Ub, junto con una señalización de IL-2 alterada; afectando los niveles de expresión de Foxp3 y, por lo tanto, la funcionalidad de las células Treg en ratones NOD.

Finalmente, teniendo en cuenta que tanto la expresión de Foxp3 como STUB-1 y USP7 son afectadas bajo estímulos inflamatorios, en nuestros experimentos también

analizamos como respondían células Treg purificadas de todas las cepas frente a estímulos proinflamatorios tales como IL-6 e IFN- γ . Luego de tres días, una fracción de células perdió la expresión de Foxp3, de manera similar en todas las cepas, con un efecto mayor en presencia de IL-6. Estos datos fueron consistentes con lo previamente reportado por otro grupo de investigadores que demostraron que células Treg derivadas de bazo luego de ser estimuladas en presencia de IL-6 durante varios días (4-6 días) disminuyen significativamente la expresión de Foxp3 (233). En presencia de citoquinas inflamatorias en los cultivos no se observaron cambios significativos en la expresión de STUB-1, aunque siempre con valores mayores en ratones NOD. Por el contrario, encontramos un aumento de células USP7 en células Treg de las cepas B6 y BALB/c con respecto a ratones NOD, probablemente en compensación a la alta expresión de STUB-1. En conclusión, nuestros resultados demuestran que en condiciones inflamatorias las células Treg de las tres cepas son igualmente inestables, no observándose un efecto mayor en la cepa NOD.

Un hallazgo interesante obtenido a través de todos los ensayos de este trabajo de tesis fue la elevada frecuencia, número absoluto, funcionalidad y capacidad de sobrevivencia en ausencia de IL-2 observada en células Treg de ratones BALB/c. En todos los parámetros evaluados las diferencias más marcadas se observaron entre células Treg de NOD y BALB/c. Estos datos son igualmente importantes, ya que podrían relacionarse, al menos en parte, a la mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores de colon y glándulas mamarias reportado en esta cepa (158), ya que es bien conocido que las células Treg aminoran las respuestas anti-tumorales y tienen un efecto perjudicial (234). En la misma línea de pensamiento, las menores diferencias en las características fenotípicas y funcionales observadas entre células Treg de NOD y B6 podrían relacionarse a la posibilidad de inducir un variado espectro de enfermedades autoinmunes (Encefalitis autoinmune, Miastenia Gravis, Uveítis, etc.) mediante inmunización con autoantígenos y adyuvantes en ratones B6 (235–237).

Restaurar el equilibrio inmunológico mediante la amplificación de las células Treg es actualmente una estrategia prometedora para tratar enfermedades autoinmunes. Sin embargo, las células Treg Foxp3⁺ son inestables cuando se amplifican *in vitro* por lo que la posibilidad de diseñar estrategias de amplificación que combinen factores indispensables como IL-2 y fármacos estabilizadores de células Treg serían ideales. Sin

embargo, para poder seleccionar el fármaco estabilizador apropiado, es importante saber qué vías están particularmente afectadas en las personas propensas a la autoinmunidad.

Integrando los resultados obtenidos en la presente tesis, a través de la comparación de la proporción y los números absolutos de células Treg CD4⁺ Foxp3⁺ entre ratones NOD, B6 y BALB/c demostramos dificultades para mantener las cantidades de células Treg y los niveles de expresión de Foxp3 en células Treg de órganos linfoides secundarios, pero no en el timo. La funcionalidad de las células Treg de ratones NOD fue menor en cultivos mezcla y su respuesta a la estimulación vía TCR más IL-2 fue más débil. En cultivo las células Treg de ratones NOD mostraron ser altamente dependientes de IL-2 para mantener su expresión de Foxp3, convirtiéndose en productoras de IL-17 e INF- γ más fácilmente que las células Treg de las otras cepas. Además, las células Treg de ratones NOD mostraron una menor capacidad de respuesta a la IL-2, no alcanzando los valores de expresión de pSTAT5 observados en las otras cepas, incluso con dosis altas de IL-2. De manera interesante, las células Treg de ratones NOD mostraron niveles más altos de OTUB-1 y SOCS3, junto con menores niveles GRAIL. células Treg de ratones NOD exhibieron mayor expresión de STUB-1 y expresión nula de USP7. Nuestros resultados sugieren que el defecto para mantener la tolerancia hacia lo propio observada en los ratones NOD podría ser el resultado de una sumatoria de mecanismos desregulados en la población de células Treg, con una expresión diferencial de factores (SOCS3, GRAIL, OTUB-1, STUB-1 y USP7) que afectan a la señalización de IL-2 y la estabilidad de Foxp3 en células Treg de ratones NOD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de ratones utilizadas

Durante el presente trabajo de tesis se utilizaron ratones de las cepas NOD, gentilmente cedidos por los Dres. Diane Mathis y Cristoph Benoist y enviados por el laboratorio Jackson (Bar Harbor, Estados Unidos). Los ratones de la cepa BALB/c y C57Bl/6 (B6) fueron adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Todos los animales fueron mantenidos y endocriados en el bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET) bajo condiciones libres de patógenos específicos y de acuerdo con los requisitos del comité ético institucional. Los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad-libitum*, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad a 20 °C bajo humedad controlada. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de Protocolos Experimentales en el uso de animales en los proyectos científicos de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (Resolución 954/2016; 723/2018). Para todos los experimentos realizados en este trabajo de tesis, se utilizaron ratones hembra de 4-6 semanas de edad, edad a la cual los animales de la cepa NOD no evidencian signos de autoinmunidad. Los animales fueron utilizados sin tratamiento previo, es decir, en condiciones basales.

Obtención de órganos linfáticos y aislamiento de células mononucleares (CMN)

Las muestras se obtuvieron de órganos linfáticos provenientes de ratones de las diferentes cepas en condiciones basales, mediante extracción directa. Para ello, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se obtuvo timo, bazo, nódulos linfáticos (axilares, inguinales, mesentéricos y pancreáticos), y placas de Peyer. Una vez extraídos, los mismos se disgregaron de manera mecánica sobre una malla metálica en una solución de PBS 1X suplementado al 3% con SFB (Natocor) para generar una suspensión celular homogénea. En el caso del bazo, las CMN se obtuvieron a partir de un gradiente de densidad Ficol-Hypaque (Sigma Aldrich) con el fin de eliminar los glóbulos rojos, los leucocitos polimorfonucleares y las células muertas. Las células obtenidas se resuspendieron en PBS suplementado al 3% con SFB.

En todas las suspensiones celulares obtenidas, se realizó el recuento de leucocitos vivos en cámara de Neubauer mediante tinción con Azul de Tripán.

Citometría de flujo de moléculas de superficie e intracelular.

- Citometría de Flujo de moléculas de superficie:

Se realizaron marcaciones *ex vivo* de células mononucleares de timo, bazo, pool de nódulos linfáticos axilares e inguinales (pGL) y nódulos linfáticos mesentéricos (mGL), luego de obtener suspensiones homogéneas de las mismas, como antes ya se mencionó. Para ello 1.10^6 células fueron incubadas en 25 μ L de PBS-3% SFB durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, con diluciones apropiadas de anticuerpos monoclonales contra las siguientes moléculas de superficie: CD45 (Biolegend), CD3 (BD Biosciences), CD4 (Biolegend), CD8 (BD Biosciences), CD25 (Biolegend), GITR (Biolegend), LAP-1 (BD Biosciences), Nrp-1 (Biolegend), CD39 (Biolegend), CD73 (Biolegend), LAG-3 (Biolegend), TIM-3 (Biolegend), PD-1 (Biolegend), PD-L1 (Biolegend), CD44 (BD Biosciences), CD62L, (Biolegend), CD103 (BD Biosciences), CXCR3 (Biolegend) y CCR6 (Biolegend); todos ellos conjugados con diferentes fluorocromos convenientemente seleccionados. Luego, las células fueron lavadas con PBS-3% SFB y se prosiguió con la marcación intracelular para la detección de Foxp3.

- Citometría de flujo de moléculas intracelulares.

Para evaluar células Treg se realizaron marcaciones intracelulares de Foxp3. Para ello, luego de la marcación de superficie antes detallada, las células fueron fijadas y permeabilizadas con un kit de fijación y permeabilización para Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Luego de ser permeabilizadas, las células fueron marcadas en 30 μ L del buffer de permeabilización provisto por el kit, durante 45 minutos a 4°C en oscuridad con una dilución adecuada del anticuerpo monoclonal anti-Foxp3 (eBioscience, clon FJK-16s) conjugado a los fluorocromos FITC, PE o APC. El mismo procedimiento fue realizado para la detección intracelular de CTLA-4 (eBioscience), Ki67 (Biolegend), Helios (Biolegend) y Bcl-2 (eBioscience) utilizando una dilución apropiada de los anticuerpos monoclonales conjugados a diferentes fluorocromos, convenientemente seleccionados. Una vez finalizado el tiempo de incubación, las células fueron resuspendidas en PBS para ser adquiridas en un citómetro de flujo FACs-CANTO II (BD Biosciences) o LSRFortessa (BD Biosciences) y los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo X (Versión 10.0.7r2).

Para determinar la producción de IL-10, LAP-1, IFN- γ e IL-17 por parte de células Treg, 1.10^6 células fueron estimuladas *in vitro* en medio RPMI completo (RPMI 1640

(Gibco) suplementando con L-glutamina (2 mM, Gibco), Gentamicina (50 µg/mL), 2β mercaptoetanol (50 mM) y SFB al 10% (vol/vol) adicionado con 50 ng/ml de PMA y 1 µg/ml de Ionomicina (Sigma-Aldrich) durante 4 hs a 37°C. Para evitar su secreción y poder detectarlas dentro de las células, se agregó al mismo tiempo 10 µg/ml de Monensina (Sigma-Aldrich) o Brefeldina (Sigma-Aldrich), ambos inhibidores del transporte vesicular. Las células fueron levantadas de los cultivos y teñidas con anticuerpos contra diferentes moléculas de superficie para luego ser fijadas y permeabilizadas con buffer de fijación y permeabilización para Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Luego de ser permeabilizadas, las células fueron marcadas en el buffer de permeabilización provisto por el kit con una dilución adecuada del anticuerpo monoclonal anti-IL-10, anti-LAP-1, anti-IFN-γ y anti-IL-17 conjugado a diferentes fluorocromos, convenientemente seleccionados. La marcación de las citoquinas intracelular se realizó durante 40 min a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS para ser adquiridas en un citómetro de flujo FACs-CANTO II (BD Biosciences) o LSRFortessa (BD Biosciences), y los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo X (Versión 10.0.7r2).

Siempre que fue necesario se agregaron, al mismo tiempo en que se realizaron las citometrías, controles apropiados tales como controles FMO (Fluorescence minus one) para diferentes moléculas de superficie y/o intracelular.

Por otro lado, en todos los experimentos realizados en este trabajo se incluyó como paso previo a la tinción de superficie, la marcación con un colorante (Live-dead fixable, Dead cells Stain, Invitrogen) para excluir células muertas del análisis de citometría, apto para ser usado en células fijadas.

Purificación de células

Para la purificación de las subpoblaciones de LT CD4⁺ de interés, se obtuvo la suspensión celular de CMNs bajo condiciones de esterilidad a partir de un pool de bazos de 12 animales de las diferentes cepas (NOD, C57BL/6, BALB/c) mediante métodos ya descritos. Luego se procedió a realizar la purificación de LT CD4⁺ CD25⁻ (Tconv) y CD4⁺ CD25^{hi} (Treg) a partir de esa suspensión de CMN mediante la combinación de dos técnicas diferentes.

1. Pre-enriquecimiento de Linfocitos T CD4⁺ con perlas magnéticas: las suspensiones de CMN de bazo obtenidas se enriquecieron en LT CD4⁺ mediante

selección negativa usando perlas magnéticas EasySep (mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit, StemCell) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células recuperadas fueron resuspendidas en un volumen apropiado de buffer MACS (PBS (Gibco) 1X suplementado con 2 mM EDTA (Gibco) y 0,5% SFB (Gibco) filtrado a través de una membrana de 0,22 µm), para la marcación de superficie posterior. Esta suspensión enriquecida en LT CD4⁺ fue teñida durante 20 minutos a 4°C en oscuridad con los anticuerpos monoclonales contra moléculas de superficie CD4 (FITC o PE-Cy7) y CD25 (PercP). Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas y filtradas utilizando un cell strainer de 70 µm (Falcon Corning) para su posterior separación mediante *cell-sorting*.

2. Purificación de linfocitos Tconv y células Treg por Cell-sorting: las células marcadas obtenidas en el paso anterior fueron separadas inmediatamente mediante *cell-sorting* utilizando un equipo BD FACSAria II. Así, se obtuvieron las 2 poblaciones de interés de LTconv y células Treg con una pureza *post-sort* >98% para cada caso, evaluada con el mismo equipo. Adicionalmente, se tomó una alícuota y se realizó el análisis de pureza para la subpoblación de LT CD4⁺ CD25^{hi} (Treg) mediante una marcación de citometría de flujo intracelular para Foxp3. La pureza de células Foxp3⁺ obtenida fue >97%. Las fracciones celulares obtenidas se resuspendieron en RPMI 1640 (Gibco), suplementando con L-glutamina (2 mM), Gentamicina (50 µg/mL), 2β mercaptoetanol (50 mM) y SFB (Gibco) al 10%. El número de células viables fue obtenido mediante el recuento en cámara de Neubauer con tinción Azul de Tripán.

Ensayos de supresión in vitro

Células Tconv (CD4⁺ CD25⁻) y células Treg (CD4⁺ CD25^{hi}) de las 3 cepas, purificadas mediante las técnicas antes descriptas, fueron co-cultivadas *in vitro* con el fin de realizar ensayos clásicos de inhibición de la proliferación de LT. Para ello, las células Tconv fueron teñidas con un colorante verde éster CFSE (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este colorante permite monitorear la proliferación, dado que es posible determinar el número de divisiones celulares a través de su dilución mediante citometría de flujo. Una vez teñidas, fueron resuspendidas en RPMI completo y añadidas en una densidad de 1.10⁵ células/pocillo en una placa de 96 pocillos fondo en U previamente sensibilizada con 1 µg/ml de anti-CD3 (BD) y 0,25 µg/ml de anti-CD28 (BD). A continuación, fueron co-cultivadas con diferentes relaciones de células

Treg resuspendidas también en RPMI completo, manteniendo siempre una densidad de 1.10^5 células de Tconv en cada pocillo y variando solo la cantidad de células Treg. Como control positivo de proliferación se dejaron pocillos con Tconv únicamente y pocillos que contenían Tconv sin estímulos de activación como control negativo de proliferación. El co-cultivo de Tconv-Treg fue mantenido durante 4 días a 37°C y en una atmósfera de CO_2 al 5%; y posterior a ello el porcentaje de proliferación/supresión fue determinado mediante citometría de flujo.

Activación *in vitro* de células Treg

Células Treg purificadas ($\text{CD4}^+ \text{CD25}^{\text{hi}}$) de las 3 cepas en estudio, obtenidos por los métodos ya descritos, fueron resuspendidos en RPMI 1640 completo y añadidos a una placa de cultivo estéril de 96 pocillos fondo en U, previamente sensibilizada con $1 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 (BD) y $0,25 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD28 (BD). Las células fueron añadidas en una densidad de 2.10^5 células/pocillo e incubadas durante 72 hs a 37°C y en una atmósfera de CO_2 al 5% en presencia o no de IL-2 recombinante humana (IL-2rh, PeproTech) a diferentes concentraciones (50, 100 o 200 UI/ml) según sea indicado en cada experimento en la sección de resultados. Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron recolectadas y sus características fenotípicas post activación fueron determinadas mediante citometría de flujo como antes ya se indicó.

Inducción de células Treg *in vitro*

Células Tconv naïve ($\text{CD4}^+ \text{CD25}^- \text{CD62L}^+ \text{CD44}^-$) obtenidos por métodos antes descritos a partir de CMN de bazo de las 3 cepas en estudio, fueron resuspendidas en RPMI completo e incubadas en una placa estéril de 24 pocillos fondo chato, previamente sensibilizada con $2 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 (BD) y $0,25 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD28 (BD) en presencia o no de 100 UI/mL IL-2rh y 5 ng/mL de TGF- β r (ambos de PeproTech). Las células fueron añadidas en una densidad de 500.10^3 células/pocillo y mantenidas en estufa a 37°C y 5% de CO_2 durante 5 días. En algunos pocillos las células Tconv fueron incubadas sin la adición del medio polarizante hacia células Treg, para ser usados como control negativo de inducción de Foxp3. Finalmente, las células fueron recolectadas y el porcentaje de inducción de Foxp3 para cada cepa, fue determinado mediante citometría de flujo. Además, en las células Foxp3+ inducidas de las 3 cepas se evaluó niveles de expresión de moléculas relacionados a fenotipo y función de una célula Treg mediante citometría de flujo.

Activación *in vitro* de células Treg en presencia de citoquinas inflamatorias

Células Treg esplénicas purificadas ($CD4^+CD25^{hi}$) de las 3 cepas en estudio, obtenidos por los métodos ya descritos, fueron resuspendidos en RPMI 1640 completo y añadidos a una placa de cultivo estéril de 96 pocillos fondo en U, previamente sensibilizada con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 (BD) y 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD28 (BD). Las células fueron añadidas en una densidad de $2 \cdot 10^5$ células/pocillo e incubadas durante 72 hs a 37°C y en una atmósfera de CO_2 al 5% en presencia de las siguientes combinaciones de citoquinas recombinantes: IL-2 recombinante humana (IL-2rh, PeproTech) (200 UI/ml), IL-2r (200 UI/mL) + IL-6r (15 ng/mL), IL-2r+ IFN- γ r (100 ng/mL). Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron recolectadas y sus características fenotípicas post activación fueron determinadas según se indica en la sección de resultados, mediante citometría de flujo como antes ya se indicó.

Evaluación de la vía de señalización de IL-2

Tinción de STAT5 fosforilado

Para determinar la fosforilación de la proteína STAT5, células Treg purificadas ($CD4^+ CD25^{hi}$), provenientes de CMN de bazo de las 3 cepas, fueron resuspendidas en RPMI completo y mantenidas en “reposo” durante 1 hora en una placa estéril de 96 pocillos fondo chato a 37°C y 5% de CO_2 . Las células se agregaron en una densidad de $200 \cdot 10^3$ células/pocillo. Pasado el tiempo de reposo, se añadió RPMI completo adicionado con 200 UI/mL de IL-2rh (PeproTech). La inducción de STAT5p fue monitoreada a diferentes tiempos de incubación luego de la adición de IL-2 (0, 30 y 60 minutos). Cumplido el tiempo de incubación correspondiente con IL-2, las células fueron inmediatamente fijadas con 200 μL de paraformaldehído al 2% (p/vol) durante 20 minutos a 37°C . Luego, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm a 4°C durante 5 minutos. El pellet celular obtenido fue resuspendido y permeabilizado inmediatamente con 200 μL de metanol frío (BD Phosflow, Perm Buffer III; BD Biosciences) al 100% (vol/vol). Luego de una incubación en hielo por 30 minutos, las células fueron lavadas 2 veces en PBS suplementado con SFB al 1,5% y teñidas durante 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con diluciones adecuadas de anticuerpos monoclonales para STAT5p (PE; clon pY694; BD), moléculas de superficie relevantes y Foxp3; conjugados a fluorocromos convenientemente seleccionados. Finalmente, las células teñidas obtenidas para cada cepa fueron resuspendidas en 200 μL de PBS para ser adquiridas en un citómetro de flujo y el porcentaje de inducción/degradación de

STAT5p en células Treg de las 3 cepas en estudio fue analizado mediante el uso del software FlowJo (Versión 10.0.7r2).

Tinción intracelular de GRAIL, OTUB-1, STUB-1 y USP7 por citometría de flujo

Para determinar los niveles de expresión de estas moléculas, células Treg esplénicas purificadas y obtenidas por métodos antes descritos, fueron resuspendidas en RPMI completo y mantenidas en “reposo” durante 1 hora en una placa estéril de 96 pocillos fondo chato a 37°C y 5% de CO₂. Las células se agregaron en una densidad de 500.10³ células/pocillo. Pasado el tiempo de reposo, se añadió RPMI completo adicionado con 200 UI/mL de IL-2rh (PeproTech). La expresión de GRAIL y OTUB-1 fue monitoreada a los mismos tiempos que pSTAT5 luego de la adición de IL-2 (0 y 30 minutos). Cumplido el tiempo de incubación correspondiente con IL-2, las células primero fueron teñidas con marcadores de superficie (anti-CD4 y anti-CD25) e inmediatamente fijadas con 100 µL de buffer de fijación para Foxp3 (eBioscience) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. El pellet celular obtenido fue resuspendido y permeabilizado inmediatamente con 100 µL de buffer de permeabilización provisto por el Kit del fabricante. Luego de una incubación en hielo por 45 minutos, las células fueron lavadas con 100µL del buffer de lavado 10X y teñidas durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con diluciones adecuadas de: anticuerpo primario anti-GRAIL y anti-OTUB-1 (rabbit, ABCAM), moléculas de superficie relevantes y anti-Foxp3 (eBioscience). Luego, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (Biolegend) conjugado a un fluorocromo conveniente durante 20 minutos. Las células obtenidas para cada cepa fueron resuspendidas en 200 µL de PBS para ser adquiridas en un citómetro de flujo. Como control se utilizaron células con el agregado de anticuerpo anti-rabbit marcado con fluorocromo, pero sin anti-GRAIL o anti-OTUB-1 (ac primario) para descontar cualquier inespecificidad. Además, se utilizó como control positivo la línea celular HEK293 marcadas con el mismo procedimiento antes descrito.

La determinación de la expresión de STUB-1 y USP7 por citometría de flujo fue realizada de manera similar utilizando células Treg esplénicas purificadas de acuerdo con métodos antes descritos. Luego de la tinción superficial, 500.10³ células Treg de cada cepa fueron fijadas con 100 µL de buffer de fijación para Foxp3 (eBioscience) durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células fueron lavadas y centrifugadas a 2000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. El pellet celular obtenido fue resuspendido y permeabilizado

inmediatamente con 100 μ L de buffer de permeabilización provisto por el Kit del fabricante. Luego de una incubación en hielo por 45 minutos, las células fueron lavadas con 100 μ L del buffer de lavado 10X y teñidas durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con diluciones adecuadas de: anticuerpo primario anti-STUB-1 y anti-USP7 (rabbit, ABCAM), moléculas de superficie relevantes y anti-Foxp3 (eBioscience). Luego, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (Biolegend) conjugado a un fluorocromo convenientemente seleccionado durante 20 minutos. Como control se utilizaron células con el agregado de anticuerpo anti-rabbit marcado con fluorocromo, pero sin rabbit anti-STUB-1 o anti-USP7 (ac primario) para descontar cualquier inespecificidad. Finalmente, las células obtenidas para cada tinción fueron resuspendidas en 200 μ L de PBS para ser adquiridas en un citómetro de flujo FACSCANTO II (BD Biosciences) y analizadas mediante el uso del software FlowJo (Versión 10.0.7r2).

qPCR en Tiempo Real

Tres millones de células Treg fueron purificadas a partir de un pool de bazos de las cepas NOD, B6 y BALB/c. Las mismas fueron resuspendidas en TRizol (Invitrogen) y posteriormente el ARN fue extraído de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir del ARN obtenido se realizó una Retro-transcripción obteniendo ADNc mediante el uso del Sistema de Transcripción Reversa (Promega). Para el gen *Rnf128* (*GRAIL*) el ADNc se amplificó por PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan prediseñadas (Applied Biosystems) y su expresión fue determinada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron sondas con los siguientes números de identificación del ensayo Applied Biosystems: Rnf128, Mn00480990.m1 y Rn18s, Mn03928990.g1. Para cada muestra, la abundancia de ARNm se normalizó a la cantidad de ARN 18S endógeno y se expresó como unidades arbitrarias y la PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en un instrumento StepOne™ (Life technologies).

Los primers utilizados para la amplificación de los genes *Foxp3*, *OTUB-1*, *SOCS3*, *STUB-1*, *USP7*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3* y *DNMT1* fueron los siguientes: **OTUB1_F**: 5'-CGA CTC CGA AGG TGT TAA CTG T-3' y **OTUB1_R**: 5'-GAG GTC CTT GAT CTT CTG TTG G-3' (macrogen); **SOCS3_F**: 5'- TGC GCC TCA AGA CCT TCA G-3' y **SOCS3_R**: 5'- GCT CCA GTA GAA TCC GCT CTC- 3' (macrogen); **STUB1_F**: 5'- CCC CCG CCC CTC CCG CAC TC- 3' y **STUB1_R**: 5'- CAT GCC AGC TCC GCC CCA CA- 3'(macrogen); **USP7_F**: 5'- CCC TCC GTG TTT TGT GCG A- 3' y **USP7_R**:

5'- GAC CAT GAC GTG GSS TCA GA- 3' (macrogen); **TET1_F**: 5'-GAG CCT GTT CCT CGA TGT GG-3' y **TET1_R**: 5'-CAA ACC CAC CTG AGG CTG TT-3'; **TET2_F**: 5'-AGA GCC TCA AGC AAC CAA AA-3' y **TET2_R**: 5'-ACA TCC CTG AGA GCT CTT GC-3'; **TET3_F**: 5'-TCC GGA TTG AGA AGG TCA TC-3' y **TET3_R**: 5'-CCA GGC CAG GAT CAA GAT AA-3'; **DNMT1_F**: 5'-GTG GGG GAC TGT GTC TCT GT-3' y **DNMT1_R**: 5'-ACC AAC TCG GTA CAG GAT GC-3'. La expresión de estos genes fue normalizada al gen eEF2 endógeno y las secuencias de primers utilizadas fueron: **eEF2_F**: 5'-AAG CTG ATC GAG AAG CTG GA -3' y **eEF2_R**: 5'-CCC CTC GTA TAG CAG CTC AC -3' (SIGMA). La PCR cuantitativa se realizó en un instrumento StepOne™ (Life technologies) utilizando SYBR® Select Master Mix (Life Technologies).

Cada experimento de qPCR se realizó al menos por triplicado, en un volumen final de 20 µL. Después de realizar el ciclo térmico, los datos de amplificación de qPCR se analizaron utilizando el software StepOne (Applied Biosystems). La cuantificación de la expresión del ARNm de cada gen fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 7.00). A menos que se indique lo contrario, en todos los análisis los valores p fueron calculados mediante el test estadístico ANOVA de una vía y posterior comparación múltiple de Bonferroni. En aquellos análisis donde correspondía según el diseño experimental, se aplicó el test ANOVA de dos vías y posterior comparación múltiple de Tukey. Los resultados se presentaron como promedio \pm error estándar de la media (SEM). Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ se los consideró estadísticamente significativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pillai S. Rethinking mechanisms of autoimmune pathogenesis. *J Autoimmun.* (2013);45:97–103.
2. Heiber JF, Geiger TL. Context and location dependence of adaptive Foxp3+regulatory T cell formation during immunopathological conditions. *Cell Immunol.* (2012);279:60–5.
3. Pillai S. Rethinking Mechanisms of Autoimmune Pathogenesis. *J Autoimmun.* (2013);93:97–103.
4. Shevach EM. Foxp3+T regulatory cells: Still many unanswered Questions-A perspective after 20 years of study. *Front Immunol.* (2018);9:1–9.
5. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells : Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res.* (2016);4:721–6.
6. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* (2008);8:523–32.
7. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* (2018);19:665–73.
8. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity.* (2009);30:636–45.
9. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol.* (2017);17:703–17.
10. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity.* (2016);44:989–1004.
11. Tai X, Laethem F Van, Pobezinsky L, Guinter T, Sharrow SO, Adams A, et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. *Blood.* (2012);119:5155–63.
12. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Mitri D Di, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* (2007);110:1225–33.
13. Chen ML, Yan BS, Bando Y, Kuchroo VK, Weiner HL. Latency-Associated Peptide Identifies a Novel CD4+CD25+ Regulatory T Cell Subset with TGF - Mediated Function and Enhanced Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* (2008);180:7327–37.
14. Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C, et al. Treg cells expressing the co-inhibitory molecule TIGIT selectively inhibit pro-inflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity.* (2014);40:569–81.
15. Campbell Daniel J.and Meghan A. Koch. Phenotypic and functional specialization of FOXP3+ regulatory T Cells. *Nat Rev Immunol.* (2012);11:119–30.
16. Zemmour D, Zilionis R, Kiner E, Klein AM, Mathis D, Benoist C. Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR. *Nat Immunol.* (2018);19:291–301.
17. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of

- Regulatory T cells. *Immunity*. (2013);38:414–23.
18. Li MO, Rudensky AY, Sloan M, Cancer K, Sloan M, Cancer K. T Cell Receptor Signaling in the Control of Regulatory T Cell Differentiation and Function. (2016);16:220–33.
 19. Kieback E, Hilgenberg E, Stervbo U, Anderton SM, Uckert W, Fillatreau S, et al. Thymus-Derived Regulatory T Cells Are Positively Selected on Natural Self-Antigen through Cognate Interactions of High Functional Avidity Article. I. (2016);44:1114–26.
 20. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T Cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T Cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. (2003);198:1875–86.
 21. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*. (2009);30:626–35.
 22. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G WS. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. (2003);198:1875–86.
 23. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, Vecken J Van Der, Liu H, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. (2013);504:451–5.
 24. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol*. (2016);37:803–11.
 25. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. (2007);5:0169–78.
 26. Szurek E, Cebula A, Wojciech L, Pietrzak M, Rempala G, Kisielow P, et al. Differences in expression level of Helios and neuropilin-1 do not distinguish thymus-derived from extrathymically-induced CD4⁺Foxp3⁺regulatory T cells. *PLoS One*. (2015);10:1–16.
 27. Angela M. Thornton, Patricia E. Korty, Dat Q. Tran, Elizabeth A. Wohlfert, Patrick E. Murray YB and EMS. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J Immunol*. (2010);184:3433–41.
 28. Singh K, Hjort M, Thorvaldson L, Sandler S. Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naïve mice. *Sci Rep*. (2015);5:1–10.
 29. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J Exp Med*. (2012);209:1723–42.
 30. Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, Anthony BA, Sverdrup FM, Head R, Kuster DJ, Ruminski P, Weiss D, Von Schack D BJ. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory

- T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med.* (2012);209:1713–22.
31. Bergot AS, Chacara W, Ruggiero E, Mariotti-Ferrandiz E, Dulauroy S, Schmidt M, et al. TCR sequences and tissue distribution discriminate the subsets of naïve and activated/memory Treg cells in mice. *Eur J Immunol.* (2015);45:1524–34.
 32. Liston A, Gray DHD. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat Rev Immunol.* (2014);14:154–65.
 33. Smigiel KS, Richards E, Srivastava S, Thomas KR, Dudda JC, Klonowski KD, et al. CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med.* (2014);211:121–36.
 34. Lee JH, Kang SG, Kim CH. FoxP3+ T Cells Undergo Conventional First Switch to Lymphoid Tissue Homing Receptors in Thymus but Accelerated Second Switch to Nonlymphoid Tissue Homing Receptors in Secondary Lymphoid Tissues. *J Immunol.* (2007);178:301–11.
 35. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, et al. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest.* (2010);120:883–93.
 36. Beyersdorf N, Ding X, Tietze JK, Hanke T. Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1. *Eur J Immunol.* (2007);37:3445–54.
 37. Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3 + regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med.* (2007);204:1335–47.
 38. Lu J, Meng H, Zhang A, Yang J, Zhang X. Phenotype and function of tissue-resident unconventional Foxp3-expressing CD4+regulatory T cells. *Cell Immunol.* (2015);297:53–9.
 39. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, et al. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue T reg cells. *Nature.* (2012);486:549–53.
 40. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* (80-). (2013);341:569–74.
 41. Ohkura N, Sakaguchi S. Treg Cells Acquire New Directions, Cytokines Navigate. *Immunity.* (2012);37:443–4.
 42. Koch M, Tucker-Heard G, Perdue N, Killebrew J, Urdahl K, Campbell D. The transcription factor T-bet controls Treg homeostasis and function during type-1 inflammation. *Nat Immunol.* (2009);10:595–602.
 43. Hall AOH, Beiting DP, Tato C, John B, Oldenhove G, Lombana CG, et al. The Cytokines Interleukin 27 and Interferon- γ Promote Distinct Treg Cell Populations Required to Limit Infection-Induced Pathology. *Immunity.* (2012);37:511–23.
 44. Ramsdell F, Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: How it all began. *Nat Rev Immunol.* (2014);14:343–9.
 45. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* (2003);4:330–6.

46. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SFRF. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* (2001);27:68–73.
47. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF OH. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* (2001);27:20–1.
48. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* (2001);27:18–20.
49. Josefowicz SZ, Lu LF RA. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol.* (2012);30:531–64.
50. Maruyama T, Konkel JE, Zamarron BF, Chen W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin Immunol.* (2012);23:418–23.
51. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature.* (2010);463:808–12.
52. Schlenner SM, Weigmann B, Ruan Q, Chen Y, von Boehmer H. Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *J Exp Med.* (2012);209:1529–35.
53. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal T H 2 inflammation. *Nature [Internet].* (2012);482:395–9. Available from: doi:10.1038/nature10772
54. Toker A, Engelbert D, Garg G, Polansky JK, Floess S, Miyao T, et al. Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus. *J Immunol.* (2013);190:3180–8.
55. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Paik JH, Depinho RA, Li MO. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+regulatory T cells. *Nat Immunol.* (2010);11:618–27.
56. Kim H-P, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor–induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med.* (2007);204:1543–51.
57. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Fehling HJ, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity.* (2012);37:785–99.
58. Wang L, Liu Y, Han R, Beier UH, Thomas RM, Wells AD, et al. Mbd2 Promotes Foxp3 Demethylation and T-Regulatory-Cell Function. *Mol Cell Biol.* (2013);33:4106–15.
59. Yue X, Trifari S, Äijö T, Tsagaratou A, Pastor WA, Zepeda-Martínez JA, et al. Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *J Exp Med.* (2016);213:377–97.

60. Nair VS, Song MH, Ko M, Oh KI. DNA Demethylation of the Foxp3 Enhancer Is Maintained through Modulation of Ten-Eleven-Translocation and DNA Methyltransferases. *Mol Cells*. (2016);39:888–97.
61. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* (80-). (2009);324:930–5.
62. Wang L, Liu Y, Beier UH, Han R, Bhatti TR, Akimova T HW. Foxp3+ T-regulatory cells require DNA methyltransferase 1 expression to prevent development of lethal autoimmunity. *Blood*. (2013);121:3631–9.
63. Sasidharan Nair V, Song MH, Oh KI. Vitamin C Facilitates Demethylation of the Foxp3 Enhancer in a Tet-Dependent Manner. *J Immunol*. (2016);196:2119–31.
64. Nair VS, Oh KI. Down-regulation of Tet2 prevents TSDR demethylation in IL2 deficient regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. (2014);450:918–24.
65. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*. (2004);4:665–74.
66. Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, Gasteiger G, Feng Y, Fontenot JD RA. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol*. (2016);17:1322–33.
67. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function. *J Immunol*. (2004);172:6519–23.
68. Spolski R et al. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat Rev Immunol*. (2018);
69. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*. (2009);9:83–9.
70. Levy DE, Darnell JE. STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2002);3:651–62.
71. Liang Y, Xu W, Peng H, Pan H. SOCS signaling in autoimmune diseases: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Eur J Immunol*. (2014);44:1265–75.
72. Babon JJ, Nicola NA. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. *Growth Factors*. (2012);30:207–19.
73. Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese L LA, Lucet IS, Norton RS NN. Suppression of Cytokine Signalling by SOCS3: Characterisation of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity*. (2012);36:239–50.
74. Yu CR; Mahdi RM; Ebong S; Vistica BP; Gery I and Egwuagu CE. Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells. *J Biol Chem*. (2003);278:29752–29759.
75. Pillemer BBL, Xu H, Oriss TB, Qi Z, Ray A. Deficient SOCS3 expression in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and SOCS3-mediated suppression of Treg function. *Eur J Immunol*. (2007);37:2082–9.

76. Fathman CG; Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol.* (2007);7:599–609.
77. Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol.* (2002);3:20–6.
78. CM. P. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* (2001);70:503–33.
79. Fathman CG LN. Molecular mechanisms of CD4+ T cell anergy. *Nat Rev Immunol.* (2007);7:599–609.
80. Mueller D. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol.* (2004);5:883–90.
81. Lin A, Mak T. The role of E3 ligases in autoimmunity and the regulation of autoreactive T cells. *Curr Opin Immunol.* (2007);19:665–73.
82. Whiting, CC ; Su, LL; Lin J and FC. GRAIL: A unique mediator of CD4 T lymphocyte unresponsiveness. *FEBS J.* (2011);278:47–58.
83. Seroogy CM, Soares L, Ranheim EA, Su L, Holness C, Bloom D, et al. The Gene Related to Anergy in Lymphocytes, an E3 Ubiquitin Ligase, Is Necessary for Anergy Induction in CD4 T Cells. *J Immunol.* (2004);173:79–85.
84. MacKenzie DA, Schartner J, Lin J, Timmel A, Jennens-Clough M, Fathman CG, et al. GRAIL is up-regulated in CD4+ CD25+ T regulatory cells and is sufficient for conversion of T cells to a regulatory phenotype. *J Biol Chem.* (2007);282:9696–702.
85. Nurieva RI, Zheng S, Jin W, Chung Y, Zhang Y, Martinez GJ, et al. The E3 ubiquitin ligase GRAIL regulates T cell tolerance and regulatory T cell function by mediating T cell receptor-CD3 degradation. *Immunity.* (2010);32:670–80.
86. Lin JT, Lineberry NB, Kattah MG, Su LL, Utz PJ, Garrison C, et al. Naive CD4 T Cell Proliferation Is Controlled by Mammalian Target of Rapamycin Regulation of GRAIL Expression. *J Immunol.* (2009);182:5919–28.
87. Soares L; Seroogy C; Skrenta H; Anandasabapathy N; Lovelace P; Chung CD; Engleman E and Fathman CG. Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nat Immunol.* (2004);5:4554.
88. Van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, Gent YYJ, Beekman JM, Van Beekum O, et al. Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization. *Blood.* (2010);115:965–74.
89. Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Bembas K, Tao R, et al. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci.* (2007);104:4571–6.
90. Xiao Y, Nagai Y, Deng G, Ohtani T, Zhu Z, Zhou Z, et al. Dynamic interactions between TIP60 and p300 regulate FOXP3 function through a structural switch defined by a single lysine on TIP60. *Cell Rep.* (2014);7:1471–80.
91. Samanta A, Li B, Song X, Bembas K, Zhang G, Katsumata M, et al. TGF-beta and IL-6 signals modulate chromatin binding and promoter occupancy by acetylated FOXP3. *Proc Natl Acad Sci.* (2008);105:14023–7.

92. Gao Z, Gao Y, Li Z, Chen Z, Lu D, Tsun A, et al. Synergy between IL-6 and TGF- β signaling promotes FOXP3 degradation. *Int J Clin Exp Pathol.* (2012);5:626–33.
93. van Loosdregt J, Brunen D, Fleskens V, Pals CEGM, Lam EWF, Coffe PJ. Rapid temporal control of foxp3 protein degradation by sirtuin-1. *PLoS One.* (2011);6:1–10.
94. Beier UH, Wang L, Bhatti TR, Liu Y, Han R, Ge G, et al. Sirtuin-1 Targeting Promotes Foxp3+ T-Regulatory Cell Function and Prolongs Allograft Survival. *Mol Cell Biol.* (2011);31:1022–9.
95. Li Z, Lin F, Zhuo C, Deng G, Chen Z, Yin S, et al. PIM1 kinase phosphorylates the human transcription factor FOXP3 at serine 422 to negatively regulate its activity under inflammation. *J Biol Chem.* (2014);289:26872–81.
96. Deng G, Nagai Y, Xiao Y, Li Z, Dai S, Ohtani T, et al. Pim-2 kinase influences regulatory T cell function and stability by mediating Foxp3 protein N-terminal phosphorylation. *J Biol Chem.* (2015);290:20211–20.
97. Morawski PA, Mehra P, Chen C, Bhatti T, Wells AD. Foxp3 protein stability is regulated by cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem.* (2013);288:24494–502.
98. Barbi J, Pardoll D, Pan F. Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunol Rev.* (2014);259:115–39.
99. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci.* (2012);125:531–7.
100. Chen Z, Barbi J, Bu S, Yang HY, Li Z, Gao Y, et al. The ubiquitin ligase stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity.* (2013);39:272–85.
101. van Loosdregt J, Fleskens V, Fu J, Brenkman AB, Bekker CPJ, Pals CEGM, et al. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases treg-cell-suppressive capacity. *Immunity.* (2013);39:259–71.
102. Wang L, Kumar S, Dahiya S, Wang F, Wu J, Newick K, et al. Ubiquitin-specific Protease-7 Inhibition Impairs Tip60-dependent Foxp3 + T-regulatory Cell Function and Promotes Antitumor Immunity. *EBioMedicine.* (2016);13:99–112.
103. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* (2007);8:277–84.
104. He X, Koenen HJPM, Slaats JHR, Joosten I. Stabilizing human regulatory T cells for tolerance inducing immunotherapy. *Immunotherapy.* (2017);9:735–51.
105. Komatsu N, Mariotti-ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci.* (2009);106:1903–8.
106. Rubtsov YP, Nieuwehuis RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, et al. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* (80-). (2010);329:1667–71.
107. Duarte JH, Zelenay S, Bergman ML, Martins AC, Demengeot J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic

- conditions. *Eur J Immunol.* (2009);39:948–55.
108. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol.* (2009);39:1088–97.
 109. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* (2009);10:1000–7.
 110. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* (2005);201:723–35.
 111. Levine AG, Medoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature.* (2017);546:421–5.
 112. Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, DeRoos P, Kim JM, Chu TT, et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature.* (2009);458:351–6.
 113. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a stat3-dependent manner. *Science* (80-). (2009);326:986–91.
 114. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med.* (2011);17:673–5.
 115. Kitz A, Dominguez-Villar M. Molecular mechanisms underlying Th1-like Treg generation and function. *Cell Mol Life Sci.* (2017);74:4059–75.
 116. McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, Esensten JH, Liu W, Hulme MA, Hoffmüller U, Baron U, Olek S, Bluestone JA BT. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Clin Invest.* (2011);186:3918–26.
 117. Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺ T cells. *Curr Opin Immunol.* (2009);21:281–5.
 118. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* (2010);10:849–59.
 119. EY. L, Torgashina A, Soloviev S, Nasonov E, SN. B. Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol.* (2007);601:113–9.
 120. Longhi M, Ma Y, Grant C, Samyn M, Gordon P, Mieli-Vergani G, et al. T-regs in autoimmune hepatitis-systemic lupus erythematosus/mixed connective tissue disease overlap syndrome are functionally defective and display a Th1 cytokine profile. *J Autoimmun.* (2013);41:146–51.
 121. Alvarado-Sanchez, B. Hernandez-Castro, B. Portales-Perez, D. Baranda L,

- Layseca-Espinosa, E. Abud-Mendoza C, Al. E. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* (2006);27:110–8.
122. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner H, Hafler D. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* (2004);199:971–9.
123. Haas J, Hug A, Viehovec A, Fritzsching B, Falk C, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* (2005);35:3343–52.
124. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA AM. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes.* (2005);54:1407–14.
125. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F GP. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* (2005);24:55–62.
126. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M TT. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* (2005);54:92–9.
127. Van Amelsfort J, Jacobs K, Bijlsma J, Lafeber F, Taams L. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* (2004);50:2775–85.
128. Ehrenstein M, Evans J, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg D, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med.* (2004);200:277–85.
129. Marazuela M, Garcia-Lopez, MA, Figueroa-Vega N, De la Fuente, H, Alvarado-Sanchez, B, Monsivais-Urenda A, Al. E. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* (2006);91:3639–46.
130. Mao C, Wang S, Xiao Y, Xu J, Jiang Q, Jin M, et al. Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol.* (2011);186:4734–43.
131. Richetta A, Mattozzi C, Salvi M, Giancristoforo S, D'Epiro S, Milana B, et al. CD4+ CD25+ T-regulatory cells in psoriasis. Correlation between their numbers and biologics-induced clinical improvement. *Eur J Dermatol.* (2011);21:344–348.
132. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens S, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* (2005);174:164–73.
133. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* (2005);128:1868–1878.
134. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and yet-unanswered questions. *Autoimmun Rev.* (2015);14:105–16.

135. Yu H, Paiva R, Flavell RA. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*. (2018);153:161–70.
136. Driver J, Serreze D, Chen Y. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunol*. (2011);33:67–87.
137. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. (1980);29:1–13.
138. Anderson M, Bluestone J. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. (2005);23:447–85.
139. Markle JG; Frank DN; Mortin-Toth S; Robertson CE; Feazel LM; Rolle-Kampczyk U; von Bergen M; McCoy KD; Macpherson AJ; Danska JS. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* (80-). (2013);339:1084–1088.
140. Nerup J, Platz P, Andersen O, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen J, et al. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*. (1974);2:864–6.
141. Singal D, Blajchman M. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. (1973);22:429–32.
142. Pearson T, Weiser P, Markees T, Serreze D, Wicker L, Al E. Islet allograft survival induced by costimulation blockade in NOD mice is controlled by allelic variants of *Idd3*. *Diabetes*. (2004);53:1972–8.
143. Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner VE, Gonzalez-Munoz A, Clark J, Veijola R, Cubbon R, Chen SL, Rosa R, Cumiskey AM, Serreze DV, Gregory S, Rogers J, Lyons PA, Healy B, Smink LJ, Todd JA, Peterson LB, Wicker LS SP. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet*. (2007);39:329–37.
144. Wicker LS, Todd JA, Prins JB, Podolin PL, Renjilian RJ PL. Resistance alleles at two non-major histocompatibility complex-linked insulin-dependent diabetes loci on chromosome 3, *Idd3* and *Idd10*, protect nonobese diabetic mice from diabetes. *J Exp Med*. (1994);180:1705–13.
145. Todd JA, Wicker LS. Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity*. (2001);15:387–95.
146. Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. *Eur J Immunol*. (1997);27:2854–62.
147. Robinson C, Bounous D, Alford C, Nguyen K, Nanni J, Peck A, et al. PSP expression in murine lacrimal glands and function as a bacteria binding protein in exocrine secretions. *Am J Physiol*. (1997);272:G863-71.
148. Lodde B, Mineshiba F, Kok M, Wang J, Zheng C, Schmidt M, et al. NOD mouse model for Sjögren's syndrome: lack of longitudinal stability. *Oral Dis*. (2006);12:566–72.

149. Giuseppe Penna; Susana Amuchastegui; Chiara Cossetti; Francesca Aquilano; Roberto Mariani; Nadia Giarratana; Elena De Carli; Benedetta Fibbi and Luciano Adorini. Spontaneous and Prostatic Steroid Binding Protein Peptide-Induced Autoimmune Prostatitis in the Nonobese Diabetic Mouse. *J Immunol.* (2007);179:1559–67.
150. Chen Z, Herman A, Matos M, Mathis D, Benoist C. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J Exp Med.* (2005);202:1387–97.
151. Rivero VE; Cailleau C; Depiante-Depaoli M; Riera CM and Carnaud C. Non-obese diabetic (NOD) mice are genetically susceptible to experimental autoimmune prostatitis (EAP). *J Immunol.* (1998);11:603–10.
152. Joseph J, Bittner S, Al E. IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. *J Immunol.* (2012);188:216–21.
153. Delovitch T, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. 1997. 7:727–738.
154. Breser M, Motrich R, Sanchez L, Mackern-Oberti J, Rivero V. Expression of CXCR3 on specific T cells is essential for homing to the prostate gland in an experimental model of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *J Immunol.* (2013);190:3121–33.
155. Liu T; Matsuguchi T; Tsuboi N; Yajima T and Yoshikai . Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun.* (2002);70:6638–45.
156. Y M Graus; P J van Breda Vriesman and M H de Baets. Characterization of anti-acetylcholine receptor (AChR) antibodies from mice differing in susceptibility for experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG). *Clin Exp Immunol.* (1993);92:506–513.
157. Sun B; Rizzo LV; Sun SH; Chan CC; Wiggert B; Wilder RL and Caspi RR. Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper-1-like or a T helper-2-like response. *J Immunol.* (1997);159:1004–11.
158. Medina D. Mammary tumorigenesis in chemical carcinogentreated mice. Incidence in BALB/c and C57BL mice. *J Natl Cancer Inst.* (1974);53:213–21.
159. Breser ML, Lino AC, Motrich RD, Godoy GJ, Demengeot J, Rivero VE. Regulatory T cells control strain specific resistance to Experimental Autoimmune Prostatitis. *Sci Rep.* (2016);6:1–12.
160. Mellanby RJ; Thomas D; Phillips JM and Cooke A. Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunology.* (2007);121:15–28.
161. Visperas A, Vignali DAA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *J Immunol.* (2016);197:3762–70.
162. You S, Cobbold S, Alyanakian M, Gouarin C, Barriot S, Garcia C, et al. Autoimmune Diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes.* (2005);54:1415–22.

163. D'Alise AM, Auyeung V, Feuerer M, Nishio J, Fontenot J, Benoist C, et al. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proc Natl Acad Sci.* (2008);105:19857–62.
164. Feuerer M; Jiang W; Holler PD; Satpathy A; Campbell C; Bogue M; Mathis D and Benoist C. Enhanced thymic selection of FoxP3-regulatory T cells in the NODmouse model of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci.* (2007);104:18181–18186.
165. Dwyer CJ, Bayer AL, Fotino C, Yu L, Cabello-Kindelan C, Ward NC, et al. Altered homeostasis and development of regulatory T cell subsets represent an IL-2R–dependent risk for diabetes in NOD mice. *Sci Signal.* (2017);10.
166. Kevin S. Goudy, Mark C. Johnson, Alaina Garland, Chengwen Li RJ, Samulski, Bo Wang and RT. Reduced IL-2 expression in NOD mice leads to a temporal increase in CD62LloFoxP3+CD4+ T cells with limited suppressor activity. *Eur J Immunol.* (2013);41:1480–90.
167. James CR, Buckle I, Muscate F, Otsuka M, Nakao M, Oon JS, et al. Reduced interleukin-2 responsiveness impairs the ability of T reg cells to compete for IL-2 in nonobese diabetic mice. *Immunol Cell Biol.* (2016);94:509–19.
168. Tritt M; Sgouroudis E; d’Hennezel E; Albanese A; Piccirillo CA. Functional waning of naturally occurring CD4+ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. *Diabetes.* (2008);57:113–23.
169. Thomas DC, Richard J, Phillips JM. An early age-related increase in the frequency of CD 4 + Foxp 3 + cells in BDC 2 Á 5 NOD mice. (2007);565–76.
170. Chen X, Oppenheim JJ, Howard OMZ, Treg T. BALB / c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4 +CD25 – responder T cells than C57BL/6 mice. *J Leukoc Biol.* (2005);78:114–21.
171. Tucker CF, Nebane-ambe DL, Chhabra A, Parnell SA, Zhao Y, Alard P, et al. Decreased frequencies of CD4+CD25+Foxp3+ cells and the potent CD103+ subset in peripheral lymph nodes correlate with autoimmune disease predisposition in some strains of mice. *Autoimmunity.* (2011);44:453–64.
172. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central role of a defective interleukin-2 production in triggering islet autoimmune destruction. *Immunity.* (2008);28:687–97.
173. Clough LE, Wang CJ, Schmidt EM, Booth G, Hou TZ, Ryan GA, et al. Release from Regulatory T Cell-Mediated Suppression during the Onset of Tissue-Specific Autoimmunity Is Associated with. *J Immunol.* (2008);180:5393–401.
174. Berzins SP, Venanzi ES, Benoist C, Mathis D. T-Cell Compartments of Prediabetic NOD Mice. *Diabetes.* (2003);52:327–34.
175. Ferreira C, Palmer D, Blake K, Oliver A, Ferreira C, Palmer D, et al. Reduced Regulatory T Cell Diversity in NOD Mice Is Linked to Early Events in the Thymus. *J Immunol.* (2014);192:4145–52.
176. Ferreira C, Singh Y, Furmanski AL, Wong FS, Garden OA, Dyson J. Non-obese diabetic mice select a low-diversity repertoire of natural regulatory T cells. *Proc*

- Natl Acad Sci. (2009);106:8320–5.
177. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA ZS. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* (2013);14:307–8.
 178. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J HW. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* (2004);34:623–30.
 179. Milpied P, Renand A, Bruneau J, Mendes-da-Cruz DA, Jacquelin S, Asnafi V, Rubio MT, MacIntyre E, Lepelletier Y HO. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol.* (2009);39:1466–71.
 180. Schuster C, Jonas F, Zhao F KS. Peripherally induced regulatory T cells contribute to the control of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Eur J Immunol.* (2018);48:1211–6.
 181. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med.* (2003);198:1875–86.
 182. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR NM. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* (2004);172:5149–53.
 183. Fisson S, Darrasse-jèze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, et al. Continuous Activation of Autoreactive CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in the Steady State. *J Exp Med.* (2003);198:737–46.
 184. Szanya V, Ermann J, Taylor C, Fathman CG. The Subpopulation of CD4 + CD25 + Splenocytes That Delays Adoptive Transfer of Diabetes Expresses L-Selectin and High Levels of CCR7. *J Immunol.* (2002);169:2461–5.
 185. Pop SM, Wong CP, Culton DA, Clarke SH, Tisch R. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes. *J Exp Med.* (2005);201:1333–46.
 186. Gregori, Silvia; Giarratana, Nadia; Smiroldo, Simona; Adorini L. Dynamics of Pathogenic and Suppressor T Cells in Autoimmune Diabetes Development. *J Immunol.* (2003);171:4040–7.
 187. Gregg, Randal K; Jain, Renu; Schoenleber, Scott J; Bell, J Jeremiah; Lee, Hyun-hee; Yu, Ping; Zaghoulani H. A sudden decline in active membrane-bound TGF-beta impairs both T regulatory cell function and protection against autoimmune diabetes. *J Immunol.* (2004);173:7308–16.
 188. Tree, TI; Roep, B O; Peakman M. A mini metaanalysis of studies on CD4+CD25+ T cells in human type 1 diabetes: report of the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Ann N Y Acad Sci.* (2006);1079:9–18.
 189. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol.* (2008);26:453–79.
 190. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* (2005);6:1142–51.

191. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA, Burchill MA, et al. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* (2007);178:280–90.
192. Cheng G, Yu A, Dee MJ, Thomas R. IL-2R Signaling Is Essential for Functional Maturation of Regulatory T Cells during Thymic Development. *J Immunol.* (2013);190:1567–75.
193. Malek TR CI. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity.* (2010);33:153–65.
194. Cheng G, Yuan X, Tsai MS, Podack ER, Yu A MT. IL-2 receptor signaling is essential for the development of Klrp1+ terminally differentiated T regulatory cells. *J Immunol.* (2012);189:1780–91.
195. Bayer AL, Yu A, Adeegbe D MT. Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period. *J Exp Med.* (2005);201:769–77.
196. Furtado GC, Curotto de Lafaille M, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4+ Regulatory T cell function. *J Exp Med.* (2002);196:851–7.
197. Almeida,AR; Legrand, N; Papiernik, M; Freitas A. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol Immunol.* (2002);169:4850–60.
198. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H SA. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* (2004);34:2480–8.
199. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF LD. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature.* (2008);453:236–40.
200. Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood.* (2007);109:4368–75.
201. Carbonetto, P;Stephens M. Integrated enrichment analysis of variants and pathways in genome-wide association studies indicates central role for IL-2 signaling genes in type 1 diabetes, and cytokine signaling genes in Crohn's disease. *PLoS Genet.* (2013);9:e1003770.
202. Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S, et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes.* (2010);59:407–15.
203. Long SA, Cerosaletti K, Wan JY, Ho J, Tatum M, Wei S, et al. An autoimmune-associated variant in PTPN2 reveals an impairment of IL-2R signaling in CD4(+) T cells. *Genes Immun.* (2011);12:116–25.
204. Garg G, Tyler JR, Yang JHM, Cutler J, Downes K, Pekalski M, et al. Type 1 Diabetes-Associated IL2RA Variation Lowers IL-2 Signaling and Contributes to Diminished CD4+ CD25+ Regulatory T Cell Function. *J Immunol.*

- (2012);188:4644–53.
205. Cerosaletti K, Schneider A, Schwedhelm K, Frank I, Tatum M, Wei S, et al. Multiple Autoimmune-Associated Variants Confer Decreased IL-2R Signaling in CD4+ CD25hi T Cells of Type 1 Diabetic and Multiple Sclerosis Patients. *PLoS One*. (2013);8:e83811.
 206. Pearson JA, Wong FS, Wen L, Haven N, Medicine E. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. (2016);66:76–88.
 207. D’Cruz L, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol*. (2005);6:1152–9.
 208. Shi FD, Flodstrom M, Balasa B, Kim SH, Van Gunst K, Strominger JL, Wilson SB SN. Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci*. (2001);98:6777–82.
 209. Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, O’Neil JJ, Harmon IR, Bensinger SJ, Turka LA, Brennan P, Jameson SC FM. Distinct Effects of STAT5 Activation on CD4+ and CD8+ T Cell Homeostasis: Development of CD4+CD25+ Regulatory T Cells versus CD8+ Memory T Cells. *J Immunol*. (2003);171:5853–64.
 210. Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*. (2002);2:410–6.
 211. Alexander W S. and Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*. (2004);22:503–529.
 212. T. Gylvin, Nolsøe R, Hansen T, Nielsen EM., Bergholdt R, Karlsen AE, et al. Mutation analysis of suppressor of cytokine signalling 3, a candidate gene in Type 1 diabetes and insulin sensitivity. *Diabetologia*. (2004);47:1273–7.
 213. Anandasabapathy N, Ford G, Bloom D, Holness C, Paragas V, Seroogy C, et al. GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells. *Immunity*. (2003);18:535–47.
 214. Heissmeyer V and Rao A. E3 ligases in T cell anergy-turning immune responses into tolerance. *Sci STKE*. (2004);2004:pe29.
 215. Banica LM, Besliu AN, Pistol GC, Stavaru C, Vlad V, Predeteanu D, et al. Dysregulation of anergy-related factors involved in regulatory T cells defects in Systemic Lupus Erythematosus patients: Rapamycin and Vitamin D efficacy in restoring regulatory T cells. *Int J Rheum Dis*. (2016);19:1294–303.
 216. Lineberry N, Su L, Lin J, Coffey G, Seroogy C, Fathman C. Cutting edge: The transmembrane E3 ligase GRAIL ubiquitinates the costimulatory molecule CD40 ligand during the induction of T cell anergy. *J Immunol*. (2008);181:1622–6.
 217. Guiducci C, Valzasina B, Dislich H, Colombo M. CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Eur J Immunol*. (2005);35:557–67.
 218. Su L, Iwai H, Lin J, Fathman C. The transmembrane E3 ligase GRAIL

- ubiquitinates and degrades CD83 on CD4 T cells. *J Immunol.* (2009);183:438–44.
219. Cohen P, Tcherpakov M. Will the ubiquitin system furnish as many drug targets as protein kinases? *Cell.* (2010);143:686–93.
220. Merlet J, Burger J, Gomes J, Pintard L. Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cell Mol Life Sci.* (2009);66:1924–38.
221. Dépis F, Kwon H, Mathis D, Benoist C. Unstable FoxP3 + T regulatory cells in NZW mice. *Proc Natl Acad Sci.* (2016);113:1345–50.
222. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoff G SS. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* (2009);30:899–911.
223. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* (2013);13:461–7.
224. Yang X, Nurieva R, Martinez G, Kang H, Chung Y, Pappu B, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* (2008);29:44–56.
225. Gavin M, Rasmussen J, Fontenot J, Vasta V, Manganiello V, Beavo J, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* (2007);445:771–5.
226. Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity.* (2009);31:772–86.
227. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity.* (2012);36:262–75.
228. Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity.* (2009);30:155–67.
229. Ciechanover A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins in health and disease. *Hepatology.* (2002);35:3–6.
230. Hochstrasser M (2006). Lingerin mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell.* (2006);124:27–34.
231. Eldridge, A.G. and O'Brien T. Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system. *Cell Death Differ.* (2010);17:4–13.
232. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773–786. (2005);123:773–86.
233. Wang K, Gu J, Ni X, Ding Z, Wang Q, Zhou H, et al. CD25 signaling regulates the function and stability of peripheral Foxp3+ regulatory T cells derived from the spleen and lymph nodes of mice. *Mol Immunol.* (2016);76:35–40.

234. Yano H, Andrews L, Workman C, Vignali D. Intratumoral regulatory T cells: markers, subsets and their impact on anti-tumor immunity. *Immunology*. (2019);
235. Contarini G, Giusti P, Skaper S. Active Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice. *Methods Mol Biol*. (2018);1727:353–60.
236. Ulusoy C, Çavuş F, Yılmaz V, Tüzün E. Immunization with Recombinantly Expressed LRP4 Induces Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in C57BL/6 Mice. *Immunol Invest*. (2017);46:490–9.
237. Mattapallil M, Silver P, LM. C, St Leger A, Jittayasothon, Y. Kielczewski J, Moon J, et al. Characterization of a New Epitope of IRBP That Induces Moderate to Severe Uveoretinitis in Mice With H-2b Haplotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. (2015);56:5439–49.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

- Gloria J. Godoy, Carolina Olivera, Salazar Florencia, Daniela Paira, Yamile Ana, Cinthia Carolina Stemphin, Ruben D. Motrich, Virginia E. Rivero. “T regulatory cells from non-obese diabetic mice show low responsiveness to IL-2 stimulation and exhibit differential expression of anergy-related and ubiquitination factors”. **Front Immunol.** 2019. **Enviado y en consideración.**
- Sanchez LR, Godoy GJ, Gorosito Serrán M, Breser ML, Fiocca Vernengo F, Engel P, Motrich RD, Gruppi A, Rivero VE. “IL-10 Producing B Cells Dampen Protective T Cell Response and Allow Chlamydia muridarum Infection of the Male Genital Tract”. **Front Immunol.** 2019 Mar 1; 10:356. doi: 10.3389/fimmu.2019.00356
- Motrich RD, Salazar FC, Breser ML, Mackern-Oberti JP, Godoy GJ, Olivera C, Paira DA, Rivero VE. “Implications of prostate inflammation on male fertility”. **Andrologia.** 2018 Dec; 50(11):e13093. doi: 10.1111/and.13093..
- Korf H, Breser L, Van Hoeck J, Godoy J, Cook DP, Stijlemans B, De Smidt E, Moyson C, Monteiro Carvalho Mori Cunha JP, Rivero V, Gysemans C, Mathieu C. “MIF inhibition interferes with the inflammatory and T cell-stimulatory capacity of NOD macrophages and delays autoimmune diabetes onset”. **PLoS One.** 2017 Nov; 12(11): e0187455. doi: 10.1371/journal.pone.0187455. 2017.
- Sanchez LR, Breser ML, Godoy GJ, Salazar FC, Mackern-Oberti JP, Cuffini C, Motrich RD, Rivero VE. “Chronic Infection of the Prostate by Chlamydia muridarum Is Accompanied by Local Inflammation and Pelvic Pain Development”. **Prostate.** 2017 Apr;77(5):517-529.
- Breser ML, Lino AC, Motrich RD, Godoy GJ, Demengeot J, Rivero VE. “Regulatory T cells control strain specific resistance to Experimental Autoimmune Prostatitis”. **Sci Rep.** 2016 Sep 14;6:33097.
- Rubén Darío Motrich; María Laura Breser; Leonardo Rodolfo Sanchez; Gloria Janet Godoy; Immo Prinz; Virginia E. Rivero. “IL-17 is not Essential for Inflammation and Chronic Pelvic Pain Development in an Experimental Model of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome”. **Pain, 2016 Mar;157(3):585-97.**

PRESENTACIÓN A CONGRESOS

2017. - “FUNCTIONAL DIFFERENCES IN REGULATORY T CELLS FROM MICE WITH DIFFERENT SUSCEPTIBILITY TO THE DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES”. Godoy GJ, Salazar FC, Olivera C, Motrich DR, Rivero VE. Reunión conjunta de Sociedades de Biociencias. November. Buenos Aires. Argentina.
- “PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL DIFFERENCES IN REGULATORY T CELLS FROM MICE WITH DIFFERENT SUSCEPTIBILITY TO THE DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES”. Godoy GJ, Salazar FC, Motrich RD, Rivero VE. WORKSHOP “FOCIS goes South: ADVANCES IN TRANSLATIONAL AND CLINICAL IMMUNOLOGY. Organized by the Millennium Institute of Immunology and Immunotherapy in conjunction with the FOCIS. Santiago de Chile, Chile.
2016. - “DIFFERENTIAL EXPRESSION OF INHIBITORY RECEPTORS BY REGULATORY T CELLS FROM MICE WITH DIFFERENT SUSCEPTIBILITY TO AUTOIMMUNITY”. Gloria Janet Godoy, Florencia Salazar, Rubén Darío Motrich, Virginia Elena Rivero. LXI Annual Scientific Meeting of Argentina Society of Clinical Investigation (SAIC), LXIV Annual Meeting of Argentina Society Argentina of Immunology (SAI), XLVIII Annual meeting of Experimental pharmacology (SAFE). Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.
2015. - “CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF REGULATORY T CELLS (TREGS) FROM MICE WITH DIFFERENTIAL SUSCEPTIBILITY TO AUTOIMMUNITY”. Gloria Janet Godoy; Leonardo Rodolfo Sanchez; Rubén Darío Motrich; Virginia E. Rivero. LV LASID Meeting. LXIII Argentinean Immunology Society Meeting. II French-Argentinean Immunology Meeting. November. Buenos Aires. Argentina
- 2014 - “INDUCTION OF TH2-MEDIATED ALLERGIC ASTHMA IN A MOUSE STRAIN HIGHLY SUSCEPTIBLE TO DEVELOP TH1 RESPONSES”. Gloria Janet Godoy; Leonardo Rodolfo Sanchez; Luciana García; Cristina Maldonado; Rubén Darío Motrich; Virginia E. Rivero. LXII Annual Meeting of the Argentina Society Argentina of Immunology (SAI). LIX Annual Scientific Meeting of the Argentina Society of Clinical Investigation (SAIC). 19-22 November. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.
2013. - “IMBALANCE BETWEEN REGULATORY AND EFFECTOR T CELLS IN MICE WITH DIFFERENT SUSCEPTIBILITY TO DEVELOP AUTOIMMUNE DISEASES”. Gloria Janet Godoy; Breser, María Laura; Leonardo Rodolfo Sanchez;

Rubén Darío Motrich; Virginia E. Rivero. LXI Annual Meeting of the Argentina Society Argentina of Immunology (SAI). 7-9 November. Los Cocos. Córdoba. Argentina.