

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

# **Rol de Receptores de Tipo Toll en la infección con el Virus del Tumor Mamario Murino**

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Licenciada Dalia Burzyn**

Director de Tesis: Dra. Isabel Piazzon

Director asistente: Dra. Irene Nepomnaschy

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Arzt

Lugar de trabajo: División Medicina Experimental, Instituto de  
Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de  
Medicina

Buenos Aires, 2006

# **Rol de Receptores de Tipo Toll en la infección con el Virus del Tumor Mamario Murino**

**Mamario Murino**

El Virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) es un retrovirus transmitido durante la lactancia que utiliza al sistema inmune del huésped para establecer la infección. La acción del superantígeno viral sobre las células T cumple un papel importante en la relación establecida entre el virus y el sistema inmune adaptativo. En este trabajo hemos investigado si el MMTV también puede influenciar la respuesta inmune interactuando con receptores de tipo Toll (TLRs).

Utilizando un modelo de infección por MMTV en ratones adultos tolerizados con ligandos de TLR4 o TLR2 determinamos que una de estas moléculas o ambas participan en importantes eventos de las primeras etapas de infección por MMTV: activación temprana de células B, reclutamiento de células B vírgenes e integración viral.

Demostramos además que el MMTV induce la activación de células dendríticas (DCs) *in vitro*, en forma dependiente de TLR4 y TLR2. La infección con MMTV *in vivo*, a través del amamantamiento, induce aumentos en el porcentaje de DCs en las placas de Peyer (PPs), el sitio de entrada del virus al organismo, y una mayor expresión del receptor de entrada del MMTV en estas DCs, siendo ambos eventos dependientes de TLR4.

Determinamos que la infección por amamantamiento también produce en las PPs un incremento en el porcentaje y número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, una parte importante de las cuales posee especificidad superantigénica. Demostramos que esta población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> está compuesta por células que presentan un fenotipo de activación (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) o un fenotipo de célula regulatoria (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) con capacidad inmunosupresora y que la proporción de estas dos subpoblaciones varía con el tiempo de infección. En ausencia de un TLR4 funcional los aumentos de ambas subpoblaciones son menores.

Finalmente, estudiamos los niveles de integración viral en ratones deficientes para TLR4 y determinamos que el nivel de infección alcanzado por el MMTV en estos animales es menor que en los ratones salvajes.

En conjunto, estos resultados indican que el TLR4 juega un rol crítico durante la infección del MMTV.

**Palabras clave:** Receptores de Tipo Toll; Virus del Tumor Mamario Murino; células dendríticas; células T regulatorias; infección retroviral

## Role of Toll-like receptors in Mouse Mammary Tumor Virus infection

Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) is a retrovirus transmitted during the lactation period. MMTV utilizes the host immune system to establish the infection. The effects of the viral superantigen (Sag) on T cells play an important role in the relationship established between MMTV and the adaptive immune system. In this work we investigated whether MMTV is also able to alter the immune response by interacting with Toll-like receptors (TLRs).

We first established an experimental model in which adult mice were tolerized with ligands of TLR4 or TLR2 and subsequently challenged with MMTV. We determined that TLR4, TLR2 or both molecules are involved in important events occurred during early stages of infection: B cell activation, naïve B cell homing and viral integration.

We then showed that MMTV induces dendritic cell (DC) activation *in vitro*, by TLR4- and TLR2-dependent mechanisms. *In vivo* MMTV infection (by breastfeeding) produces an increase in the percentage of DCs in the first site of infection -the Peyer's patches (PPs)- and an up-regulation of the MMTV cell entry receptor in these cells. Both events are dependent on the presence of a functional TLR4.

We determined that *in vivo* MMTV infection also increases the percentage and absolute number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the PPs. A high percentage of these cells specifically recognizes the viral Sag. We showed that the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> population is composed by cells with an activation phenotype (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) and cells with a regulatory T cell phenotype (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) with immunosuppressive properties. The proportion of both subpopulations varies along time during infection. TLR4-deficient mice showed a diminished increase in both Sag-specific activated and regulatory T cells.

Finally, we studied the viral integration during *in vivo* infection in TLR4-deficient mice, showing that the level of infection is significantly higher in the presence of a functional TLR4.

Our results show that TLR4 has a critical role during the infection with MMTV.

**Key words:** Toll-like receptors; Mouse Mammary Tumor Virus; dendritic cells; regulatory T cells; retroviral infection

## **Abreviaturas**

**DC:** célula dendrítica

**AT-2:** 2,2'-ditiopiridina

**BMDC:** célula dendrítica derivada de médula ósea

**BSA:** seroalbúmina bovina

**CFSE:** 5, 6 carboxifluorescein diacetato succinimidil éster

**CPA:** célula presentadora de antígeno

**CTLA-4:** cytotoxic T lymphocyte antigen-4

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**GITR:** glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene

**GM-CSF:** factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos de ratón

**GPI:** glicosil-fosfatidil-inositol

**IFM:** intensidad de fluorescencia media

**LPS:** lipopolisacárido

**LTR:** long terminal repeat

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad

**MMTV:** virus del tumor mamario murino

**PBS:** buffer fosfato

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PGN:** péptidoglicano

**PP:** placa de Peyer

**RPA:** ensayo de protección de RNAsa

**RT-PCR:** transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa

**Sag:** superantígeno

**SBF:** suero bovino fetal

**TCR:** receptor de la célula T

**Th:** célula T helper

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TLR:** receptor de tipo Toll

**Treg:** célula T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatoria

**TVLB:** Type B leukemogenic virus

**V $\beta$ :** segmento V de la cadena  $\beta$  del TCR

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que, de diferentes maneras, estuvieron a mi lado durante el desarrollo de este trabajo:

A Isabel y a Irene, mis directoras, quienes me brindaron la posibilidad de realizar esta Tesis y me guiaron, me enseñaron, me alentaron y me apoyaron todo este tiempo, depositando toda su confianza en mí.

A la Dra. Pasqualini, quien constantemente nos transmite su entusiasmo por el trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, los actuales y los que lo fueron en algún momento, quienes compartieron todos estos años conmigo y se han convertido en varios casos en verdaderos amigos. Su ayuda ha sido absolutamente indispensable en todo sentido. Y, como lo prometido es deuda, un agradecimiento especial a todos los que colaboraron sacando y procesando innumerables y diminutas placas de Peyer.

A Tito, por su enorme dedicación para el laboratorio y por ayudarme siempre que lo necesito.

A todas las personas que trabajan en la División Medicina Experimental y compartieron estos años conmigo, colaborando en todo momento.

A todos los integrantes del laboratorio de la Dra. Susan Ross, por recibirme y ayudarme durante mis pasantías en la Universidad de Pennsylvania.

A todos mis amigos, quienes me acompañaron durante todo este tiempo y me dieron la fuerza que necesitaba.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por su confianza en mí, por su contención. Porque siempre me acompañan y me alientan. Porque valoran el esfuerzo, y me brindan todo su amor.

<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>3</b>
<b>Virus del Tumor Mamario Murino</b> -----	<b>4</b>
Estructura del MMTV -----	5
Ciclo de replicación-----	7
Superantígeno viral -----	7
Ciclo de vida del MMTV. Interacción del virus con el sistema inmune del huésped-----	8
Modelos para el estudio de la infección con MMTV <i>in vivo</i> -----	11
Tumorigénesis inducida por MMTV -----	12
<b>Receptores de Tipo Toll</b> -----	<b>14</b>
Receptor Toll de <i>Drosophila</i> -----	15
Receptores de tipo Toll de mamíferos -----	16
Estructura -----	16
Expresión y distribución -----	16
Descripción de los TLRs y sus ligandos -----	17
Señalización a través de los TLRs -----	21
Rol de los TLRs en la respuesta inmune innata -----	23
Rol de los TLRs en la respuesta inmune adaptativa -----	23
<b>Células Dendríticas</b> -----	<b>25</b>
Distribución celular, subpoblaciones y ontogenia-----	26
Maduración de las DCs -----	28
Rol de las DCs en la inmunidad adquirida -----	31
Rol de las DCs en la tolerancia periférica -----	33
<b>Células T Regulatorias</b> -----	<b>36</b>
Células T regulatorias CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -----	37
Fenotipo de las células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorias naturales-----	38
Inducción de Foxp3 en células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -----	41
Activación de células regulatorias CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -----	41
Señales coestimuladoras e inhibitorias para la activación de las células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ----	42
Células regulatorias CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y receptores de tipo Toll -----	43
Mecanismos de acción y células blanco -----	44
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>49</b>
Ratones -----	50
Purificación viral -----	50
Suspensiones celulares -----	51
Tolerizaciones <i>in vivo</i> -----	51
Desafío con MMTV <i>in vivo</i> -----	51
Experimentos de tráfico en animales tolerizados-----	52
Marcación con CFSE -----	52
Citometría de flujo -----	52
Proliferación con yoduro de propidio (IP) -----	54
Extracción de ADN -----	54
Extracción de ARN -----	55
PCR -----	55
RT-PCR -----	55

Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)-----	58
Estimulación de BMDCs-----	58
Tolerización de BMDCs -----	59
ELISA -----	59
Ensayo de protección de RNAsa (RPA) -----	59
Cultivo mixto linfocitario-----	60
PCR radiactiva-----	61
Presentación de los resultados-----	61
Estadística-----	61
<b>RESULTADOS -----</b>	<b>62</b>
<b>A. Infección con MMTV en ratones adultos tolerizados con ligandos de TLR4 y</b>	
<b>TLR2 -----</b>	<b>63</b>
<b>B. Células dendríticas y receptores de tipo Toll en la infección con MMTV-----</b>	<b>69</b>
B.1- Efecto del MMTV sobre las células dendríticas-----	69
B.2- Rol del TLR4 en la activación de BMDCs inducida por el MMTV-----	75
B.3- Rol del TLR2 en la activación de BMDCs inducida por el MMTV-----	79
B.4- Expresión del receptor de entrada del MMTV (CD71) en las BMDCs-----	83
B.5- Efecto de la infección <i>in vivo</i> con MMTV en las DCs de las PPs. Rol del TLR4 ----	85
<b>C. Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y receptores de tipo Toll en la infección con MMTV -----</b>	<b>87</b>
C.1- Estudio de la población CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> de las PPs durante la infección con MMTV --	87
C.1.1- Expresión de citoquinas y quemoquinas en las PPs de crías infectadas -----	87
C.1.2- Células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> durante la primera semana de infección con MMTV-----	88
C.1.3- Células regulatorias y células activadas en la población CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -----	93
C.1.4- Especificidad superantigénica de las células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -----	97
C.1.5- Capacidad inmunosupresora de las células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> de las PPs -----	102
C.2- Rol del TLR4 en el aumento de CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> inducido por el MMTV -----	106
<b>D. Infección con MMTV en ratones deficientes para TLR4 -----</b>	<b>109</b>
<b>DISCUSIÓN -----</b>	<b>110</b>
<b>CONCLUSIONES-----</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA -----</b>	<b>134</b>

# INTRODUCCIÓN

---

## **Virus del Tumor Mamario Murino**

A finales del siglo XIX se sabía que ciertas cepas de ratones endocriadas desarrollaban cáncer de mama. En 1936 Bittner<sup>1</sup> demostró la existencia de un “factor de la leche materna” en cepas de ratones que presentaban alta incidencia de tumores mamarios. Estudios posteriores<sup>2,3</sup> sugirieron que la “influencia materna” era un virus altamente infeccioso, el virus del tumor mamario murino (MMTV).

El MMTV es un retrovirus de tipo B que induce adenocarcinomas mamarios en el ratón por mutagénesis insercional, al integrarse cerca o dentro de oncogenes celulares en las células del epitelio mamario<sup>4</sup>. Las partículas de MMTV se encuentran en la leche materna y son transmitidas a las crías a través del amamantamiento. Si bien su órgano blanco final es la glándula mamaria, el primer blanco de la infección del MMTV son las células del sistema inmune. Como se explicará más adelante, en estas células -mediante la expresión del superantígeno del virus- se produce un aumento en la carga viral que resulta crítico para que el ciclo de vida se complete en forma exitosa. Por otro lado, las células del sistema inmune serían responsables del traslado del virus a la glándula mamaria.

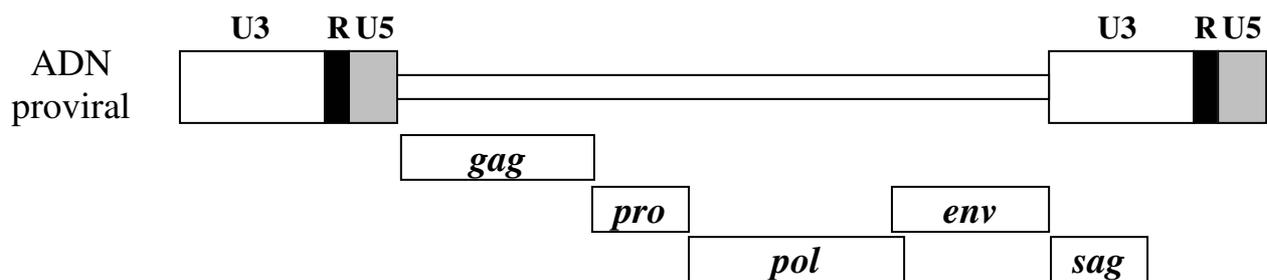
Luego de que el MMTV fue identificado como retrovirus, resultó claro que existía un modo adicional de transmisión que consistía en retrovirus endógenos integrados en la línea germinal<sup>5</sup>. Además de las variantes virales exógenas del MMTV, existen numerosos provirus endógenos denominados *Mtv*, los cuales están integrados permanentemente al genoma del ratón y son transmitidos en forma vertical a la descendencia. Se cree que los *Mtv* se originaron por infecciones ancestrales en células de la línea germinal. Se han descrito al menos 10 variantes de MMTV exógenos y más de 30 variantes endógenas. Tanto las cepas de ratones criadas en los bioterios como los ratones de poblaciones salvajes poseen entre 2 y 14 provirus *Mtv* distintos en su genoma<sup>6</sup>. La mayoría de los virus endógenos no producen partículas virales debido a la presencia de mutaciones en sus genes regulatorios o estructurales, aunque sí pueden expresar algún/os de sus genes<sup>7</sup>. Unos pocos *Mtv* endógenos son productivos y causan tumores mamarios<sup>8</sup>. A diferencia de los MMTV exógenos, los *Mtv* endógenos productivos no pueden ser eliminados por amamantamiento de las crías recién nacidas con nodrizas no infectadas.

### Estructura del MMTV

Los retrovirus son virus envueltos, cuyo genoma es de ARN. El ARN se encuentra en el interior del virión, asociado a proteínas y cubierto por una cápside proteica. Una membrana lipídica que contiene proteínas virales recubre a la partícula<sup>9</sup>.

Los MMTV exógenos poseen, al igual que otros retrovirus, un genoma dimérico compuesto por dos cadenas positivas de ARN poliadenilado asociadas a la enzima transcriptasa reversa (TR), a proteínas de la cápside derivadas del gen *gag* y al ARN de transferencia tRNA<sup>Lys</sup>, el cual es utilizado como *primer* para la retrotranscripción.

El genoma viral se esquematiza en la **Figura A**. El gen *gag* codifica para una poliproteína precursora de las proteínas internas estructurales. La proteína Gag es clivada para dar lugar a las proteínas de la cápside MA, CA y NC, además de otros productos del clivaje con función desconocida. MA (*membrane-associated*) forma la capa más externa de la cápside e interactúa con la bicapa lipídica y proteínas que forman la envoltura. CA (*capsid*) forma una capa o *cápside* que rodea al complejo ribonucleoproteico que contiene al genoma. La cápside más los componentes que ésta encierra se conocen como *core*. NC (*nucleocapsid*) es una proteína básica pequeña fuertemente unida al ARN genómico<sup>9</sup>.



**Figura A.** Genoma del MMTV

El gen *pro* codifica para una proteasa viral que se encarga de procesar proteolíticamente a las poliproteínas virales<sup>9</sup>.

El gen *pol* codifica para las enzimas transcriptasa reversa (con actividades de ADN polimerasa y ARNasa H) e integrasa, que cataliza la inserción del ADN viral recientemente sintetizado en el genoma de la célula huésped<sup>9</sup>.

El gen *env* codifica para un precursor que da lugar a las proteínas de la envoltura SU (surface) y TM (transmembrane). SU (gp52) y TM (gp36) permanecen unidas luego del corte proteolítico y ambas están glicosiladas. La proteína Env es el determinante primario del tipo de célula que un retrovirus puede infectar, ya que es la que reconoce a la proteína de la superficie celular que es el receptor viral. La interacción entre las proteínas Env y los receptores virales conducen a la fusión de las membranas virales y celulares<sup>9</sup>.

En los extremos del ADN viral se encuentran dos secuencias idénticas denominadas LTRs (long terminal repeats). Los LTRs pueden ser divididos en tres elementos: U3, derivado de una secuencia única próxima al extremo 3' del ARN genómico; U5, derivado de una secuencia única próxima al extremo 5' del ARN; y R, derivado de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN. Los LTRs se generan durante la retrotranscripción, cuando la TR "salta" de un extremo a otro del templado. El sitio de iniciación de la transcripción se encuentra en el límite entre U3 y R; el sitio de poliadenilación se encuentra entre R y U5; U3 contiene la mayoría de los elementos de control transcripcional del provirus, incluyendo al promotor y secuencias "enhancers" que responden a proteínas celulares. El proceso de retrotranscripción ubica a todas estas secuencias en el lugar apropiado del ADN viral<sup>9</sup>.

Tanto los MMTV exógenos como los Mtv endógenos poseen en el LTR 3' un gen que codifica para la proteína superantígeno (Sag)<sup>10,11</sup>. El gen *sag* se encuentra en los MMTV endógenos y exógenos pero no en otros retrovirus. El Sag es una glicoproteína de transmembrana de tipo II, que cumple un rol fundamental en el ciclo del MMTV, como se explicará más adelante.

### *Ciclo de replicación*

El ciclo de replicación del MMTV puede dividirse en dos fases. En la primera se producen los siguientes eventos: la unión del virión a su receptor celular, la entrada del core del virión al citoplasma, la síntesis de ADN doble cadena, la transferencia de la estructura core-ADN al núcleo y la integración del ADN al genoma. Estos pasos están mediados por proteínas del virión y ocurren en ausencia de la expresión de genes virales. En la segunda fase se produce la transcripción del genoma viral completo. Parte de este ARN da lugar a ARNs subgenómicos generados por splicing para la síntesis de proteínas codificadas hacia el extremo 3', como Env y Sag. La otra parte del ARN completo producido por la transcripción del ADN viral no sufre proceso de splicing para ser utilizado como ARNm de *gag*, *pro* y *pol* o como genoma viral para la formación de viriones. El genoma viral se encapsida y se asocia con la membrana celular que contiene a las proteínas codificadas por *env*. Los nuevos viriones salen de la célula por brotación, rodeándose de la bicapa lipídica que forma la envoltura.

### *Superantígeno viral*

Clásicamente, los antígenos reconocidos por los receptores  $\alpha\beta$  de las células T (TCR  $\alpha\beta$ ) son pequeños péptidos unidos al surco de unión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La frecuencia de células T que reconocen dichos antígenos es de  $1/10^4$  a  $1/10^6$ . Muchos de los aminoácidos del TCR que reconocen a estos péptidos se encuentran en una región polimórfica del receptor denominada tercera región determinante de complementariedad (CDR3), formada durante el rearreglo de los segmentos génicos V, D y J.

Los superantígenos (Sags) son proteínas de origen bacteriano o viral que se unen a los laterales del TCR y de la molécula MHC II, que son regiones mucho menos polimórficas. A diferencia de los antígenos convencionales, los Sags forman complejos con las moléculas MHC II, interaccionando por fuera del surco de unión al antígeno de las mismas, y con regiones conservadas del segmento V de la cadena  $\beta$  del TCR ( $V\beta$ ). Cada Sag puede interaccionar con uno o más segmentos  $V\beta$ . Dado que existe un número limitado de segmentos  $V\beta$  (25 en el ratón), la frecuencia de células T que reconocen al Sag

varía entre del 2 al 20 %. De esta manera, un Sag estimula la respuesta de todos aquellos clones T que tengan en su TCR un segmento V $\beta$  específico para ese Sag, independientemente de la especificidad antigénica de cada TCR.

La estimulación de las células T con un Sag induce una intensa proliferación de los clones reactivos al mismo, y una elevada producción de citoquinas. Una continua exposición a un Sag *in vivo* conduce finalmente a la muerte de las células respondedoras, es decir a la delección de los clones que reconocen al Sag.

El Sag del MMTV es codificado por un gen localizado en el LTR 3' del genoma viral. Es una proteína transmembrana de tipo II que necesita un procesamiento proteolítico para ser activada<sup>12</sup>. Se ha demostrado que las distintas variantes de MMTV codifican para diferentes Sags, los cuales presentan una gran variabilidad en su extremo carboxiterminal<sup>10,13-17</sup>. Esta variabilidad determina la especificidad de reconocimiento por la región V $\beta$  del TCR, de manera que cada variante viral estimula la proliferación y posterior delección de distintas poblaciones de células T.

Los Mtv endógenos también poseen un gen *sag*, que generalmente es funcional y genera una proteína equivalente a la de los MMTV exógenos, con gran variabilidad en su extremo carboxiterminal. Se ha demostrado que todos los superantígenos endógenos denominados anteriormente MIs (Minor lymphocyte stimulating antigen) están codificados por Mtv<sup>18,19</sup>. Dado que los Mtv endógenos están integrados en el genoma del ratón, los Sags endógenos son reconocidos como proteínas propias durante la selección tímica, induciendo la delección de los clones T reactivos al mismo. Como consecuencia, cuando se analiza el repertorio de segmentos V $\beta$  presente en la población de células T de la periferia, se observa que cada cepa de ratones posee una diversidad de clones V $\beta$  específicos particular que depende de qué Mtv endógenos posee esa cepa, careciendo de aquellos clones que fueron deleccionados en el timo. El rol del Sag viral en el ciclo de vida del MMTV se discutirá en el siguiente punto.

#### *Ciclo de vida del MMTV. Interacción del virus con el sistema inmune del huésped.*

El ciclo del MMTV se muestra en la **Figura B**. La leche materna de hembras infectadas con un MMTV exógeno contiene altos títulos de virus, el cual es transmitido a

la descendencia durante la etapa de la lactancia. Las crías amamantadas por las hembras infectadas adquieren el virus a través del intestino, más precisamente a través de los tejidos linfáticos asociados al mismo, las placas de Peyer (PPs)<sup>20</sup>. La infección por esta ruta es posible durante las dos primeras semanas de vida, antes de la acidificación del estómago. El virus entra a través de la región del domo que cubre las PPs e infecta las células B de las PPs<sup>21</sup>. Hasta el momento se desconoce si las células dendríticas (DCs) de las PPs también son infectadas por el virus, aunque estudios realizados en un modelo de infección con MMTV en ratones adultos (por inyección subcutánea del virus en la almohadilla plantar) indican que las DCs del ganglio drenante de la inoculación viral se infectan tempranamente, a la par de las células B<sup>22</sup>. Recientemente se ha demostrado que el receptor de transferrina tipo 1 (Tfr1), también llamado CD71, es la molécula utilizada por el MMTV como receptor de entrada a la célula<sup>23</sup>. Las células B infectadas, y también probablemente las DCs, comienzan a expresar el Sag viral en su membrana, asociado a moléculas MHC de clase II. En pocos días se produce en las PPs una respuesta proliferativa de los clones T V $\beta$  específicos para el Sag viral<sup>20</sup>. La interacción T-B ocurrida durante la presentación del Sag a las células T también induce la activación y proliferación de las células B infectadas. De esta manera se produce una amplificación del reservorio del virus<sup>24</sup>. Muchos días después se comienzan a detectar células infectadas en otros órganos linfoides. A lo largo de la vida del ratón se puede encontrar una pequeña fracción de células B, T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> infectadas con MMTV en todos los órganos linfoides y en muchos órganos no linfoides. La infección de los linfocitos está coordinada con el desarrollo. Para el comienzo de la pubertad, el MMTV ya se ha expandido exitosamente en la población linfocitaria y los linfocitos llevan al virus desde los compartimientos linfoides al epitelio mamario en división<sup>25</sup>. La infección de la glándula mamaria se detecta a partir de la pubertad. La preñez, otra etapa de división celular de la glándula mamaria, también amplifica la infección en el tejido mamario. Las células epiteliales mamarias infectadas producen gran cantidad de viriones por estimulación de elementos respondedores a hormonas y elementos tejido-específicos contenidos en el LTR viral<sup>26</sup>. El virus producido en la glándula mamaria es secretado en la leche y de esta manera se completa el ciclo del MMTV.

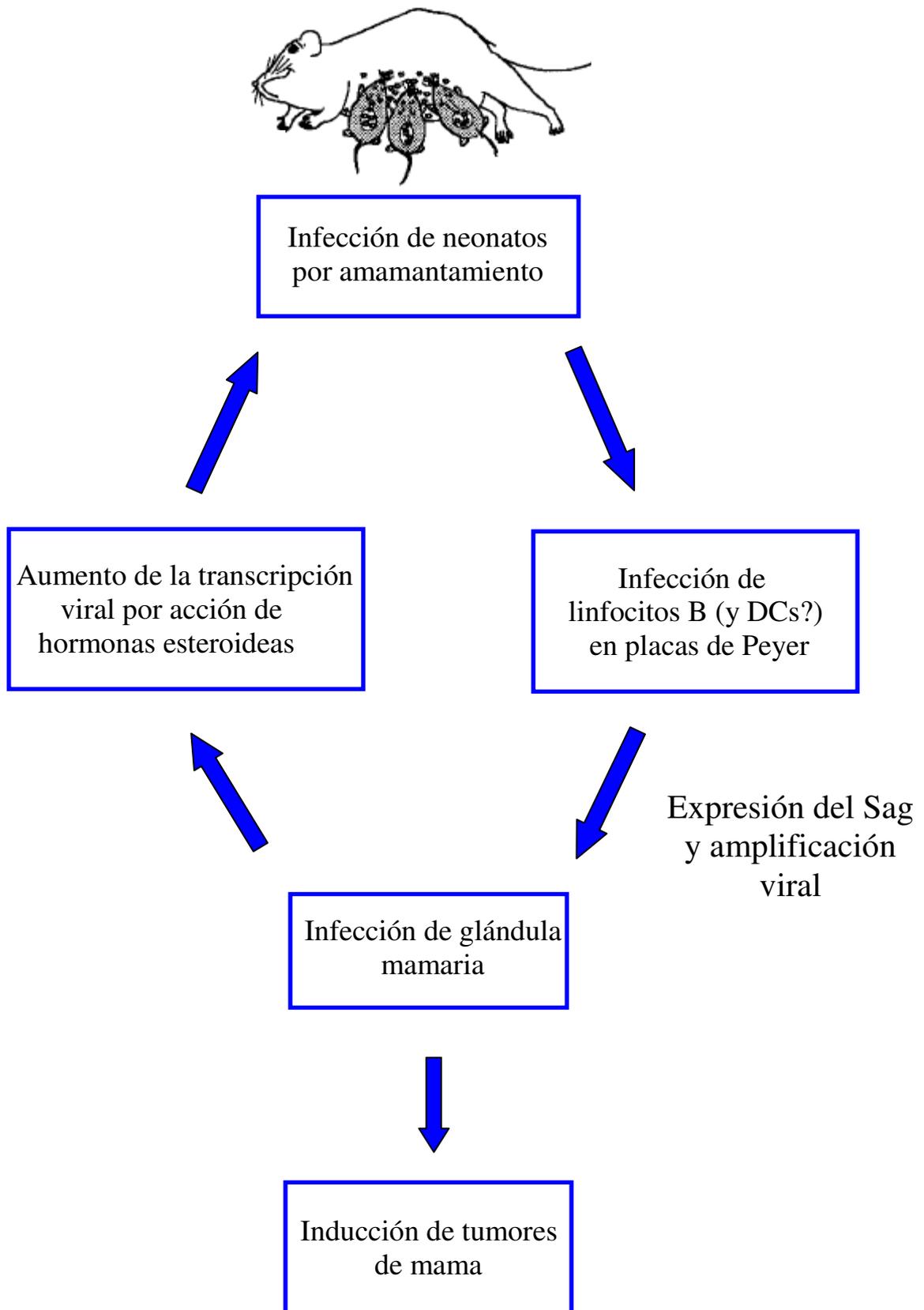


Figura B. Ciclo del MMTV

Muchos estudios han demostrado que el Sag juega un rol crítico en el ciclo de vida del MMTV<sup>27-29</sup>. La ausencia de células reactivas al Sag (por ejemplo, por acción de un Sag endógeno que cause su delección en el timo) conduce a la falta de respuesta al Sag del virus exógeno y disminuye fuertemente la probabilidad de que la infección llegue a la glándula mamaria. Luego de una a cinco generaciones el virus exógeno se pierde en la cepa de ratón que originalmente había infectado<sup>28,29</sup>. Resultados similares se observaron en ratones que expresan moléculas MHC de clase II que no presentan al Sag en forma eficiente, o en ratones sin células B o moléculas de clase II<sup>30,31</sup>.

Además de proteger al huésped de infecciones con virus exógenos que expresen Sags con reactividad cruzada, la presencia de los virus endógenos generaría ventajas selectivas para los MMTVs. Se ha demostrado que los virus MMTV infecciosos son capaces de recombinar con provirus endógenos no productores de partículas virales, dando lugar a la aparición de nuevas variantes virales que pueden resultar más patogénicas que los virus parentales<sup>32-34</sup>. La variante de MMTV utilizada a lo largo de este trabajo, MMTV(LA), surgió en nuestro laboratorio de una recombinación ocurrida entre la variante exógena MMTV(BALB14) y el provirus endógeno *Mtv-7*<sup>33</sup>. Hemos determinado que la región hipervariable del gen *sag* del virus recombinante deriva del *Mtv-7*, por lo cual los clones T estimulados por el Sag del MMTV(LA) son los mismos estimulados por el Sag del *Mtv-7*: V $\beta$ 6, V $\beta$ 8.1, V $\beta$ 7 y V $\beta$ 9<sup>33</sup>. El MMTV(LA) posee una mayor capacidad tumorigénica que el virus parental, MMTV(BALB14)<sup>33</sup>.

#### *Modelos para el estudio de la infección con MMTV in vivo*

La mayoría de los trabajos que estudian la interacción del MMTV con el sistema inmune han sido realizados en un modelo experimental de infección en ratones adultos, en el cual el virus es inoculado en forma subcutánea en la almohadilla plantar del ratón y la respuesta es estudiada en el ganglio drenante de la inoculación, el ganglio poplíteo. La utilización de este modelo ha permitido grandes avances en el conocimiento del MMTV, aunque difiere de la infección natural en neonatos en algunos puntos importantes, como la edad del huésped, la carga viral y las características del tejido inmune que entra en contacto con el virus por primera vez.

Como se explicó anteriormente, en el ciclo natural del MMTV las PPs constituyen el sitio de entrada del virus al organismo. Las PPs son agregados linfoides macroscópicos que se encuentran en la submucosa a lo largo del intestino, en el borde antimesentérico<sup>35</sup>. Las PPs maduras consisten en grupos de tres o más grandes folículos de células B2, con áreas T interpuestas. Las áreas linfoides están separadas del lumen intestinal por una capa única de células epiteliales columnares, conocida como epitelio asociado al folículo (“follicle-associated epithelium” o FAE) y un área más difusa inmediatamente por debajo del epitelio, conocida como domo subepitelial (“subepithelial dome” o SED)<sup>36</sup>.

El FAE difiere del epitelio que recubre el resto de la mucosa intestinal ya que contiene menores niveles de enzimas digestivas y un borde en cepillo menos pronunciado; además contiene grandes números de células B, T y dendríticas infiltradas. La principal característica del FAE es la presencia de células M, que son enterocitos especializados que carecen de los microvilli superficiales y de la capa gruesa de mucus. Las células M se diferencian a partir de enterocitos bajo la influencia de  $LT\alpha_1\beta_2$  presente en las células linfoides locales, principalmente células B<sup>37,38</sup>. Las células M unen patógenos invasivos como Salmonella, Shigella, Yersinia y reovirus, y otros antígenos particulados<sup>36</sup>. Golovkina y colaboradores han sugerido que la falta de células M inhibe la infección con MMTV<sup>38</sup>.

El domo contiene una extensa red de DCs, la mayoría de las cuales son  $CD11b^-CD8^-CD11c^{+39}$ . Está claro que estas DCs juegan un rol importante en la inducción de respuestas inmunes en las PPs, ya que en los ratones knock out para CCR6, que carecen de DCs en el SED, no pueden montar una respuesta inmune contra un antígeno administrado en forma oral o contra un rotavirus enteropático<sup>40</sup>. Se cree que antígenos y microorganismos son transportados por las células M y capturados por las DCs del SED. Luego, estas DCs migran directamente a las zonas T interfoliculares de las PPs o bien, vía vasos linfáticos, a los ganglios mesentéricos<sup>35</sup>.

### *Tumorigénesis inducida por MMTV*

En general, las propiedades transformantes del MMTV han sido consideradas como el resultado de efectos posicionales causados por la integración viral próxima a proto-

oncogenes. Específicamente la transformación celular causada por el MMTV ha sido atribuida a la inserción cerca o dentro de genes de la familia Wnt/FGF<sup>41</sup>. Sin embargo, evidencia genética sugiere que los productos de los genes virales *gag* y *env* también están involucrados en la tumorigénesis inducida por MMTV<sup>42</sup>. Recientemente se ha demostrado que la proteína Env del MMTV posee un dominio ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) y que la señalización generada a través de este dominio es suficiente para inducir la transformación de células normales<sup>43</sup>.

## **Receptores de Tipo Toll**

El sistema inmune de los vertebrados comprende al sistema inmune innato y al sistema inmune adaptativo. La primera línea de defensa contra los patógenos es el sistema inmune innato, capaz de reconocer un número limitado de estructuras moleculares de los patógenos e iniciar una respuesta inflamatoria que en muchos casos es suficiente para la eliminación de los mismos. El sistema inmune innato está filogenéticamente conservado y está presente en casi todos los organismos multicelulares, en muchos de los cuales es el único sistema inmunológico<sup>44</sup>. Los vertebrados han evolucionado una segunda línea de defensa, el sistema inmune adaptativo, el cual es capaz de reconocer un amplio espectro de antígenos a través de una inmensa diversidad de receptores (receptores T- TCRs y receptores B- BCRs) producidos por rearrreglos génicos somáticos. La inmunidad adaptativa se caracteriza por su alta especificidad, desarrollada mediante la selección clonal de los linfocitos que expresan receptores específicos para el antígeno.

La respuesta inmune innata no es completamente inespecífica como se creía anteriormente, sino que es capaz de discriminar entre lo propio y una variedad de patógenos. El sistema inmune innato reconoce microorganismos a través de receptores denominados receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (pattern recognition receptors- PRRs). A diferencia de los receptores T y B utilizados en la respuesta inmune adaptativa, existe un número limitado de PRRs, los cuales se encuentran codificados en la línea germinal y no sufren ningún tipo de rearrreglo.

Los PRRs poseen características en común. Primero, reconocen componentes microbianos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen associated molecular patterns- PAMPs) que son esenciales para la supervivencia del microorganismo y por lo tanto altamente conservados. Segundo, se expresan en forma constitutiva en el huésped. Tercero, están codificados en la línea germinal, no son clonales, se expresan en distintos tipos celulares y son independientes de la memoria inmunológica<sup>45</sup>. Los PRRs pueden ser expresados en la superficie celular, en compartimentos intracelulares o secretados al torrente sanguíneo o tejidos tisulares<sup>46</sup>. Las principales funciones de estos receptores incluyen: opsonización, activación de cascadas de complemento y coagulación, fagocitosis, activación de vías de señalización proinflamatorias e inducción de apoptosis<sup>47</sup>. Algunos ejemplos de PRRs son la proteína de

unión a manano, la proteína C reactiva, el receptor de manosa, el receptor scavenger y los receptores de tipo Toll<sup>47</sup>. Existe también una gran familia de PRRs citoplasmáticos como las proteínas NOD-LRR y las helicasas CARD, implicadas en el reconocimiento de componentes bacterianos y virales, respectivamente<sup>45</sup>.

### RECEPTORES DE TIPO TOLL

Los receptores de tipo Toll (TLRs) son una clase de PRRs evolutivamente conservados desde *Caenorhabditis elegans* hasta los mamíferos<sup>45</sup>. En la actualidad son considerados los sensores primarios de patógenos y los responsables de orquestar la respuesta inmune innata. Además existe creciente evidencia de que los TLRs contribuyen significativamente a la activación y modulación de la respuesta inmune adaptativa<sup>48</sup>. La unión de un TLR a su ligando puede activar a macrófagos y células dendríticas (DCs), y tiene un rol importante en la maduración de las DCs. Luego del reconocimiento de patógenos microbianos, los TLRs disparan señales intracelulares que resultan en la inducción de citoquinas inflamatorias, interferones de tipo I y quemoquinas, además de un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras.

#### *Receptor Toll de Drosophila*

El receptor Toll de *Drosophila* fue el primer miembro de la familia de los TLRs en ser identificado. Fue descrito originalmente como un receptor transmembrana requerido para el establecimiento del eje dorso-ventral en el embrión en desarrollo<sup>49</sup>. Cuando Toll es activado por su ligando endógeno Spätzle se inicia una cascada de señalización intracelular que conduce a la traslocación de la proteína Dorsal al núcleo, donde regula la expresión de genes blanco específicos<sup>50</sup>. La vía de señalización del receptor Toll de *Drosophila* muestra notables similitudes con la vía de señalización de la IL-1 de mamíferos, la cual conduce a la activación de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción responsable de muchos aspectos de las respuestas inflamatorias e inmunológicas. De hecho, los dominios citoplasmáticos de Toll y del receptor de IL-1 (IL-1R) están altamente conservados y se refiere a ellos como el dominio Toll/IL-1R (TIR). En base a esta similitud, se propuso que la vía de señalización mediada por el receptor Toll podría estar involucrada en la regulación de respuestas

inmunes<sup>50</sup>. Esto fue demostrado en estudios de moscas mutantes para algunos de los componentes de la vía mediada por Toll<sup>51,52</sup>, las cuales eran sensibles a infecciones por hongos o bacterias. A diferencia de los TLRs de mamíferos, el Toll de *Drosophila* es activado indirectamente por Spätzle, y no directamente por componentes microbianos. El mecanismo por el cual Toll es activado en respuesta a una infección microbiana no se conoce bien aún.

### *Receptores de tipo Toll de mamíferos*

Un año después del descubrimiento del rol del receptor Toll de *Drosophila* contra la infección fúngica, se identificó un homólogo de Toll en mamíferos<sup>53</sup>. Luego se identificaron más miembros de esta familia de proteínas estructuralmente relacionadas con Toll, conocidas en conjunto como receptores de tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs). Hasta el día de hoy, la familia de los TLRs de mamíferos tiene 12 miembros (TLR1-12)<sup>45</sup>.

### *Estructura*

Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana de tipo I. Los miembros de la familia TLR se caracterizan estructuralmente por la presencia de un dominio de repetición rico en leucinas (leucine rich repeat, LRR) en su dominio extracelular y un dominio TIR en su dominio intracelular<sup>52</sup>. En base a sus secuencias aminoacídicas, los TLRs pueden ser divididos en subfamilias, cada una de las cuales reconoce PAMPs relacionados: la subfamilia de TLR1, TLR2 y TLR6 reconoce principalmente lípidos, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos<sup>45</sup>. Sin embargo, los TLRs son receptores inusuales porque algunos de ellos, como por ejemplo el TLR4 (ver más adelante), pueden reconocer muchos ligandos que no están estructuralmente relacionados.

### *Expresión y distribución*

Los TLRs se expresan en varias células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, DCs, células B, algunos tipos de células T, y también en células no inmunes como fibroblastos o células epiteliales. La expresión de los TLRs no es estática sino que es

rápidamente modulada en respuesta a patógenos, citoquinas o factores de estrés ambiental. Algunos TLRs (TLR1, 2, 4, 5 y 6) se expresan en la superficie celular mientras que otros (TLRs 3, 7, 8 y 9) se encuentran casi exclusivamente en compartimientos intracelulares como endosomas, y sus ligandos requieren ser internalizados al endosoma para disparar la señalización.

### *Descripción de los TLRs y sus ligandos*

Describiremos a los TLRs más mencionados en la literatura, profundizando en aquellos relevantes para este trabajo, el TLR4 y el TLR2.

**TLR4:** El ligando más estudiado del TLR4 es el lipopolisacárido (LPS), glicolípido que constituye el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El lípido A es la porción del LPS que posee actividad inmunomoduladora.

Dos cepas de ratones, C3H/HeJ y C57BL/ScCr fueron conocidas por un largo tiempo por presentar hiporrespuesta al LPS. En la búsqueda de los genes responsables de esta hiporrespuesta, dos grupos independientes identificaron mutaciones en el gen *Tlr4*<sup>54,55</sup>. La cepa C3H/HeJ tiene una mutación puntual en la región del gen *Tlr4* que codifica para la región intracelular, que lleva al reemplazo de una prolina altamente conservada por una histidina. Esta mutación resulta en la generación de un alelo dominante negativo, defectos en la señalización mediada por TLR4 y la consecuente supresión de la respuesta al LPS<sup>56</sup>. La denominación de este alelo mutado es *Tlr4*<sup>LPS-d</sup> y la del normal es *Tlr4*<sup>LPS-n</sup>, por lo cual la cepa C3H/HeJ es *Tlr4*<sup>LPS-d</sup>/*Tlr4*<sup>LPS-d</sup>, mientras que la cepa C3H/HeN es *Tlr4*<sup>LPS-n</sup>/*Tlr4*<sup>LPS-n</sup>. La cepa C57BL/ScCr tiene una delección en el gen *Tlr4*<sup>54,55</sup>. Los ratones knock out para TLR4 también presentan hiporrespuesta al LPS, confirmando que el TLR4 es el receptor esencial para el reconocimiento del LPS<sup>56</sup>.

El reconocimiento del LPS requiere otras moléculas además del TLR4. El LPS se une a la proteína de unión al LPS presente en el suero, y el complejo formado es luego reconocido por CD14, una proteína anclada a la membrana por glicofosfatidil inositol. El complejo LPS/CD14 estimula al complejo formado por TLR4 y la proteína MD-2 en la superficie celular<sup>57</sup>. MD-2 es una molécula que se asocia con la porción extracelular del TLR4 y es indispensable para el reconocimiento del LPS por el TLR4<sup>57-59</sup> y para la

localización normal de TLR4 en la membrana plasmática<sup>58</sup>. La interacción del LPS con TLR4/MD-2 induce la homodimerización de TLR4 y la señalización intracelular a partir del mismo<sup>60</sup>.

Otra proteína de superficie, RP105, también está involucrada en el reconocimiento de LPS. RP105 contiene un dominio LRR estructuralmente relacionado con la porción extracelular de los TLRs y se expresa preferencialmente en la superficie de las células B<sup>61</sup>. RP105 se asocia funcionalmente con TLR4 para reconocer al LPS<sup>62</sup>. Por lo tanto, muchos componentes están implicados en el reconocimiento del LPS, indicando que el receptor funcional del LPS forma un gran complejo.

Otros ligandos de TLR4: Además del LPS, el TLR4 reconoce muchos otros ligandos. La molécula de origen vegetal Taxol, de potente actividad antitumoral y antimicótica por su acción de estabilización de microtúbulos que impide la división celular durante la mitosis, posee actividad inmunoestimuladora similar al LPS en ratones pero no en humanos<sup>63,64</sup>. Esta actividad está mediada por TLR4 y MD-2. Algunas proteínas virales interaccionan con el TLR4. Por ejemplo, el TLR4 y CD14 reconocen la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial<sup>65,66</sup>. Por otro lado, las proteínas de la envoltura del MMTV y del virus de la leucemia murina Moloney coinmunoprecipitan con el TLR4 e inducen la activación del factor NF- $\kappa$ B a través del mismo<sup>67</sup>.

El TLR4 también parece reconocer ligandos endógenos, entre los que se incluyen las proteínas de shock térmico (heat shock proteins, HSPs), algunos componentes de la matriz extracelular,  $\beta$ -defensina y la proteína surfactante A<sup>68</sup>. Las HSPs se encuentran muy conservadas filogenéticamente; son inducidas por una amplia variedad de condiciones de estrés como shock térmico, radiación ultravioleta e infecciones bacterianas y virales. Las HSPs tienen como función primaria la de ser chaperona de proteínas nacientes o mal plegadas. Además, las HSPs activan macrófagos y DCs a través del TLR4 y el TLR2 induciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras<sup>69-71</sup>.

Los componentes de la matriz extracelular se producen en respuesta a la injuria tisular y juegan un importante rol en la remodelación de tejidos, conteniendo al agente acusante de la injuria, cerrando de la herida y completando la curación. Se ha demostrado que varios componentes de la matriz, entre ellos un dominio de la fibronectina (type III

repeat extra domain A), el ácido hialurónico y sus derivados de bajo peso molecular, fragmentos de heparán sulfato y el fibrinógeno, poseen actividad inmunoestimuladora similar al LPS y ésta es mediada por TLR4<sup>72-75</sup>.

Por lo tanto, el TLR4 está presumiblemente involucrado en diversos aspectos de la respuesta inflamatoria mediante el reconocimiento de ligandos endógenos producidos durante la inflamación, aun en ausencia de infección. Estos ligandos podrían representar un tipo de “señal de peligro” endógena, es decir, moléculas o estructuras moleculares que son liberadas o producidas por células que se encuentran bajo estrés o muerte celular anormal (necrosis). Estas señales son reconocidas por macrófagos y DCs que en consecuencia inician una respuesta inmune<sup>76</sup>. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que todos estos ligandos endógenos activan células del sistema inmune sólo a concentraciones muy elevadas, en contraste con las bajas concentraciones requeridas de LPS. Se ha sugerido la posibilidad de que estos ligandos endógenos podrían estar en algunos casos contaminados con un verdadero ligando del TLR4 como por ejemplo el LPS<sup>68</sup>.

**TLR2, TLR1, TLR6, TLR10:** El TLR2 reconoce componentes de una variedad de microorganismos, incluyendo entre otros peptidoglicano (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias Gram positivas<sup>77-80</sup>, lipoproteínas de bacterias Gram negativas, micoplasmas y espiroquetas<sup>81-85</sup>, lipoarabinomano de micobacterias<sup>79,80,86,87</sup>, glicolípidos y glicosilfosfatidil-inositoles (GPIs) de parásitos<sup>88</sup> y zymosan (carbohidrato de la pared de levaduras)<sup>89</sup>. El PGN es un polímero único compuesto por una mezcla heterogénea de disacáridos repetidos y es la única molécula biológica conocida que contiene D-aminoácidos, mientras que el LTA está compuesto por un polímero polifosfato hidrofílico unido a un glicolípido<sup>90</sup>. Ambas moléculas se encuentran muy conservadas entre las bacterias Gram positivas y son indispensables para su viabilidad, lo cual las convierte en PAMPs ideales para el reconocimiento por TLRs. Aunque los GPIs no son estructuras exclusivas de patógenos, los GPIs de *Treponema maltophilum*, *Trypanosoma cruzi*, y *Plasmodium falciparum* son estructuralmente diferentes de los del huésped y se expresan de diez a cien veces más<sup>90,91</sup>.

El TLR2 juega un papel muy importante en la detección de bacterias Gram positivas. Los ratones deficientes en TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) son altamente susceptibles a desafíos con *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*<sup>92,93</sup>. Un polimorfismo en el gen

del TLR2 humano ha sido asociado a una respuesta reducida a varias lipoproteínas bacterianas y con un shock séptico luego de la infección con bacterias Gram positivas<sup>94</sup>.

Además, el TLR2 reconoce algunas formas atípicas de LPS de *Leptospira interrogans* y *Porphyromonas gingivalis*, a diferencia del TLR4, que reconoce el LPS de enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella spp*<sup>95,96</sup>. Los LPS reconocidos por el TLR2 difieren de las de aquellos reconocidos por el TLR4 en particular en el número de cadenas acilo del lípido A. Debe tenerse en cuenta que aún no se ha probado que pequeñas cantidades de un ligando de TLR2 contaminen las preparaciones de estos LPS.

La capacidad del TLR2 para inducir activación celular depende de la formación de heterodímeros con los miembros de su subfamilia TLR1 y TLR6. Tanto los heterodímeros TLR2:TLR1 como los TLR2:TLR6 pueden funcionar como receptores del PGN<sup>97-99</sup>. En cambio, los heterodímeros TLR2:TLR1 y TLR2:TLR6 reconocen diferencialmente triacil- y diacil-lipopéptidos, respectivamente<sup>98-100</sup>. La molécula CD14 también participa junto con el TLR2 como receptor de PGN y otros componentes de bacterias Gram positivas<sup>101</sup>.

El TLR10 humano es un miembro huérfano de la subfamilia del TLR2, codificado en el mismo locus que contiene a TLR1 y TLR6<sup>102</sup>. TLR10 puede formar tanto homodímeros como heterodímeros con TLR1 o TLR2<sup>103</sup>.

**TLR5:** El ligando del TLR5 es un componente del flagelo bacteriano. La flagelina es un componente importante tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas ya que es requerida para el ensamblaje del filamento flagelar y para la motilidad y es por lo tanto esencial para la supervivencia<sup>104</sup>. Se ha demostrado que el reconocimiento de la flagelina mediado por TLR5 cumple un rol importante en las respuestas inmunes protectoras contra la enfermedad del legionario y la fiebre tifoidea en humanos<sup>105,106</sup>.

**TLR3:** El TLR3 se expresa intracelularmente y ha sido identificado como receptor de ARN doble cadena (ARNdc) asociado a infecciones virales<sup>107</sup>. El ARNdc puede estar presente en el genoma viral o puede ser generado durante la replicación viral. El ARNdc es un potente inductor de interferones de tipo I, los cuales tienen muchos efectos, incluyendo actividad antiviral e inmunoestimulación<sup>52</sup>. Ratones deficientes para TLR3 son hipersusceptibles a la infección con citomegalovirus, indicando que el TLR3 tiene un rol

protectivo contra la infección viral<sup>108</sup>. Algunos ARNdc sintéticos como el ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] poseen una actividad similar al ARNdc viral.

**TLR9:** El TLR9 también es de localización intracelular. Reconoce ciertas secuencias de ADN como dinucleótidos CG no metilados (llamados motivos CpG), los cuales son estructuras conservadas que se encuentran frecuentemente en la mayoría de los genomas bacterianos y en ciertos genomas virales<sup>109</sup>. El TLR9 también reconoce otros componentes de patógenos distintos del ADN, como la hemozoina de *Plasmodium falciparum*<sup>110</sup>.

**TLR7 y TLR8:** Estos dos receptores son altamente homólogos al TLR9<sup>52</sup>. El TLR7 murino, el TLR7 humano y el TLR8 humano reconocen a ligandos sintéticos tipo imidazoquinolina como el imiquimod (R-837) y el resiquimod (R-848) y análogos de guanosina como loxorribina, los cuales poseen una potente actividad antiviral<sup>111-113</sup>. La similitud estructural entre estos compuestos y los ácidos ribonucleicos sugiere la posibilidad de que TLR7 y TLR8 pueden detectar la presencia de virus y existen trabajos que apoyan esta teoría, mostrando que ARN viral de simple cadena funciona como ligando de estos receptores<sup>114,115</sup>.

#### *Señalización a través de los TLRs*

El reconocimiento de ligandos por los TLRs conduce a una rápida y compleja cascada de señalización intracelular que involucra la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, MAP quinasas y factores regulatorios de interferón (IRFs). Esto conduce a una activación celular que incluye la producción de citoquinas, quemoquinas, interferones e inmunoglobulinas, así como también el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras<sup>116</sup>.

Los TLRs activan las mismas moléculas intracelulares utilizadas en la señalización a través del receptor de IL-1<sup>117</sup>. Luego de la unión del ligando, los TLRs sufren cambios conformacionales, requeridos para el reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR hacia la porción citoplasmática de los receptores<sup>45</sup>. La interacción homofílica entre los dominios TIR de las proteínas adaptadoras y los TLRs dispara una cascada de señalización y la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias. Se

han descrito cuatro moléculas adaptadoras con dominios TIR<sup>45</sup>: MyD88, TIRAP/MAL, TRIF/TICAM-1 y TRAM/TICAM-2. Las diferentes respuestas inducidas por distintos TLRs pueden ser explicadas en parte por el uso selectivo de estas moléculas adaptadoras. MyD88 y TRIF son responsables de la activación de distintas vías de señalización que conducen a la producción de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I, respectivamente.

MyD88 es utilizado por todos los TLRs, con excepción del TLR3<sup>118</sup>. TLR2 y TLR4 requieren otro adaptador (TIRAP/MAL) para reclutar MyD88 al receptor, mientras que para los otros TLRs la interacción es directa. La asociación entre los TLRs y MyD88 recluta miembros de la familia de quinasas IRAK. Dos miembros de esta familia, IRAK4 e IRAK1, son fosforilados secuencialmente, causando su disociación del complejo del receptor y su asociación con TRAF6. TRAF6 forma un complejo con enzimas de ubiquitinación, el cual activa a la quinasa TAK1, que a su vez activa a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (a través del complejo de la quinasa de I $\kappa$ B- IKK-) y AP-1 (a través de MAP quinasas). Esta “vía de señalización dependiente de MyD88” resulta en la activación de genes de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>118</sup>. Recientemente se ha demostrado que otro factor de transcripción, IRF-5, también es activado a través de MyD88, induciendo varios genes de citoquinas inflamatorias por asociación con NF- $\kappa$ B p50.

La unión del ligando a TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9, pero no a TLR2, induce una “vía de señalización independiente de MyD88” que utiliza a TRIF como molécula adaptadora. En el caso de TLR4 también participa TRAM como puente adaptador entre TRIF y el receptor. Mediante otros intermediarios, TRIF induce la activación de NF- $\kappa$ B y de los factores de transcripción IRF-3 e IRF-7, los cuales inducen la expresión de interferones de tipo I y de otros genes inducibles por interferón. Por el contrario, la inducción de IFN- $\alpha$  por TLR7 y TLR9 a través de IRF-7 sí depende de MyD88<sup>116,118</sup>.

Además de la producción de interferones de tipo I, existen otros eventos mediados por los TLRs que son independientes de MyD88, como por ejemplo el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en DCs estimuladas con LPS<sup>119</sup>.

Las complejas cascadas de señalización de los TLRs ofrecen múltiples puntos para la regulación negativa<sup>120</sup>. Algunos reguladores negativos como ST-2 secuestrarían

proteínas adaptadoras, limitando su disponibilidad<sup>121</sup>. Otros como Tollip, MyD88s, IRAK-M o SIGIRR tienen como blanco la actividad de fosforilación de algunos intermediarios o rompen la interacción entre dominios modulares<sup>122-125</sup>. Por otro lado, la proteína SOCS tiene la capacidad de inhibir la producción de IFN de tipo I dejando intacta la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por NF- $\kappa$ B<sup>126</sup>, mientras que la proteína A20 suprime la actividad de NF- $\kappa$ B a nivel de TRAF6<sup>127</sup>. Debe remarcarse que el desarrollo de tolerancia en muchos sistemas celulares cuando son expuestos a estimulación repetitiva de los TLRs podría estar generado a través de la modulación de estos controles de señalización más que por una simple disminución en la expresión de los TLRs<sup>128-131</sup>.

#### *Rol de los TLRs en la respuesta inmune innata*

Los TLRs participan de la respuesta inmune innata generando protección inmediata contra patógenos invasores a través de distintos mecanismos. Los TLRs inducen la producción de citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y quemoquinas (por ejemplo KC-1 y MCP-1) que en conjunto inducen respuestas inflamatorias agudas contra los patógenos, atrayendo y activando a células del sistema inmune innato y también activando a células estromales y leucocitos residentes del tejido local<sup>132</sup>. Los TLRs también inducen la secreción de péptidos y proteínas anti-microbianos en varios tipos celulares<sup>133</sup>. Por otro lado la activación a través de los TLRs aumenta la fagocitosis y eliminación de patógenos por los macrófagos. Además, la inducción de interferones de tipo I por los TLRs en respuesta a ADN o ARN viral conduce a la transcripción de proteínas anti-virales necesarias para eliminar las infecciones virales.

#### *Rol de los TLRs en la respuesta inmune adaptativa*

Además de su función en la respuesta innata, existe creciente evidencia de que los TLRs contribuyen significativamente a la activación de la respuesta inmune adaptativa<sup>48,132</sup>. Aunque los TLRs están involucrados en la actividad de las células B (por ejemplo en el switch de clase), es su rol en la respuesta de las células T el que predomina<sup>134</sup>. A través de su influencia sobre las DCs en cuanto a la captura antigénica, la diferenciación y la migración, los TLRs pueden polarizar la respuesta T helper. Mientras

que el TLR4 y el TLR9 están más asociados a respuestas Th1, el TLR2 y el TLR5 lo están con respuestas Th2<sup>120</sup>. Uno de los mecanismos por los cuales los TLRs influyen en la respuesta inmune adaptativa es aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras en las DCs. Además, algunas citoquinas inducidas por la activación a través de los TLRs, como la IL-12, favorecen una respuesta tipo Th1. Los interferones de tipo 1 también pueden influir sobre varios procesos de la respuesta inmune adaptativa como la producción de IFN- $\gamma$  por células T o la activación de DCs<sup>48,132</sup>. Se ha descrito que los TLRs contribuyen a la activación de las células T mediante el bloqueo de la actividad supresora de las células T regulatorias. En un trabajo reciente se muestra que la producción de IL-6 inducida por el TLR4 en las DCs es necesaria para inhibir la actividad supresora de las células T regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y para que se produzca la activación de las células T. La IL-6 actúa haciendo a las células respondedoras refractarias a la supresión y no inactivando a las células supresoras<sup>135</sup>. Aunque en general el TLR4 participa en la activación de la respuesta inmune, también ha sido involucrado en la activación directa de las células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>136</sup>. La proliferación y capacidad supresora de estas células es aumentada por el LPS, en forma dependiente del TLR4<sup>136</sup>.

## Células Dendríticas

Las células dendríticas (DCs) fueron descritas por primera vez en 1973 por Steinmann y Cohn como un nuevo tipo celular presente en los órganos linfáticos del ratón, que se diferenciaba de otros leucocitos por presentar extensiones citoplasmáticas de forma y número variables, similares a dendritas<sup>137</sup>. En ese momento las células T eran consideradas las células más importantes en la respuesta inmune y los macrófagos como las principales células presentadoras de antígeno (CPAs). Al comienzo las DCs permanecieron como células bastante enigmáticas; su aislamiento y caracterización eran difíciles, y su origen era desconocido. Con el tiempo, el campo de investigación de las DCs se fue ampliando considerablemente y se produjeron grandes avances en el conocimiento de estas células. Hoy en día se considera que las DCs cumplen un rol fundamental en la iniciación y control de las respuestas inmunes innatas y adquiridas<sup>138</sup>, como así también en el balance entre inmunidad y tolerancia inmunológica<sup>139</sup>.

Las DCs representan una población celular heterogénea que se encuentra distribuida en la mayoría de los tejidos periféricos, en particular en sitios de interfase con el medio ambiente (piel y mucosas), en donde representan un 1-2% de las células totales<sup>140,141</sup>. En ausencia de respuestas inmunes e inflamatorias, estas DCs, consideradas inmaduras, cumplen la función de “centinelas” capaces de detectar la entrada de patógenos, inflamación o daño celular. Las DCs inmaduras poseen una alta capacidad para capturar antígenos pero la presentación de los mismos a las células T es ineficiente. Una señal de activación induce la entrada de las DCs en un programa de desarrollo llamado *maduración* que transforma a las DCs en células altamente eficientes para la presentación de antígenos y la activación de células T. Muchos productos derivados de patógenos, como así también citoquinas inflamatorias y otras moléculas propias, pueden inducir la maduración de las DCs a través de la interacción directa con receptores de su superficie. El proceso de maduración produce en las DCs una disminución en su capacidad de captura antigénica, un aumento en la presentación del antígeno en moléculas MHC, un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras y la migración de estas células a los órganos linfáticos a través de la linfa. En conjunto, estos cambios hacen de la DC una potente CPA que se destaca por su capacidad de activar linfocitos T vírgenes e iniciar respuestas inmunes primarias. Finalmente, los linfocitos T y las células endoteliales contribuyen a la

maduración final de las DCs a través del contacto célula-célula y la secreción de citoquinas<sup>142</sup>.

Debe tenerse en cuenta que aunque este modelo es el paradigma clásico de las DCs, existen estudios más recientes que complican esta visión relativamente simple. Primero, se han descrito poblaciones de DCs inmaduras que residen en regiones discretas de órganos linfáticos secundarios. Estas células pueden procesar antígenos solubles que llegan por sangre<sup>143</sup> para presentarlos a las células T. Segundo, se ha demostrado que no todas las DCs de los órganos linfáticos secundarios provienen de tejidos periféricos por migración a través de la linfa, sino que algunas derivan de precursores de médula ósea que llegan a los tejidos linfáticos por vía sanguínea. Tercero, lejos de ser simplemente células estacionarias que esperan ser activadas para madurar y migrar, las DCs migran continuamente en ausencia de inflamación o infección desde sitios de la periferia hacia los tejidos linfoides organizados, a través de la linfa. Se cree que estas DCs que migran en “estado estacionario” se encuentran en un estado de activación inmaduro y presentan en forma continua antígenos propios endógenos o exógenos -probablemente adquiridos de células apoptóticas- para la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica<sup>144</sup>. Otro factor que hace más compleja a la comprensión de la función de las DCs es el hecho de que se han identificado múltiples subtipos de DCs tanto en ratones como en humanos<sup>145,146</sup>. Las DCs son una población celular heterogénea en cuanto a su ontogenia, fenotipo, función y distribución celular. Esto, junto con la compleja interrelación existente entre los distintos tipos de DCs y el hecho de que eventos de activación-diferenciación pueden cambiar la morfología, expresión de marcadores y función de las DCs, ha creado dificultades para establecer una clasificación clara.

#### *Distribución celular, subpoblaciones y ontogenia*

Estudios tempranos sobre las DCs indican que estas células tienen origen en la médula ósea<sup>147</sup>. Se cree que los precursores de DCs migran de la médula ósea al torrente sanguíneo, desde donde generan a las DCs intersticiales que se observan en los tejidos periféricos no linfoides<sup>141,148</sup>. Se han encontrado DCs en corazón, hígado, tiroides, páncreas, vejiga, riñón y piel, la cual contiene a una subpoblación de DCs muy caracterizada, denominada células de Langerhans<sup>149,150</sup>. También se observan DCs en las

redes de circulación corporales, incluyendo la sangre<sup>151</sup> y los vasos linfáticos aferentes<sup>152</sup>. En cuanto a los tejidos linfoides, todos ellos contienen DCs, que pueden ser subdivididas en varias subpoblaciones en base a la expresión de marcadores de superficie.

En la actualidad, el mejor marcador para las DCs murinas es CD11c (integrina  $\alpha$ )<sup>153</sup>. Se han descrito numerosos tipos de DCs, dependiendo de su localización y de la expresión de una variedad de marcadores de superficie, principalmente CD11b, F4/80, CD4, CD8 (expresado como homodímero  $\alpha\alpha$ ), DEC-205, 33D1 y Langerina<sup>139</sup>. En base a la expresión de marcadores mieloides o linfoides se describieron originalmente dos subpoblaciones principales de DCs, una “mieloide” (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) y una “linfoide” (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)<sup>146</sup>. Las DCs CD8<sup>-</sup> del bazo pueden ser subdivididas según su expresión de CD4 (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>)<sup>145</sup>. Un tipo adicional de DCs son las DCs “plasmacitoides”, que expresan B220 y se distribuyen en varios órganos, donde se especializan en la producción de interferón de tipo I en respuesta a infecciones virales<sup>154</sup>.

En el caso particular de las placas de Peyer (PPs), que constituyen el sitio de entrada del MMTV al organismo, se han descrito cinco subpoblaciones de DCs<sup>155</sup>. Tres de ellas expresan altos niveles de CD11c y pueden ser definidas según la expresión de CD8 $\alpha$  y CD11b: CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, o CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup><sup>156</sup>. Luego de su purificación los tres grupos muestran bajos niveles de moléculas MHC II y moléculas coestimuladoras, aumentando su expresión luego de ser activadas. Los distintos tipos de DCs de las PPs mantienen su expresión de CD8 $\alpha$  y CD11b luego de la purificación, sugiriendo que una subpoblación no sería simplemente una forma más diferenciada o activada de otra. Recientemente se han descrito dos subpoblaciones de DCs plasmacitoides en las PPs: CD11c<sup>int</sup> CD8<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> Ly6C<sup>+157-159</sup> y CD11c<sup>int</sup> CD8<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> Ly6C<sup>+155</sup>.

En el bazo<sup>160</sup> y en las PPs<sup>39</sup>, las DCs CD8<sup>-</sup> se localizan principalmente en las zonas de captura antigénica (zona marginal en el bazo y domo subepitelial en las PPs) pero migran a las zonas T luego de ser estimuladas por productos microbianos<sup>161,162</sup>, mientras que las DCs CD8<sup>+</sup> se encuentran en las áreas T. Se ha reportado que las DCs CD8<sup>-</sup>, pero no las CD8<sup>+</sup> se encuentran también en los folículos B y en las zonas T-B<sup>163</sup>, y que tienen la capacidad de inducir la activación de células B y la diferenciación de plasmablastos<sup>164,165</sup>.

Las células  $CD8\alpha^+CD4^-CD11b^-$ , que constituyen una subpoblación particular de las PPs, se encuentran distribuidas ampliamente en este órgano, tanto en zonas de captura antigénica, como en zonas T y en folículos, excepto en los centros germinales<sup>155</sup>.

Las DCs se originan a partir de precursores hematopoyéticos mieloides o linfoides de la médula ósea, a través de precursores intermediarios de DCs que migran hacia los distintos tejidos y dan lugar a DCs inmaduras. Inicialmente se consideraba que las DCs “mieloides” y “linfoides” pertenecían a los linajes mieloides y linfoides, respectivamente<sup>166,167</sup>. Más tarde se demostró que DCs  $CD8^+$  y  $CD8^-$  pueden ser obtenidas a partir de ambos tipos de precursores<sup>168,169</sup>. Además se ha encontrado un precursor común en sangre capaz de originar DCs  $CD8^+$ ,  $CD8^-$  y plasmacitoides<sup>148</sup>. Esta plasticidad en el desarrollo de las DCs no se encuentra en otros linajes hematopoyéticos<sup>170</sup> y ocasiona que las teorías sobre la relación entre los linajes y los diferentes tipos de DCs sean continuamente discutidas y corregidas.

Estudios *in vivo* han confirmado que las DCs convencionales y la plasmacitoides derivan de la subpoblación  $Flt3^+$ , ya sea de los progenitores comunes mieloides como de los linfoides<sup>171,172</sup>. Es posible derivar los distintos tipos de DCs cultivando células de médula ósea en presencia de cocktails definidos de factores de crecimiento, incluyendo  $Flt3L$ <sup>173,174</sup>. Sin embargo,  $Flt3L$  no es específico para las DCs ya que puede estimular la expansión de otros linajes hematopoyéticos<sup>175</sup>. Otro factor utilizado para la obtención de DCs *in vitro* a partir de diversos precursores es el factor de estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), con el agregado opcional de IL-4 o  $TNF-\alpha$ <sup>145,176</sup>.

### *Maduración de las DCs*

Las DCs inmaduras localizadas en los tejidos periféricos tienen características que las convierten en células ideales para el monitoreo y captura de patógenos del ambiente circundante<sup>141</sup>. Estas DCs expresan una gran variedad de receptores que reconocen específicamente moléculas derivadas de patógenos (receptores de reconocimiento de patógenos o PRRs), incluyendo receptores de tipo Toll<sup>132</sup> y lectinas de tipo C, las cuales reconocen estructuras de carbohidratos (como el receptor de manosa, DEC-205 y DC-SIGN)<sup>177</sup>. Una vez en contacto con el antígeno, las DCs inmaduras usan diversas vías de

captura como la endocitosis mediada por receptor (mediada por lectinas de tipo C y receptores FC $\gamma$ II/III) y la endocitosis no específica de partículas y solutos por fagocitosis y macropinocitosis<sup>141,178</sup>. Estas vías también parecen ser utilizadas para la captura de antígenos propios<sup>179</sup>. La expresión de las integrinas  $\alpha\text{v}\beta 3$  y  $\alpha\text{v}\beta 5$  y de CD36 facilitan la toma continua de material apoptótico<sup>180</sup>, proceso importante para el mantenimiento de la tolerancia.

Una vez que ingresa en la vía endocítica de las DCs, el antígeno internalizado se acumula en compartimientos endosomales especializados ricos en moléculas MHC de clase II, denominados MIIC<sup>181</sup>. Los MIIC poseen un pH levemente ácido y contienen diferentes proteínas lisosomales, lo cual favorece la degradación de una variedad de antígenos exógenos. Los MIIC son particularmente prevalentes en las DCs inmaduras<sup>182</sup>. Sin embargo, antes de poder formar los complejos péptido antigénico-molécula MHC y presentarlos en la superficie celular, las DCs deben pasar por un proceso de maduración funcional.

La maduración es un proceso complejo que conduce a la diferenciación de las DCs a células con una potente actividad inmunoestimuladora. Varios eventos forman parte de este proceso: reorganización del citoesqueleto, adquisición de motilidad celular, migración a los tejidos linfoides, aumento de la capacidad de activación de células T y desarrollo de extensiones citoplasmáticas o “dendritas”<sup>183</sup>.

La maduración es inducida por estímulos llamados “señales de peligro” que alertan a las DCs sobre la presencia de patógenos, inflamación o daño tisular<sup>184,185</sup>. Estas señales pueden provenir de moléculas inflamatorias del huésped como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$  o de productos microbianos como el LPS y moléculas liberadas por tejidos dañados que interactúan con los PRRs de las DCs.

La migración de las DCs a las zonas T de los ganglios linfáticos es promovida por cambios en la expresión de moléculas de adhesión y receptores de quemoquinas. Algunos receptores disminuyen, como CCR1, CCR5 y CCR6<sup>186</sup>. El ligando de CCR6, CCL20 (MIP3- $\alpha$ ), localiza a las células de Langerhans en los tejidos dérmicos<sup>187</sup>. Las células de Langerhans también bajan la expresión de E-caderina, que actúa a través de interacciones homotrópicas para mantener a las células de Langerhans entre los queratinocitos<sup>188</sup>. Otros

receptores de quemoquinas aumentan su expresión, como CCR7. Las quemoquinas CCL21 (SLC) y CCL19 (MIP3- $\beta$ ) son ligandos de CCR7 que inducen la entrada de las DCs en los vasos linfáticos. La migración de DCs en estado estacionario, en ausencia de activación inducida por patógenos, también es mediada por CCR7. Una maduración incompleta (inducida por ejemplo por la fagocitosis de células apoptóticas) también es capaz de aumentar la expresión de CCR7<sup>189</sup>. También se demostró que CCR7 es esencial para la migración de DCs de la dermis o epidermis tanto en condiciones inflamatorias como de estado estacionario<sup>190</sup>. La maduración también induce en las DCs la secreción de quemoquinas como TARC, MDC o IP-10 (que reclutan varios tipos de células T) y RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP1- $\beta$ , que reclutan monocitos y DCs al ambiente local<sup>183</sup>.

La presentación antigénica de las DCs se ve fuertemente aumentada por el proceso de maduración, que produce aumentos en la carga de péptidos en moléculas MHC, en el transporte del complejo molécula MHC-péptido a la superficie celular y en la vida media del complejo en la membrana<sup>191</sup>. En las DCs inmaduras los antígenos internalizados se acumulan en los MIIC<sup>192</sup>. Sin embargo, la maduración induce la activación de las enzimas necesarias para formar los complejos molécula MHC-péptido<sup>193</sup>. Concomitantemente, disminuye la capacidad endocítica de las DCs, impidiendo la reabsorción y degradación de los complejos molécula MHC-péptido que llegan a la membrana y promoviendo su expresión estable en la superficie celular<sup>194</sup>. La expresión de moléculas MHC en las DCs maduras es de diez a cien veces más alta que en células B o monocitos<sup>195</sup>.

La maduración también induce la síntesis *de novo* de moléculas MHC de clase I y otros componentes de la vía de presentación endógena como TAP y componentes del inmunoproteasoma<sup>191,196</sup>.

En algunos casos, las proteínas secuestradas en los MIIC pueden ser transportadas al citosol, donde seguirán la vía de presentación en moléculas MHC de clase I. La presentación de antígenos extracelulares vía MHC de clase I se conoce como “presentación cruzada”<sup>196-198</sup>. En el ratón, la presentación cruzada está fuertemente controlada por la maduración de DCs inducida por ligación de CD40 y tratamiento con agonistas de TLRs como LPS, poli I:C o DNA CpG<sup>199,200</sup>.

Las DCs también pueden presentar antígenos lipídicos derivados de patógenos (como micolatos de micobacterias) o propios (como esfingolípidos y fosfatidilinositoles).

Estos antígenos se procesan en compartimentos especializados y se presentan en moléculas CD1, que heterodimerizan con la  $\beta 2$ -microglobulina<sup>201,202</sup>.

La maduración también mejora la capacidad de presentación antigénica y de activación de células T mediante el aumento en la expresión de moléculas involucradas en la interacción con las células T<sup>183</sup>. Las DCs maduras expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40), moléculas de adhesión (CD2, CD11a, CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), y las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) y miembros de la familia TNF (CD137, CD134/OX40L, CD70).

Por otro lado la maduración de las DCs induce la producción de un patrón citoquinas que depende del tipo de estímulo madurativo, el subtipo de DC estimulada y el origen de esa DC<sup>183,203</sup>. Entre las citoquinas que producen los distintos tipos de DCs se encuentran: citoquinas que participan en la polarización de la respuesta T helper, como la IL-12<sup>204,205</sup>; citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>206</sup>, involucradas en la respuesta inmune innata y en la activación de DCs inmaduras; citoquinas que participan en la respuesta antiviral como los interferones de tipo I (IFN $\alpha/\beta$ )<sup>207</sup> y citoquinas involucradas en la inducción de tolerancia inmunológica, como la IL-10<sup>208</sup>.

#### *Rol de las DCs en la inmunidad adquirida*

Las DCs activadas y cargadas con el Ag migran a las zonas T de los órganos linfáticos secundarios para iniciar las respuestas de las células T. Las DCs pueden entrar al ganglio linfático a través de la sangre o de la linfa<sup>209</sup>. Se ha observado que durante las primeras horas luego de entrar al ganglio, las células T antígeno-específicas examinan rápidamente muchas DCs diferentes y sólo establecen interacciones cortas que no duran más de unos minutos. Luego de 6-8 horas, la motilidad de las células T decrece y los contactos formados con las DCs duran más de 1 hora. Los contactos duraderos entre DCs y células T continúan el primer día hasta que las células T comienzan a proliferar<sup>210</sup>. Las interacciones estables entre DCs y células T son necesarias para inducir la activación de las células T<sup>211</sup>. Los contactos estables entre DCs y células T observados *in vitro* se asocian a la formación de una sinapsis inmunológica, que es una zona especializada de contacto que

contiene al TCR, al complejo molécula MHC-péptido así como todas las moléculas accesorias necesarias para la interacción y activación<sup>212</sup>.

La activación efectiva de las células T resulta en su expansión clonal y diferenciación a células efectoras y de memoria. El tipo de respuesta T generada (ya sea CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) depende de muchos factores, incluyendo la concentración del antígeno en la DC, la afinidad del TCR por el complejo péptido-molécula MHC, la duración de la interacción entre la DC y la célula T, el estado de maduración de la DC y el tipo de estímulo que causó la maduración de la DC<sup>213</sup>. El patrón de citoquinas de la DC estimuladora determina la polarización de la respuesta T CD4<sup>+</sup>. Las DCs que producen IL-12, IL-18 e IL-27 polarizan hacia una respuesta tipo T helper 1 (Th1), mientras que la secreción de CCL17 o CCL22, la expresión de determinados ligandos de Notch<sup>214</sup> o la ausencia de IL-12 induce una respuesta tipo T helper 2 (Th2). El perfil de citoquinas producido por una DC depende de varios factores: el tipo de DC, el microambiente local y localización anatómica y el tipo de estímulo madurativo<sup>183</sup>. Estos factores también controlan otros aspectos de la respuesta T, como por ejemplo la inducción de tolerancia<sup>215</sup>. Numerosos trabajos muestran la influencia de estos factores: por ejemplo, las DCs CD8<sup>+</sup> dan preferentemente respuestas Th1 y las DCs CD8<sup>-</sup> respuestas Th2<sup>145,216</sup>; por otro lado, DCs totales de placas de Peyer inducen la secreción de IL-10 e IL-4 en células T, mientras que DCs de bazo inducen predominantemente la secreción de IFN $\gamma$ <sup>208</sup>. En cuanto a la influencia del estímulo madurativo, se ha demostrado que diversos ligandos de TLRs modulan diferencialmente a las DCs, generando células inductoras de respuestas Th1 o Th2 según el caso<sup>217</sup>. Por ejemplo, el LPS, la flagelina y ligandos del TLR9 (ADN con motivos CpG)<sup>218,219</sup> inducen la producción de IL-12 en DCs murinas, mientras que ligandos del TLR2 como Pam3Cys inducen preferencialmente DCs inductoras de respuestas Th2<sup>220</sup>.

Las DCs también pueden interactuar directamente con las células B. Las DCs activadas pueden inducir la proliferación de las células B, el switch de clase y la diferenciación a célula plasmática en respuesta a antígenos T independientes a través de la producción de factores de activación y supervivencia B como BAFF y APRIL<sup>164,221,222</sup>.

### *Rol de las DCs en la tolerancia periférica*

Las células T autorreactivas que escapan a la delección tímica pueden ser controladas en la periferia. Numerosos estudios han dejado claro que las DCs también participan en la generación y mantenimiento de la tolerancia periférica a través de diversos mecanismos<sup>223</sup>. Por un lado, la presentación de antígeno por DCs en estado estacionario o inmaduras resulta en un estado de tolerancia, ya sea por delección o anergia de las células T antígeno específicas<sup>224-226</sup>. Las DCs que no recibieron una señal de peligro presentan el antígeno a las células T en ausencia de señales coestimuladoras. En ausencia de coestimulación o en presencia de coinhibición, las células T pueden ser silenciadas funcionalmente y transformarse en células no respondedoras (anérgicas) a dicho antígeno en el futuro<sup>227,228</sup>. Algunos subtipos de DCs parecen ser tolerogénicos *in situ*. En humanos, se ha descrito una subpoblación de DCs derivadas de monocitos que expresa indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima que cataboliza triptofano y cuya actividad se asocia con la inhibición de la proliferación de células T y la inducción de muerte de células T<sup>229</sup>. La presencia de estas DCs en ganglios linfáticos drenantes de tumores contribuiría a la falta de respuesta inmunológica en pacientes de cáncer<sup>229,230</sup>.

Por otro lado, las DCs pueden generar tolerancia a través de la inducción de diversos tipos de células regulatorias capaces de suprimir una respuesta T. Las DCs han sido involucradas en la generación de células CD4<sup>+</sup> regulatorias inducidas por un antígeno en la periferia, como las células Tr1 y las Th3, que suprimen respuestas inmunes a través de citoquinas como IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>231-234</sup>. Por ejemplo, se ha mostrado que una población de DCs de ratón que expresa altos niveles de CD45RB<sup>high</sup> y presenta un fenotipo de DC inmadura induce la generación de células Tr1 mediante la secreción de IL-10, tanto *ex vivo* como *in vivo*<sup>232</sup>. Además, ciertos patógenos o productos derivados de los mismos pueden aumentar la producción de IL-10 en las DCs, las cuales a su vez inducen a las células Tr1<sup>235-237</sup>.

Otra población de células regulatorias influenciadas por las DCs son las células regulatorias naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de origen tímico (Tregs). Mientras que las DCs inmaduras de los tejidos linfoides son capaces de inducir tolerancia intrínseca durante el estado estacionario, DCs en diferentes estadios de diferenciación influyen en la biología de las Tregs<sup>238</sup>. Las DCs son capaces de inducir la proliferación de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *in*

*vitro*, mediante la presentación de un antígeno o un estímulo policlonal como un anticuerpo anti-CD3<sup>239-242</sup>. El estado de maduración de las DCs influye en el grado de expansión de las Tregs<sup>238</sup>. Las DCs maduras (generadas por estimulación con citoquinas o ligandos de TLRs) serían más efectivas para romper la anergia de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e inducir su proliferación<sup>240,242,243</sup>. La proliferación de Tregs antígeno-específicas inducida por DCs cargadas con el antígeno correspondiente también ha sido observada *in vivo*<sup>240,241</sup>. En un trabajo reciente se ha demostrado que las DCs expanden a la población de células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cuando presentan al antígeno en concentraciones inmunogénicas, mientras que en condiciones subinmunogénicas pueden inducir la generación de células Treg a partir de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup><sup>244</sup>.

Aunque es claro que las DCs son capaces de expandir a las Tregs, existen discrepancias acerca de la influencia de las DCs sobre la función regulatoria de dichas células. Algunos trabajos muestran que la proliferación de las Tregs inducida por DCs maduras no afecta o aumenta su capacidad inmunosupresora *in vitro* o *in vivo*<sup>240,243,244</sup>, mientras que otros sugieren lo contrario<sup>242,245</sup>. Esto parece depender de si la capacidad supresora de las Tregs se mide durante o después de su proliferación. Se ha sugerido que la proliferación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suprime en forma temporal su capacidad regulatoria<sup>242,246,247</sup>. En co-cultivos de DCs maduras, células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> y células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, estas últimas proliferan y su actividad supresora sobre la proliferación de las CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> se ve anulada<sup>242,245</sup>. En cambio, células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> previamente expandidas por DCs maduras muestran una potente capacidad supresora en cultivos posteriores o al ser inoculadas *in vivo*<sup>239-241</sup>. En general se considera que las DCs inmaduras o en estado estacionario mantienen la capacidad supresora de las Tregs mientras que las DCs maduras la anulan, lo cual permitiría que ocurra una respuesta efectora ante la entrada de un patógeno. Las DCs pueden influir en forma indirecta sobre las Tregs: Pasare y Medzhitov<sup>135</sup> demostraron que la IL-6 producida por las DCs activadas por ligandos de TLRs actúa sobre las células T efectoras, de manera que estas células adquieren resistencia a la supresión mediada por las Tregs.

Se han descrito mecanismos por los cuales las DCs pueden ser transformadas en células tolerogénicas. El cultivo de células de médula ósea de ratón en presencia de IL-10 induce la diferenciación de una población de DCs CD11c<sup>low</sup> que expresan CD45RB, presente en órganos linfáticos de ratones normales. Como se mencionó previamente, estas

células secretan altos niveles de IL-10 luego de ser activadas y generan tolerancia antígeno-específica a través de la inducción de células Tr1, que a su vez también producen IL-10<sup>232</sup>. La presencia de TGF- $\beta$ , vitamina D3, IL-10 o corticosteroides en cultivo también confiere propiedades tolerogénicas a las DCs<sup>183</sup>. Las DCs también pueden ser convertidas en células tolerogénicas por la células regulatorias naturales CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, las cuales aumentan la expresión de receptores inhibitorios (ILT3 e ILT4) en la superficie de las DCs<sup>248</sup>. Las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias pueden, a su vez, influir sobre la capacidad tolerogénica de las DCs, restringiendo su maduración<sup>249-251</sup>.

## **Células T Regulatorias**

Todo proceso fisiológico necesita ser controlado. Sin regulación, los procesos fisiológicos tienen un alto riesgo de volverse patológicos. Las respuestas inmunes no son una excepción; además de la autoinmunidad, el sistema inmune también puede inducir enfermedad cuando los mecanismos inmunológicos protectores empleados para limitar el crecimiento de patógenos o células tumorales causan un “daño colateral” en células normales vecinas al ataque inmunológico.

El sistema inmune utiliza numerosos mecanismos que permiten establecer y mantener una falta de respuesta a antígenos propios (auto-tolerancia inmunológica) y evitar el daño colateral durante una respuesta. Los controles incluyen la eliminación física o la inactivación funcional de los linfocitos autorreactivos (deleción clonal y anergia, respectivamente), como así también una compleja red de mecanismos regulatorios periféricos. La existencia de células T con función específicamente supresora ha sido muy discutida. A pesar de que su existencia se ha postulado hace muchos años<sup>252</sup>, durante un largo tiempo este concepto fue cuestionado, sugiriéndose que la regulación de la respuesta inmune se produce solamente por células no especializadas, a través mecanismos intrínsecos a la activación y diferenciación de células T inducidas por el antígeno<sup>253</sup>. Sin embargo, nuevos trabajos publicados en la década del '90 hicieron resurgir el concepto de células supresoras o regulatorias<sup>254-256</sup>. En poco tiempo se han identificado numerosos subtipos celulares dentro de la población de células T supresoras o regulatorias, encontrándose una gran variabilidad en varios aspectos, incluyendo el origen, los mecanismos y blancos de acción y la especificidad antigénica. Esta gran heterogeneidad genera, aún hoy en día, confusión en la literatura.

Los términos “células T supresoras” y “células T regulatorias” han sido utilizados alternativamente por diversos autores, aunque en la actualidad se habla preferentemente de “células T regulatorias”. La familia de células T regulatorias está compuesta por diversos subtipos celulares que existen en forma “natural” en un individuo sano o son inducidos durante una respuesta inmune. Entre los diferentes miembros de la familia se encuentran las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>255</sup>, Tr1<sup>254</sup>, Th3<sup>256</sup>, NKT<sup>257</sup> y CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup><sup>258</sup>.

### Células T regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias (Tregs) son quizás hoy en día las células regulatorias más estudiadas. Desde la década del '70 hubo evidencia de que existían células CD4<sup>+</sup> capaces de suprimir la autoinmunidad en animales con timentomía neonatal o enfermedades autoinmunes espontáneas<sup>259-262</sup>. En la búsqueda de un marcador de superficie que definiera más específicamente a estas células CD4<sup>+</sup> con propiedades inmunorregulatorias, Sakaguchi y colaboradores<sup>255</sup> describieron en 1995 una población de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que constituye aproximadamente un 5-10 % de todas las células T CD4<sup>+</sup> y un 5 % de los timocitos maduros CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Esta población existe en forma natural en el ratón, en ausencia de cualquier tipo de enfermedad o afección. Por este motivo son frecuentemente llamadas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias *naturales* (aunque, como se explicará más adelante, se ha sugerido que existen células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> adaptativas o inducidas). Se ha identificado una población con fenotipo similar en humanos<sup>263,264</sup>.

Estas células poseen potentes funciones regulatorias de la respuesta inmune tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>255,265</sup>. En cultivo, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> murinas suprimen la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> o CD8<sup>+</sup><sup>266</sup>. En un principio se determinó que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tienen un papel importante en la supresión de respuestas autoinmunes a través de la inhibición de las células T autorreactivas. Por ejemplo, la inyección de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) induce colitis, mientras que la co-inyección junto con células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> previene la inflamación intestinal. Posteriormente se encontró que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> también participan en el control negativo de otros procesos como alergias, respuestas inmunes antitumorales, respuestas inmunes a agentes infecciosos y rechazo a trasplantes<sup>265,267-270</sup>.

Existen numerosos reportes de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> con propiedades regulatorias en individuos sanos<sup>271</sup>. Esto implica que las células regulatorias CD4<sup>+</sup> naturales no están necesariamente confinadas a la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>267</sup>.

**A lo largo de este trabajo utilizaremos el término “Treg” para denominar a células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con fenotipo regulatorio Foxp3<sup>+</sup> (ver siguiente punto).**

*Fenotipo de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias naturales*

La molécula CD25 es la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 y su expresión resulta en la conformación de un receptor de alta afinidad<sup>272</sup>. CD25 ha sido un buen marcador para identificar a las células CD4<sup>+</sup> regulatorias de origen tímico. Sin embargo, la activación de células T vírgenes induce la expresión transiente de CD25<sup>273-276</sup>, lo cual sugiere que CD25 no sería el marcador óptimo. En un ratón normal, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son una población que constituye el 5-10% de las células CD4<sup>+</sup> y es fácilmente distinguible de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Por lo tanto el aislamiento de células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de ratón no presenta un problema a menos que el animal se encuentre atravesando un estado de activación inmunológica. En humanos, en cambio, aproximadamente el 30% de las células CD4<sup>+</sup> expresan CD25. La mayoría expresa CD25 con intensidad baja o media (CD25<sup>int</sup>) y sólo de un 1 a un 3% lo expresan con una intensidad alta (CD25<sup>high</sup>)<sup>277</sup>. Estudios *in vitro* demostraron que es la población CD25<sup>high</sup> la que posee propiedades inmunosupresoras<sup>278</sup>. Las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int</sup> son consideradas células de memoria generadas luego del encuentro con un antígeno.

Las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias naturales expresan constitutivamente una variedad de moléculas de superficie que, al igual que CD25, se asocian en general con células activadas o de memoria. Algunas de estas moléculas son CD45RB<sup>low</sup>, CD62L, CD103, CD152 o CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), y GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene)<sup>255,279-284</sup>. Aunque ninguno de estos marcadores se expresan exclusivamente en las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias naturales, su nivel de expresión y naturaleza constitutiva los transforma en útiles herramientas para el aislamiento y estudio de dichas células. El nivel de expresión de estas moléculas puede aumentar en las células Treg ante determinados estímulos<sup>281,282</sup>.

En la actualidad, el marcador más selectivo de las células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> es el factor de transcripción Foxp3. El gen de Foxp3 fue identificado por clonado posicional como el gen defectuoso en los ratones mutantes Scurfy<sup>285</sup>. Estos ratones presentan una mutación recesiva ligada al cromosoma X que es letal en los machos en el primer mes de vida. Los animales afectados presentan una enfermedad autoinmune linfoproliferativa, con hiperactivación de células T CD4<sup>+</sup> y producción espontánea de citoquinas<sup>286</sup>. Más tarde se demostró que mutaciones en el gen del Foxp3 humano

(FOXP3) son las causantes del síndrome de inmunodeficiencia ligado al cromosoma X, IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome), asociado con enfermedad autoinmune en múltiples órganos, enfermedad inflamatoria intestinal, alergia severa incluyendo dermatitis atópica y alergia a alimentos, e infección fatal<sup>287</sup>.

Estudios recientes revelaron el rol específico de Foxp3 en el desarrollo y función de las células regulatorias naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+288-291</sup>. Varios grupos determinaron simultáneamente que Foxp3 se expresa predominantemente en la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> periférica y la población de timocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, mientras que no se detecta expresión alguna otros timocitos/células T y células B.

Inicialmente se propuso que sólo las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expresaban Foxp3 mientras que en otras subpoblaciones T la expresión no era detectable. Sin embargo, un creciente número de trabajos demuestra que una fracción de la población CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>CD25<sup>-</sup> en el ratón normal naïve tiene una expresión intermedia de Foxp3 y presenta actividad regulatoria *in vitro* e *in vivo*<sup>289,292-295</sup>. Utilizando un alelo knock-in de Foxp3 consistente en una fusión (en marco de lectura) de Foxp3 con la proteína fluorescente verde (green fluorescent protein-GFP)<sup>295</sup>, se demostró que Foxp3 es expresado predominantemente por células T TCRαβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, y que existe una subpoblación CD4<sup>+</sup> con expresión baja o nula de CD25 que también expresa Foxp3. La proporción de células Foxp3<sup>+</sup> que son CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>-</sup> varía según el tejido u órgano analizado. **Se determinó además que la expresión de Foxp3 correlaciona con la actividad supresora de las células, independientemente de la expresión de CD25.**

Estudios genéticos y funcionales en el ratón han determinado que la expresión de Foxp3 constituye un buen marcador de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias. Además de la correlación entre la expresión de Foxp3 y la actividad regulatoria de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, se ha reportado recientemente la capacidad de Foxp3 para reprogramar la función de las CD4<sup>+288-290</sup>. La transducción retroviral o expresión transgénica de Foxp3 en células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> o CD8<sup>+</sup> las convierte fenotípica y funcionalmente en células similares a las Tregs naturales; por ejemplo, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> transducidas con Foxp3 pueden suprimir la proliferación de otras células T *in vitro* como así también el desarrollo de enfermedades autoinmunes *in vivo*<sup>288-290</sup>. La transducción de Foxp3 también

suprime la producción de IL-2 (las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se caracterizan por su incapacidad para producir IL-2) e induce la expresión de moléculas asociadas a las Tregs, como CD25, CTLA-4 y GITR<sup>289</sup>. Foxp3 parece ser un “gen maestro de control” para el desarrollo y/o función de las Tregs naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

Así como la expresión ectópica de Foxp3 induce función regulatoria, la falta de Foxp3 ha sido correlacionada con una falta de Tregs<sup>288,290,295</sup>, mostrando la importancia de Foxp3 en el desarrollo de estas células. Una delección condicional de Foxp3 en las células CD4<sup>+</sup> genera una enfermedad linfoproliferativa indistinguible de la observada en los ratones scurfy<sup>295</sup>. En experimentos con quimeras de médula ósea se demostró que sólo la médula ósea de un animal normal y no la de uno Foxp3<sup>-/-</sup> es capaz de regenerar el compartimiento CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, demostrando el rol crítico de Foxp3 en la determinación del linaje de las Tregs y que este rol es intrínseco de las células regulatorias<sup>288</sup>. Estos resultados indican que, **en el ratón, Foxp3 sería necesario y suficiente para el desarrollo y función de las Tregs.**

Los factores que afectan la expresión de Foxp3 no han sido determinados aún en forma concluyente. La mayor dificultad radica en que aquellos factores que afectan la expresión de Foxp3 también afectan a la supervivencia y expansión de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias. Entre estos factores se encuentran la IL-2, CD28 y TGF-β<sup>296</sup>. Fontenot y colaboradores han demostrado con su modelo de knock-in<sup>295</sup> que la expresión tímica de Foxp3 es absolutamente dependiente de la interacción TCR-MHC.

El rol de TGF-β en el proceso de diferenciación de células regulatorias en el ratón es controversial. Los experimentos realizados por varios autores fueron criticados por utilizar concentraciones suprafisiológicas de este factor y porque esta citoquina puede inhibir el efecto proliferativo de la IL-2 en células T convencionales, favoreciendo la expansión de células Foxp3<sup>+</sup> en el cultivo<sup>297</sup>. Los datos de experimentos *in vivo* con animales knock out para TGF-β o sus receptores arrojaron datos contradictorios. Algunos mostraron que el TGF-β es indispensable para la función y expansión de las Tregs y otros que es completamente prescindible.

### Inducción de *Foxp3* en células $CD4^+CD25^-$

La estimulación (policlonal o antígeno específica) de células  $CD4^+CD25^-$  humanas induce la expresión de FOXP3<sup>291,298,299</sup>. Estos resultados sugieren que, en humanos, FOXP3 se comporta como un gen inducido por activación en células  $CD4^+$ . Aún no se ha determinado en forma concluyente si la expresión inducida de FOXP3 conduce a la generación de células regulatorias. Algunos autores mostraron que las células  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  obtenidas a partir de  $CD4^+CD25^-FOXP3^-$  humanas por estimulación *in vitro* poseen capacidad supresora<sup>291,300</sup>. Sin embargo, Gavin y colaboradores han demostrado que la expresión de FOXP3 inducida por activación en células humanas es transiente y no induce un fenotipo regulatorio<sup>301</sup>.

La generación de células  $Foxp3^+$  con fenotipo regulatorio a partir de células  $Foxp3^-$  de ratón también está muy discutida. Mientras que algunos grupos demostraron que no se puede inducir la expresión de *Foxp3* en células  $CD4^+CD25^-$  murinas<sup>288,289</sup>, otros han demostrado que el cultivo *in vitro* de células  $CD4^+CD25^-$  con un cocktail de TGF- $\beta$ , IL-2 y estimulación del TCR y CD28 conduce a la inducción de *Foxp3* y la adquisición de actividad supresora<sup>302-304</sup>. Utilizando células T transgénicas para un TCR, se ha observado que la presentación del antígeno correspondiente en cantidades subinmunogénicas induce la conversión *in vivo* de células naïve  $Foxp3^-$  en células regulatorias  $Foxp3^{+244}$ .

### Activación de células regulatorias $CD4^+CD25^+$

Las células  $CD4^+CD25^+$  purificadas de un individuo normal no tienen la capacidad de suprimir respuestas T y sólo ejercen su función inhibitoria luego de la estimulación a través del TCR<sup>297</sup>. Tanto la estimulación policlonal como la antígeno específica activa a las  $CD4^+CD25^+$  e induce su función supresora *in vitro*, mientras que antígenos no reconocidos por el TCR no lo hacen<sup>305,306</sup>. Las células  $CD4^+CD25^+$  son muy sensibles a la estimulación por un antígeno y son supresoras a dosis antigénicas de 10 a 100 veces menores que las requeridas para la activación de las células T  $CD25^-$ <sup>305</sup>. Tienen un repertorio de TCRs muy diverso, por lo cual son capaces de responder a una gran variedad de antígenos, incluyendo antígenos microbianos, alimenticios y propios<sup>263,271,307,308</sup>.

Se había descrito que una característica distintiva de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> era su falta de respuesta proliferativa ante la activación del TCR o la estimulación con anticuerpos mitogénicos. Por este motivo, a estas células se les atribuyó un fenotipo anérgico, aunque luego se ha demostrado que existe proliferación de las mismas *in vivo* (homeostática<sup>309-312</sup> e inducida por antígenos<sup>292,313,314</sup>) y que se pueden expandir *in vitro*<sup>136,240,242,243</sup>. En general, se considera que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no producen IL-2 *in vitro* y dependen de IL-2 exógena<sup>315,316</sup>. Se ha demostrado que la IL-2 es indispensable para mantener la homeostasis periférica y la función supresora de las Tregs *in vivo*, aunque la actividad de esta citoquina no sería imprescindible durante su desarrollo en el timo<sup>309,317</sup>.

#### *Señales coestimuladoras e inhibitorias para la activación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>*

La activación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias requiere dos señales: una a través del TCR y otra señal coestimuladora presentada por las APCs. Se han estudiado diversas moléculas de membrana expresadas por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> involucradas en la detección de la señal coestimuladora, entre las que se encuentran CD28, CTLA-4 y GITR.

Las señales a través de CD28 serían críticas para la generación tímica de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias, así como también para su supervivencia y auto-renovación en la periferia<sup>318</sup>. Por otro lado, la estimulación de las Tregs a través de CD28 *in vitro* atenúa su capacidad supresora y estimula su proliferación. Las DCs maduras CD86<sup>high</sup> estimulan la proliferación de estas células, sugiriendo que las DCs activadas no sólo activan a células T naïve sino que a la vez disminuyen la supresión mediada por las Tregs, haciendo más efectiva la respuesta inmune<sup>318</sup>.

Las células regulatorias naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expresan la molécula CTLA-4, mientras que las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> efectoras la expresan sólo luego de su activación<sup>281,282,319</sup>. Además de mediar en forma directa la supresión ejercida por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (ver más adelante), se ha postulado que en estas células la molécula CTLA-4 transduce una señal coestimuladora que las activa para ejercer la supresión<sup>318</sup>.

La molécula GITR es expresada por las células Treg en forma constitutiva<sup>283,284</sup>. Otras células, como células T, células B, DCs y macrófagos muestran baja expresión de

GITR, pero ésta se ve aumentada luego de la activación<sup>283,284</sup>. El entrecruzamiento de los receptores GITR de las Tregs, junto con la estimulación a través de su TCR, inhibe la actividad supresora de estas células y dispara su proliferación en presencia de IL-2<sup>283,284</sup>. Se ha sugerido que la inhibición de la supresión podría ocurrir por la señalización a través de GITR expresado por las Tregs (es decir, por inhibición directa de la actividad regulatoria de estas células)<sup>283</sup> o por la señalización a través de GITR expresado por las células T activadas<sup>320</sup>. En este caso, la unión de GITR a su ligando induciría un aumento en el umbral de permisividad de las células activadas para ser blanco de la supresión. El ligando de GITR, GITR-L, es una molécula de membrana expresada por CPAs en reposo y su expresión disminuye por activación a través del receptor B, CD40 y diferentes TLRs<sup>297,320-322</sup>. La modulación de la expresión de GITR-L durante la maduración de las DCs contribuiría al control de la activación inmune y la tolerancia por parte de estas células<sup>297,318</sup>.

#### *Células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y receptores de tipo Toll*

Se ha reportado que las células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expresan varios miembros de la familia de los TLRs, incluyendo el TLR4<sup>136</sup>. La estimulación *in vitro* de estas células a través del TLR4 con una alta concentración de LPS induce su proliferación, prolonga su supervivencia y aumenta su capacidad supresora, incluso en ausencia de CPAs, indicando que el LPS actúa directamente sobre el TLR4 de las CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>136</sup>. Por otro lado, se ha descrito que la estimulación de DCs con ligandos de TLRs induce la producción de citoquinas (en particular IL-6) que generan en las células T naïve resistencia a la supresión mediada por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>135</sup>. Además, la falta de respuesta primaria de células T CD4<sup>+</sup> observada al inocular un ratón con DCs knock-out para MyD88 puede ser revertida con la depleción de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>323</sup>. Aunque los efectos del LPS sobre la respuesta inmune parecen oponerse (maduración de DCs e inducción de respuesta adaptativa versus activación de células regulatorias que suprimen la respuesta), las concentraciones de LPS que causan estos efectos son distintas, siendo mucho más alta la cantidad de LPS que se necesita para observar un efecto sobre las Tregs que la requerida para activar a las DCs<sup>135,136</sup>. Se ha hipotetizado que en una infección con bacterias Gram-negativas la estimulación con LPS dispararía al comienzo la maduración de las DCs y la consecuente

activación, expansión y diferenciación de células T antígeno específicas. En el caso de producirse grandes cantidades de LPS, éste activaría a las Tregs, evitándose así el desarrollo de una inmunopatología local o sistémica (como el shock séptico) que podría desencadenarse en presencia de una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias<sup>324</sup>. Se ha demostrado que la IL-10 producida por Tregs activadas puede suprimir la activación de macrófagos y la producción de citoquinas por los mismos<sup>269</sup>.

Otros TLRs también están involucrados en la biología de las Tregs. La estimulación de células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con un ligando del TLR2 en combinación con un estímulo del TCR aumenta la proliferación de estas células *in vivo* e *in vitro*, pero produce en las mismas una pérdida temporal del fenotipo supresor<sup>246,247</sup>. También se ha demostrado que ligandos sintéticos y naturales del TLR8 pueden revertir la función supresora de las Tregs<sup>325</sup>.

#### *Mecanismos de acción y células blanco*

Una vez que las Tregs han sido activadas, inhiben la producción de IL-2 en las células T y suprimen la proliferación y la producción de citoquinas en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en forma antígeno-independiente<sup>266,305,306,326</sup>. Aunque el efecto supresor de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ha sido estudiado principalmente sobre las células T, se ha demostrado que las Tregs también tienen efectos inhibitorios sobre DCs y otras CPAs, y también sobre células B y natural killer<sup>249-251,327-329</sup>.

Numerosos trabajos han estudiado los mecanismos de inmunosupresión utilizados por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> para regular la actividad de las células T<sup>330</sup>. Sin embargo, no se ha encontrado un único modo de acción regulatoria de estas células. En particular, existen importantes diferencias entre los mecanismos descritos *in vitro* e *in vivo*.

La mayoría de los estudios *in vitro* han concluido que la supresión mediada por células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tanto murinas como humanas se da a través de un mecanismo dependiente del contacto célula-célula. La supresión *in vitro* no es bloqueada por anticuerpos neutralizantes contra IL-4, IL-10 o TGF- $\beta$ . Por otro lado, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son incapaces de ejercer su función regulatoria cuando están separadas de las células blanco por una membrana permeable que impide el contacto entre células pero no

el pasaje de moléculas proteicas<sup>264,305,306</sup>. Notablemente, células Treg CD25<sup>+</sup> humanas fijadas con paraformaldehído mantienen su función supresora, siempre y cuando hayan sido activadas antes de la fijación<sup>331,332</sup>. La molécula de superficie CTLA-4 expresada por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cumple un rol importante en la inhibición por contacto célula-célula. Se han descrito dos mecanismos inhibitorios en los que participa CTLA-4. Uno involucra la unión de CTLA-4 a CD80 y CD86 expresados por las células T blanco, lo cual conduciría una señal inhibitoria hacia el interior de estas células<sup>333</sup>. El segundo mecanismo sería la interacción de CTLA-4 con CD80 y CD86 expresados por las DCs, resultando en la inducción de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO)<sup>334</sup>, que provoca una disminución en la disponibilidad de triptofano y una consecuente disminución de la activación de células T<sup>229</sup>. Se ha postulado que otro mecanismo de supresión *in vitro* sería por actividad citolítica (dependiente de granzima A y perforina) de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup><sup>335</sup>.

En cuanto a la participación de TGF- $\beta$  en ensayos de supresión *in vitro*, se han obtenido resultados contradictorios. Aunque algunos trabajos muestran que la presencia este factor no constituye un requerimiento para la actividad supresora de las células Treg<sup>330</sup>, otros sugieren que el TGF- $\beta$  de membrana expresado por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> es esencial para inhibición por contacto célula-célula<sup>336</sup>. Respecto al rol de TGF- $\beta$  *in vivo*, se ha demostrado que esta citoquina es necesaria para la supresión de células CD8<sup>+</sup> (involucradas en autoinmunidad o rechazo de tumores) por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. No está claro si en estos casos el TGF- $\beta$  es producido por las Tregs o por otras células como por ejemplo CPAs.

La supresión *in vitro* mediada por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias parece tener como blanco principal el control transcripcional del gen de la IL-2 en las células efectoras<sup>305,306</sup>. Sin embargo los estudios *in vitro* no descartan que la inhibición de la proliferación se deba al consumo de IL-2 por las Tregs<sup>337</sup>. Éstas presentan una mayor expresión del receptor de IL-2 (CD25), por lo cual competirían fuertemente por la citoquina, que es un factor de crecimiento esencial para las células T estimuladas *in vitro*.

Aunque se ha propuesto que las células Treg actuarían principalmente regulando los niveles de producción de IL-2 *in vitro*, no se ha demostrado que éste sea el único mecanismo *in vivo*. El hecho de que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pueden suprimir la respuesta

autoinmune en ratones deficientes en IL-2R descarta la posibilidad de que la competencia por IL-2 o la inhibición de la transcripción del gen de IL-2 representen mecanismos esenciales de supresión por las Tregs *in vivo*, indicando que existen otros blancos afectados por estas células<sup>338-341</sup>.

Uno de los mecanismos de supresión de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias *in vivo* es la producción de IL-10. Se ha demostrado que estas células producen IL-10 *in vivo*<sup>313,342</sup> y se ha establecido que la secreción de IL-10 es necesaria para generar supresión<sup>343,344</sup>. Otros autores han demostrado que en algunos casos la supresión *in vivo* es independiente de la IL-10<sup>315,344</sup>. Se ha sugerido que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias pueden ejercer su función a través de diversos mecanismos, dependiendo en cada caso del microambiente en el cual las células supresoras fueron activadas<sup>330</sup>.

Se ha postulado otro mecanismo de supresión *in vivo*, denominado “tolerancia infecciosa”, mediante el cual las Tregs generarían un medio en el cual algunas células efectoras se convertirían en células supresoras<sup>345</sup>. Otro modelo de tolerancia infecciosa sugiere que algunas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> pueden ser inducidas por células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a secretar TGF- $\beta$  y/o IL-10<sup>332</sup>.

La especificidad antigénica de las Tregs es aún un punto controversial. En base a la expresión de diversos segmentos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR, se sabe que tanto las Tregs murinas como las humanas poseen un variado repertorio de TCRs, al igual que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup><sup>305,346,347</sup>, lo cual permite predecir que reconocerían una amplia variedad de antígenos. En un principio se había postulado que las Tregs reconocían principalmente antígenos propios, aunque en la actualidad no está claro si los TCRs que reconocen autoantígenos están más representados dentro de la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias<sup>297</sup>. Un trabajo reciente ha demostrado que durante la infección crónica con *Leishmania major* se produce una acumulación de Tregs que reconocen específicamente al patógeno, demostrando que las Tregs también pueden reconocer antígenos no propios<sup>348</sup>. En relación a la importancia de la especificidad antigénica en la actividad de las células Treg, algunos estudios *in vitro* han demostrado que la actividad supresora de las Tregs depende de su activación previa a través del TCR pero que, una vez activadas, las Tregs son capaces de suprimir células T con otras especificidades<sup>238,305,326,349</sup>. Varios trabajos indican que las Tregs antígeno-específicas son más eficaces para ejercer su función

supresora<sup>241,297,350,351</sup>, aunque no se ha determinado si esto se debe a que estas Tregs son activadas preferencialmente o a que actúan selectivamente sobre las células T específicas para el mismo antígeno.

El análisis de la supresión generada *in vivo* por las Tregs debe considerar la capacidad de estas células para localizarse cerca de células T efectoras con una determinada especificidad antigénica y entrar en contacto ya sea directamente o a través de CPAs intermediarias. La migración y homing de las Tregs deben ser similares a los de las células T efectoras para permitir una interacción efectiva cuando están respondiendo a ligandos presentados por las CPAs en el mismo microambiente<sup>330</sup>.

En un ratón naïve, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias de periferia expresan CD62L (L-selectina) y aparentemente recirculan de sangre a linfa al igual que las células T vírgenes. Luego de la estimulación antigénica las Treg migran a los ganglios drenantes del antígeno donde se acumulan y proliferan estimuladas por la unión de ligandos agonistas a sus TCRs<sup>240,314,352,353</sup>. Esto permitiría una supresión efectiva de la respuesta inmune local.

Dos trabajos recientes han estudiado por técnicas complejas de microscopía los mecanismos ejercidos por las Tregs *in vivo*<sup>350,354</sup>, utilizando Tregs y células T no regulatorias, expresando ambas poblaciones un TCR transgénico. Los autores demostraron que las Tregs inhiben el arresto en la migración de las células naïve inducido normalmente por el antígeno. En ausencia de las Tregs, las células T disminuyen su motilidad en respuesta al antígeno, y los contactos entre las células T y DCs cargadas con antígeno son de mayor duración. Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> policlonales también son capaces de disminuir el arresto de células activadas inducido por el antígeno, aunque en menor grado que las Tregs que expresan un TCR específico. Además, sólo se pudieron registrar interacciones estables Treg-DC y T efectora-DC pero no interacciones Treg-T efectora o Treg-T efectora-DC.

Durante el curso de la estimulación antigénica, las Tregs, al igual que las células T efectoras, pueden cambiar su actividad migratoria y dirigirse a los tejidos inflamados, en donde ejercen su función supresora<sup>269,355,356</sup>. Por lo tanto, la capacidad regulatoria de las Tregs no está restringida a la inhibición de la proliferación inicial de las células efectoras en órganos linfáticos secundarios, sino que también involucra la supresión de células activadas en los tejidos inflamados. La capacidad de las Tregs de expandirse y migrar en

respuesta al antígeno constituiría entonces un mecanismo esencial para la regulación de varias etapas de la respuesta inmune.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## Ratones

Todos los animales fueron criados en los bioterios de la División Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Se utilizaron ratones de las cepas BALB/c, C3H/HeN, C3H/HeJ ( $Tlr4^{Lps-d}/Tlr4^{Lps-d}$ ), C.C3H  $Tlr4^{Lps-d}$  (BALB/c congénicos para la mutación en TLR4 de la cepa C3H/HeJ)<sup>357</sup>, C57BL/6 y TLR2 knock out ( $TLR2^{-/-}$ )<sup>358</sup> en background C57BL/6.

## Purificación viral

Las variantes MMTV(LA)<sup>33,34</sup> y MMTV(FM)<sup>359</sup> se aislaron de tumores mamarios de ratones C3H/HeN o BALB/c como se describió previamente<sup>360</sup>. Los tumores fueron homogeneizados en un buffer Tris 0,01M (pH=8), NaCl 0,1M, EDTA 2mM. Los restos celulares fueron separados por dos centrifugaciones sucesivas a 600 x g y 12400 x g, conservándose el sobrenadante. Luego se precipitó el virus por ultracentrifugación 1 hora a 21000 rpm (rotor SW50.1), a 4°C, y se resuspendió el pellet en buffer fosfato (PBS). Esta preparación se colocó sobre un gradiente de sacarosa 0-60% y se centrifugó 1 hora a 32000 rpm (rotor SW50.1), a 4°C. Se recuperó la banda correspondiente al virus y se realizó un lavado con PBS, 1 hora a 32000 rpm (rotor SW50.1), a 4°C. El virus obtenido de cada tumor (~800 mg) se resuspendió en un volumen final de 600 µl de PBS. Distintas diluciones de la preparación viral se probaron tanto *in vivo*, para determinar si inducían activación temprana de células B y activación dependiente del superantígeno<sup>67</sup>, como *in vitro*, sobre células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) de ratones C3H/HeN. La mayor dilución con la cual se obtuvo la máxima activación de las BMDCs luego de 18 horas (en general de 1:10 a 1:20) fue la utilizada en los experimentos subsiguientes.

Para los estudios de inactivación viral, el virus fue incubado bajo luz ultravioleta (UV) de onda corta durante 30 minutos en hielo, o con 2,2'-ditiopiridina (AT-2) (Sigma, Inc., St Louis, MO, USA) (5mM) durante 60 minutos a 37°C y luego fue utilizado inmediatamente en los ensayos con BMDCs.

### **Suspensiones celulares**

Para distintos experimentos (citometría de flujo, extracción de ácidos nucleicos, separación magnética de células) se extrajeron placas de Peyer, bazos o ganglios linfáticos y se prepararon las suspensiones celulares en medio RPMI 1640 (Sigma, Inc., St Louis, Mo.) por pasaje a través de una malla de acero inoxidable. Después de un lavado con medio de cultivo suplementado con 3% de suero bovino fetal (SBF), se determinó la viabilidad por el método de exclusión de Azul Tripán, requiriéndose un mínimo de 90% de células vivas.

Las suspensiones de células mononucleares de bazo se sembraron de 5 a 20 x 10<sup>6</sup> células/ml en volúmenes de 0,5 a 1,5 ml sobre 1 ml de Ficoll-Triyosom. Las mismas se centrifugaron a 2000 rpm (aceleración rápida sin freno) durante 30 minutos a 16°C. Las células mononucleares se lavaron dos veces con medio RPMI con 3% de SBF.

Cuando las células se utilizaron para llevar a cabo análisis citofluorométricos la suspensión final de las mismas se hizo en medio RPMI 1640 sin rojo fenol.

### **Tolerizaciones *in vivo***

Se tolerizaron ratones BALB/c adultos durante 3 días por vía subcutánea en la almohadilla plantar con LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) (2 µg/día) o PGN de *S. aureus* (5 µg/día) (Fluka, Buchs, Suiza). El grupo control fue tratado con solución fisiológica. Un día después de finalizada la tolerización los ratones se desafiaron, por la misma vía, con dosis estimuladoras de LPS (20 µg) o PGN (20 µg), para comprobar la eficacia del protocolo para generar tolerancia a LPS y PGN, respectivamente. Luego de 90 minutos se extrajeron los ganglios poplíteos drenantes y se midió la expresión de las citoquinas TNF-α e IL-6 por RT-PCR.

### **Desafío con MMTV *in vivo***

Un día después de la tolerización los ratones fueron desafiados en la almohadilla plantar (subcutáneo) con leche de hembras BALB/c libres de MMTV o infectadas con el virus MMTV(LA) (alternativamente, se utilizó virus purificado de tumores y PBS como

control). A los tiempos indicados se extrajo el ganglio poplíteo drenante de la inoculación para los estudios por citometría de flujo, PCR o RT-PCR

### Experimentos de tráfico en animales tolerizados

Un día después de la tolerización los ratones fueron desafiados con MMTV en la almohadilla plantar e inoculados simultáneamente por vía intravenosa con  $5 \times 10^7$  células mononucleares de bazo obtenidas por gradiente de Ficoll-Triyosom y marcadas con el colorante CFSE (ver punto siguiente). A las 36 horas se extrajo el ganglio drenante de la inoculación viral y se obtuvo una suspensión celular que fue marcada con los anticuerpos anti-B220-PE y anti-CD44-Cy. Luego se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células vírgenes en las células B220<sup>+</sup> que migraron al ganglio drenante como el porcentaje de células B220<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> que expresaban CD44<sup>low</sup> (% CD44<sup>low</sup>/B220<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>)

### Marcación con CFSE

El siguiente protocolo se utilizó para marcar células para los experimentos de tráfico *in vivo* y para los experimentos de cultivo mixto linfocitario. Las células ( $1 \times 10^7$  células/ml) se resuspendieron en PBS con 0,3% de seroalbúmina bovina (BSA) (Gibco, NY, USA) y se incubaron con 5, 6 carboxifluorescein diacetato succinimidil éster (CFSE) (Molecular probes, Eugene, OR, USA), 5-10  $\mu$ M, durante 10 minutos a 37°C. Luego se realizaron tres lavados extensivos con PBS con 10% de SBF, realizando incubaciones de 5 minutos a 37°C entre lavados para favorecer la eliminación del CFSE residual. Por citometría de flujo se determinó que la marca de las células fuera homogénea y con una intensidad media de fluorescencia de  $10^3$ .

### Citometría de flujo

En todos los casos se realizaron marcaciones directas, con anticuerpos conjugados a los fluorocromos fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Cy-chrome 5 (Cy) o PercP. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de BD-PharMingen (San Diego, CA, USA): anti-CD4 (clon H129.19); anti-CD69 (clon H1.2F3); anti-V $\beta$ 6 (clon RR4-7); anti-

V $\beta$ 10 (clon B21.5); anti-CD44 (clon IM7), anti- B220 (clon RA3-6B2), anti-CD11c (clon HL3); anti-CD40 (clon HM40-3); anti-CD80 (clon 16-10A1); anti CD71 (clon C2); CD25 (clon PC61); anti-CD45RB (clon 16A); anti-CTLA-4 (clon UC10-4F10-11); anti-IL-10 PE (clon JES5-16E3) y el siguiente anticuerpo de e-Bioscience (San Diego, CA, USA): anti-Foxp3 (clon FJK-16s). Para los controles de isotipo se utilizaron los siguientes anticuerpos (BD-PharMingen): IgG<sub>1</sub> de rata (clon R3-34), IgG<sub>2</sub> de rata (clon R35-95), IgG1 de hamster (clon G235-2356), IgG<sub>2</sub> de hamster (clon B81-3).

*Marcación de superficie:* Se utilizaron protocolos de marcación similares tanto para células derivadas de cultivos *in vitro* como para células frescas obtenidas de órganos de ratón. Para realizar la marcación se obtuvieron suspensiones celulares de entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células/ml. Para la incubación con anticuerpos y para los lavados se utilizó un buffer de marcación compuesto por RPMI sin rojo fenol, azida sódica (0,1%) y SBF (3 %). En el caso de las BMDCs, las células se incubaron en primer lugar con un anticuerpo bloqueante de receptores Fc (anti-mouse CD16/32; BD-Pharming en, San Diego, CA, USA) para impedir la unión no específica de anticuerpos. Las células se incubaron con 1  $\mu$ g de anticuerpo/ $10^6$  células durante 30-45 minutos, a 4°C y en oscuridad. Luego se realizaron dos lavados con el buffer de marcación y finalmente las células se fijaron en PBS-paraformaldehído 0,5%, conservándose a 4°C y oscuridad hasta el momento de la adquisición.

*Marcación intracelular:* Para la medición de CTLA-4, IL-10 y Foxp3 se realizaron marcaciones intracelulares. En el caso de CTLA-4 e IL-10 se utilizó el kit de marcación intracelular Cytofix/Cytoperm (BD-Pharming en, San Diego, CA, USA) y en el caso de Foxp3 el kit marcación intracelular Mouse Foxp3 Staining set (e-Bioscience, San Diego, CA, USA). Primero se marcaron a las células con uno o dos anticuerpos para medir moléculas de superficie utilizando el protocolo ya mencionado, eliminando el último paso de fijación. A partir de aquí se siguieron las instrucciones del fabricante, tratando a las células con la solución de fijación y luego con la solución de permeabilización del kit correspondiente. Se incubaron las células resuspendidas en la solución de permeabilización con un anticuerpo anti-CD16/32 y seguidamente con el anticuerpo anti CTLA-4, anti-IL-10 o anti-Foxp3. Luego se realizaron dos lavados con la solución de permeabilización y se adquirieron las células en el citómetro de flujo.

En todos los casos, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA). Las células muertas fueron excluidas basándose en los parámetros de tamaño y complejidad. Los resultados se analizaron utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), restando los valores de los controles de isotipo.

### **Proliferación con yoduro de propidio (IP)**

Se purificaron células CD4<sup>+</sup> de las PPs mediante separación magnética (ver más adelante). Las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD25 conjugado a FITC utilizando el protocolo de marcación de superficie ya mencionado, exceptuando el último paso de fijación. Las células fueron lavadas con PBS (sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>) frío y fijadas en 1 ml de etanol 70%, luego se guardaron a 4°C en oscuridad un mínimo de 18 horas. Las células fueron lavadas y resuspendidas en 500 µl de solución de tinción (1mg/ml RNasa A (Sigma), 20 µg/ml yoduro de propidio (IP) (Sigma) en PBS conteniendo 1g/l glucosa) e incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Se adquirieron 30.000 eventos utilizando un citómetro de flujo FACScan. El IP se intercala entre las bases del ADN y permite discriminar entre las células que están en proceso de síntesis o han duplicado su contenido de ADN, de aquellas que no se están dividiendo o han perdido parte de su contenido de ADN al entrar en el proceso de apoptosis.

### **Extracción de ADN**

Las muestras de tejido o suspensiones celulares se guardaron a -70° C hasta el momento de la extracción del ADN. Ésta se realizó utilizando el kit de purificación de ADN Wizard Genomic Purification (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN fue determinada por medio de la medición de absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro. Su calidad se estimó a través de la relación de absorbancias 260/280 nm utilizando solamente aquellas muestras cuya relación se encontró entre 1,7 y 1,9.

## **Extracción de ARN**

Se extrajo ARN total de las muestras de tejido o suspensiones celulares utilizando el kit Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), según indica su protocolo. Luego de disolverlo en agua libre de RNAsas, la concentración del ARN se determinó por la medición de absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro. Su calidad se estimó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para visualizar los ARN ribosomales y a través de la relación de absorbancias 260/280 nm, utilizando aquellas muestras cuya relación se encontró entre 1,7 y 1,9.

## **PCR**

Para los ensayos de PCR para medir niveles de infección con el MMTV(LA) se partió de 0,5-1 µg de ADN y se agregaron los siguientes reactivos (Invitrogen, CA, USA) en las concentraciones finales indicadas entre paréntesis: dNTPs (0,2 mM), primers (0,5 µM cada uno), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), Taq polimerasa (2 U/50 µl), buffer de reacción para Taq polimerasa (1X), y agua libre de nucleasas para llevar a un volumen de 50 µl. Las muestras se cubrieron con aceite mineral (Promega, Madison, WI, USA) y se realizó la amplificación con un ciclador MJ Research PTC 100. Se utilizaron primers específicos para detectar integración viral de la variante MMTV(LA) y el gen de β-actina (Tabla I). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Para encontrar el número de ciclos de amplificación indicado para cada producto a estudiar, se realizó una curva con cada par de primers a utilizar. Se graficó en base semilogarítmica número de ciclos versus producto amplificado. Se eligió un rango de ciclos de manera tal que el producto quede comprendido dentro de la fase lineal de la curva de amplificación.

## **RT-PCR**

Los ensayos de RT-PCR se realizaron en algunos casos con un sistema de un solo paso (one step RT-PCR), el Access RT-PCR System kit (Promega) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Para 0,5 µg de ARN total, se agregaron los siguientes reactivos del kit a cada tubo de reacción, en las concentraciones finales indicadas entre paréntesis: buffer de reacción AMV/Tfl (1X), dNTPs (0,2 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), primers (1 µM cada uno), transcriptasa reversa AMV (5 U/50 µl), ADN polimerasa Tfl (5 U/50µl), agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 50 µl y 1 gota de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras en el termociclador. A continuación se realizó la retrotranscripción y la amplificación por PCR sin retirar los tubos del termociclador. Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas fueron: 45°C, 45 minutos (retrotranscripción); 94°C, 2 minutos (inactivación AMV RT y desnaturalización de ARN/cDNA/primer); y luego las condiciones de amplificación correspondientes a cada par de primers, indicadas en la Tabla I.

En otros casos se realizó la RT-PCR en pasos sucesivos de retrotranscripción y posterior PCR. Para la retrotranscripción se partió de 1-2 µg de ARN a los cuales se agregaron los siguientes reactivos en las concentraciones finales indicadas entre paréntesis: oligo(dT)<sub>20</sub> (25 µg/ml), dNTPs (1 mM), buffer de síntesis para AMV (1X), DTT (5 µM), acetato de magnesio (4 mM), RNAsin (Promega) (40 U/20 µl), retrotranscriptasa de AMV (Invitrogen) (15 U/20 µl), agua libre de nucleasas para completar el volumen a 20 µl. La retrotranscripción se realizó a 45°C, 50 minutos. El cDNA (1-2 µl, tomando cantidades iguales de las muestras a comparar) se utilizó para realizar una reacción de PCR como se describió previamente. En la tabla I se detallan las secuencias de los pares de primers utilizados en los ensayos de RT-PCR y las condiciones de ciclado.

**Tabla I:** Secuencias de primers utilizados para PCR y condiciones de ciclado para cada par de primers. Cada ciclado fue precedido por una fase de desnaturalización inicial (94°C, 4 minutos) y seguido de una elongación final (72°C, 7 minutos). El número de ciclos se ajustó para cada tipo de muestra como se explicó en el texto.

	Primers	Desnaturali- zación	Aparea- miento	Elongación
$\beta$ -actina	5' TCATGAAGTGTGACGTTGACATC 3' 5'CCTAGAAGCATTGCGGTGCAACGATG3'	94°C 45 seg	57°C 40 seg	72°C 1 min
TNF- $\alpha$	5' TTCATCAGTTCTATGGCCC 3' 5' GGGAGTAGACAAGGTACAAC 3'	94°C 45 seg	56°C 1 min	72°C 1 min
IL-6	5' TTCCTCTCTGCAAGAGACT 3' 5' TGTATCTCTCTGAAGGACT 3'	94°C 45 seg	56°C 1 min	72°C 1 min
IL-10	5' AGAGCAAGGCAGTGGAGCAG 3' 5' GGGATGACAGTAGGGGAACC 3'	94°C 45 seg	60°C 45 seg	72°C 1 min
CCL4 (MIP-1 $\beta$ )	5' CCACAATAGCAGAGAAACAGCAAT 3' 5'AACCCCGAGCAACACCATGAAG 3'	94°C 45 seg	60°C 1 min	72°C 1 min
CXCL13 (BLC)	5' CCAGGCAGAATGAGGCTCAG 3' 5' CTCAGCTCCTGCAGGATTGG 3'	94°C 45 seg	60°C 1 min	72°C 1 min
CXCL10 (IP-10)	5' CGCACCTCCACATAGCTTACAG 3' 5' CCTATCCTGCCACGTGTTGAG 3'	94°C 45 seg	57°C 1 min	72°C 1 min
MMTV(LA)	5' AATTCGGAGAACTCGACCTTCC 3' 5' CCCCCATGAGTATATTTGA 3'	94°C 45 seg	56°C 40 seg	72°C 1 min
Foxp3	5' CATTGCCAGCAGTGGGTAG 3' 5' CAGCTGCCTACAGTGCCCTAG 3'	94°C 45 seg	60°C 45 seg	72°C 1 min

### **Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)**

Las células dendríticas derivadas de médula ósea se generaron según el método descrito por Lutz y colaboradores<sup>361</sup>. Los fémures y tibias de ratones de 2 meses fueron removidos y se eliminaron los restos de músculos y tendones. Se colocaron los huesos en etanol 70% por 2 minutos y luego se lavaron con PBS. Para obtener la médula ósea se cortaron ambos extremos de los huesos y se eluyó el contenido de los mismos con RPMI. Se dispersaron los agregados con pipeta y las células se centrifugaron 8 minutos a 360 x g. Las células se colocaron en placas de Petri para bacterias a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en 10 ml de RPMI con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, 2-mercaptoetanol 50 µM y SBF 10% (medio R10) suplementado con 30% de sobrenadante conteniendo factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos de ratón (mGM-CSF) (obtenido de la línea J558 transfectada en forma estable con el cDNA de mGM-CSF). Al día 3 de cultivo se agregaron otros 10 ml de R10 suplementado con mGM-CSF. A los días 6 y 8 de cultivo se tomó la mitad del medio de la placa y se centrifugó; luego el pellet se resuspendió en 10 ml de R10 con mGM-CSF y se colocaron las células nuevamente en la misma placa. Al día 10 se tomaron las células no adherentes, se centrifugaron 8 minutos a 300xg y se resuspendieron en medio R10. Por citometría de flujo se determinó que el 90% de estas células eran CD11c<sup>+</sup>.

### **Estimulación de BMDCs**

Las BMDCs se incubaron en medio R10 con LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (100ng/ml, Sigma) o con preparaciones virales diluidas. Se realizaron incubaciones de 3 horas para los ensayos de RT-PCR y RPA, e incubaciones de 18 hs para ensayos de ELISA y citometría de flujo. Para los experimentos de bloqueo, la preparación viral diluida fue mezclada con una dilución 1:10 de suero de cabra anti-MMTV o anti-gp52 (Quality Biotech, Camden, NJ, USA). Para las pruebas de contaminación con endotoxina, las preparaciones de LPS o MMTV fueron hervidas 1 hora a 100°C antes de su agregado a las células. Para algunos experimentos, el MMTV fue pretratado con AT-2 o con luz UV como se describió previamente.

### **Tolerización de BMDCs**

Se agregó LPS (10 ng/ml) a un cultivo de BMDCs de 9 días. Luego de 20 horas las células fueron incubadas con LPS o MMTV como se describió previamente.

### **ELISA**

La producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 fue detectada en el sobrenadante de BMDCs luego de 18 hs de estimulación utilizando los kits comerciales para ELISA Quantikine de R&D (Minneapolis, Minn., USA) siguiendo las instrucciones de los mismos. Los datos se presentan como media  $\pm$  desvío estándar de triplicados.

### **Ensayo de protección de RNAsa (RPA)**

Se utilizó el kit Riboquant de BD-Biosciences siguiendo las instrucciones del fabricante para analizar de 2,5 a 6  $\mu$ g de ARN total obtenido a partir de BMDCs incubadas 3 horas con virus o LPS. Las multisondas utilizadas como templado fueron: mCK-3b para analizar expresión de citoquinas y mCK-5c para la expresión de quemoquinas. Las bandas correspondientes a los diversos ARNm fueron cuantificadas utilizando un Phosphorimager (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA, USA) y el programa ImageQuant. Para la cuantificación, los niveles de los ARNm fueron normalizados con respecto a la expresión de los genes L32 y GAPDH de cada muestra. Los datos fueron presentados como incremento en la expresión de ARNm en las células estimuladas versus células sin estimular (basal).

### **Separación magnética de células**

La purificación de células (CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) se realizó utilizando el sistema de separación con partículas magnéticas (Miltenyi Biotec, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se obtuvo una suspensión celular del órgano en el buffer de purificación (PBS, SBF 3%, EDTA 2 mM). La purificación de células CD4<sup>+</sup> se realizó por selección negativa: la suspensión celular fue incubada con una mezcla

de anticuerpos biotinilados anti-CD8a, CD11b, CD45R, CD49b y Ter-119 y luego con partículas magnéticas conjugadas a un anticuerpo anti-biotina. Luego de un lavado la suspensión se aplicó a una columna de separación LD (Miltenyi Biotec) colocada en un magneto. Las células CD4<sup>+</sup> se recuperaron inmediatamente ya que no quedaron retenidas en la columna. La separación de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> se realizó por selección positiva de las células CD25<sup>+</sup>. Para esto la suspensión de células CD4<sup>+</sup> se incubó con un anticuerpo anti-CD25 conjugado a PE y luego con partículas magnéticas conjugadas a un anticuerpo anti-PE. Luego de un lavado la suspensión se aplicó a una columna de separación MS (Miltenyi Biotec) colocada en un magneto. Las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> se recuperaron inmediatamente ya que no quedaron retenidas en la columna y las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se recuperaron luego de separar a la columna del magneto y realizar un lavado con el buffer de purificación. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad. Se testeó por citometría de flujo el grado de purificación, el cual resultó mayor al 93 %.

### **Cultivo mixto linfocitario**

Las células presentadoras se obtuvieron purificando células mononucleares de bazo de ratones AKR mediante un gradiente de Ficoll-Triyosom. Luego, estas células fueron tratadas con mitomicina C para impedir su proliferación durante el cultivo. El tratamiento consistió en incubar  $25 \times 10^6$  células/ml en RPMI con SBF con mitomicina C (Sigma, Inc., St Louis, MO, USA) (25 ug/ml) durante 20 minutos a 37°C. Luego se realizaron tres lavados con RPMI-SBF 10%, realizando incubaciones de 5 minutos a 37°C entre lavados para favorecer la eliminación de mitomicina C.

Las células respondedoras se obtuvieron realizando una suspensión celular a partir de ganglios linfáticos de ratones BALB/c. Para algunos experimentos, a partir de esta suspensión se purificaron células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> por separación magnética. Las células totales de ganglio o las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> fueron marcadas con CFSE para seguir su proliferación *in vitro*.

El cultivo mixto linfocitario se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en “U”. Se utilizó el siguiente medio de cultivo: RPMI con L-glutamina 2 mM, penicilina 100

U/ml, estreptomina 100 µg/ml, 2-mercaptoetanol 50 µM y SBF 10%. En cada pocillo se colocaron  $2 \times 10^5$  células presentadoras y  $2 \times 10^5$  células respondedoras y un número variable de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> purificadas de las PPs, en un volumen final de 200µl. Las células se incubaron a 37°C durante 3 días y luego se recuperaron para su análisis por citometría de flujo.

### **PCR radiactiva**

Se realizó una reacción de PCR como se describió previamente, a partir 500 ng de ADN, agregando a la mezcla de reacción ya mencionada deoxiadenosina 5' trifosfato, ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) en una concentración de 0.5 µCi/rección. Los productos de PCR se corrieron en un gel de poliacrilamida 3,5 % con buffer Tris-Borato-EDTA (TBE). Luego de secado (90 minutos, 80°C), el gel se expuso a una placa autorradiográfica AGFA CP-BU.

### **Presentación de los resultados**

Las figuras, tablas y fotos contienen, salvo que se indique, resultados representativos obtenidos de experimentos repetidos de tres a cinco veces en forma independiente. Los histogramas y dot plots de los análisis citofluorométricos se representan como el logaritmo de la fluorescencia de los marcadores respectivos.

### **Estadística**

Para analizar la significación de los resultados se utilizó el t-test de Student de dos colas. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como indicativos de una diferencia significativa.

## RESULTADOS

---

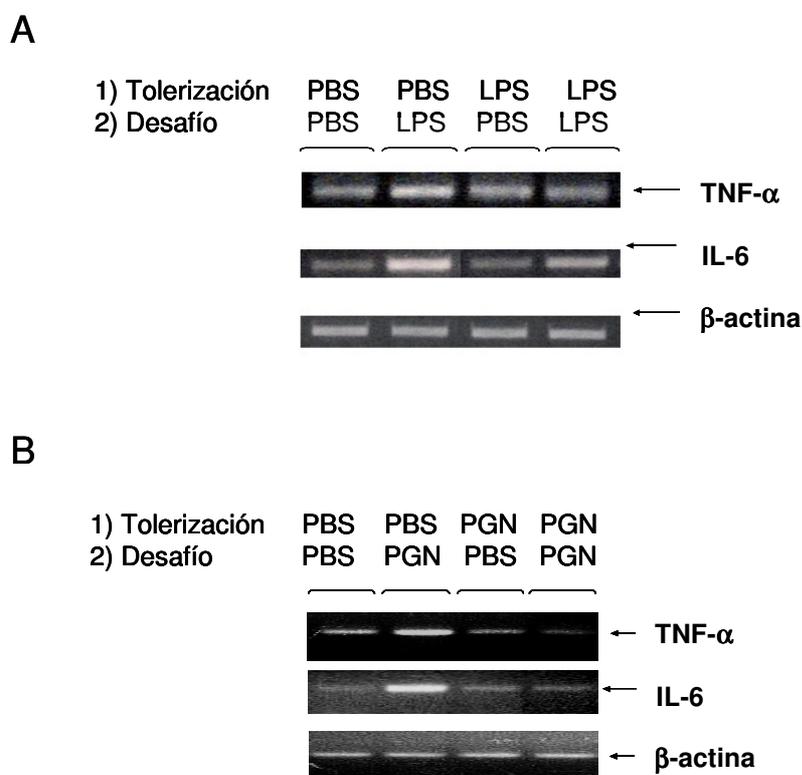
## A. INFECCIÓN CON MMTV EN RATONES ADULTOS TOLERIZADOS CON LIGANDOS DE TLR4 Y TLR2

El MMTV es un retrovirus que utiliza al sistema inmune del huésped para establecer la infección. Se ha determinado que la interacción entre el Sag viral y el TCR de las células T reactivas al mismo cumple un papel importante en la relación establecida entre el virus y el sistema inmune. Sin embargo, el MMTV también podría influenciar la respuesta inmune mediante otras interacciones. Se ha demostrado recientemente mediante ensayos *in vitro* que la proteína gp52 de la envoltura viral es capaz de unirse al TLR4, aunque aún no son claras las consecuencias de esta interacción en el desarrollo de la infección.

Para estudiar el rol de los TLRs en las primeras etapas de la infección por MMTV utilizamos protocolos de tolerización inoculando ratones BALB/c adultos en forma repetida con bajas concentraciones de ligandos de TLRs. La exposición previa a LPS inhibe la capacidad de diversos tipos celulares de responder a un nuevo desafío con este compuesto. Este fenómeno se conoce con el nombre de tolerancia, hiporrespuesta o refractariedad al LPS. Estudios recientes indican que el desarrollo del fenómeno de tolerancia al LPS y otros compuestos bacterianos está relacionado con la modulación en los niveles de expresión y/o en la vía de señalización de los TLRs<sup>362</sup>. Además, numerosos trabajos han reportado el fenómeno de tolerancia cruzada, que consiste en la generación de un estado de refractariedad a un ligando de un determinado TLR mediante la exposición previa a un ligando de otro TLR<sup>363</sup>. La tolerancia cruzada ocurre *in vitro* e *in vivo*<sup>363</sup> y se produciría por la inactivación de vías de señalización intracelular compartidas por ambos TLRs<sup>80,364,365</sup>.

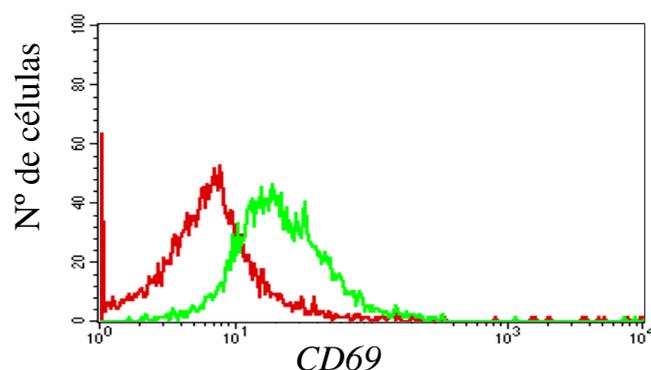
Realizamos la tolerización inoculando ratones BALB/c adultos en forma repetida con bajas concentraciones de LPS (ligando de TLR4) o PGN (peptidoglicano, ligando de TLR2) en la almohadilla plantar (inoculación subcutánea). La eficacia de este protocolo para generar un estado de tolerancia fue determinada desafiando a los ratones tolerizados con LPS o PGN con dosis altas de LPS o PGN, respectivamente, en la almohadilla plantar. La inoculación de una dosis alta de estos compuestos en ratones control no tolerizados indujo un aumento en la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el ganglio poplíteo drenante

(Figura 1). En cambio, los aumentos en la expresión de estas citoquinas fueron totalmente inhibidos por la tolerización previa con LPS o PGN (Figura 1).

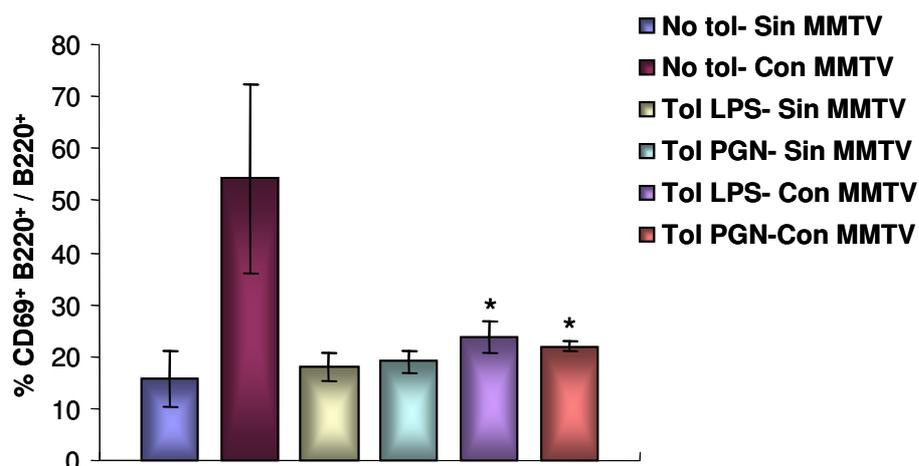


**FIGURA 1.** Generación de tolerancia al LPS y al PGN. Ratones BALB/c adultos fueron tolerizados con dosis bajas y repetitivas de LPS (A) o PGN (B) y luego desafiados con 20 mg de LPS o PGN respectivamente. Expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en ratones no tolerizados y no desafiados (calle 1), no tolerizados y desafiados (calle 2), tolerizados y no desafiados (calle 3) y tolerizados y desafiados (calle 4). El experimento se realizó 3 veces con resultados similares.

Una vez establecido el modelo de tolerización, estudiamos el rol de TLR2 y TLR4 en la activación temprana de células B causada por el MMTV. Para esto, ratones no tolerizados o tolerizados con LPS o PGN fueron inoculados con la variante viral MMTV(LA) en la almohadilla plantar. Luego se estudió la activación de células B en el ganglio poplíteo drenante por citofluorometría (expresión del marcador de activación temprana CD69). Los ratones control (no tolerizados) mostraron un aumento en el porcentaje de células B que expresan CD69 (Figura 2). Sin embargo, al inocular el virus en animales previamente tolerizados con LPS o PGN, la activación B fue significativamente menor (Figura 3) que la observada en los animales no tolerizados.



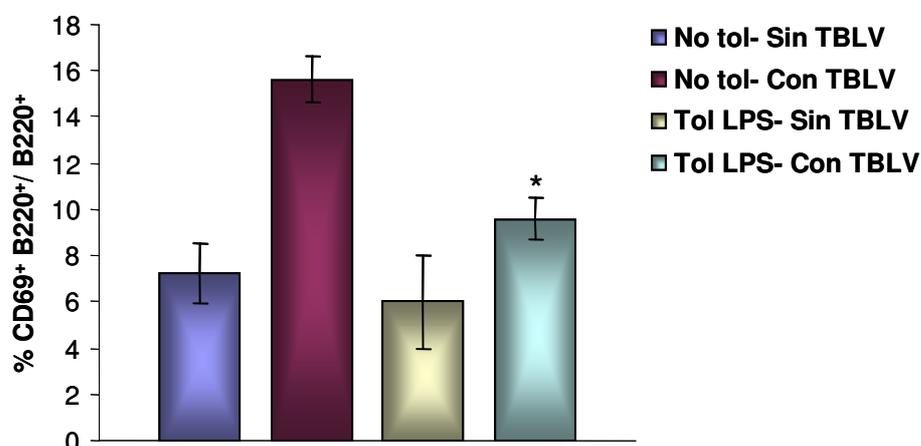
**FIGURA 2.** Expresión del marcador de activación temprana *CD69* en linfocitos *B* de ratones inoculados con *MMTV(LA)*. Histograma representativo de la expresión de *CD69* en células *B220+* a las 24 hs de la inoculación del virus. (—): Ratón inoculado con *MMTV*; (—): ratón control sin *MMTV*.



**FIGURA 3.** Expresión de *CD69* en linfocitos *B* de ratones tolerizados con *LPS* o *PGN* y desafiados con *MMTV(LA)*. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar ( $n=4$ ) del porcentaje de células *B220+* del ganglio drenante que expresan *CD69* a las 24 hs de la inoculación del virus. \*  $p < 0,05$  con respecto al grupo “no tolerizado-Con *MMTV*”.

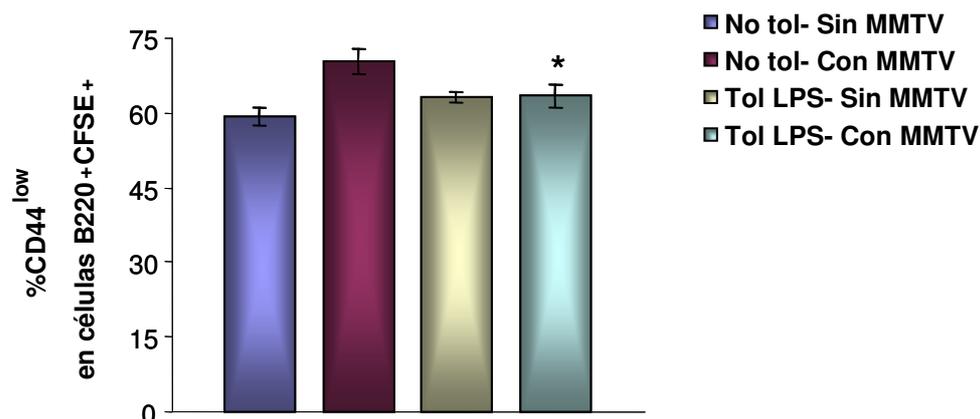
Con el objeto de descartar la participación de la respuesta al superantígeno viral en la activación temprana de las células *B*, se realizó el mismo experimento, pero utilizando una variante de *MMTV* denominada *TBLV*, que posee una delección en el gen *sag* que impide su expresión. Como se observa en la **Figura 4**, el *TBLV* fue capaz de activar a las

células B y este efecto se vio inhibido en animales tolerizados con LPS, al igual que lo ocurrido con el MMTV(LA).



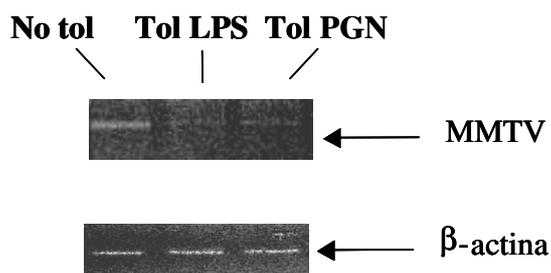
**FIGURA 4.** Expresión de CD69 en células B de ratones tolerizados con LPS y desafiados con TBLV. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar (n=4) del porcentaje de células B220<sup>+</sup> del ganglio drenante que expresan CD69 a las 24 hs de la inoculación del virus. \* p<0,05 con respecto al grupo No tolerizado- Con MMTV

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que en ratones recién nacidos amamantados por nodrizas infectadas con MMTV existe un aumento en el tráfico de células B vírgenes a las placas de Peyer. Este fenómeno ocurre antes de la estimulación superantigénica. Este aumento también se observa en el ganglio poplíteo drenante al inocular el virus en la almohadilla plantar. En base a estos antecedentes decidimos investigar el efecto de la tolerización con LPS en el tráfico de células B vírgenes inducido por MMTV. Ratones controles o tolerizados con LPS fueron inoculados con MMTV(LA) en la almohadilla plantar y simultáneamente con células de bazo (por inoculación intravenosa) marcadas con carboxifluorescein diacetato succinimidil éster (CFSE). Luego de 36 horas se extrajo el ganglio drenante de la inoculación viral y se determinó el porcentaje de células B220<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> (células B220<sup>+</sup> que migraron al ganglio) que expresaban bajos niveles de CD44 (marcador de células vírgenes). En la **Figura 5** se observa que la tolerización con LPS causó una disminución en el tráfico de células B vírgenes causado por el MMTV.



**FIGURA 5.** Efecto de la tolerización con LPS en el tráfico de células B vírgenes inducido por MMTV. Ratones controles o tolerizados con LPS fueron inoculados con MMTV(LA) (sc) y simultáneamente con células de bazo (iv) marcadas con CFSE. A las 36 hs se extrajo el ganglio drenante y se midió la expresión de CD44<sup>low</sup> (marcador de células vírgenes) en las células B que migraron al ganglio (B220+ CFSE+). Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar (n=4) del porcentaje de células B220+ CFSE+ que expresan CD44<sup>low</sup>. \*: p< 0,05 con respecto al grupo No tolerizado-Con MMTV. El experimento se realizó 3 veces. Resultados similares fueron obtenidos realizando la tolerización con PGN.

Estudiamos luego los niveles de integración viral, por PCR, en el ganglio drenante de la inoculación con MMTV(LA). La integración viral resultó menor en los animales tolerizados (**Figura 6**).



**FIGURA 6.** Niveles de integración viral en ratones tolerizados. A las 24 hs de la inoculación se extrajo el ADN del ganglio drenante y se realizó una PCR con primers específicos para MMTV(LA) para detectar integración viral. Se muestra un experimento representativo. El experimento se realizó 3 veces en forma independiente.

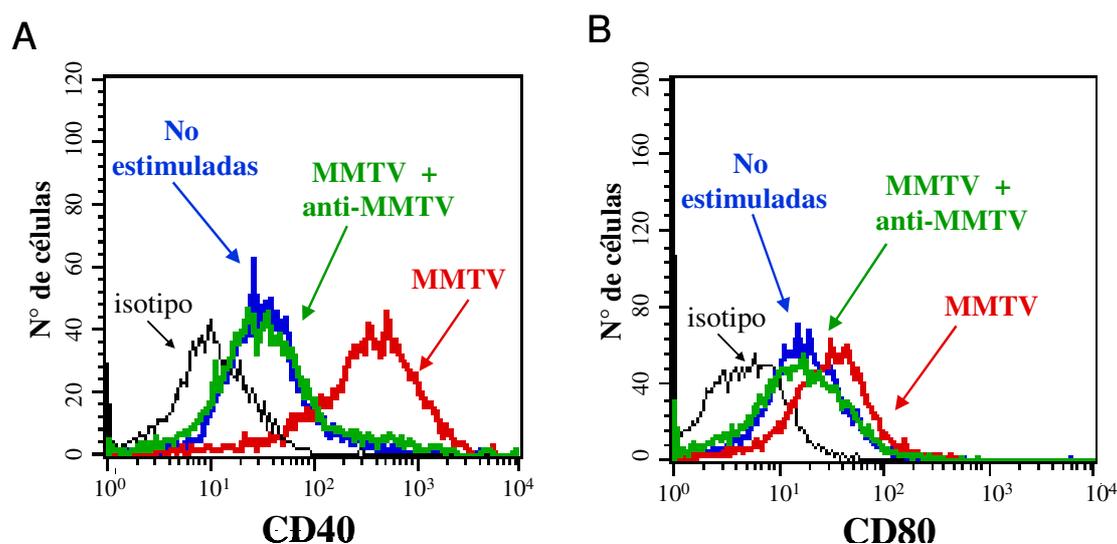
**Los experimentos realizados hasta este punto sugieren que el TLR4 y/o el TLR2 participan en las primeras etapas de la infección por MMTV: activación temprana B, reclutamiento de células B vírgenes e integración viral.**

Los TLRs se expresan en muchas células del sistema inmune, entre ellas las células dendríticas (DCs), importantes células presentadoras de antígeno (CPAs) que participan en la inmunidad innata y adquirida<sup>140</sup>. Se sabe que la activación de los TLRs expresados por las DCs induce la maduración de las mismas<sup>218</sup>. Por otro lado, se ha demostrado recientemente en un modelo de infección en ratones adultos que el MMTV es capaz de infectar a las DCs<sup>22,366</sup>. Decidimos investigar el efecto de la interacción entre el MMTV y las DCs y el posible rol de los TLRs en este proceso, comenzando por el TLR4.

## B. CÉLULAS DENDRÍTICAS Y RECEPTORES DE TIPO TOLL EN LA INFECCIÓN CON MMTV

### B.1- Efecto del MMTV sobre las células dendríticas

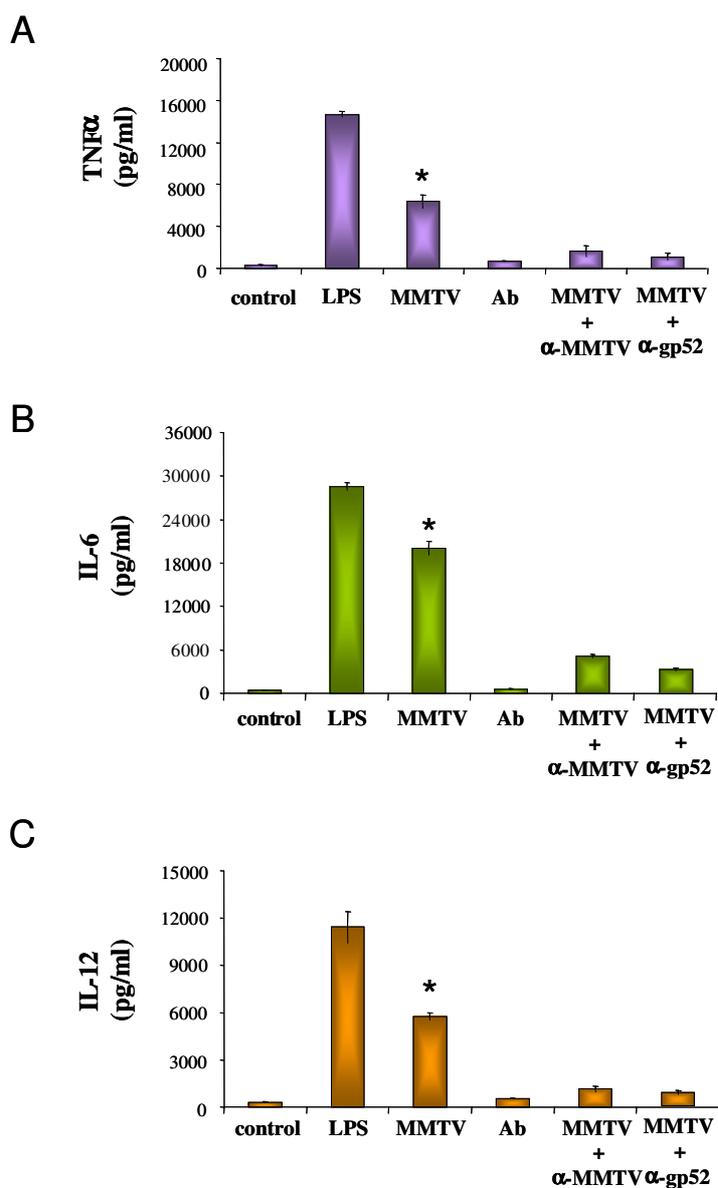
Para investigar si el MMTV ejerce algún efecto directo sobre la función de las DCs, utilizamos como modelo a DCs derivadas de médula ósea (BMDCs). Las BMDCs fueron obtenidas de células de médula ósea de ratones C3H/HeN cultivadas durante 10 días con GM-CSF<sup>361</sup>. Para estudiar si el MMTV es capaz de activar estas DCs, incubamos las células durante 18 hs con MMTV(LA) y luego medimos la expresión de moléculas coestimuladoras por citometría de flujo. Las DCs incubadas con el virus mostraron un aumento en la expresión de CD40 y CD80 (**Figura 7**). Este efecto fue bloqueado preincubando al virus con un anticuerpo anti-MMTV (**Figura 7**).



**Figura 7:** Expresión de moléculas coestimuladoras en BMDCs luego de la estimulación con MMTV. Las BMDCs se incubaron por 18 hs con MMTV(LA) o MMTV(LA) más antisuero anti-MMTV. La expresión de CD40 (A) o CD80 (B) en células CD11c<sup>+</sup> fue analizada por citometría de flujo. Las líneas negras representan el control de isotipo. Los histogramas muestran resultados representativos. El experimento fue realizado tres veces con resultados similares.

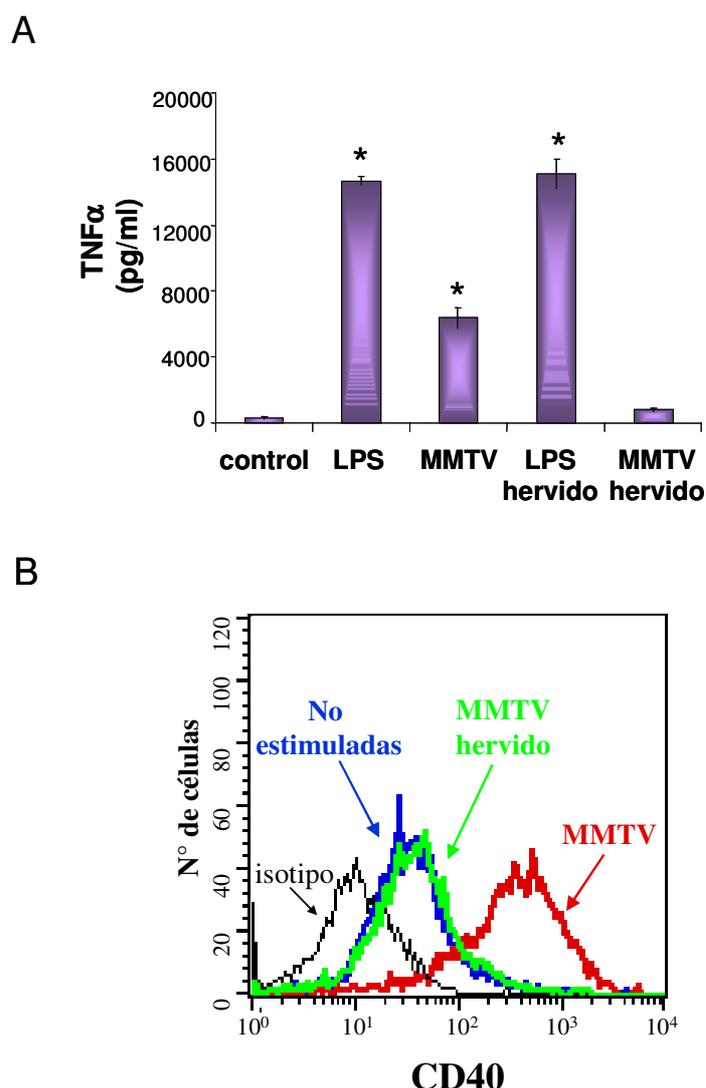
La etapa de maduración de las DCs también se caracteriza por un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas para reclutar células inmunes al sitio de infección<sup>367</sup>. Determinamos por ELISA la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 en BMDCs estimuladas con MMTV(LA). La secreción de estas citoquinas se vio

incrementada en las BMDCs tratadas con el virus. Este efecto pudo ser bloqueado preincubando el virus con un anticuerpo anti-MMTV o con un anticuerpo específico contra la proteína de la envoltura gp52 (**Figura 8**), que es la proteína expuesta en la superficie del virus que es capaz de unirse al TLR4<sup>67</sup>. La efectividad del anticuerpo para bloquear los efectos del MMTV sobre las BMDCs descarta que estos efectos se debieran a la presencia de contaminantes agonistas de TLRs, como por ejemplo el LPS.



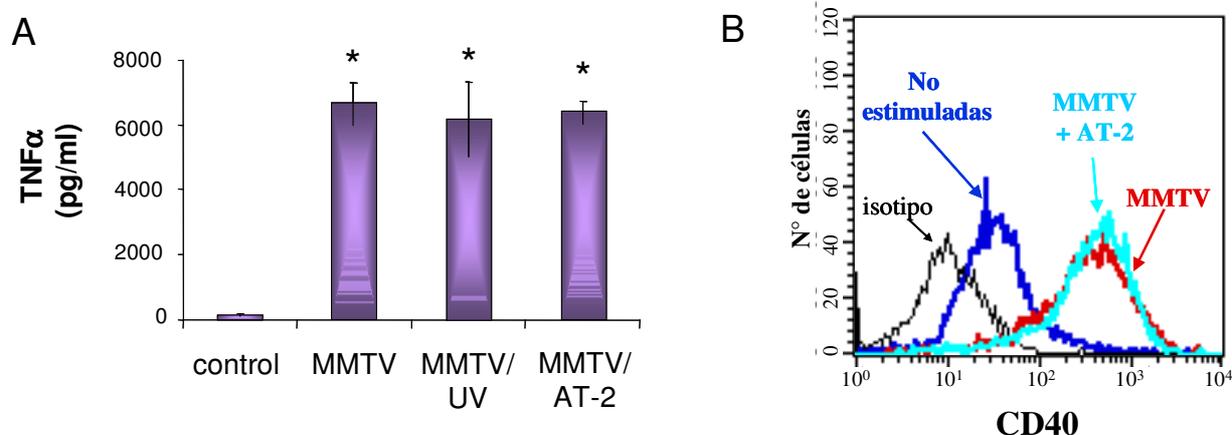
**Figura 8.** Producción de citoquinas proinflamatorias en BMDCs estimuladas con MMTV. Las BMDCs fueron incubadas con LPS (100 ng/ml) o MMTV(LA), en presencia o ausencia de anticuerpos anti-MMTV o anti-gp52. Luego de 18 hs se midió por ELISA la concentración de TNFα (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) en el sobrenadante. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar de cuatro experimentos. \*,  $p < 0,001$  comparado con el grupo control (BMDCs no estimuladas).

Se realizaron experimentos adicionales con el objeto de descartar una posible contaminación con LPS en la preparación viral. Se incubaron las BMDCs con virus expuesto a altas temperaturas. Trabajos previos han mostrado que el tratamiento del LPS con calor no anula la actividad estimuladora del LPS<sup>71,73,74,368</sup>. El pre-tratamiento del virus a 100°C durante 1 hora anuló por completo la activación de las BMDCs inducida por el MMTV mientras que el LPS hervido activó a las células en igual grado que el LPS intacto (**Figura 9**).



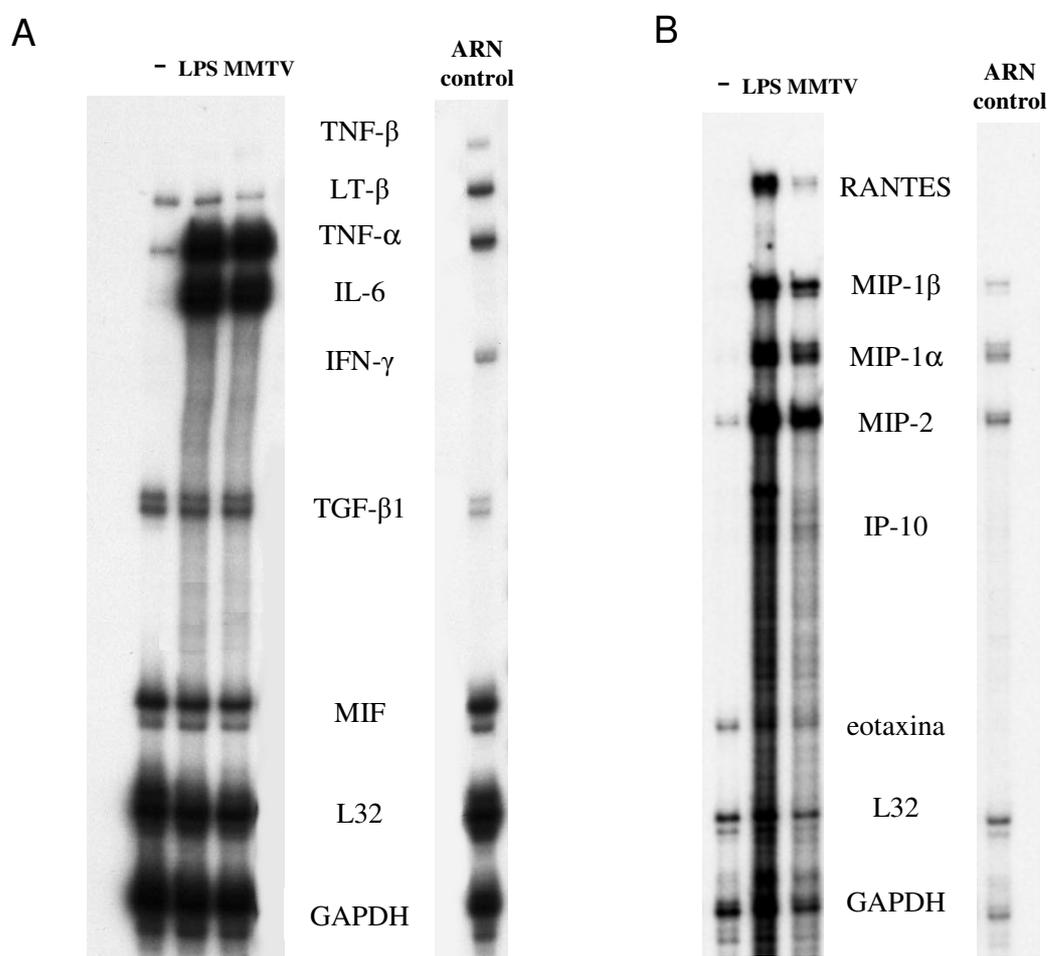
**Figura 9.** Ausencia de contaminación con LPS en la preparación viral. Las BMDCs fueron incubadas con LPS (100 ng/ml) o MMTV(LA), intactos o hervidos previamente durante una hora. Luego de 18 hs se midió por ELISA la concentración de TNF $\alpha$  en el sobrenadante (**A**) y por citometría de flujo la expresión de CD40 (**B**). Los datos en **A**) representan la media  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos. \*,  $p < 0,001$  comparado con el grupo control (BMDCs no estimuladas). En **B**) se muestran histogramas representativos. Se realizaron 3 experimentos con resultados similares. El MMTV expuesto a altas temperaturas tampoco indujo aumentos en la producción de IL-6 e IL-12 ni en la expresión de CD80 en las BMDCs.

Para determinar si la activación de las BMDCs inducida por el MMTV depende de la expresión de genes virales se utilizaron dos pre-tratamientos distintos que inactivan al virus: preincubación con la droga AT-2 y exposición a la luz ultravioleta (UV). AT-2 interactúa con los dominios “dedo de zinc” de la nucleocápside bloqueando la infección inmediatamente después de la entrada del virus a la célula. Se ha demostrado que AT-2 es capaz de inactivar al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>369</sup> y al MMTV<sup>67</sup>. La luz UV produce inactivación viral por causar daños permanentes en los ácidos nucleicos y otras biomoléculas, impidiendo la progresión del ciclo viral. El efecto del MMTV(LA) tratado con AT-2 o luz UV sobre la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas fue similar al observado para el MMTV(LA) sin tratar (**Figura 10**). Estos resultados indican que el MMTV activa a las BMDCs por un mecanismo independiente de la infección.



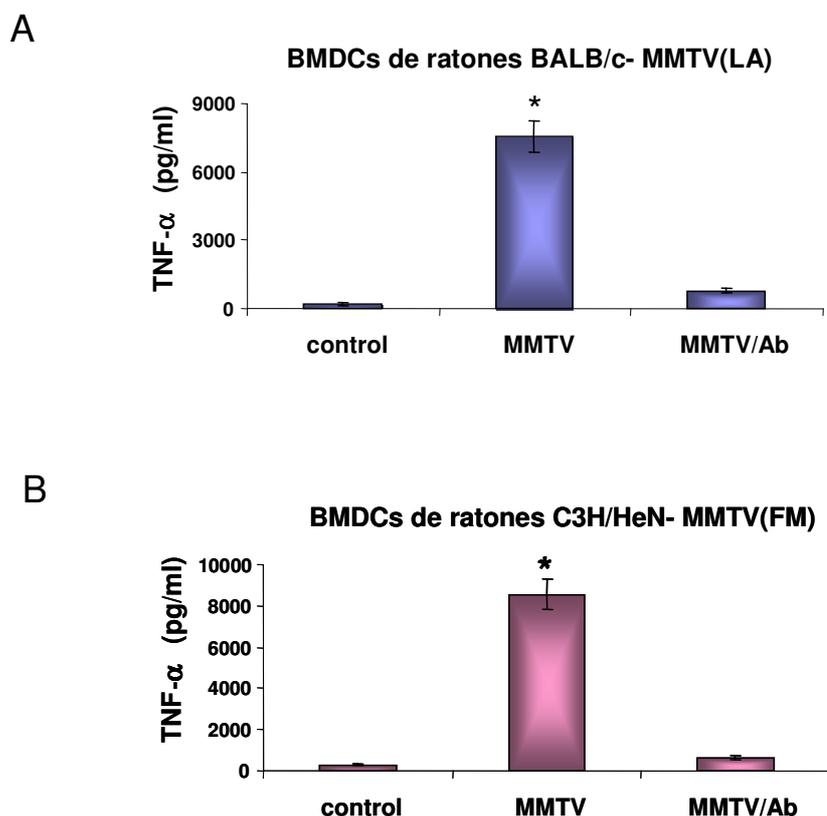
**Figura 10.** La activación de las BMDCs se produce en ausencia de la expresión de genes virales. Las BMDCs fueron incubadas con MMTV(LA), intacto o pretratado con la droga AT-2 o con luz UV. Luego de 18 hs se midió por ELISA la concentración de TNFα en el sobrenadante (**A**) y por citometría de flujo la expresión de CD40 (**B**). Los datos en **A**) representan la media  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos. \*,  $p < 0,001$  comparado con el grupo control (BMDCs no estimuladas). En **B**) se muestran histogramas representativos. Se realizaron 3 experimentos con resultados similares. El tratamiento del MMTV con AT-2 tampoco modificó su capacidad para inducir la producción de IL-6 e IL-12 y la expresión de CD80 en las BMDCs.

Por otro lado, realizamos ensayos de protección de RNAsa (RPAs) para determinar si el MMTV induce la transcripción de genes de citoquinas y quemoquinas en las BMDCs. Las células se incubaron 3 horas con el virus y luego se analizaron los niveles de ARNm de distintos genes, utilizando a los genes de expresión constitutiva GAPDH y L32 como controles para la normalización. Como se observa en la **Figura 11**, los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES y eotaxina fueron incrementados por el MMTV. Por el contrario, no se observaron variaciones en los niveles de MIF (factor inhibitorio de proliferación) y de TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento transformante).



**Figura 11:** Niveles de ARNm de citoquinas y quemoquinas en BMDCs estimuladas con MMTV. Se incubaron BMDCs con LPS (100 ng/ml) o MMTV(LA). Luego de 3 horas se purificó ARN total de las células y se midieron los niveles de citoquinas (A) y quemoquinas (B) mediante RPAs, utilizando una mezcla de sondas para detectar los distintos mensajeros. A la derecha de cada figura se muestra el patrón de bandas obtenido con el ARN control incluido en el kit de RPA. Se muestra un experimento representativo. Se realizaron 3 experimentos en forma independiente.

Los experimentos para estudiar la activación de BMDCs inducida por MMTV fueron repetidos utilizando BMDCs de ratones BALB/c, como así también utilizando otra variante viral, MMTV(FM). En ambos casos se obtuvieron resultados similares a los observados para BMDCs de ratones C3H/HeN y la cepa MMTV(LA) (**Figura 12**).

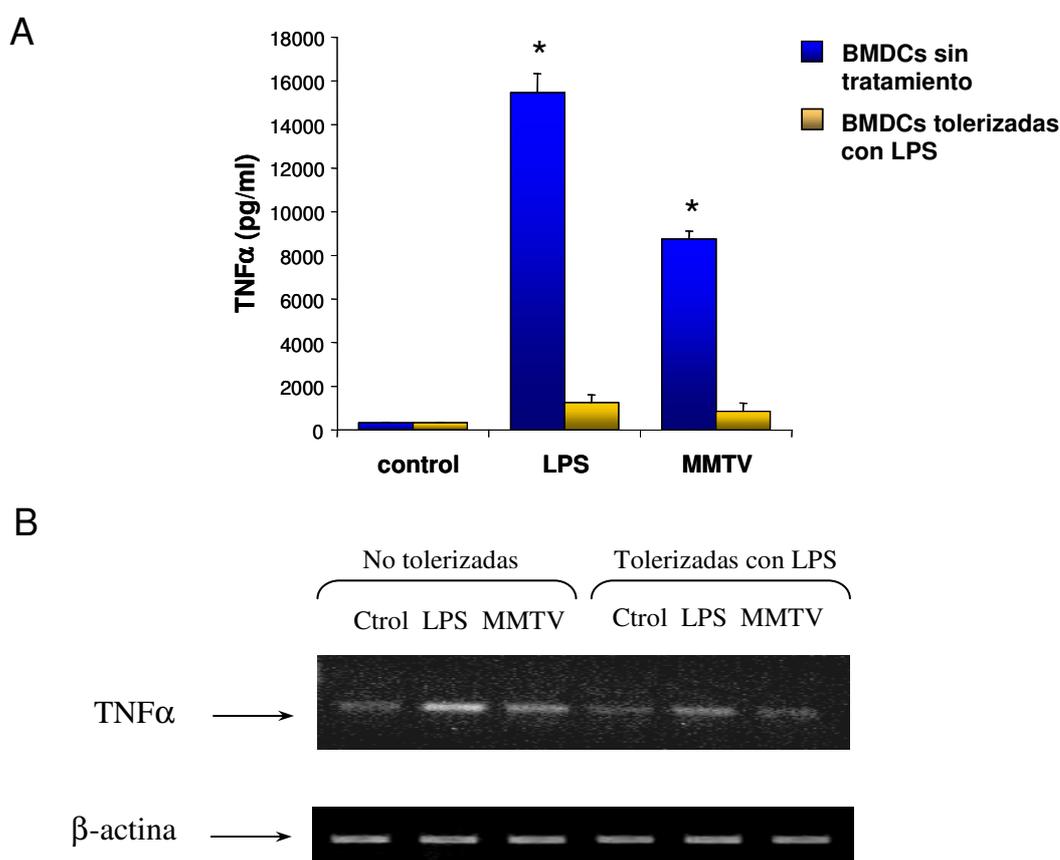


**Figura 12:** La activación de BMDCs inducida por MMTV es independiente de la cepa murina o la variante viral. **A)** BMDCs obtenidas de ratones BALB/c fueron estimuladas 18 hs con MMTV(LA) solo o junto con un anticuerpo anti-MMTV (Ab) y **B)** BMDCs obtenidas de ratones C3H/HeN fueron estimuladas por 18 hs con MMTV(FM) solo o junto con un anticuerpo anti-MMTV. En ambos casos, luego de la incubación se midió por ELISA la concentración de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos. \*  $p < 0,001$  comparado con el grupo control (BMDCs no estimuladas).

**Por lo tanto, el MMTV es capaz de inducir la activación de las BMDCs, independientemente de la expresión de genes virales. Los efectos del virus sobre las BMDCs no son específicos de una variante viral en particular, ni dependen de la cepa murina de la que se obtuvieron las células.**

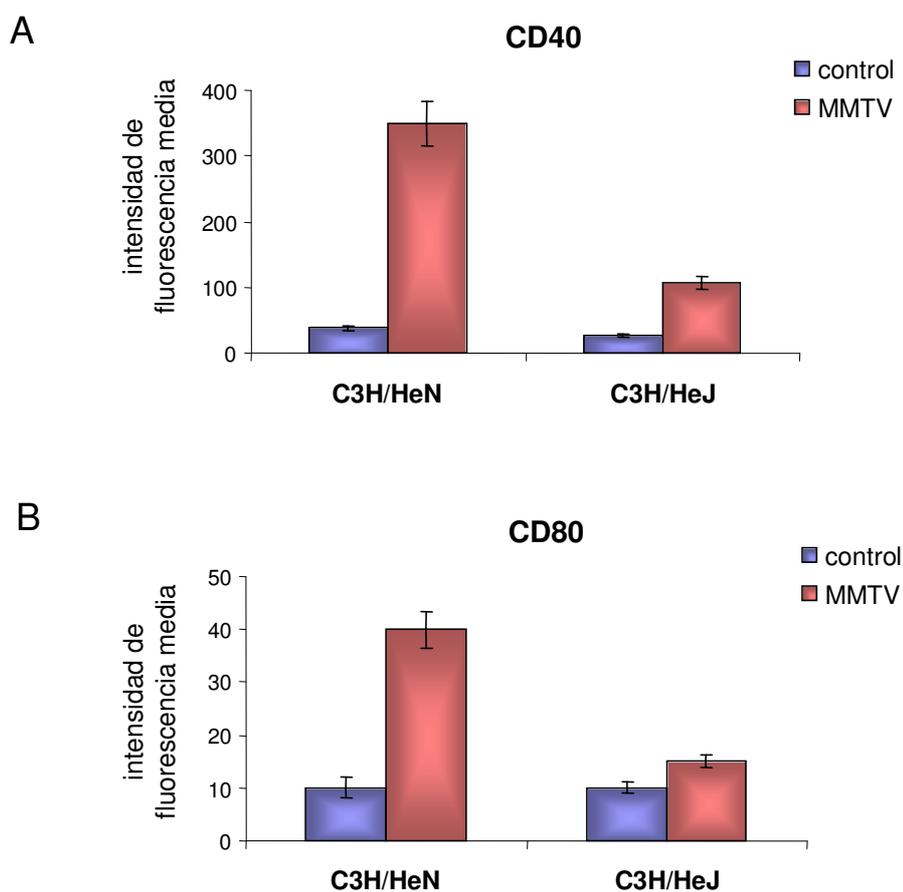
## B.2- Rol del TLR4 en la activación de BMDCs inducida por el MMTV

Para estudiar si el MMTV activa a las BMDCs a través del TLR4 utilizamos como primera estrategia un ensayo de tolerización. Con este objetivo, las BMDCs fueron preincubadas con dosis bajas de LPS durante 20 horas. Como se muestra en la **Figura 13**, el tratamiento de tolerización *in vitro* resultó efectivo ya que el desafío de las BMDCs con una dosis alta de LPS no indujo la producción de TNF- $\alpha$ . Comparamos la producción de TNF- $\alpha$  por ELISA y RT-PCR en BMDCs tolerizadas o no tolerizadas incubadas con el virus. La tolerización inhibió el efecto del MMTV(LA) sobre las DCs (**Figura 13**), sugiriendo una posible participación del TLR4 en la interacción entre el MMTV y las DCs.



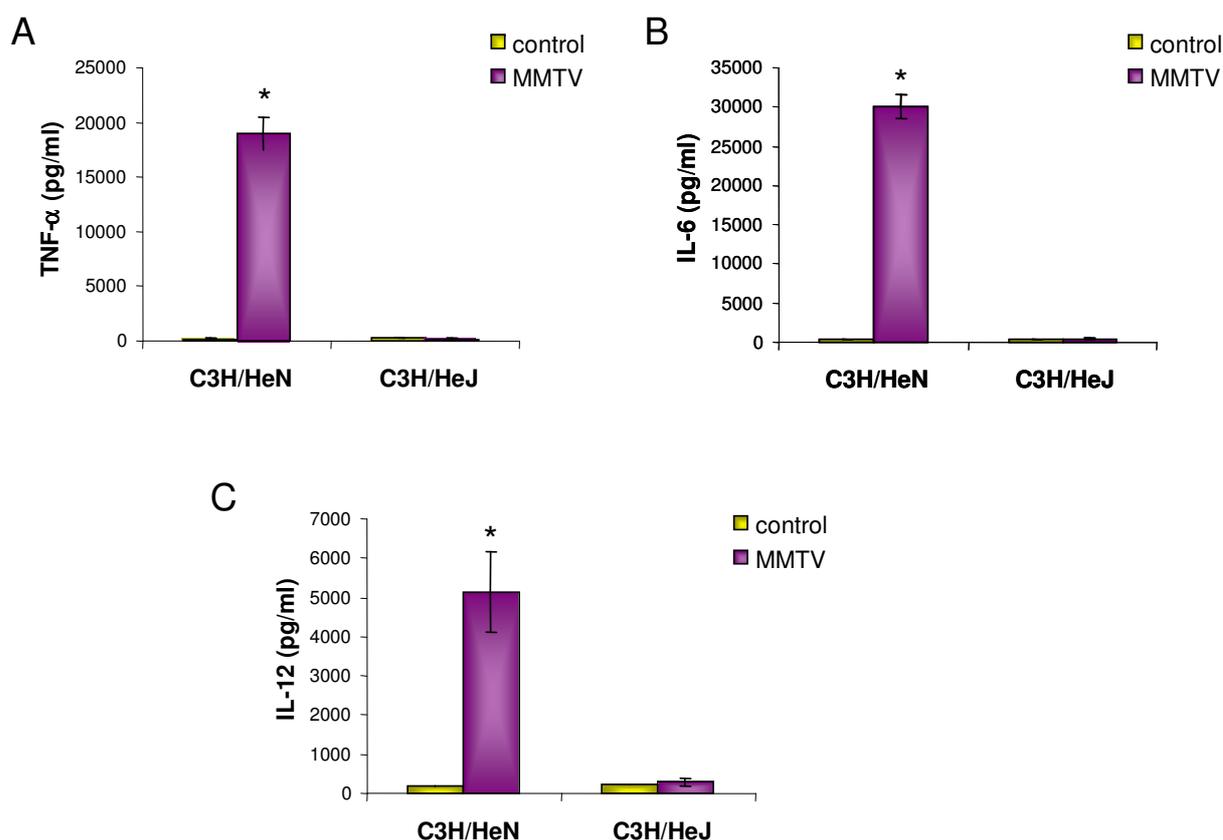
**Figura 13.** Efecto del MMTV sobre BMDCs tolerizadas con LPS. BMDCs de ratones BALB/cJ fueron tolerizadas por 20 hs con LPS (10 ng/ml) y luego estimuladas con LPS (100 ng/ml) o MMTV por 18 hs. La concentración de TNF $\alpha$  en el sobrenadante fue medida por ELISA (**A**), y el ARN total extraído de las células fue analizado por RT-PCR usando primers específicos para TNF- $\alpha$  (**B**). Las figuras son representativas de tres experimentos con resultados similares. Los datos se expresan como media  $\pm$  desvío estándar. \*,  $p < 0,001$  comparado con el grupo control (BMDCs no tolerizadas).

La incapacidad del MMTV para activar a las BMDCs tolerizadas podría deberse a la pérdida de expresión o función del TLR4 que se produce durante el proceso de tolerización. Para determinar si el TLR4 está involucrado en el efecto del MMTV sobre las BMDCs, obtuvimos BMDCs de ratones C3H/HeJ ( $Tlr4^{LPS-d}/TLR4^{LPS-d}$ ). Esta cepa de ratones posee una mutación puntual en el gen del TLR4, que da lugar a un receptor incapaz de generar señalización intracelular<sup>54-56</sup>. Se incubaron BMDCs de ratones C3H/HeN ( $Tlr4^{LPS-n}/Tlr4^{LPS-n}$ ) y C3H/HeJ con MMTV(LA) durante 18 horas y se estudió la expresión de moléculas coestimuladoras por citometría de flujo. El aumento de CD40 y CD80 inducido por el MMTV se vio significativamente reducido en las BMDCs de ratones C3H/HeJ (**Figura 14**), indicando que la presencia de un TLR4 funcional es necesaria para que se produzca la activación de las BMDCs por el virus.

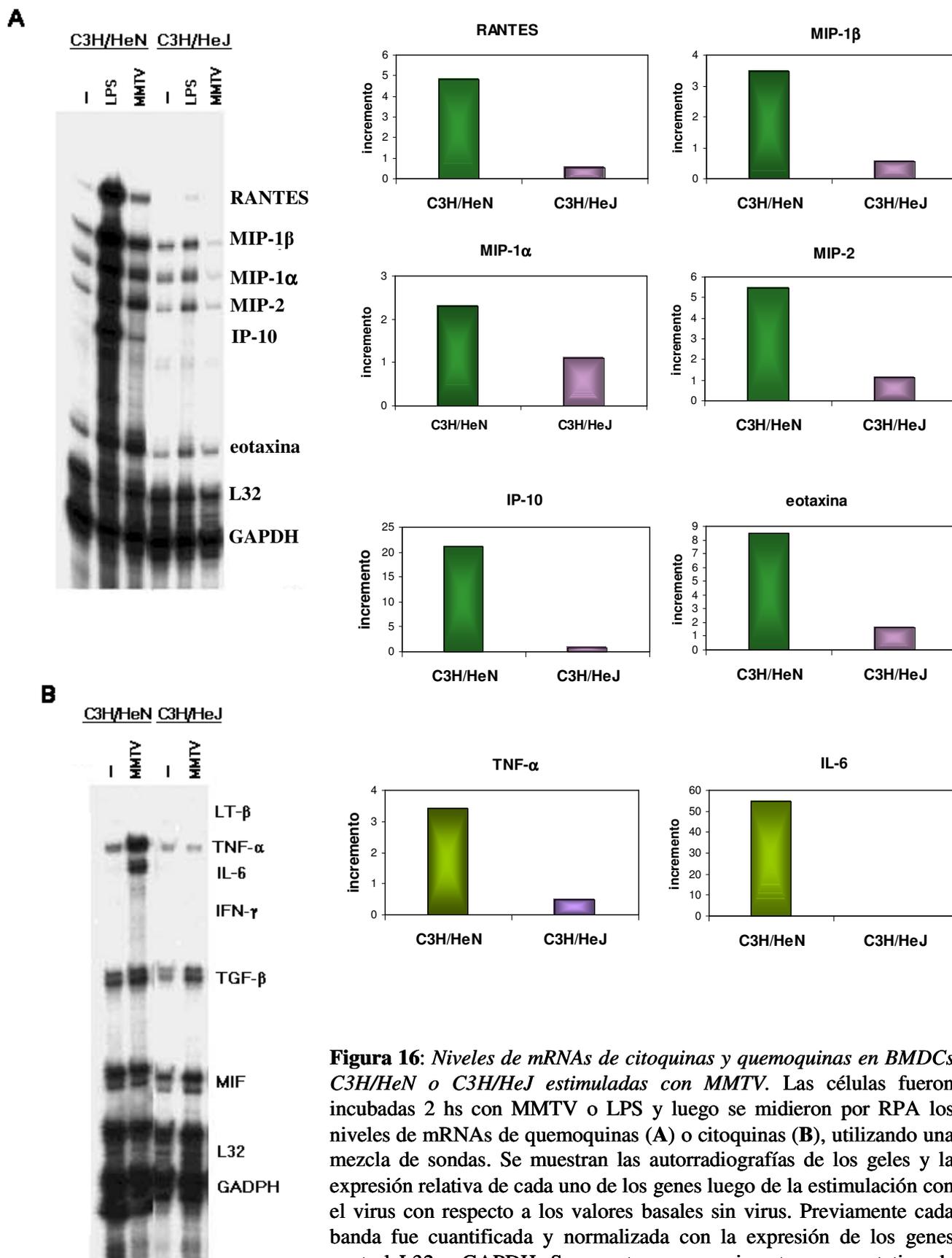


**Figura 14.** Expresión de moléculas coestimuladoras en BMDCs salvajes o deficientes para TLR4 tratadas con MMTV. BMDCs de ratones C3H/HeN o C3H/HeJ fueron incubadas por 18 horas con MMTV. Luego se analizó la expresión de CD40 (A) o CD80 (B) por citometría de flujo. Los datos representan la intensidad de fluorescencia media y se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=3). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

El tratamiento de BMDCs con LPS induce la producción de citoquinas proinflamatorias por un mecanismo dependiente del TLR4<sup>119</sup>. Investigamos si el aumento de citoquinas producido por el MMTV también depende del TLR4 al igual que el aumento de moléculas coestimuladoras. Como se observa en la **Figura 15**, no se detectaron aumentos en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 o IL-12 en las BMDCs C3H/HeJ incubadas con MMTV(LA). Mediante RPAs se compararon los niveles de expresión de diversos genes en BMDCs de C3H/HeN y C3H/HeJ. Luego de 3 horas de estimulación con el virus, las BMDCs C3H/HeN mostraron un incremento en los niveles de los ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES y eotaxina, mientras que no se observaron aumentos en ninguno de estos ARNm en las BMDCs derivadas de ratones C3H/HeJ (**Figura 16**).

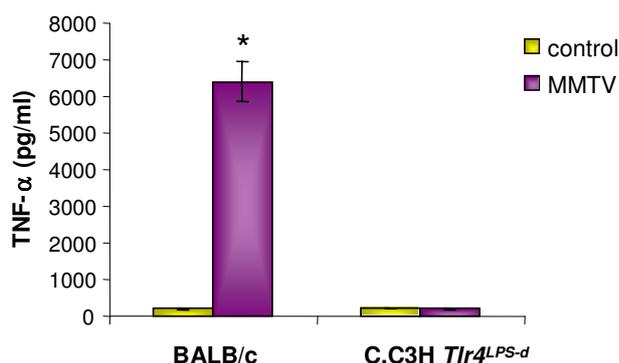


**Figura 15.** Producción de citoquinas en BMDCs salvajes o deficientes para TLR4 tratadas con MMTV. BMDCs de ratones C3H/HeN o C3H/HeJ fueron incubadas por 18 horas con MMTV. Luego se estudió en los sobrenadantes la presencia de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) por ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar; n=3). El experimento se realizó tres veces con resultados similares. \*, p<0,001 comparado con BMDCs de la cepa C3H/HeN, no estimuladas.



**Figura 16:** Niveles de mRNAs de citoquinas y quemoquinas en BMDCs C3H/HeN o C3H/HeJ estimuladas con MMTV. Las células fueron incubadas 2 hs con MMTV o LPS y luego se midieron por RPA los niveles de mRNAs de quemoquinas (A) o citoquinas (B), utilizando una mezcla de sondas. Se muestran las autorradiografías de los geles y la expresión relativa de cada uno de los genes luego de la estimulación con el virus con respecto a los valores basales sin virus. Previamente cada banda fue cuantificada y normalizada con la expresión de los genes control L32 y GAPDH. Se muestra un experimento representativo de tres.

Para estudiar si las diferencias observadas entre las BMDCs salvajes o “wild type” (C3H/HeN) y deficientes para TLR4 (C3H/HeJ) también existían en ratones con otro fondo genético, obtuvimos BMDCs derivadas de ratones BALB/c congénicos para el gen *Tlr4* mutado de la cepa C3H/HeJ (C.C3H *Tlr4*<sup>LPS-d</sup>)<sup>357</sup>. Estas células también mostraron una respuesta nula al MMTV en las condiciones experimentales utilizadas (**Figura 17**).



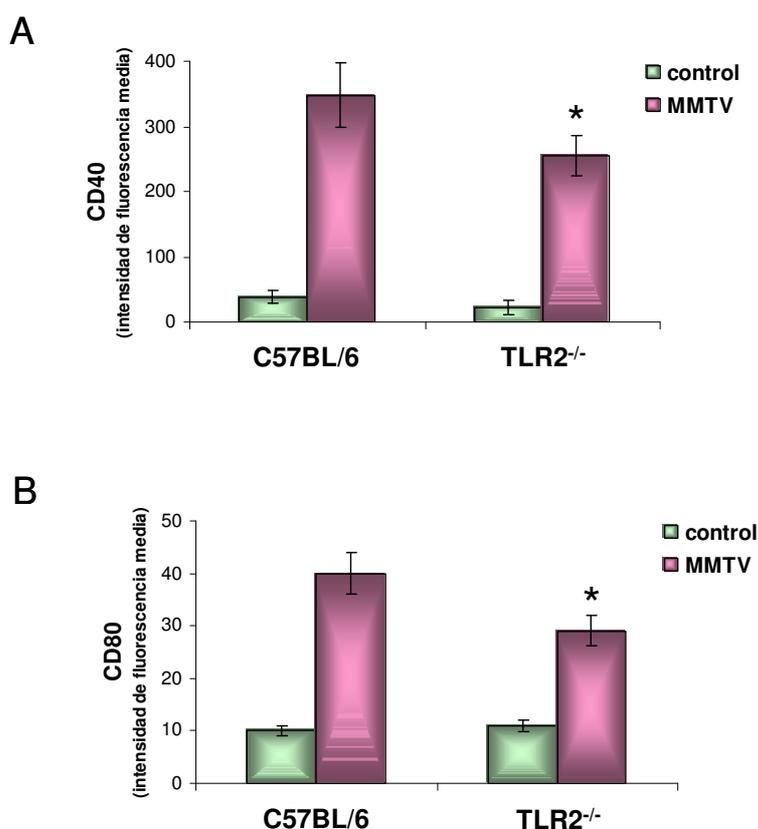
**Figura 17:** Efecto del MMTV sobre BMDCs ratones *TLR4*<sup>LPSd</sup>/*TLR4*<sup>LPSd</sup> con fondo genético *BALB/c*. Se obtuvieron BMDCs de ratones *BALB/c* y de ratones C.C3H *Tlr4*<sup>LPS-d</sup> (*BALB/c* congénicos para la mutación en el gen de TLR4 de los ratones C3H/HeJ). Estas se incubaron 18 hs con MMTV y luego se midió por ELISA la concentración de TNF $\alpha$  en el sobrenadante. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos. \*  $p < 0,001$ .

**Los experimentos de tolerización de BMDCs con LPS y la utilización de BMDCs que expresan un TLR4 no funcional muestran que el TLR4 cumple un rol fundamental en la activación de BMDCs inducida por el MMTV.**

### B.3- Rol del TLR2 en la activación de BMDCs inducida por el MMTV

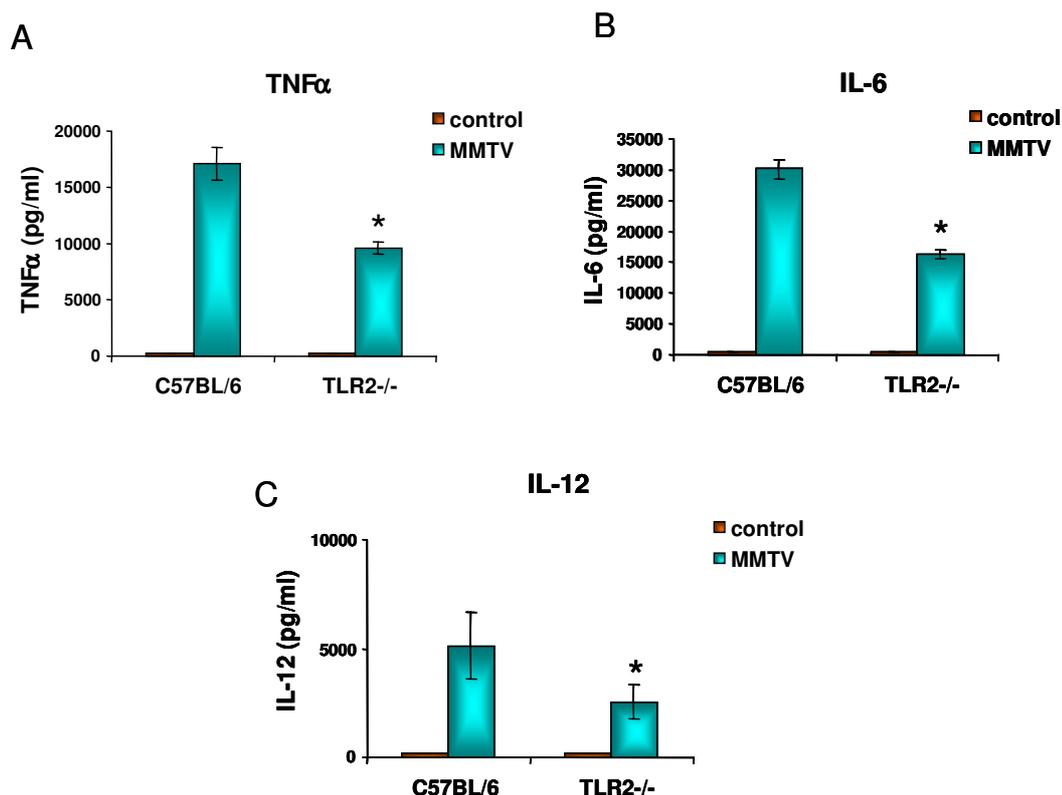
Recientemente, el grupo de la Dra. Susan Ross en la Universidad de Pennsylvania ha demostrado mediante experimentos de transfección y coimmunoprecipitación que la proteína de la envoltura del MMTV también se une al TLR2<sup>370</sup>. Para determinar si el MMTV también es capaz de activar a las DCs por interacción con el TLR2, trabajamos con BMDCs obtenidas de ratones *TLR2*<sup>-/-</sup> (con fondo genético C57BL/6) e investigamos el efecto del MMTV sobre estas células, utilizando como control a BMDCs obtenidas de animales C57BL/6 (salvajes).

Las BMDCs de C57BL/6 y TLR2<sup>-/-</sup> se incubaron 18 horas con MMTV(LA). Luego se examinó por citometría de flujo la expresión de las moléculas CD40 y CD80. Al igual que las BMDCs de otras cepas salvajes analizadas (C3H/HeN y BALB/c), las BMDCs de ratones C57BL/6 mostraron un aumento significativo en la expresión de CD40 y CD80 (**Figura 18**). El MMTV fue capaz de activar a las BMDCs TLR2<sup>-/-</sup> aunque los niveles de expresión de CD40 y CD80 alcanzados fueron significativamente menores que los observados en las BMDCs control (**Figura 18**).



**Figura 18:** Expresión de moléculas coestimuladoras en BMDCs salvajes o deficientes para TLR2 tratadas con MMTV. BMDCs de ratones C57BL/6 o TLR2<sup>-/-</sup> fueron incubadas por 18 horas con MMTV. Luego se analizó la expresión de CD40 (**A**) o CD80 (**B**) por citometría de flujo. Los datos representan la intensidad de fluorescencia media y se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=3). \*: p < 0,05 con respecto al valor de C57BL/6 con MMTV. El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

Estudiamos también la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por el MMTV en las BMDCs TLR2<sup>-/-</sup>. Los ensayos de ELISA mostraron que los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 inducidos por el MMTV en las células carentes de TLR2 son menores con respecto a los producidos por las BMDCs control (**Figura 19**).

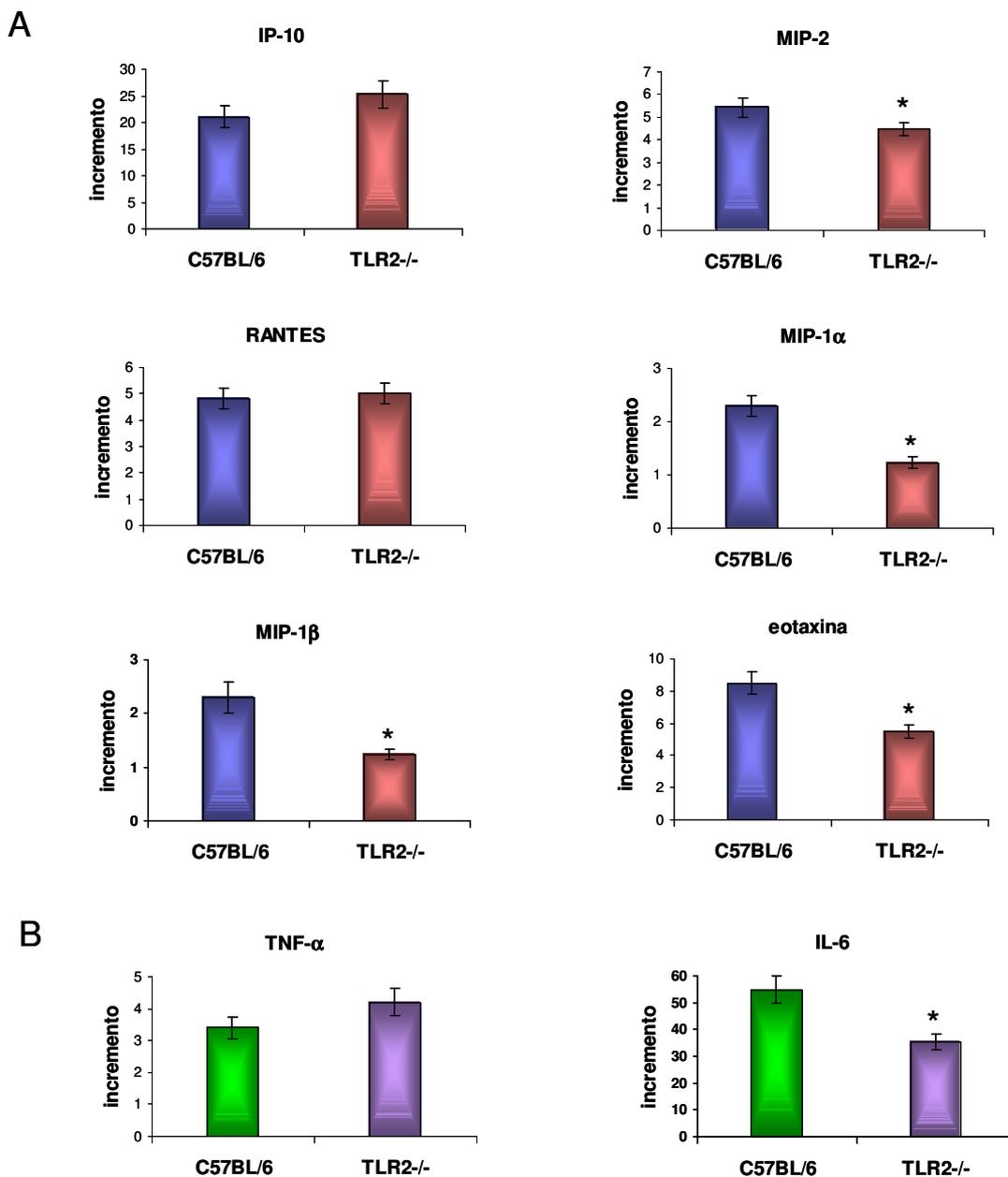


**Figura 19.** Producción de citoquinas en BMDCs salvajes o deficientes para TLR2 tratadas con MMTV. BMDCs de ratones C57BL/6 o TLR2<sup>-/-</sup> fueron incubadas por 18 horas con MMTV. Luego se estudió en los sobrenadantes la presencia de TNF $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) por ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=3). \*: p < 0,05 con respecto al valor de C57BL/6 con MMTV. El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

Por último, realizamos ensayos de protección de RNAsa para analizar el efecto del MMTV en los niveles de expresión de citoquinas y quemoquinas en BMDCs TLR2<sup>-/-</sup>. Los aumentos causados por el MMTV en los niveles de mRNAs de IL-6, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 y eotaxina de las BMDCs fueron significativamente menores en ausencia del TLR2 (Figura 20). Por otro lado, los aumentos de TNF- $\alpha$ , RANTES e IP-10 en respuesta al virus fueron similares en las BMDCs control y las TLR2<sup>-/-</sup> (Figura 20).

**El estudio de los efectos del MMTV sobre BMDCs deficientes en TLR2 indica que el TLR2 está involucrado en la activación de las BMDCs inducida por el virus, aunque, aparentemente, en menor medida que el TLR4.**

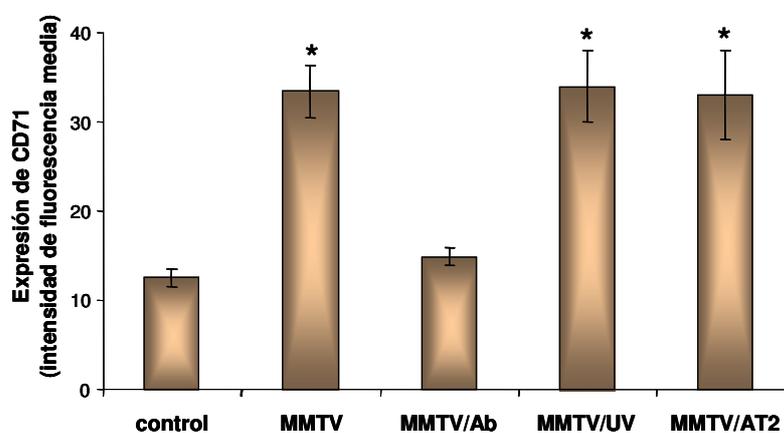
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta este punto, nos centramos a partir de aquí en el estudio del rol del TLR4 en la infección por MMTV.



**Figura 20:** Niveles de mRNAs de citoquinas y quemoquinas en BMDCs C57BL/6 o TLR2<sup>-/-</sup> estimuladas con MMTV. Las células fueron incubadas 2 hs con MMTV o LPS y luego se midieron por RPA los niveles de mRNAs de quemoquinas (A) o citoquinas (B), utilizando una mezcla de sondas. Se muestra la expresión relativa de cada uno de los genes luego de la estimulación con el virus con respecto a los valores basales sin virus. Previamente cada banda fue cuantificada y normalizada con la expresión de los genes control L32 y GAPDH. \*:  $p < 0,05$ . Se muestra un experimento representativo de tres.

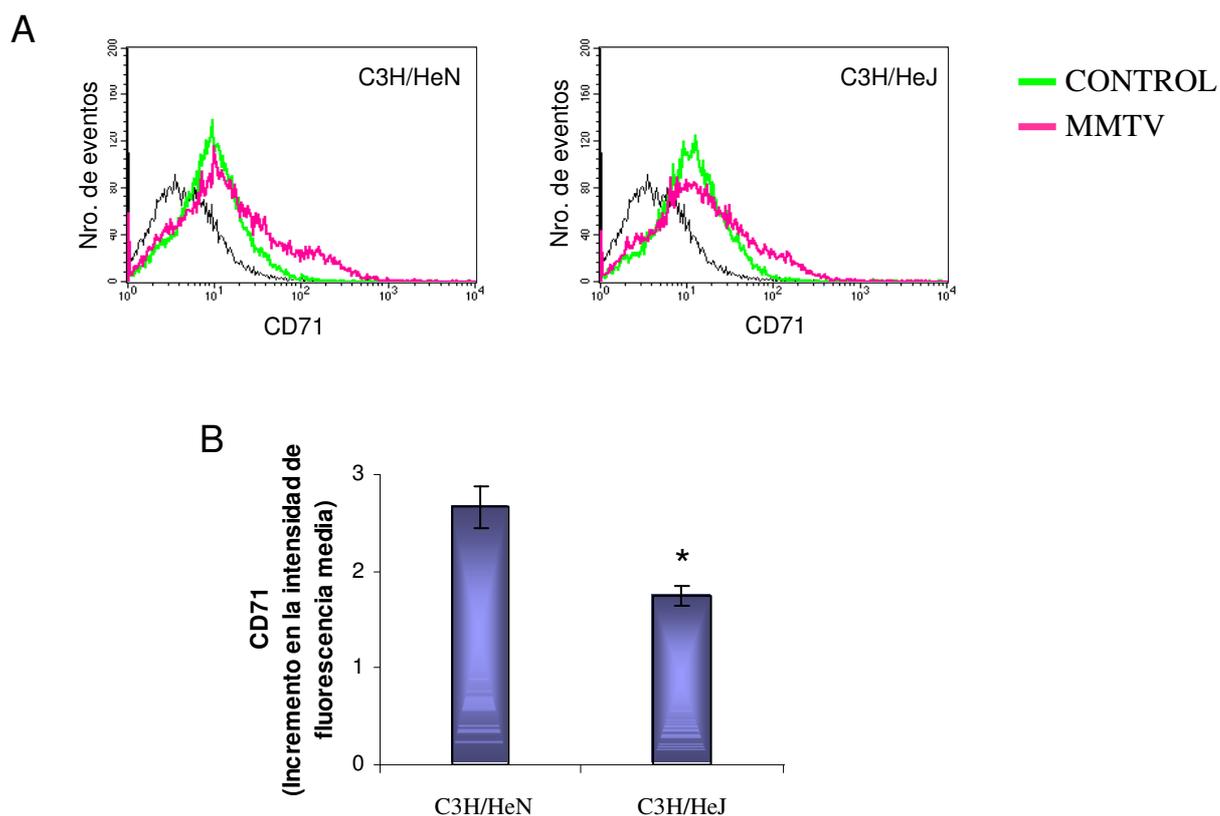
#### B.4- Expresión del receptor de entrada del MMTV (CD71) en las BMDCs

Se ha demostrado recientemente que el MMTV utiliza a la molécula CD71, también conocida como el receptor de transferrina TfR1, como receptor de entrada a la célula<sup>23</sup>. Decidimos investigar si el MMTV afecta la expresión de CD71 en las DCs. Se incubaron BMDCs de ratones C3H/HeN con MMTV(LA) durante 18 horas y se estudió la expresión de CD71 de superficie por citometría de flujo. El virus fue capaz de aumentar la expresión de CD71 en las BMDCs (**Figura 21**). El antisuero anti-MMTV bloqueó el aumento de CD71, mientras que el pretratamiento del virus con la droga AT-2 o con luz UV no alteró el aumento de CD71 (**Figura 21**).



**Figura 21.** Expresión del receptor de entrada del MMTV (CD71) en BMDCs estimuladas por el virus. BMDCs de ratones C3H/HeN fueron incubadas 18 hs con MMTV solo, MMTV más un anticuerpo anti-MMTV (Ab), MMTV pretratado con luz UV o MMTV pretratado con la droga AT-2. Luego se midió la expresión de CD71 en superficie por citometría de flujo. Los datos representan la intensidad de fluorescencia media y se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=3). \*:  $p < 0,05$  con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

Estudiamos si el TLR4 está involucrado en el aumento de CD71 producido por el virus en las BMDCs. Tanto las BMDCs de ratones C3H/HeN ( $Tlr4^{LPS-n}/Tlr4^{LPS-n}$ ) como las de C3H/HeJ ( $Tlr4^{LPS-d}/Tlr4^{LPS-d}$ ) mostraron un aumento en la expresión de CD71, pero este aumento fue significativamente menor en las BMDCs C3H/HeJ que en las C3H/HeN (**Figura 22**).



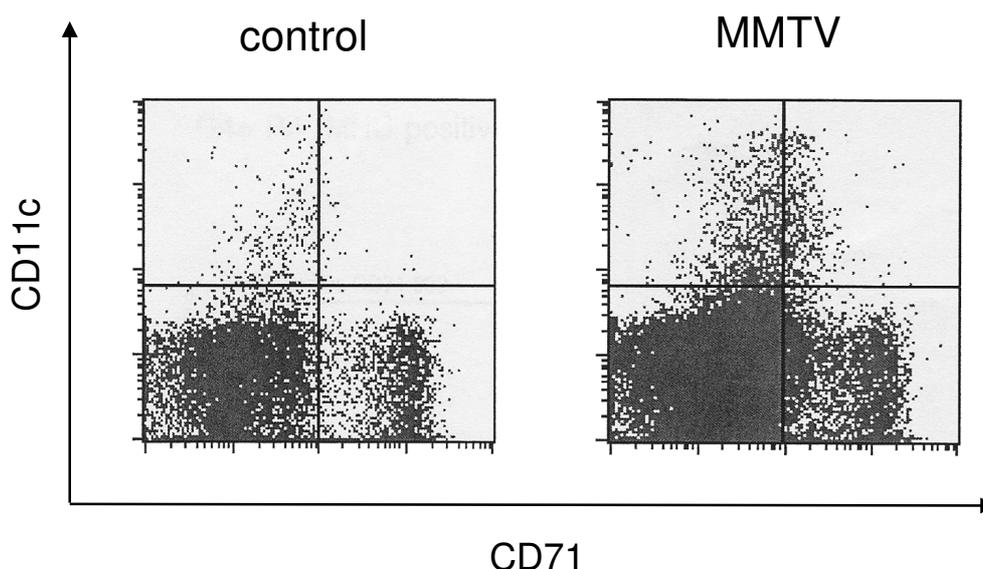
**Figura 22:** *Expresión del receptor CD71 en BMDCs deficientes en TLR4.* BMDCs de ratones C3H/HeN o C3H/HeJ fueron incubadas con MMTV por 18 hs. Luego se midió por citometría de flujo la expresión de CD11c y CD71 en superficie. **A)** Histogramas representativos de la expresión de CD71 analizada en la población CD11c<sup>+</sup> (en negro, control de isotipo, en verde BMDCs control, en rosa BMDCs con MMTV). **B)** Incremento en la intensidad de fluorescencia media de CD71 en la población CD11c<sup>+</sup>. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=3) de un experimento representativo. \*:  $p < 0,01$  (C3H/HeN vs C3H/HeJ). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

**En conclusión, el MMTV es capaz de inducir en las BMDCs un aumento en la expresión de su receptor de entrada a la célula, y este efecto es significativamente menor en ausencia de un TLR4 funcional.**

### B.5- Efecto de la infección *in vivo* con MMTV en las DCs de las placas de Peyer. Rol del TLR4

En un trabajo reciente se ha reportado que la inoculación subcutánea de MMTV en la almohadilla plantar de ratones BALB/c adultos induce un aumento en el número de células dendríticas en el ganglio poplíteo drenante<sup>366</sup>. Para determinar si la infección natural con MMTV a través de la leche materna genera cambios similares en las células CD11c<sup>+</sup> de las PPs, crías C3H/HeN fueron amamantadas durante 3 días con hembras infectadas con MMTV(LA). Luego se estudió por citometría de flujo el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> en las PPs de las crías. Como se observa en la **Figura 23** y en la **Tabla 1**, la infección con MMTV incrementó significativamente el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup>. Sin embargo, no se observaron cambios en la población CD11c<sup>+</sup> en crías C3H/HeJ amamantadas con madres infectadas (**Tabla 1**).

Utilizando el mismo modelo experimental investigamos si el MMTV también era capaz de aumentar la expresión de su receptor de entrada a la célula en las DCs de las PPs. La infección con MMTV(LA) a través del amamantamiento produjo en las PPs de crías C3H/HeN un aumento significativo en el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> que expresan CD71 y en la intensidad de expresión de CD71 (**Figura 23 y Tabla 1**), mientras que no se detectó ningún cambio en las DCs de crías deficientes en TLR4 (**Tabla 1**).



**Figura 23:** Expresión de CD71 en las DCs de las PPs luego de la infección con MMTV. Crías C3H/HeN fueron amamantadas 3 días con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV. Luego se obtuvieron las células de las PPs y se realizó una citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD11c y anti-CD71. Se muestra un dot plot representativo. El experimento se realizó 3 veces con resultados similares.

**Tabla 1:** Porcentaje de células DCs y expresión de CD71 en las PPs de crías infectadas con MMTV

Cepa	MMTV	% CD11c <sup>+</sup>	%CD71 <sup>+</sup> /CD11c <sup>+</sup>
C3H/HeN (TLR4 <sup>LPSn</sup> /TLR4 <sup>LPSn</sup> )	-	2,3 ± 0,2	25,1 ± 2,0
	+	5,6 ± 1,0 *	38,4 ± 0,9 *
C3H/HeJ (TLR4 <sup>LPSd</sup> /TLR4 <sup>LPSd</sup> )	-	1,9 ± 0,5	30,0 ± 3,0
	+	1,7 ± 0,4	27,5 ± 1,8

Crías C3H/HeN y C3H/HeJ fueron amamantadas 3 días con hembras no infectadas (-) o infectadas con MMTV(LA) (+). Luego se obtuvieron las células de las PPs y se realizó una citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD11c y anti-CD71. Se muestra el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup>/PP y el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> que expresan CD71. Los datos se presentan como media ± desvío estándar (n=3). Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares. \*: p < 0,05 con respecto al control (-) de la misma cepa.

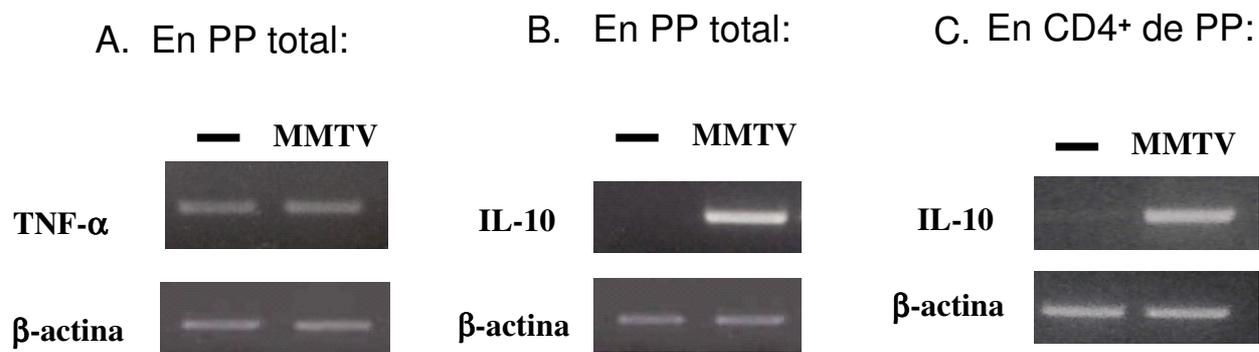
**Estos resultados muestran que la infección con MMTV a través del amamantamiento afecta a las DCs en el primer sitio de infección, las PPs. La infección con MMTV aumenta el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> en las PPs y la expresión del receptor de entrada del virus en estas células. Ambos eventos son dependientes de la presencia de un TLR4 funcional.**

## C. CÉLULAS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Y RECEPTORES DE TIPO TOLL EN LA INFECCIÓN CON MMTV

### C.1- ESTUDIO DE LA POBLACIÓN CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> DE LAS PPs DURANTE LA INFECCIÓN CON MMTV

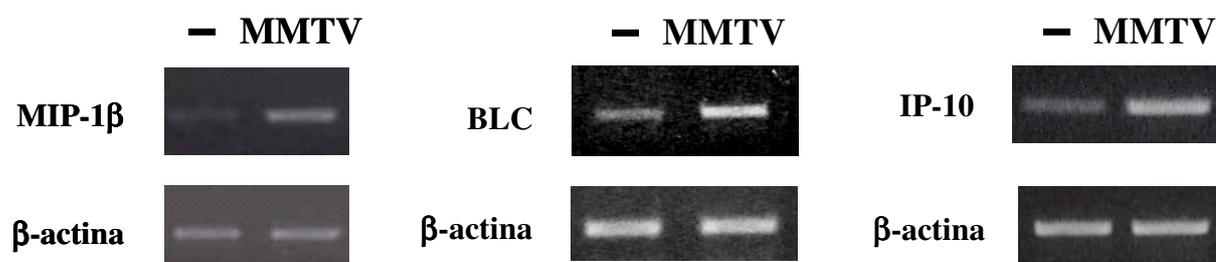
#### C.1.1- Expresión de citoquinas y quemoquinas en las PPs de crías infectadas

En la primera parte de este trabajo observamos que el MMTV estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  en DCs cultivadas *in vitro*. Decidimos investigar el patrón de citoquinas producido en las PPs durante la infección por la vía natural del MMTV, a través de la leche materna. Se amamantaron crías BALB/c con nodrizas BALB/c infectadas con MMTV(LA) y a los 2 días se analizó la expresión de diversas citoquinas en las PPs por RT-PCR. Sorprendentemente, no pudimos detectar alteraciones en los niveles de TNF- $\alpha$  (**Figura 24**). Sin embargo, observamos un gran aumento en la expresión de IL-10 (**Figura 24**). El aumento de la expresión de IL-10 también se observó en células CD4<sup>+</sup> purificadas de las PPs (**Figura 24 C**).



**Figura 24.** Expresión de TNF $\alpha$  e IL-10 en las PPs de crías infectadas con MMTV. Crías BALB/c fueron amamantadas 2 días con hembras no infectadas (-) o infectadas con MMTV(LA). Luego se extrajo ARN de las PPs y se realizaron ensayos de RT-PCR para medir los niveles de expresión de TNF $\alpha$  (A) e IL-10 (B). En algunos experimentos las mediciones se realizaron sobre ARN de células CD4<sup>+</sup> purificadas de las PP (C). Para cada citoquina se muestra un gel representativo. El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

Mediante RT-PCR medimos también la expresión de varias quemoquinas en las PPs de las crías infectadas. Como se observa en la **Figura 25** la expresión de las quemoquinas MIP-1 $\beta$  (CCL4), BLC (CXCL13) e IP-10 (CXCL10) se encuentra incrementada en las PPs de crías infectadas.



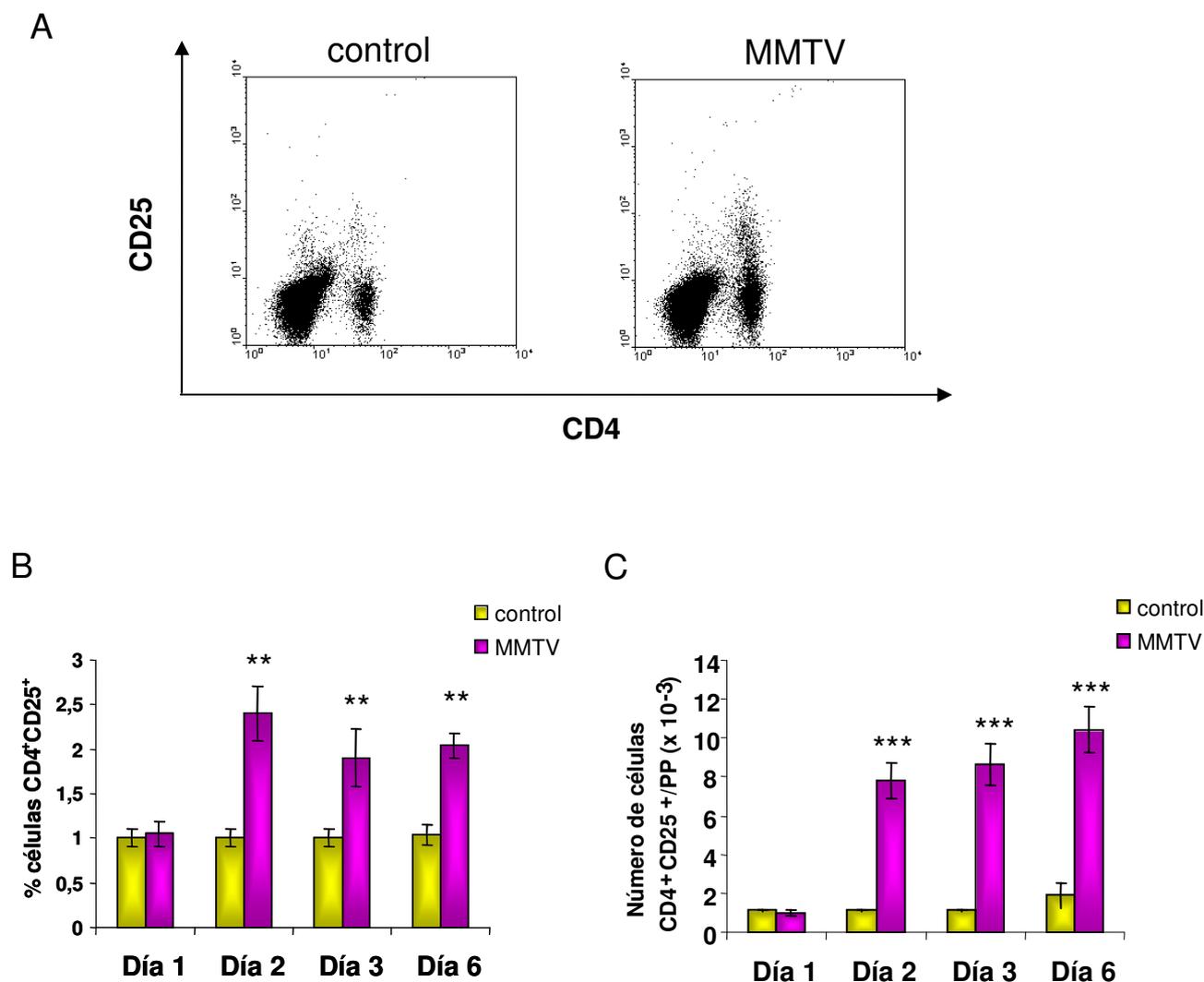
**Figura 25.** Expresión de quemoquinas en las PPs de crías infectadas con MMTV. Crías BALB/c fueron amamantadas 2 días con hembras no infectadas (-) o infectadas con MMTV(LA). Luego se extrajo ARN de las PPs y se realizaron ensayos de RT-PCR para medir los niveles de expresión de MIP-1 $\beta$  (CCL4), BLC (CXCL13) e IP-10 (CXCL10). Para cada quemoquina se muestra un gel representativo. El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

La IL-10 es una citoquina inmunomoduladora secretada por diferentes tipos celulares, dentro de los que se incluyen las células T regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs)<sup>371</sup>. Las Tregs cumplen un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia inmunológica a antígenos propios así como en la modulación de respuestas inmunes frente a antígenos no propios. Por otro lado, en un trabajo reciente se ha demostrado que CCL4 recluta células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>328</sup>. **Los notables aumentos de IL-10 y CCL4 producidos en las PPs a sólo dos días de la infección con MMTV nos llevaron a investigar si la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs se ve afectada por el virus.**

### C.1.2- Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> durante la primera semana de infección con MMTV

Para comenzar, estudiamos por citometría de flujo el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en las PPs a lo largo de la primera semana de infección con MMTV(LA). Como se observa en la **Figura 26 B**, a partir del día 2 el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se encuentra significativamente aumentado, observándose un pico al segundo día de

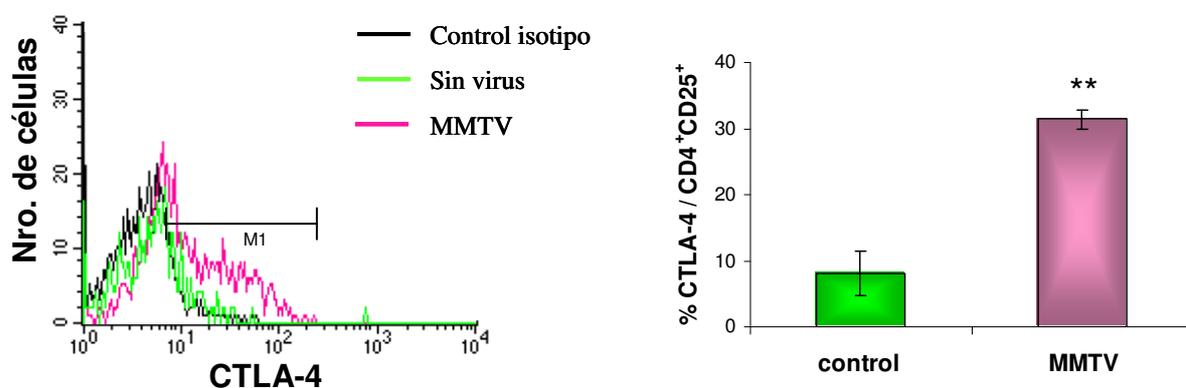
infección. El número absoluto de células  $CD4^+CD25^+$  en las PPs también se vio aumentado por la infección durante el período estudiado (**Figura 26 C**).



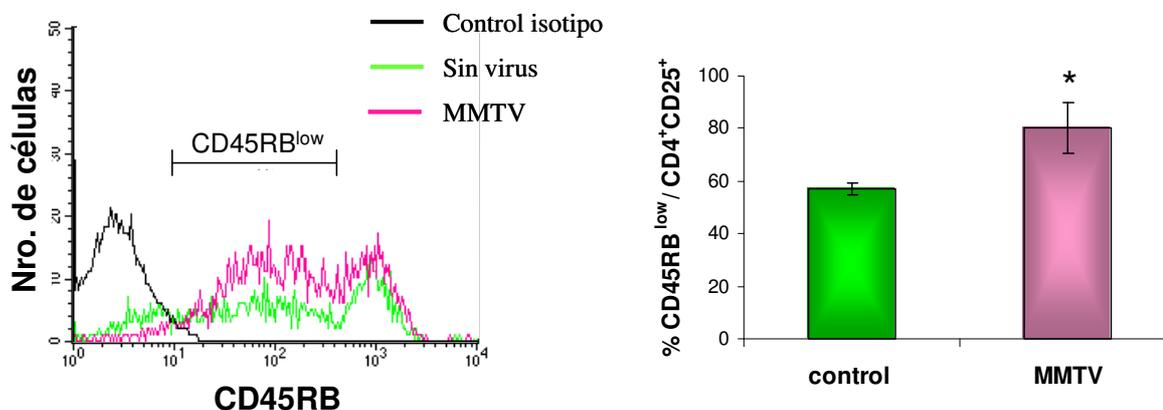
**Figura 26:** Cambios en la población  $CD4^+CD25^+$  de las PPs inducidos por el MMTV en la primera semana de infección. Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). A diferentes días se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD4 y CD25. **A)** Dot plots representativos de la expresión de CD4 y CD25 al día 2 de infección. **B)** Porcentaje y **C)** Número absoluto de células  $CD4^+CD25^+$  en las PP a distintos días de infección. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=5). Se muestra un experimento representativo. \*\*: p< 0,01 y \*\*\*: p< 0,005 con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó cinco veces con resultados similares.

Para caracterizar a la población  $CD4^+CD25^+$  en estudio, determinamos en estas células la expresión de otros marcadores, CTLA-4 y  $CD45RB^{low}$ . Como se muestra en la **Figura 27**, ambas moléculas son expresadas por un porcentaje de las células  $CD4^+CD25^+$  de las PPs. El porcentaje de  $CD4^+CD25^+$  que expresan CTLA-4 se encuentra aumentado luego de la infección con MMTV(LA) (**Figura 27 A**). Lo mismo se observa con respecto a  $CD45RB^{low}$  (**Figura 27 B**).

A

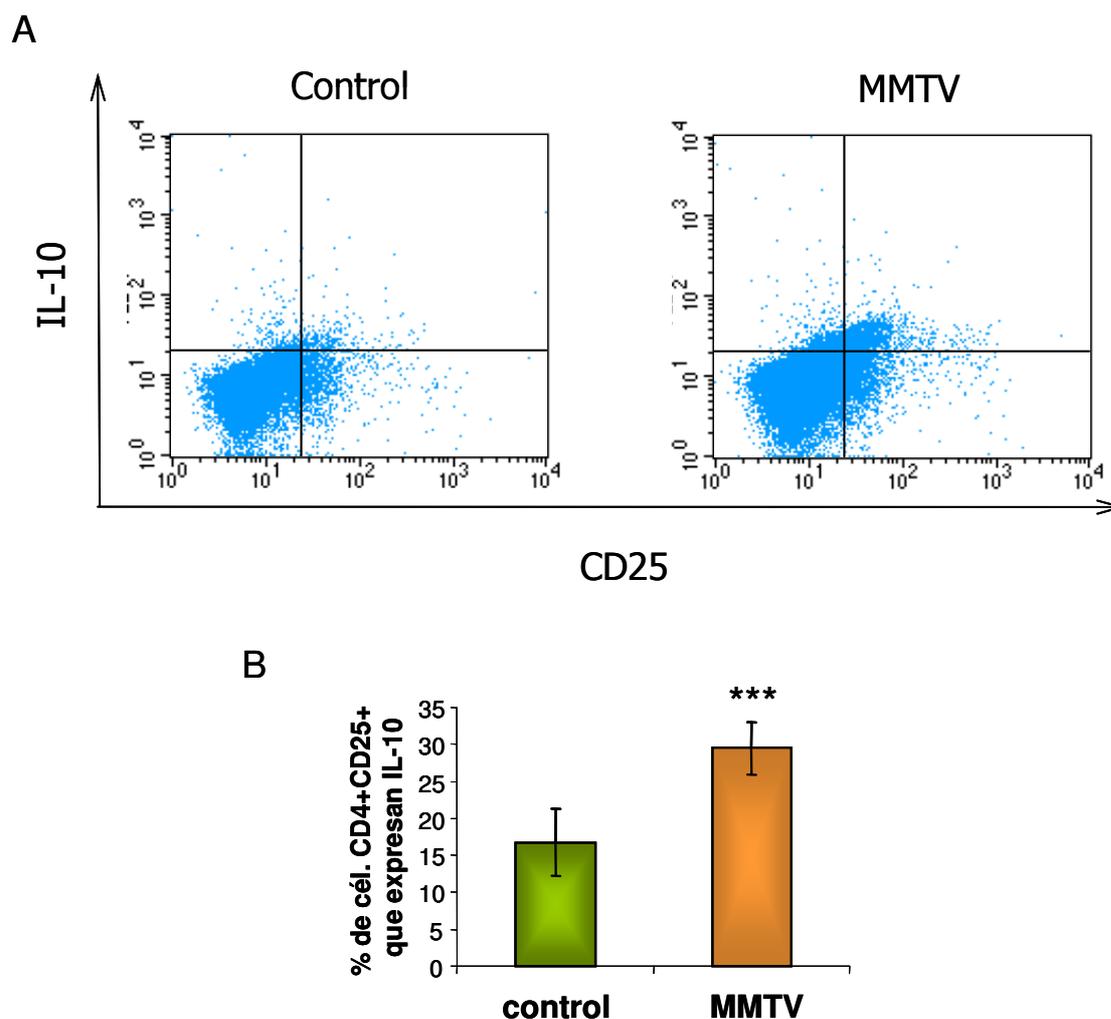


B



**Figura 27:** Expresión de CTLA-4 y  $CD45RB^{low}$  en la población  $CD4^+CD25^+$  de las PPs. Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). A diferentes días se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD4, CD25, CTLA-4 (intracelular), y CD45RB. A la izquierda se muestran histogramas representativos de la expresión de CTLA-4 (**A**) y CD45RB (**B**) en las células  $CD4^+CD25^+$  al día 3 de infección. A la derecha se muestra el porcentaje de células  $CD4^+CD25^+$  que expresa CTLA-4 (**A**) o  $CD45RB^{low}$  (**B**) al día 3 de infección. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=4). Se muestra un experimento representativo. \*:  $p < 0,05$  y \*\*:  $p < 0,01$  con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

Se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales las células  $CD4^+CD25^+$  regulatorias ejercen su acción inmunomoduladora<sup>330</sup>. Uno de ellos es la producción de IL-10. Investigamos la expresión de IL-10 en las  $CD4^+CD25^+$  durante la infección con MMTV(LA). Luego de 6 días de infección, la expresión de IL-10 se ve significativamente aumentada en la población  $CD4^+CD25^+$  de las PPs (**Figura 28**).



**Figura 28:** Expresión de IL-10 en la población  $CD4^+CD25^+$  de las PPs. Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). A diferentes días se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de CD4 y CD25 de superficie y la de IL-10 intracelular. **A)** Dot plots representativos de la expresión de IL-10 y CD25 dentro de la población  $CD4^+$  al día 6 de infección. **(B)** Porcentaje de células  $CD4^+CD25^+$  que expresan IL-10. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=4). Se muestra un experimento representativo. \*\*\*:  $p < 0,005$  con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

Para estudiar si la tasa de proliferación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs se ve afectada por el virus, purificamos células CD4<sup>+</sup> de las PPs, realizamos una marcación con CD25 y yoduro de propidio (IP) y analizamos por citometría de flujo el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que se encontraban en las fases S o G2 del ciclo celular. Encontramos que a partir del día 2 de infección con MMTV(LA) la proliferación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs es significativamente mayor que la observada en animales no infectados (**Tabla 2**). Al día 6 se observa un máximo de proliferación (**Tabla 2**). Pasada la primera semana de infección, la proliferación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sigue siendo elevada, aunque es menor que la observada al día 6 (**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Proliferación de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en las PPs de ratones infectados

	Porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> en proliferación			
	Día 2	Día 6	Día 13	Día 18
Control	5,5 ± 0,7	2,7 ± 0,6	5,0 ± 0,6	2,6 ± 0,8
MMTV	13,1 ± 2,3 *	28,1 ± 3,2 *	10,4 ± 0,7 *	7,9 ± 0,4 *

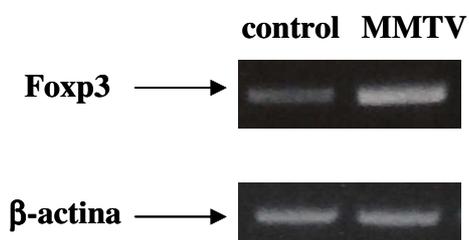
Crías BALB/c fueron amamantadas a distintos tiempos con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV. Luego se purificaron las células CD4<sup>+</sup> de las PPs por separación magnética y se realizó una citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD25-FITC, seguido de una marcación con IP. Se analizó el contenido de yoduro de propidio para calcular el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que se encuentran en las fases S o G2 del ciclo celular. Los datos se presentan como media ± desvío estándar (n=3). Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares. \*: p < 0,05.

**Por lo tanto, en la primera semana de infección con MMTV a través del amamantamiento se produce en las PPs un incremento en el porcentaje y número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Estas células muestran un aumento en la expresión de CTLA-4, CD45RB<sup>low</sup> e IL-10, como así también en la tasa proliferación celular.**

### C.1.3- Células regulatorias y células activadas en la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

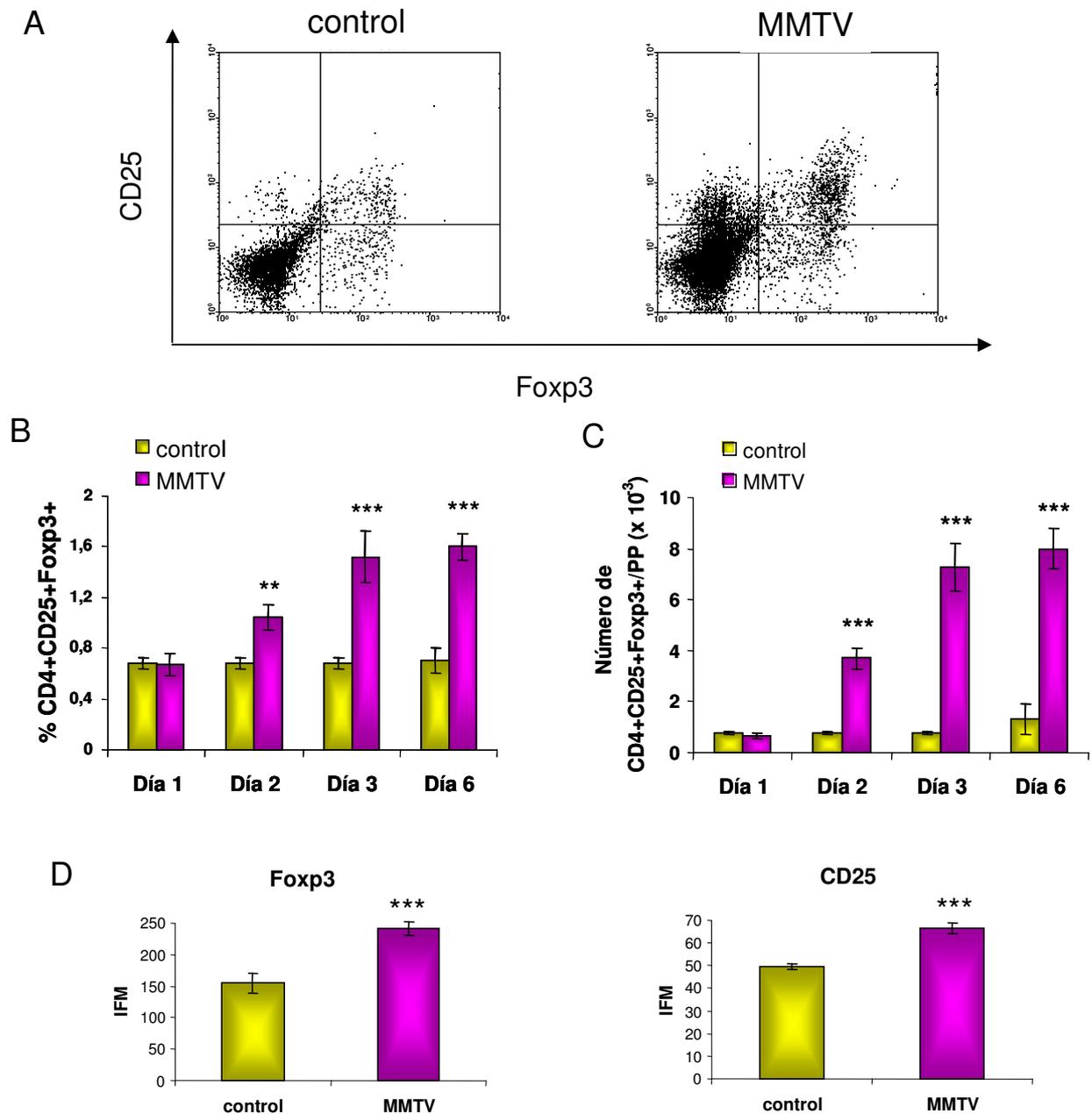
Como se mencionó en la Introducción, CD25 no es un marcador específico de las Tregs, sino que también es expresado transitoriamente por las células T activadas. En la actualidad, el marcador más selectivo de las Tregs es el factor de transcripción Foxp3, cuya expresión es requerida para el desarrollo de dichas células.

Estudiamos por RT-PCR la expresión de Foxp3 en las PPs de ratones control o infectados con MMTV. Como se observa en la **Figura 29**, la expresión de Foxp3 aumenta en las PPs luego de la infección.



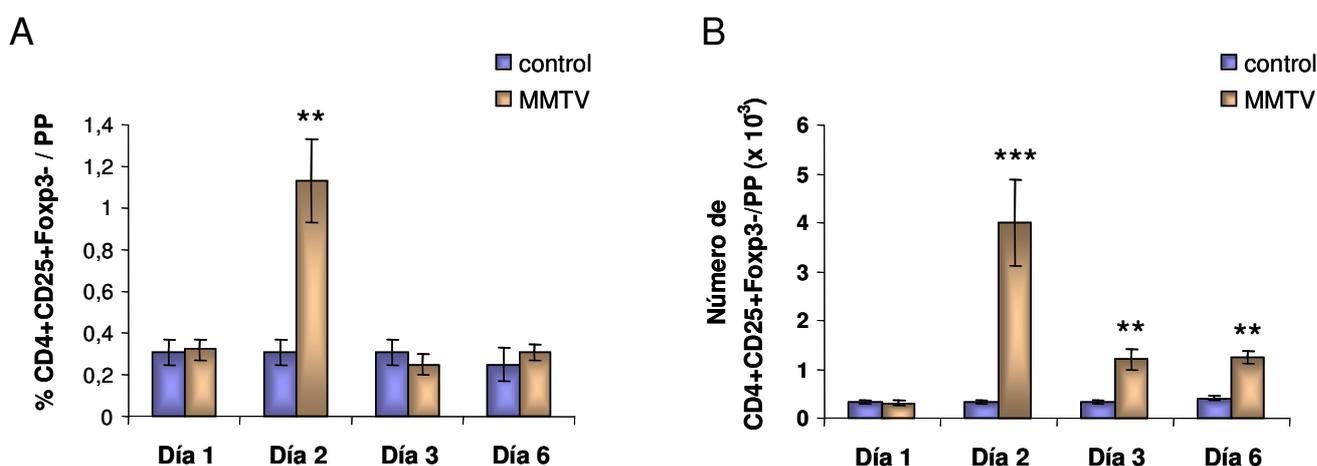
**Figura 29.** *Expresión de Foxp3 en las PPs de crías infectadas con MMTV.* Crías BALB/c fueron amamantadas 2 días con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). Luego se extrajo ARN de las PPs y se realizaron ensayos de RT-PCR para medir los niveles de expresión del factor de transcripción Foxp3. El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares.

Para estudiar la expresión de Foxp3 por citometría de flujo, realizamos una marcación simultánea de CD4 y CD25 de membrana y de Foxp3 intracelular en células totales de las PPs. El análisis muestra que el porcentaje y número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> aumenta progresivamente desde el segundo día de la infección (**Figura 30 A, B y C**). La intensidad de fluorescencia media por célula de CD25 y Foxp3 en las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> también se encuentra incrementada (**Figura 30 D**).



**Figura 30:** Expresión de CD4, CD25 y Fopx3 en las PPs en la primera semana de infección con MMTV. Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). A diferentes días se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD4 y CD25 (de superficie) y Fopx3 (intracelular). **A**) Dot plots representativos de la expresión de CD25 y Fopx3 en células CD4<sup>+</sup> al día 2 de infección. **B**) Porcentaje y **C**) Número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fopx3<sup>+</sup> en las PP a distintos días de infección. **D**) Intensidad de fluorescencia media de Fopx3 y CD25 en la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fopx3<sup>+</sup>. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=5). Se muestra un experimento representativo. \*\*: p < 0,01 y \*\*\*: p < 0,005 con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares.

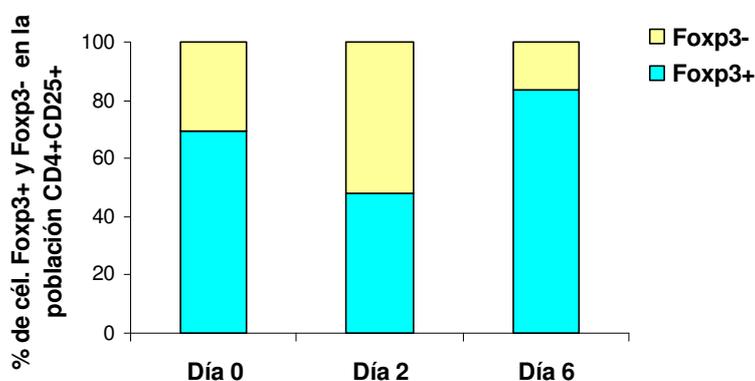
Esta tinción nos permitió distinguir entre células con fenotipo regulatorio ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) y células  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ , a las cuales llamaremos activadas o células con fenotipo activado. Como se observa en la **Figura 30 A**, el aumento de células  $CD4^+CD25^+$  inducido por el virus (**Figura 26**) ocurre tanto por un incremento en el porcentaje de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  como de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ . El porcentaje de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  se encuentra significativamente aumentado al día 2; desde el día 3 en adelante no se registran cambios significativos con respecto a los porcentajes observados en animales no infectados (**Figura 31 A**). El número absoluto de esta población llega a un máximo al día 2 y luego decrece significativamente, aunque continúa levemente aumentado con respecto al control (**Figura 31 B**).



**Figura 31:** Expresión de  $CD4$ ,  $CD25$  y  $Foxp3$  en las PPs en la primera semana de infección con MMTV (continuación). Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). A diferentes días se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores  $CD4$  y  $CD25$  (de superficie) y  $Foxp3$  (intracelular). **A**) Porcentaje y **B**) Número absoluto de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  en las PP a distintos días de infección. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar ( $n=5$ ). Se muestra un experimento representativo. \*\*:  $p < 0,01$  y \*\*\*:  $p < 0,005$  con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares.

Por lo tanto, a medida que avanza la infección se producen cambios en la composición de la población  $CD4^+CD25^+$  de las PPs en cuanto a la expresión de  $Foxp3$ . En la **Figura 32** se grafica la proporción de células  $Foxp3^+$  y  $Foxp3^-$  dentro del total de células  $CD4^+CD25^+$  durante los primeros días de infección con MMTV. Aunque al día 2 el 52% de las células  $CD4^+CD25^+$  son  $Foxp3^-$ , al día 6 de amamantamiento el porcentaje de

células  $CD4^+CD25^+$  que expresan Foxp3 es de 84%, valor significativamente mayor al 71% observado en ausencia de infección (día 0).

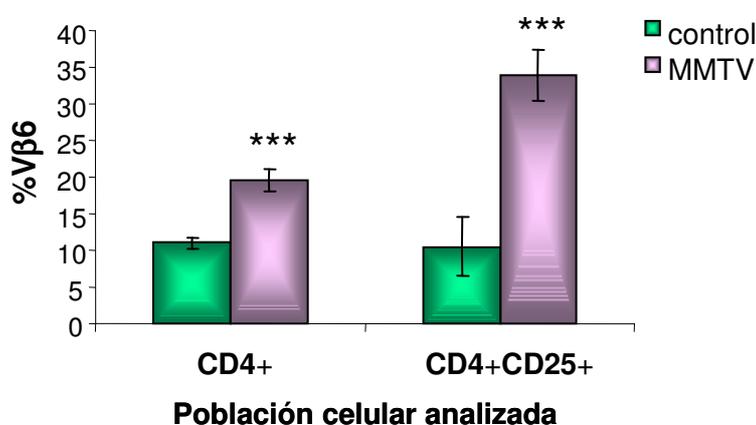


**Figura 32:** Porcentaje de células  $Fxp3^+$  y  $Fxp3^-$  dentro de la población  $CD4^+CD25^+$  a distintos días de infección con MMTV. Utilizando los datos de los experimentos mostrados en las figuras 32 y 33 se realizó este gráfico para esquematizar la variación en la composición de la población  $CD4^+CD25^+$  con respecto a la expresión de Fxp3, desde el día 0 (no infectado) hasta el día 6.

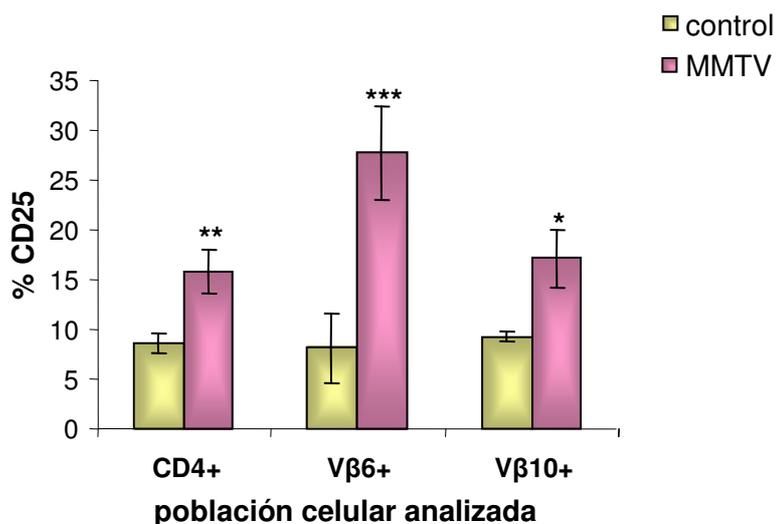
En conjunto, estos resultados muestran que la población de células  $CD4^+CD25^+$  que aumenta durante la infección con MMTV está compuesta por células que presentan un fenotipo de activación ( $CD4^+CD25^+Fxp3^-$ ) o un fenotipo de célula regulatoria ( $CD4^+CD25^+Fxp3^+$ ). La proporción de estas subpoblaciones varía con el tiempo de infección: el número y el porcentaje de células activadas hacen un pico al día 2 y bajan drásticamente a partir del día 3, mientras que las células con fenotipo regulatorio aumentan progresivamente desde el segundo día de infección hasta, al menos, el día 6.

### C.1.4- Especificidad superantigénica de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

La respuesta al superantígeno viral se produce en forma temprana en la infección y se detecta como un aumento en el porcentaje de clones T V $\beta$  específicos reactivos al mismo<sup>20</sup>. En base a este antecedente, investigamos si las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs de ratones amamantados 2 días con una nodriza infectada son reactivas al superantígeno del MMTV(LA). El análisis por citometría de flujo muestra que el porcentaje de células V $\beta$ 6<sup>+</sup> se encuentra muy aumentado dentro de la subpoblación CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en las crías infectadas y este incremento es significativamente mayor que el observado en la población CD4<sup>+</sup> total. (**Figura 33**). Por otro lado, se observa un incremento en el porcentaje de células CD25<sup>+</sup> dentro de la subpoblación CD4<sup>+</sup>V $\beta$ 6<sup>+</sup> (**Figura 34**) y este aumento es notablemente mayor que el observado en la población CD4<sup>+</sup> total o dentro de la subpoblación CD4<sup>+</sup>V $\beta$ 10<sup>+</sup>, no reactiva al superantígeno (**Figura 34**).

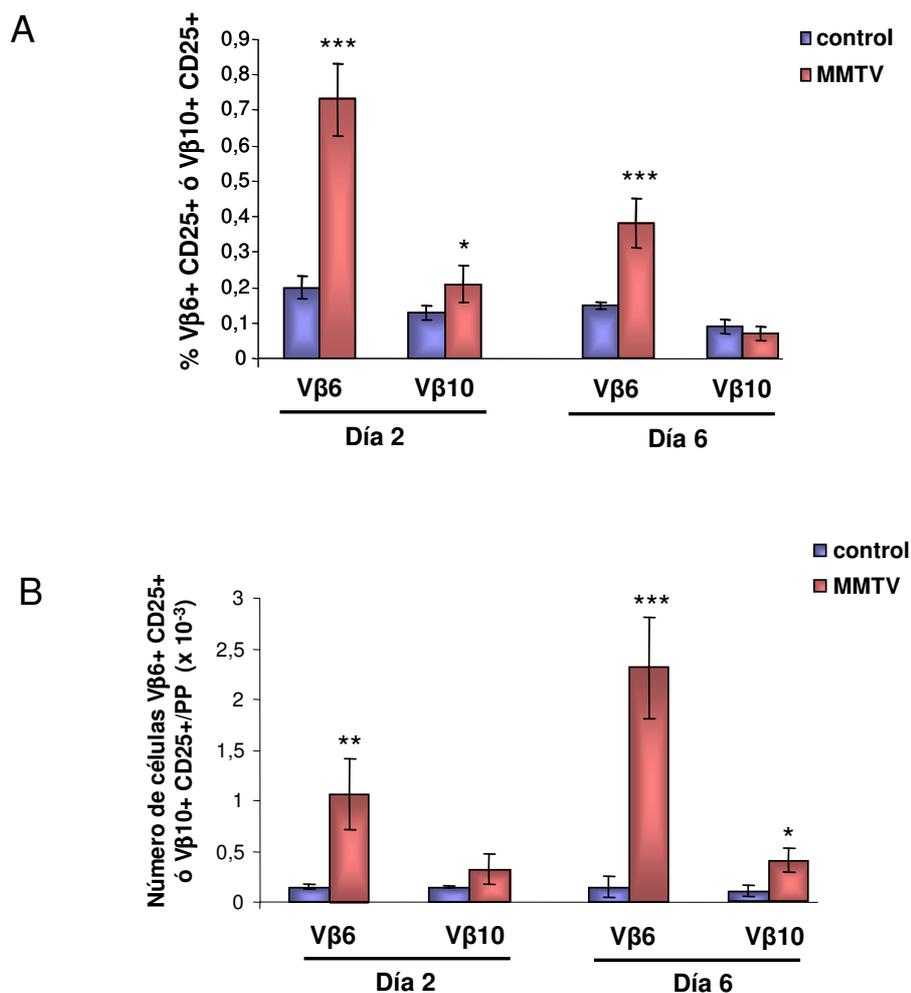


**Figura 33:** Expresión de V $\beta$ 6 en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs. Crías BALB/c fueron amamantadas 2 días con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). Luego se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de CD4, CD25 y V $\beta$ 6. Los datos representan el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que expresan V $\beta$ 6 al día 2 de infección y se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=4). Se muestra un experimento representativo. \*\*\*: p< 0,005 con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.



**Figura 34:** Expresión de CD25 en las poblaciones CD4<sup>+</sup>, Vβ6<sup>+</sup> y Vβ10<sup>+</sup> de las PPs. Crías BALB/c fueron amamantadas 2 días con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA) Luego se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de CD4, CD25, Vβ6 y Vβ10. Los datos representan el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>, Vβ6<sup>+</sup> o Vβ10<sup>+</sup> que expresan CD25 al día 2 de infección y se expresan como la media ± desvío estándar (n=4). Se muestra un experimento representativo. \*:p< 0,05; \*\*: p< 0,01; \*\*\*: p< 0,005 con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

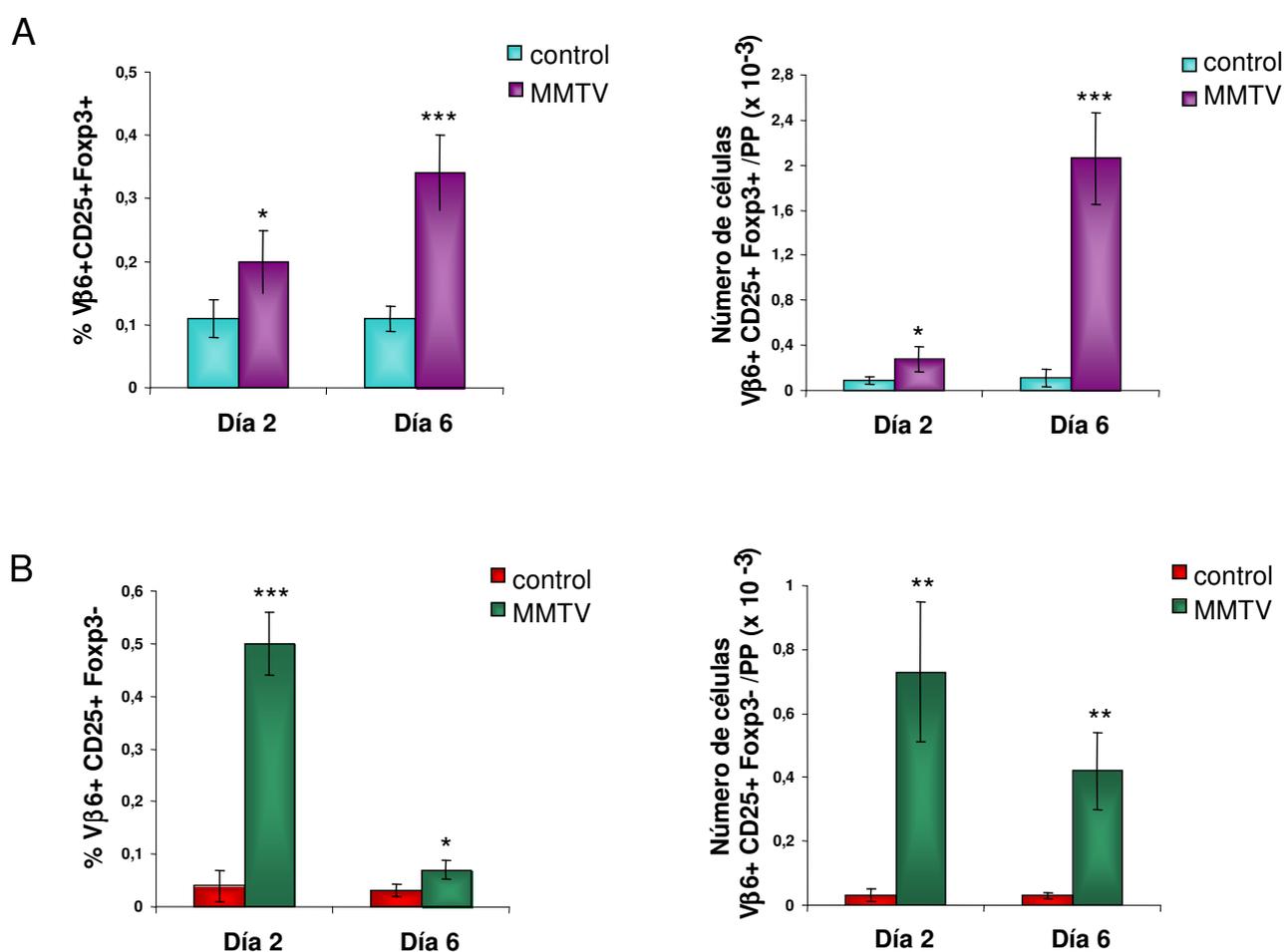
Al igual que lo observado para la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, el porcentaje y número absoluto de las células Vβ6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> varían con los días de infección durante el período estudiado (primera semana de infección) (**Figura 35**). El porcentaje de células Vβ6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> llega a un máximo al día 2 y luego decrece, aunque continúa significativamente aumentado (**Figura 35 A**), mientras que el porcentaje de células Vβ10<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (no respondedoras al Sag viral) sólo muestra un leve pero significativo aumento al día 2 (probablemente debido a un estado de activación no específica en las PPs), volviendo a los valores basales al día 6. En cuanto al número absoluto de células Vβ6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, éste aumenta progresivamente desde el día 2 (**Figura 35 B**). Aunque el número absoluto de células Vβ10<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> también aumenta con los días de infección, el incremento es mucho más leve que el observado para las células Vβ6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y es hipotéticamente atribuible a un aumento en el número de células CD4<sup>+</sup> totales que se produce durante la infección.



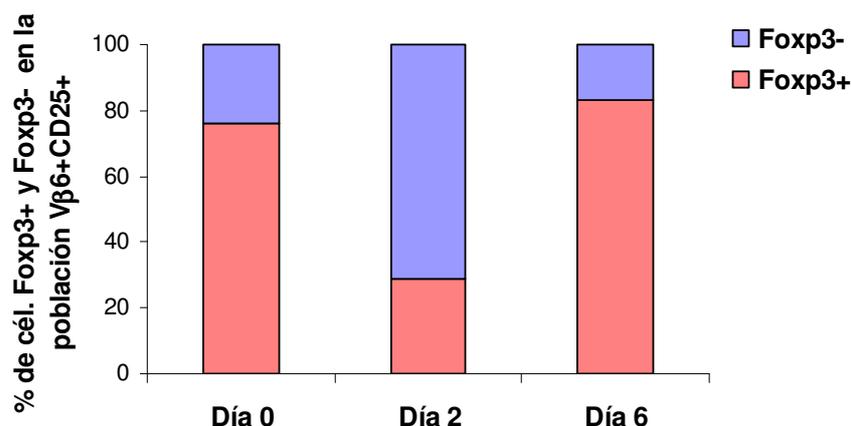
**Figura 35:** Especificidad superantigénica de la población  $CD25^+$  de las PP durante la infección con MMTV. Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). A distintos tiempos se extrajeron las PP y se midió por citometría de flujo la expresión de CD25,  $V\beta 6$  y  $V\beta 10$ . **A)** Porcentaje y **B)** número absoluto de células  $V\beta 6^+CD25^+$  o  $V\beta 10^+CD25^+$  a los días 2 y 6 de infección. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=4). Se muestra un experimento representativo. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$  con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó tres veces con resultados similares.

Dado que las células  $V\beta 6^+$  están siendo directamente estimuladas por el superantígeno y que CD25 es también un marcador de activación linfocitaria, estudiamos la expresión de Foxp3 en las células  $V\beta 6^+CD25^+$ , para definir si el gran aumento en el porcentaje de estas células observado a partir del segundo día de infección se debe a un aumento en las células activadas (Foxp3<sup>-</sup>), en las células regulatorias (Foxp3<sup>+</sup>) o en ambas. Los resultados mostrados en la **Figura 36**, indican que al día 2 se produce un aumento en ambas poblaciones, aunque el incremento en la población de células activadas

( $V\beta6^+CD25^+Foxp3^-$ ) es mucho mayor que el observado en las células Treg ( $V\beta6^+CD25^+Foxp3^+$ ). Al día 6 de infección, el porcentaje y número absoluto de células  $V\beta6^+CD25^+Foxp3^+$  están aumentados con respecto a los valores del día 2 mientras que las células  $V\beta6^+CD25^+Foxp3^-$  están disminuidas (**Figura 36**). En la **Figura 37** se grafica como varía la composición de la población  $V\beta6^+CD25^+$  durante la infección con MMTV. Se observa un patrón similar al de las células  $CD4^+CD25^+$  (**Figura 32**). En crías no infectadas (día 0) el 75% de las células  $V\beta6^+CD25^+$  son  $Foxp3^+$ ; al día 2 sólo un 29% son  $Foxp3^+$  y al día 6 las células  $Foxp3^+$  constituyen un 84% de la población  $V\beta6^+CD25^+$ .



**Figura 36:** Expresión de  $V\beta6$ ,  $CD25$  y  $Foxp3$  en las PPs en la primera semana de infección con MMTV. Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas (control) o infectadas con MMTV(LA). A distintos tiempos se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores  $V\beta6$  y  $CD25$  (de superficie) y  $Foxp3$  (intracelular). **A**) Porcentaje y número absoluto de células  $V\beta6^+CD25^+Foxp3^+$  en las PP a distintos días de infección. **B**) Porcentaje y número absoluto de células  $V\beta6^+CD25^+Foxp3^-$  en las PP a distintos días de infección. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=5). Se muestra un experimento representativo. \*\*:  $p < 0,01$  y \*\*\*:  $p < 0,005$  con respecto al valor basal (control). El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares.



**Figura 37:** Porcentaje de células *Foxp3*<sup>+</sup> y *Foxp3*<sup>-</sup> dentro de la población *Vβ6*<sup>+</sup>*CD25*<sup>+</sup> a distintos días de infección con MMTV. Utilizando los datos de los experimentos mostrados en la figuras 38 (A y B) se realizó este gráfico para esquematizar la variación en la composición de la población *Vβ6*<sup>+</sup>*CD25*<sup>+</sup> con respecto a la expresión de *Foxp3*, entre el día 0 (no infectado) y el día 6.

Por otro lado, observamos que dentro de la población *Vβ6*<sup>+</sup> no sólo se encuentran aumentadas las células *Foxp3*<sup>+</sup>*CD25*<sup>+</sup> sino también las *Foxp3*<sup>+</sup>*CD25*<sup>-</sup> (**Tabla 3**). Esta última población celular ha sido recientemente descrita como un reservorio de células Treg en la periferia<sup>372</sup>. Los aumentos en ambas subpoblaciones de células *Foxp3*<sup>+</sup> producen un notable aumento progresivo en el porcentaje de células *Foxp3*<sup>+</sup> totales dentro de la población *Vβ6*<sup>+</sup> (**Tabla 3**). Mientras que en las crías no infectadas el 8 % de las células reactivas al Sag son *Foxp3*<sup>+</sup>, este porcentaje se ve aumentado al día 6 de infección (14%), y llega al 31% al día 15.

**En conjunto, estos resultados muestran que una parte importante de las células *CD4*<sup>+</sup>*CD25*<sup>+</sup> inducidas por el MMTV poseen especificidad superantigénica, y que esta especificidad se observa tanto en las células *CD25*<sup>+</sup> activadas como en aquéllas con fenotipo regulatorio. Además, a medida que avanza la infección aumenta progresivamente el porcentaje de células respondedoras al Sag con fenotipo regulatorio.**

**Tabla 3:** Porcentaje de células  $Foxp3^+$  dentro de la población  $V\beta6^+$ 

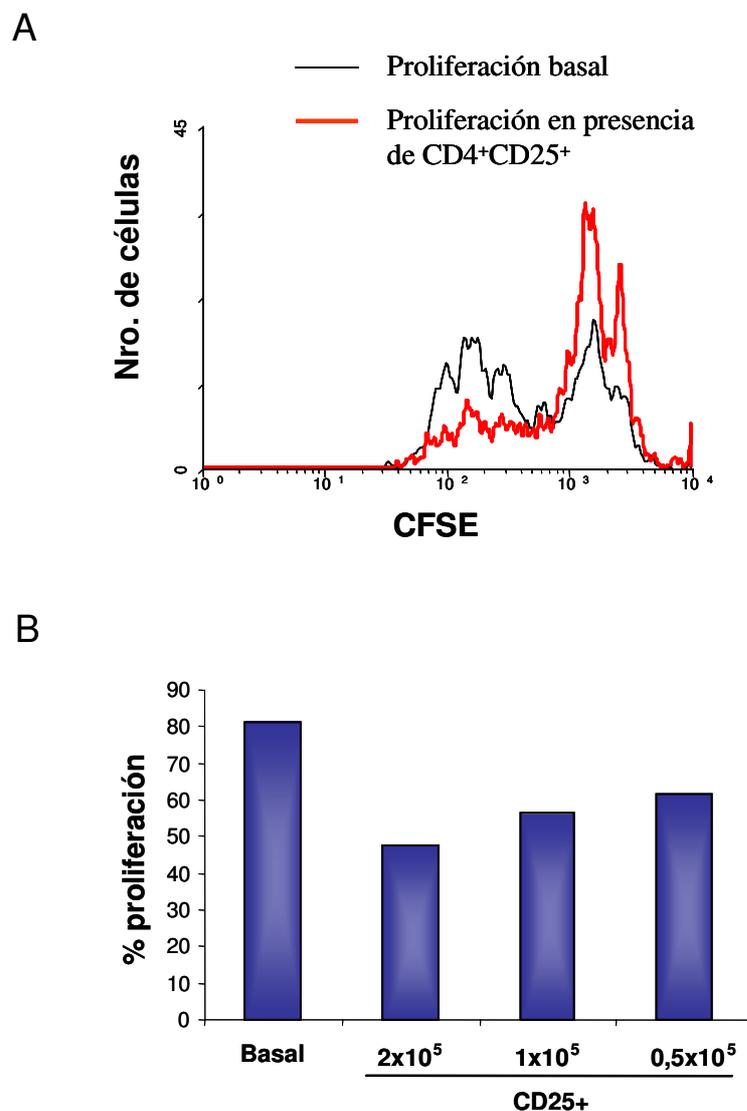
	% $Foxp3^+/V\beta6^+$	% $Foxp3^+CD25^+/V\beta6^+$	% $Foxp3^+CD25^-/V\beta6^+$
No infectados	8,39 ± 0,64	4,05 ± 0,44	4,45 ± 0,39
MMTV Día 6	14,12 ± 1,39 **	6,72 ± 0,85 **	7,4 ± 0,86 **
MMTV Día 15	31,36 ± 2,97 **	12,15 ± 2.1 **	19,21 ± 1,12 **

Crías BALB/c fueron amamantadas con hembras no infectadas o infectadas con MMTV(LA). A distintos tiempos se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores  $V\beta6$  y  $CD25$  (de superficie) y  $Foxp3$  (intracelular). Los datos se expresan como la media ± desvío estándar (n=4). Se muestra un experimento representativo. \*\*: p< 0,01 con respecto al valor basal (no infectados).El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares.

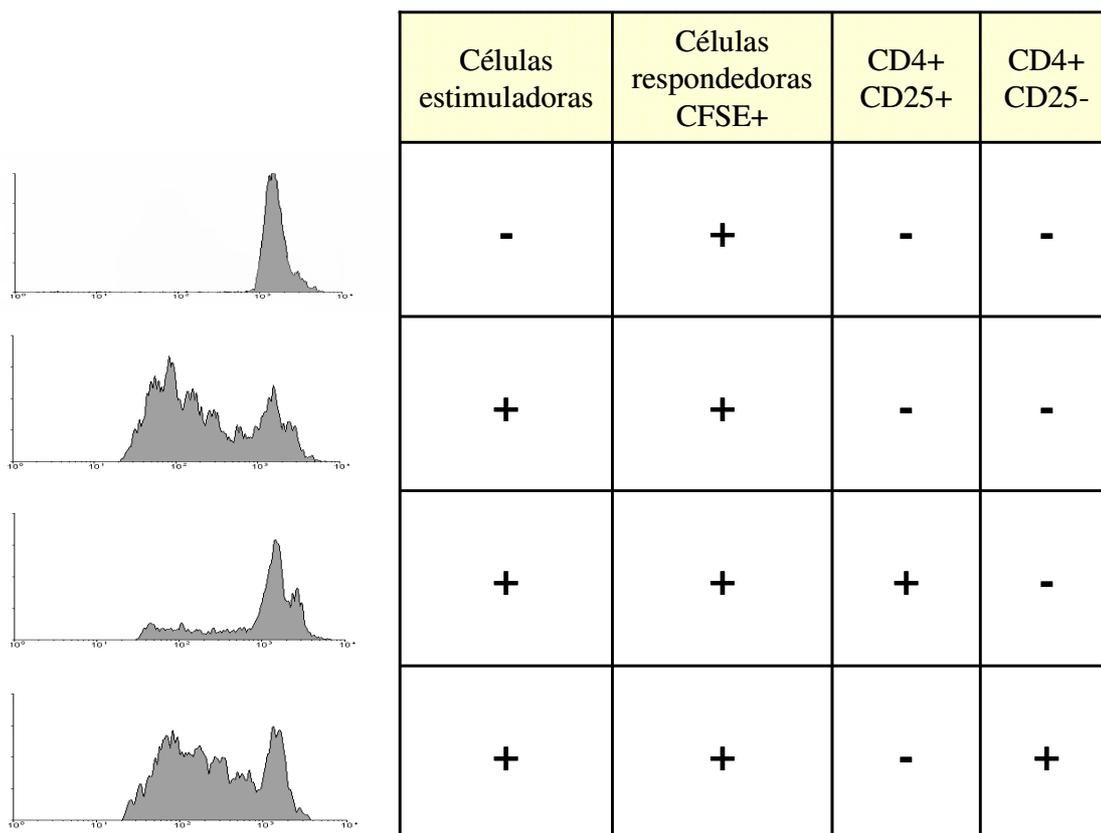
### C.1.5- Capacidad inmunosupresora de las células $CD4^+CD25^+$ de las PPs

Para determinar si la población  $CD4^+CD25^+$  que aumenta en las PPs por la infección con MMTV posee funciones inmunorregulatorias, purificamos por separación magnética células  $CD4^+CD25^+$  de PPs de crías infectadas durante 6 días con MMTV(LA) y estudiamos su capacidad supresora en un cultivo mixto linfocitario. La purificación de las células  $CD4^+CD25^+$  se realizó al día 6 de infección ya que en este día la mayor parte de esta población es  $Foxp3^+$  (**Figura 32**). Para este experimento, células de ganglio linfático de ratones BALB/c fueron marcadas con CFSE y cocultivadas con células mononucleares de bazo de ratones AKR pretratadas con mitomicina. Al cocultivo se agregaron, desde el comienzo, células  $CD4^+CD25^+$  o  $CD4^+CD25^-$  obtenidas de PPs de crías infectadas con MMTV (6 días de amamantamiento), en distintas proporciones. Luego de 3 días de cultivo la división de las células  $CD4^+$  fue analizada por dilución del CFSE. La **Figura 38 A** ilustra un perfil representativo de la inhibición causada en el cultivo mixto por el agregado

de  $CD4^+CD25^+$ . El porcentaje de inhibición se vio incrementado al aumentar el número de células regulatorias agregadas al cultivo (**Figura 38 B**). Las células  $CD4^+CD25^-$  no tuvieron ningún efecto o sólo un efecto menor sobre la proliferación (**Figura 39**).

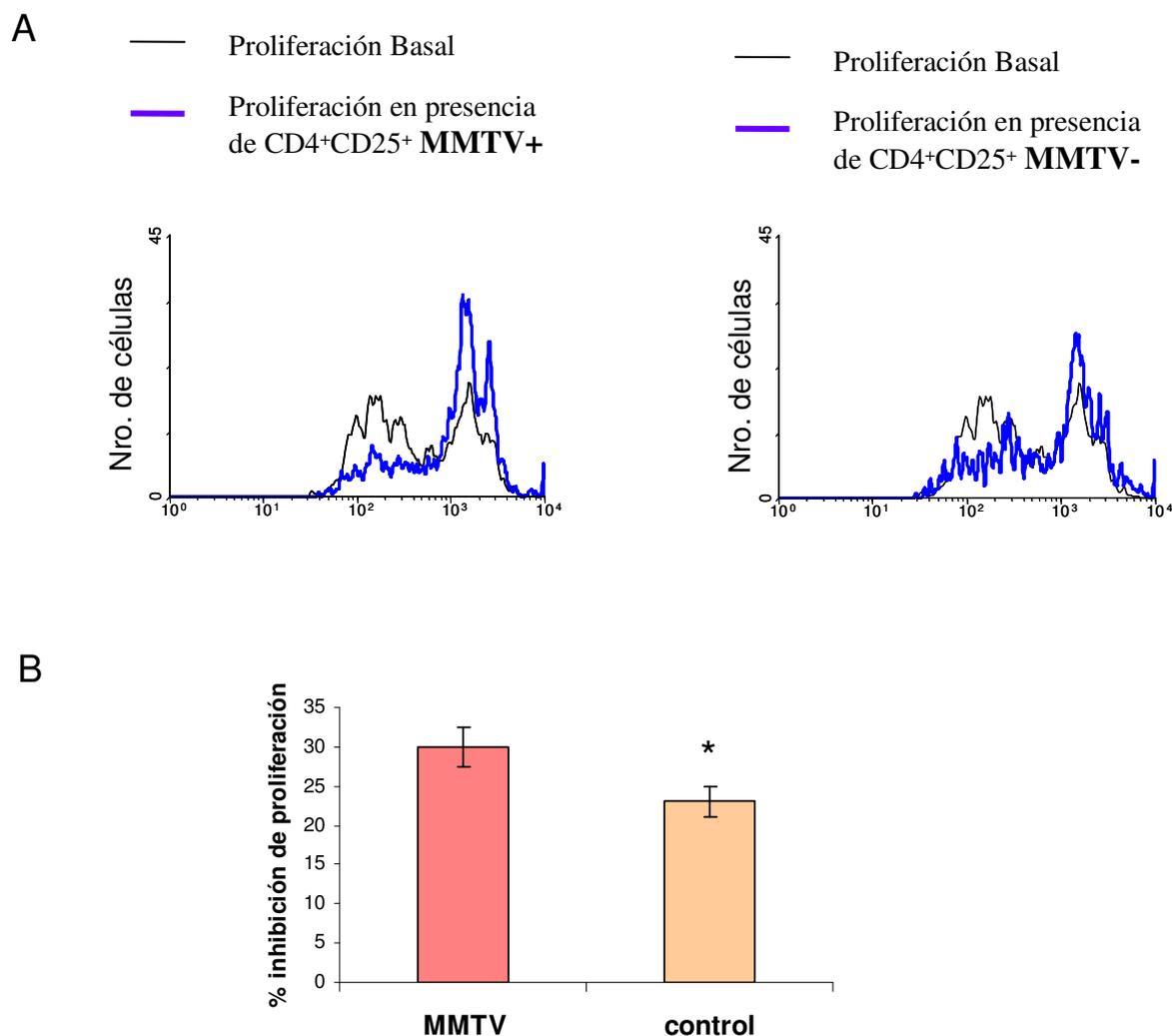


**Figura 38:** Actividad inmunosupresora de células  $CD4^+CD25^+$  de PPs de crías infectadas con MMTV. Se realizó un cultivo mixto linfocitario como se describe en materiales y métodos ( $2 \times 10^5$  células presentadoras AKR +  $2 \times 10^5$  células  $CD4^+$  respondedoras BALB/c marcadas con CFSE), al cual se agregaron células  $CD4^+CD25^+$  purificadas de PPs de crías BALB/c infectadas 6 días con MMTV(LA). La proliferación se evaluó por citometría de flujo como la pérdida de intensidad del colorante CFSE en las células  $CD4^+$  respondedoras. **A)** Histograma representativo de la proliferación basal versus la proliferación en presencia de  $10^5$  células  $CD4^+CD25^+$ . **B)** Porcentaje de proliferación en presencia de distintas cantidades de células  $CD4^+CD25^+$ . Se muestra un experimento representativo de 3.



**Figura 39:** Efecto de células  $CD4^+CD25^+$  y  $CD4^+CD25^-$  de PPs en un cultivo mixto linfocitario. Se realizó un cultivo mixto linfocitario como se describe en materiales y métodos ( $2 \times 10^5$  células presentadoras AKR +  $2 \times 10^5$  células respondedoras BALB/c marcadas con CFSE), al cual se agregaron  $1 \times 10^5$  células  $CD4^+CD25^+$  purificadas de PPs de crías BALB/c infectadas 6 días con MMTV(LA). La proliferación se evaluó por citometría de flujo como la pérdida de intensidad del colorante CFSE en las células  $CD4^+$  respondedoras. Se muestra un experimento representativo de 3.

Con el objeto de estudiar si la infección con MMTV aumenta la capacidad regulatoria de las células  $CD4^+CD25^+$  de las PPs, comparamos la inhibición causada en un cultivo mixto por el agregado de igual número de células  $CD4^+CD25^+$  de PPs de crías infectadas y no infectadas. Como se observa en la **Figura 40**, las células  $CD4^+CD25^+$  purificadas de animales infectados 6 días poseen una mayor capacidad inhibitoria de la proliferación que aquellas obtenidas de animales no infectados de la misma edad.

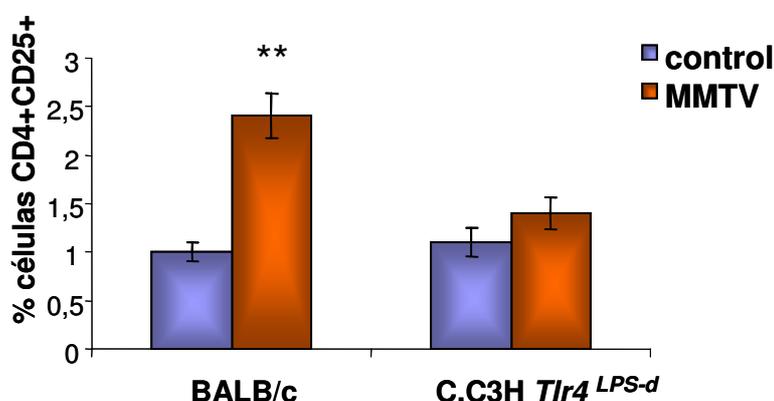


**Figura 40:** Comparación de la actividad inmunosupresora de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de ratones no infectados e infectados con MMTV. Se realizó un cultivo mixto linfocitario como se describe en materiales y métodos ( $2 \times 10^5$  células presentadoras AKR +  $2 \times 10^5$  células respondedoras BALB/c marcadas con CFSE), al cual se agregaron  $1 \times 10^5$  células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificadas de PPs de crías BALB/c no infectadas (control) o infectadas 6 días con MMTV(LA). La proliferación se evaluó por citometría de flujo como la pérdida de intensidad del colorante CFSE en las células CD4<sup>+</sup> respondedoras. **A)** Histogramas representativos de la proliferación basal versus la proliferación en presencia de  $1 \times 10^5$  células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. **B)** Porcentaje de proliferación en presencia de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. \*:  $p < 0,05$  Se muestra un experimento representativo de 3.

Por lo tanto, la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs de ratones infectados con MMTV posee actividad inmunosupresora, y esta actividad es mayor que la observada en células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de animales no infectados de la misma edad.

C.2- ROL DEL TLR4 EN EL AUMENTO DE CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> INDUCIDO POR EL MMTV

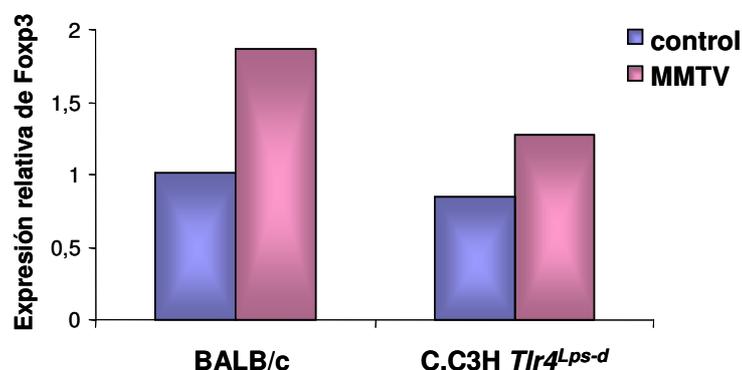
Con el objeto de estudiar si la presencia de un TLR4 funcional influye en el aumento en el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en las PPs, comparamos el porcentaje de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en PPs de crías BALB/c y C.C3H *Tlr4*<sup>Lps-d</sup> (los cuales expresan un TLR4 no funcional) amamantadas 2 días con una nodriza libre de virus o con una nodriza infectada con MMTV(LA). Contrariamente a lo observado en los ratones BALB/c, que expresan un TLR4 normal, la infección con MMTV no produjo cambios significativos en el porcentaje de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en los animales C.C3H *Tlr4*<sup>Lps-d</sup> (**Figura 41**).



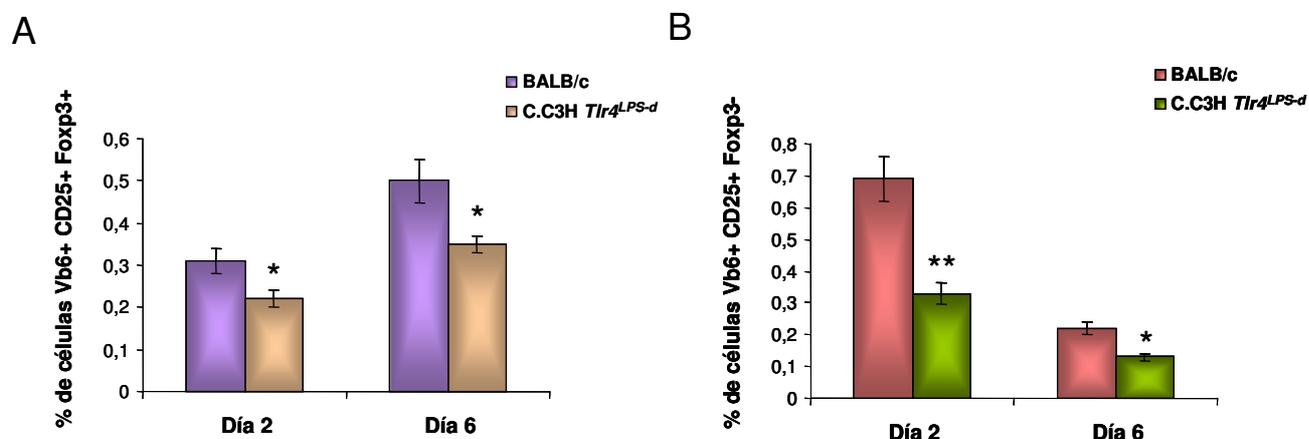
**Figura 41:** Expresión de CD4 y CD25 en las PPs de crías BALB/c y C.C3H *Tlr4*<sup>LPS-d</sup> infectadas con MMTV. Crías BALB/c y C.C3H *Tlr4*<sup>LPS-d</sup> fueron amamantadas con hembras no infectadas o infectadas con MMTV(LA) durante 2 días. Luego se extrajeron las PPs y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD4 y CD25. Se grafica el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/PP. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=3). Se muestra un experimento representativo. \*\*: p < 0,01 con respecto al valor de BALB/c en el día analizado. El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares.

Mediante ensayos de RT-PCR comparamos la expresión de Foxp3 en las PPs de crías BALB/c y C.C3H *Tlr4*<sup>Lps-d</sup>. Observamos que en los ratones mutantes para TLR4 el aumento en la expresión de Foxp3 inducido por el MMTV es menor (**Figura 42**). Luego estudiamos por citofluorometría los aumentos inducidos por el MMTV en la población V $\beta$ 6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> de las PPs de ambas cepas de ratones. Como se muestra en la **Figura 43 A**, el incremento en el porcentaje de células V $\beta$ 6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> fue significativamente menor en las crías C.C3H *Tlr4*<sup>Lps-d</sup> que en las crías BALB/c, tanto al día 2 como al día 6 de

infección. Por otro lado, el aumento en el porcentaje de células  $V\beta6^+CD25^+Foxp3^-$  también fue menor en los ratones C.C3H  $Tlr4^{Lps-d}$  (Figura 43 B).



**Figura 42:** Efecto del MMTV sobre los niveles de expresión de *Foxp3* en ratones deficientes en *TLR4*. Crías BALB/c y C.C3H  $Tlr4^{LPS-d}$  fueron amamantadas con hembras no infectadas o infectadas con MMTV(LA) durante 2 días. Luego se extrajo ARN de las PP y se realizaron ensayos de RT-PCR para medir los niveles de expresión de *Foxp3* y  $\beta$ -actina. Se graficó la expresión relativa de *Foxp3* con respecto a la expresión de  $\beta$ -actina de la misma muestra. Se muestra un experimento representativo de tres, en los que se obtuvieron resultados similares.



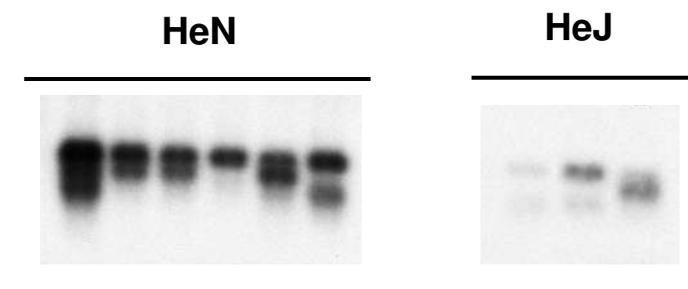
**Figura 43:** Expresión de  $V\beta6$ , *CD25* y *Foxp3* en las PP en crías BALB/c y C.C3H  $Tlr4^{LPS-d}$  infectadas con MMTV. Crías BALB/c y C.C3H  $Tlr4^{LPS-d}$  fueron amamantadas con hembras no infectadas o infectadas con MMTV(LA) a distintos tiempos. Luego se extrajeron las PP y se midió por citometría de flujo la expresión de los marcadores  $V\beta6$  y *CD25* (de superficie) y *Foxp3* (intracelular). Dado que en todos los casos los valores basales (sin infección) de ambas cepas de ratón fueron similares, estos valores fueron omitidos del gráfico y sólo se muestran los valores obtenidos en los ratones infectados A) Porcentaje de células  $V\beta6^+CD25^+Foxp3^+$  en las PP a distintos días de infección. B) Porcentaje de células  $V\beta6^+CD25^+Foxp3^-$  en las PP a distintos días de infección. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (n=5). Se muestra un experimento representativo. \*:  $p < 0,05$  y \*\*:  $p < 0,01$  con respecto al valor de BALB/c en el día analizado. El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares.

**Estos resultados muestran que, en ausencia de un TLR4 funcional, los aumentos inducidos por el MMTV en células T reactivas al Sag con fenotipos de activación y regulatorio son significativamente menores.**

#### D. INFECCIÓN CON MMTV EN RATONES DEFICIENTES PARA TLR4

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que importantes eventos ocurridos durante las primeras etapas de la infección con MMTV dependen de la presencia de un TLR4 funcional. La combinación de estos eventos afectará en última instancia el resultado de la infección.

Para evaluar las consecuencias de la falta de un TLR4 funcional en la infección con MMTV, estudiamos los niveles de integración viral en ratones C3H/HeN (salvajes) y C3H/HeJ (deficientes para TLR4). Crías C3H/HeN y C3H/HeJ fueron amamantadas desde su nacimiento con hembras infectadas con MMTV. Luego de tres semanas se realizaron ensayos de PCR radioactiva para determinar los niveles de integración del virus en el bazo de estos ratones. Como se observa en la **Figura 44**, los ratones C3H/HeJ muestran una disminución muy marcada en la infección con MMTV con respecto a los ratones C3H/HeN.



**Figura 44:** *Infección con MMTV en ratones deficientes en TLR4.* Crías BALB/c y C.C3H *Tlr4*<sup>LPS-d</sup> fueron amamantadas con hembras no infectadas o infectadas con MMTV(LA) durante 21 días. Luego se extrajo ADN del bazo y se realizaron ensayos de PCR radioactiva para medir los niveles integración viral en el genoma celular. Se muestra un experimento representativo de tres.

**Estos resultados demuestran que la presencia de un TLR4 funcional aumenta los niveles de infección alcanzados por el MMTV.**

## DISCUSIÓN

---

La interacción entre el sistema inmune del huésped y los patógenos es un proceso único y muy complejo. Numerosos tipos celulares y moléculas pueden participar en la respuesta inmune, la cual también es influenciada por características propias del patógeno, como la vía de entrada al organismo, la expresión de factores de virulencia y los mecanismos de evasión de la respuesta inmune. En el caso del MMTV, su relación con el sistema inmune es aun más compleja, ya que este virus utiliza al sistema inmune para completar su ciclo de infección. La interacción entre el MMTV y el sistema inmune adaptativo es necesaria para el establecimiento de la infección, la amplificación del reservorio viral y la llegada del virus a la glándula mamaria.

Durante mucho tiempo el estudio de la infección con MMTV se ha centrado en el rol del superantígeno (Sag) viral y en la respuesta T que éste genera, y se ha demostrado la importancia del Sag para que ocurra una infección eficiente. Los eventos inmediatos ocurridos luego de la entrada del MMTV al organismo, antes de la respuesta T al Sag viral, y la participación de otros tipos celulares del sistema inmune han sido poco estudiados. En este trabajo hemos investigado la participación de otros componentes moleculares y celulares del sistema inmune -los receptores de tipo Toll, las células dendríticas y las células T regulatorias  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  durante la infección con MMTV, y hemos evaluado las consecuencias de la interacción del MMTV con receptores de tipo Toll sobre los niveles de infección.

Generalmente se considera que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son los principales TLRs que reconocen PAMPs de origen viral (en este caso ácidos nucleicos)<sup>373</sup>. Sin embargo, algunos trabajos describen la interacción entre proteínas virales y otros TLRs. Se ha demostrado que la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial estimula la producción de IL-6 en monocitos a través del TLR4<sup>65</sup> y que el virus Coxsackie es reconocido por el TLR4 disparando una respuesta inflamatoria<sup>374</sup>. Otros virus y componentes virales son reconocidos por el TLR2, como por ejemplo la proteína hemaglutinina del virus del sarampión<sup>375</sup> y el citomegalovirus humano<sup>376</sup>. Durante la realización del presente trabajo, Rassa y colaboradores demostraron por ensayos de transfección y coimmunoprecipitación que la proteínas de la envoltura del virus de la leucemia murina de Moloney y del MMTV son capaces de unirse al TLR4<sup>67</sup>. La proteína de la envoltura del MMTV también es capaz de unirse al TLR2<sup>370</sup>. Sin embargo, es escasa

la información acerca de las consecuencias de la interacción del MMTV con estos TLRs en la infección viral.

Como primer modelo de estudio para determinar el rol de los receptores de tipo Toll (TLRs) en etapas tempranas de la infección con MMTV, se infectaron animales adultos previamente tolerizados con ligandos de TLR4 y TLR2. El fenómeno de tolerancia al LPS ha sido largamente estudiado y consiste en un estado de hiporrespuesta celular al LPS generado por una exposición previa a bajas dosis de este compuesto<sup>377,378</sup>. Entre otras consecuencias, la tolerancia al LPS se asocia con una producción disminuida de citoquinas proinflamatorias ante un nuevo desafío con LPS<sup>377,378</sup>. Este fenómeno se observa tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>379-381</sup> y puede ocurrir por la disminución de la expresión del TLR4 de superficie o por alteraciones en la vía de señalización del LPS<sup>362,382</sup> como por ejemplo un aumento en la degradación de IRAK, una disminución en la asociación entre MyD88 e IRAK o una menor transactivación de genes por AP-1 y NFκB<sup>362</sup>. Se ha reportado que el tratamiento con ligandos del TLR2<sup>383,384</sup>, TLR5<sup>131</sup> o TLR9<sup>385</sup> también inducen tolerancia ante una nueva exposición al mismo ligando. Se ha demostrado, además, que las células tolerizadas con un ligando de un determinado TLR también resultan tolerantes a otros ligandos del mismo TLR<sup>364</sup>. Por otro lado, numerosos trabajos han reportado el fenómeno de tolerancia cruzada, que consiste en la generación de un estado de refractariedad a un ligando de un determinado TLR mediante la exposición previa a un ligando de otro TLR<sup>363</sup>. La tolerancia cruzada ocurre *in vitro* e *in vivo*<sup>363</sup> y se produciría por la inactivación de vías de señalización intracelular compartidas por ambos TLRs<sup>80,364,365</sup>. En cuanto al TLR4 y el TLR2, se ha descrito que existe tolerancia cruzada generada por ligandos del TLR4 sobre el TLR2 y por ligandos del TLR2 sobre el TLR4<sup>80,363,383,386</sup>, aunque en este último caso la tolerización generada no parece ser tan efectiva en algunas condiciones experimentales<sup>365,387</sup>.

Estudiamos entonces la infección con MMTV en ratones adultos tolerizados con LPS (ligando del TLR4) o PGN (ligando del TLR2). Demostramos que los ratones adultos tolerizados con LPS o PGN muestran una inhibición en la activación temprana de células B inducida por el MMTV. Los resultados obtenidos utilizando la variante viral TBLV, que posee una delección en el gen *sag* que impide su expresión, permitieron además establecer que la activación temprana de las células B no depende del Sag viral. Los animales tolerizados también mostraron una disminución en el tráfico de células B vírgenes al

ganglio drenante de la inoculación del virus y menores niveles de integración viral con respecto a animales no tolerizados. Debido a la existencia de tolerancia cruzada entre el TLR4 y el TLR2, los experimentos realizados hasta este punto no permiten discriminar si el MMTV interactúa con ambos TLRs o sólo con uno de ellos. **Estos resultados nos sugirieron que el TLR4 y/o el TLR2 estarían involucrados en las primeras etapas de la infección de animales adultos con MMTV, favoreciendo la misma.**

Los TLRs se expresan en muchas células del sistema inmune y también en otros tipos celulares<sup>52,120</sup>. Los experimentos de tolerización *in vivo* no permiten definir qué tipos celulares se ven afectados por las tolerizaciones ni cómo la presencia de células refractarias a la activación a través de los TLRs influye luego en la infección. A modo de ejemplo, la activación de células B inducida por el MMTV podría deberse a una interacción directa del virus con el TLR4 y/o TLR2 de estas células<sup>388</sup> y/o a un efecto indirecto, por acción del virus sobre otros tipos celulares que también expresen dichos TLRs, como por ejemplo las células dendríticas.

Las células dendríticas (DCs), importantes células presentadoras de antígeno (CPAs)<sup>389</sup>, expresan diversos TLRs en su superficie<sup>132</sup>. Debido a su localización estratégica en la mayoría de los tejidos periféricos, en particular en sitios de interfase con el medio ambiente, y a su capacidad para reconocer, capturar y ser activadas por diversos antígenos, las DCs cumplen un rol fundamental en la detección temprana de patógenos y en la coordinación de la respuesta inmune innata y adquirida<sup>138,141</sup>.

La participación de las DCs en la infección con MMTV no ha sido estudiada en profundidad hasta el momento. Continuamos nuestro trabajo con el estudio de la interacción entre el MMTV y las células dendríticas y la participación del TLR4 y el TLR2 en este proceso.

En primer lugar, estudiamos si el MMTV es capaz de interactuar *in vitro* con DCs derivadas de médula ósea (BMDCs). Luego de ser expuestas al virus, las BMDCs aumentan la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD80 y la secreción de citoquinas proinflamatorias, y muestran incrementos en los niveles de ARNm de varios genes de citoquinas y quemoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES y eotaxina). Este proceso de activación inducido por el MMTV es independiente de la infección viral, dado que el pretratamiento del virus con la droga AT-2 o luz UV no

bloquea los efectos del virus sobre las BMDCs. La activación de BMDCs inducida por el MMTV no es una respuesta específica de una sola cepa de ratones ni de una única cepa viral, ya que los resultados obtenidos utilizando BMDCs de ratones BALB/c fueron similares a los observados para las BMDCs de ratones C3H/HeN y no se observaron diferencias entre los efectos de dos variantes de MMTV [MMTV(LA) y MMTV(FM)]. **Los resultados obtenidos muestran que el MMTV es capaz de inducir la activación de las BMDCs en forma independiente de la expresión de genes virales<sup>390</sup>.**

Los ligandos del TLR4 inducen la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 en DCs, monocitos y macrófagos. Para evaluar si el TLR4 está involucrado en la producción de citoquinas inducida por el MMTV en las BMDCs, tolerizamos a estas células *in vitro* con LPS. Las BMDCs tolerizadas mostraron una menor producción de TNF- $\alpha$  en respuesta al MMTV(LA). **La baja respuesta de las BMDCs tolerizadas sugiere que el TLR4 participa en la activación de las DCs inducida por el MMTV<sup>390</sup>, aunque, como se señaló anteriormente, no puede descartarse la participación del TLR2 por efectos de tolerización cruzada.**

Para determinar en forma concluyente el rol del TLR4 utilizamos entonces BMDCs obtenidas de ratones C3H/HeJ (TLR4<sup>LPS-d</sup>/TLR4<sup>LPS-d</sup>). Esta cepa se diferencia de la cepa C3H/HeN (TLR4<sup>LPS-n</sup>/TLR4<sup>LPS-n</sup>) porque posee una mutación puntual en el gen que codifica para el TLR4<sup>54-56</sup>. Como consecuencia, los ratones C3H/HeJ expresan un TLR4 no funcional, incapaz de activar las vías de señalización intracelular<sup>56</sup>. Las BMDCs de ratones C3H/HeJ mostraron una gran disminución en el aumento de moléculas coestimuladoras inducido por el MMTV. Además, los aumentos en la producción de citoquinas proinflamatorias y en los niveles de ARNm de citoquinas y quemoquinas en las BMDCs de ratones C3H/HeJ fueron prácticamente nulos en las condiciones experimentales utilizadas. **La utilización de BMDCs que expresan un TLR4 no funcional muestra que el TLR4 cumple un rol fundamental en la activación de BMDCs inducida por el MMTV<sup>390</sup>.**

Para determinar si el MMTV es capaz de activar a las DCs también por interacción con el TLR2, trabajamos con BMDCs derivadas de ratones deficientes para este receptor (BMDCs TLR2<sup>-/-</sup>) e investigamos el efecto del MMTV sobre estas células. Las BMDCs TLR2<sup>-/-</sup> mostraron aumentos en la producción de citoquinas y en la expresión de moléculas coestimuladoras en respuesta al MMTV, aunque estos aumentos fueron significativamente

menores que los observados en las BMDCs salvajes. En cuanto a la expresión de genes de citoquinas y quemoquinas, medida por ensayos de RPA, observamos que para algunos genes (IL-6, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 y eotaxina) los aumentos inducidos por el MMTV en las BMDCs TLR2<sup>-/-</sup> fueron menores que los inducidos en las BMDCs control. Sin embargo, la expresión de otros genes inducidos por el virus, como TNF- $\alpha$ , RANTES e IP-10, no se vio afectada por la ausencia del TLR2. Se han reportado otros modelos en los cuales los ligandos de TLR4 y TLR2 inducen genes en forma diferencial. Re y colaboradores<sup>391</sup> demostraron que en DCs humanas la expresión de IP-10 es inducida por LPS pero no por PGN. En otro trabajo<sup>392</sup> realizado con macrófagos alveolares se muestra que el LPS induce la expresión de TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES y agonistas del TLR2 sólo inducen MIP-1 $\beta$ , mientras que en una línea celular macrofágica murina la producción de TNF- $\alpha$  es inducida tanto a través del TLR4 como del TLR2. En cambio, se ha reportado que el PGN aumenta la producción de TNF- $\alpha$  en DCs murinas<sup>367</sup>, indicando que los efectos de la unión de los ligandos a los TLRs no sólo dependen del tipo de TLR involucrado sino también del tipo celular y las condiciones experimentales utilizadas. **Los resultados obtenidos indican que el TLR2 está involucrado en la activación de las BMDCs inducida por el virus, aunque aparentemente en menor medida que el TLR4<sup>393</sup>.**

Hasta este punto nuestros resultados muestran que el MMTV puede activar a las BMDCs tanto a través del TLR4 como del TLR2. Para algunos de los parámetros medidos (por ejemplo la producción de citoquinas), la ausencia de un TLR4 funcional parece eliminar por completo los efectos del MMTV sobre la activación de las DCs *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos con células deficientes para TLR2 muestran que este receptor también participa en la activación de las DCs. La falta de efecto del MMTV sobre las BMDCs TLR4<sup>LPS-d</sup>/TLR4<sup>LPS-d</sup> podría deberse a las condiciones experimentales utilizadas. Alternativamente, estos resultados podrían explicarse considerando que algunos de los efectos del MMTV sobre las DCs podrían estar mediados por heterodímeros TLR4/TLR2. Se ha descrito que la capacidad del TLR2 para inducir activación celular depende de la formación de heterodímeros con los miembros de su subfamilia TLR1 y TLR6; no se ha reportado hasta el momento la existencia de homodímeros TLR2/TLR2. Recientemente el grupo de la Dra. Susan Ross en la Universidad de Pennsylvania ha sugerido la existencia de heterodímeros TLR4/TLR2 en ensayos de

coimmunoprecipitación<sup>370</sup>. Si el MMTV interactuara con el heterodímero TLR4/TLR2 y con el homodímero TLR4/TLR4, la ausencia del TLR2 sólo inhibiría parcialmente los efectos del MMTV sobre las DCs, mientras que la ausencia de un TLR4 funcional los inhibiría por completo.

**En este trabajo hemos demostrado que además de inducir la activación de BMDCs, el MMTV es capaz de inducir aumentos significativos en la expresión de su receptor de entrada a la célula, CD71<sup>390</sup>.** Estos aumentos son independientes de la expresión de genes virales. Cuando examinamos a las BMDCs de ratones C3H/HeJ, el incremento en la expresión de CD71 fue significativamente menor aunque, en las condiciones experimentales utilizadas, no se vio completamente inhibido. La utilización de ratones deficientes en TLR4 y TLR2 (criados en el bioterio de la Universidad de Pennsylvania) nos permitió determinar que en las BMDCs de estos ratones se anula por completo el aumento en la expresión de CD71 inducido por MMTV<sup>390</sup>. Correlacionando con este hecho, los niveles de infección en estas células fueron significativamente menores<sup>390</sup>. Se ha reportado que el virus del sarampión también utiliza como estrategia la inducción de un aumento en la expresión de su propio receptor, CD150, en este caso a través de su interacción con el TLR2 en monocitos<sup>375,394</sup>.

Se ha observado que durante la infección experimental con MMTV en ratones adultos (por inoculación en la almohadilla plantar) se produce un aumento significativo de DCs en el ganglio poplíteo drenante<sup>366</sup>. Este aumento es atribuido a un reclutamiento de precursores de DCs de la sangre, por un mecanismo dependiente de CD62L<sup>148</sup>. La mayor parte de los estudios acerca de la interacción entre el MMTV y el sistema inmune ha sido desarrollada mediante ensayos locales en huéspedes adultos, siendo escasa la información sobre dicha interacción cuando el virus es transmitido por leche al recién nacido. Investigamos entonces las alteraciones que se producen en las PPs, que constituyen el sitio de entrada del virus<sup>20</sup>, durante los primeros días de infección por amamantamiento.

En primer lugar, observamos que durante la infección natural por amamantamiento el MMTV produce un aumento en el porcentaje de DCs en las PPs, demostrando por primera vez que **la infección natural con MMTV afecta significativamente a la población de DCs en el sitio de entrada del virus<sup>390</sup>.** Por otro lado, el aumento en el número de DCs no se observa en ausencia de un TLR4 funcional. Por lo tanto, **el**

**incremento de DCs en las PPs muestra una dependencia del TLR4<sup>390</sup>.** Esto puede relacionarse con el hecho de que el MMTV induce en las DCs, a través de su interacción con TLR4, la producción de quemoquinas como MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4) y RANTES (CCL5), las cuales atraen DCs inmaduras hacia el sitio en el cual se encuentran los patógenos<sup>395,396</sup>. Sin embargo, estos experimentos no nos permiten concluir que el aumento en el porcentaje de DCs en las PPs se debe al tráfico de DCs o de precursores a este sitio, ya que podrían deberse además a eventos de proliferación. Aunque en general se considera que las DCs maduras son células de vida corta que no se dividen, es decir, células terminales de una vía de desarrollo<sup>397</sup>, se ha demostrado recientemente que células estromales de bazo pueden inducir la división de ciertas DCs maduras (derivadas de médula ósea con GM-CSF e IL-4) y su transformación en DCs regulatorias con algunas características de macrófagos<sup>398</sup>. Todavía no se ha determinado si este potencial de proliferación y diferenciación está restringido a un único tipo de DCs o si todas las DCs maduras lo presentan

**Hemos observado que la infección con MMTV también induce aumentos en la expresión de CD71 en las DCs de las PPs de ratones C3H/HeN. Por el contrario, no se detectaron alteraciones en la expresión de CD71 en las DCs de ratones deficientes para TLR4 infectados con MMTV<sup>390</sup>.** Trabajos recientes muestran que en las primeras etapas de la infección de ratones adultos por inoculación de MMTV en la almohadilla plantar las DCs se infectan en niveles similares a los observados en las células B B220<sup>+</sup><sup>22,366</sup>. El aumento de la expresión de su propio receptor de entrada en las DCs podría ser un mecanismo utilizado por el MMTV para aumentar la eficiencia de infección de estas células. Las DCs infectadas pueden ser fundamentales como reservorio viral y, además, para la presentación eficiente del SAg a las células T, iniciando así uno de los eventos clave para para la propagación del virus.

Como hemos señalado, la falta del TLR4 durante la infección *in vivo* anula por completo el efecto del MMTV sobre la expresión de su receptor de entrada, mientras que *in vitro* se observa una inhibición significativa pero parcial. Debe considerarse no sólo que las BMDCs constituyen una población diferente a la de las DCs de las PPs, sino además que la exposición al MMTV *in vivo* difiere de la exposición *in vitro* no sólo en cuanto a la

concentración de virus que encuentran las DCs sino también en cuanto al tiempo de exposición.

Existen varias subpoblaciones de células CD11c<sup>+</sup> en las PPs, cada una de las cuales posee características estructurales y funcionales únicas<sup>155</sup>. Aún no se ha reportado el patrón de expresión de TLRs de los distintos subtipos de DCs de las PPs, aunque se ha demostrado que cada subpoblación puede responder en forma diferencial a un estímulo microbiano<sup>39,156</sup>. Otro factor a tener en cuenta es que la infección con MMTV por la vía natural de amamantamiento ocurre en ratones neonatos. Las diferencias entre las DCs de ratones recién nacidos y DCs de ratones adultos son discutidas. En general, se ha demostrado que las DCs neonatales difieren de las DCs de adultos en cuanto a número y composición de subpoblaciones<sup>399-401</sup>. Sin embargo, algunos trabajos indican que las DCs neonatales son similares en su función a las DCs de adultos y no muestran diferencias en respuesta a estímulos microbianos o inflamatorios<sup>399,400</sup>, mientras que otros autores demuestran lo contrario<sup>401,402</sup>. No se ha realizado aún un estudio comparativo entre las DCs de las PPs neonatales y adultas. Si bien en este trabajo no se evaluaron individualmente las distintas subpoblaciones de DCs, pudimos demostrar que, en su conjunto, las DCs de las PPs se ven afectadas por el MMTV de manera dependiente del TLR4. Dicho receptor está fuertemente involucrado en el aumento en el número de células dendríticas en el sitio de infección y tiene además un rol central en los aumentos de la expresión del receptor de entrada del virus en las células.

Como explicamos anteriormente, las DCs son unos de los principales sensores de infecciones microbianas. Estas células interactúan con los linfocitos T y con otras células involucradas en el reconocimiento de patógenos, y juegan un rol en la eliminación de agentes infecciosos a través de la secreción de mediadores de la respuesta inflamatoria, como citoquinas y quemoquinas, y a través de su capacidad para actuar como CPAs. En consecuencia, la activación de las DCs a través de los TLRs tiene profundos efectos no sólo en la respuesta inmune innata sino también en la respuesta adaptativa generadas ante diversos patógenos. Varios autores han demostrado que algunas poblaciones de DCs se localizan en las PPs justo por debajo del epitelio que las separa del lumen del intestino<sup>403</sup>, lo cual sugiere fuertemente que las DCs se encontrarían entre las primeras células que entran en contacto con el MMTV. Las DCs podrían ser entonces las primeras células en ser activadas e infectadas por el MMTV. Nuestros resultados muestran que la interacción entre

el virus y las DCs de las PPs a través de los TLRs juega un rol de importancia en el comienzo de la infección.

En la primera parte de este trabajo observamos que el MMTV estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  en DCs cultivadas *in vitro*. Sin embargo, al estudiar la expresión de TNF- $\alpha$  en las PPs de ratones infectados con MMTV no detectamos ninguna diferencia con respecto a los niveles de expresión en los ratones no infectados. En cambio, la infección con MMTV produce un importante aumento en la expresión de IL-10 en las PPs. La IL-10 es una citoquina reconocida por su capacidad para inhibir la activación y funciones efectoras de muchas de las células del sistema inmune, limitando las respuestas inflamatorias<sup>371</sup>. La respuesta inmune en las PPs y en el resto del sistema inmune del intestino está comúnmente asociada a la producción de IL-10<sup>36,208,404</sup>. Esto se relaciona en general con la función del sistema inmune intestinal en el mantenimiento de la tolerancia oral hacia los antígenos alimenticios y la flora comensal<sup>36,405</sup>. Comparaciones realizadas entre DCs de las PPs y DCs de bazo mostraron que un mismo estímulo genera la producción de IL-10 en las DCs de las PPs pero no en las de bazo, y que las DCs de PPs inducen respuestas tipo Th2 caracterizadas por la producción de IL-10 e IL-4<sup>208</sup>. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que las distintas subpoblaciones de DCs de las PPs se comportan de manera diferente ante un mismo estímulo, y que algunas de estas subpoblaciones no producen IL-10 y promueven la diferenciación de células T productoras de IFN- $\gamma$ <sup>156</sup>. No podemos descartar la posibilidad de que las distintas subpoblaciones de DCs de las PPs respondan al MMTV produciendo distintas citoquinas. Otros tipos celulares productores de IL-10 presentes generalmente en las PPs son las células B y B1<sup>371,406</sup>, las células Th2<sup>407</sup> y varios tipos de células T regulatorias<sup>408</sup>. **En este trabajo hemos determinado que a los pocos días de infección con MMTV se produce un fuerte aumento en la expresión de IL-10 en las células CD4<sup>+</sup> de las PPs, y en particular en las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>**. Estudios de citometría de flujo adicionales no nos permitieron detectar cambios en la producción de IL-10 en células B y DCs de las PPs.

**Determinamos que la infección con MMTV a través del amamantamiento también induce un aumento en la expresión de varias quemoquinas en las PPs: MIP-1 $\beta$  (CCL4), BLC (CXCL13) e IP-10 (CXCL10).** El aumento en los niveles de expresión

de estas moléculas, quimioattractantes de diversos tipos de leucocitos, correlaciona con estudios previos realizados en nuestro laboratorio que demuestran que el MMTV provoca el reclutamiento masivo de células B y CD4<sup>+</sup> a las PPs. En este trabajo mostramos que también se produce un aumento en el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup>.

Como se mencionó previamente, la IL-10 es una citoquina con propiedades inmunomodulatorias que es producida, entre otras células, por varios tipos de células T regulatorias entre los que se incluyen las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias (Tregs)<sup>409</sup>. Las Tregs cumplen un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia inmunológica a antígenos propios así como en la modulación de respuestas inmunes frente a antígenos no propios. Por otro lado, en un trabajo reciente se ha demostrado que células B, macrófagos y DCs reclutan células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mediante la producción de CCL4 (MIP-1β)<sup>328</sup>.

Los notables aumentos de IL-10 y CCL4 producidos en las PPs a sólo dos días de la infección con MMTV nos llevaron a investigar si la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs se ve afectada por el virus. **En la primera semana de infección con MMTV a través del amamantamiento se produce en las PPs un incremento en el porcentaje y número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Además, estas células muestran un aumento en la expresión de CTLA-4, CD45RB<sup>low</sup> e IL-10 en respuesta al MMTV.** Aunque las Tregs son caracterizadas frecuentemente por la expresión de las moléculas de superficie CTLA-4 y CD45RB<sup>low</sup> y la producción de IL-10, ninguno de estos marcadores es específico, ya que son expresados también por otras células T. Las células T activadas expresan tanto CTLA-4 y CD45RB<sup>low</sup> como CD25<sup>410</sup> y células T diferenciadas a células Th2 producen IL-10<sup>407</sup>. Es lógico pensar que en el contexto de una infección viral aguda en las PPs existe activación celular como así también inducción de células regulatorias. Por lo tanto, durante la infección con MMTV la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs podría incluir tanto células activadas como regulatorias.

El marcador más selectivo de las Tregs es el factor de transcripción Foxp3, cuya expresión es requerida para el desarrollo de dichas células<sup>288-291</sup>. Mediante RT-PCR determinamos que la expresión de Foxp3 aumenta significativamente en las PPs a tan sólo dos días de infección con MMTV, correlacionando con el aumento de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. La marcación intracelular con un anticuerpo anti-Foxp3 nos permitió discriminar entre

células activadas y células T regulatorias dentro de la población  $CD4^+CD25^+$  de las PPs. De esta manera, **demostramos que los aumentos detectados en las células  $CD4^+CD25^+$  se deben a aumentos tanto en la población  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  (fenotipo regulatorio) como en la población  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  (fenotipo activado).** Sin embargo, la cinética seguida por estos dos tipos celulares es distinta. Las células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  muestran un aumento progresivo a lo largo de la primera semana de infección, tanto en el porcentaje como en el número absoluto. En cambio, el porcentaje de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  sólo muestra un aumento significativo al día 2 de infección, mientras que el número absoluto es máximo en ese día y luego decrece, aunque continúa significativamente aumentado con respecto a los animales no infectados. Podría pensarse que esta disminución de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  está causada por una disminución en la expresión de CD25 en las células  $CD4^+$  activadas. Se ha descrito en numerosos trabajos que la expresión de CD25 durante la activación celular es transiente<sup>273-276</sup>. Por ejemplo, en células  $CD4^+$  transgénicas para un TCR que reconoce OVA y transferidas a un ratón normal, la estimulación antigénica *in vivo* induce aumentos en la expresión de CD25 en el 90% de las células a las 24 hs mientras que a las 48 hs la expresión de CD25 retorna a los valores basales<sup>273,274</sup>. Sin embargo, resulta difícil que esto suceda en nuestro modelo experimental ya que el virus continúa infectando y el Sag se debería seguir presentando a las células  $CD4^+$  vírgenes que llegan a las PPs. Por otro lado, la disminución de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  puede estar directamente asociada al aumento de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  con fenotipo regulatorio, las cuales podrían estar regulando negativamente la activación inducida por el MMTV.

Hemos observado que en las PPs de crías BALB/c normales, en ausencia de cualquier tipo de infección, alrededor de un 70% de las células  $CD4^+CD25^+$  son  $Foxp3^+$ , lo que indica que la mayoría de las células  $CD4^+CD25^+$  tienen un fenotipo regulatorio. Esto es similar a lo reportado en la bibliografía, en la cual se considera que las células  $CD4^+CD25^+$  presentes en un individuo normal son células regulatorias<sup>297</sup>. El porcentaje de células  $Foxp3^+$  dentro de la población  $CD4^+CD25^+$  de las PPs (70%) es más bajo que el encontrado en ganglios linfáticos adultos (83%)<sup>295</sup>, quizás debido al constante contacto con antígenos que existe en las PPs<sup>36,405</sup>, que conduciría a una mayor presencia de células activadas ( $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ ) en comparación a otros órganos. Como hemos señalado, la proporción de células  $Foxp3^+$  y  $Foxp3^-$  dentro del total de células  $CD4^+CD25^+$  varía

durante los primeros días de infección con MMTV. Al día 2 el 52% de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son Foxp3<sup>-</sup>. Al día 6 de amamantamiento el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que expresan Foxp3 es de 84%, superando al valor observado en ausencia de infección (día 0). **Por lo tanto, al final de la primera semana de infección con MMTV la proporción de células con fenotipo regulatorio se encuentra aumentada.**

Los ensayos de incorporación de yoduro de propidio realizados permitieron determinar que el MMTV induce la proliferación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs desde el segundo día de infección al menos hasta el día 18. El máximo de proliferación se observa al día 6. Aunque estos experimentos no permiten saber si las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que se encuentran proliferando expresan Foxp3, el pico de proliferación ocurre cuando la mayoría de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son Foxp3<sup>+</sup> y el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> en las PPs presenta valores basales. Generalmente se considera que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias naturales son anérgicas<sup>411</sup>, aunque existe creciente evidencia de que estas células sí son capaces de proliferar ante un estímulo adecuado. En particular, varios grupos han demostrado que el encuentro *in vivo* con un antígeno reconocido específicamente por su TCR o con un aloantígeno induce la proliferación de las Tregs<sup>292,313,314</sup>. Además, se ha determinado que las Tregs son capaces de proliferar *in vitro* cuando son incubadas con DCs y antígeno o DCs y anti-CD3, especialmente en presencia de IL-2 exógena<sup>240,242,243</sup>. Por último, Caramahlo y colaboradores demostraron que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expresan TLR4 y proliferan en respuesta al LPS<sup>136</sup>, y dos trabajos recientemente publicados muestran que la proliferación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias puede ser estimulada *in vitro* e *in vivo* mediante una combinación de ligandos del TLR2 y estimulación del TCR<sup>246,247</sup>.

La especificidad antigénica de las Tregs es otro de los puntos controversiales en el estudio de estas células. El modelo del MMTV permite abordar este tema de una manera simple gracias a la expresión del Sag viral durante la infección. Aun cuando existen diferencias entre los superantígenos y los antígenos convencionales<sup>412</sup>, el estudio de la expresión de un segmento V $\beta$  específico para el Sag del MMTV(LA) en las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs nos permitió evaluar la especificidad de las mismas para reconocer antígenos extraños. La respuesta al superantígeno viral se produce en forma temprana en la infección y se detecta como un aumento en el porcentaje de clones T V $\beta$  específicos

reactivos al mismo en las PPs<sup>20</sup>. Primero determinamos que el aumento en el porcentaje de células  $V\beta 6^+$  también es detectable dentro de la población  $CD4^+CD25^+$ , y que este aumento es significativamente mayor que el observado en la población  $CD4^+$  total. Por otro lado, el MMTV induce aumentos en el porcentaje y número absoluto de las células  $V\beta 6^+CD25^+$  durante el período estudiado (primera semana de infección). El porcentaje de células  $V\beta 10^+CD25^+$  (no respondedoras al Sag viral) sólo muestra un leve pero significativo aumento al día 2 (probablemente debido a un estado de activación no específica en las PPs), volviendo a los valores basales al día 6. Estos resultados sugieren que el aumento de células  $CD25^+$  puede detectarse principalmente dentro de una subpoblación de células que responden al Sag del MMTV. El Sag del MMTV(LA) no sólo es reconocido por los segmentos  $V\beta 6$  sino también por  $V\beta 9$ ,  $V\beta 7$ ,  $V\beta 8.1$ <sup>413</sup>. Esto permite suponer que el porcentaje de células con especificidad dentro de la población  $CD4^+CD25^+$  podría ser mayor, aunque hasta el momento no hemos determinado la especificidad superantigénica de las células  $CD4^+CD25^+V\beta 6^-V\beta 10^-$ . Tampoco se puede descartar que dentro de la población  $CD4^+CD25^+$  haya células con especificidad para otros antígenos del MMTV, como por ejemplo la proteína Env.

Dado que las células  $V\beta 6^+$  están siendo directamente estimuladas por el superantígeno y que  $CD25$  es también un marcador de activación linfocitaria, estudiamos la expresión de  $Foxp3$  en las células  $V\beta 6^+CD25^+$ , para definir si el gran aumento en el porcentaje de estas células observado a partir del segundo día de infección se debe a un aumento en las células activadas ( $Foxp3^-$ ), en las células regulatorias ( $Foxp3^+$ ) o en ambas. Determinamos que el incremento de células  $V\beta 6^+CD25^+$  en las PPs ocurre por aumentos simultáneos en las subpoblaciones  $V\beta 6^+CD25^+Foxp3^+$  y  $V\beta 6^+CD25^+Foxp3^-$ . **Esto indica que la población celular que reconoce específicamente al superantígeno viral no sólo contiene células activadas sino también células con fenotipo regulatorio, aun en estadios muy tempranos de la infección. La cinética seguida por ambas subpoblaciones durante la primera semana de infección es similar a la observada para las subpoblaciones  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  y  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ .** Así, al analizar la composición de la población  $V\beta 6^+CD25^+$  en cuanto a la expresión de  $Foxp3$ , encontramos que al segundo día de infección sólo un 29% de las células son  $Foxp3^+$  y un 71% son  $Foxp3^-$ , indicando que la activación al día 2 es muy alta cuando se analiza dentro de la

población antígeno específica. Luego, al día 6, el porcentaje de células  $V\beta 6^+CD25^+$  con fenotipo regulatorio ( $Foxp3^+$ ) alcanza un 84%. Al igual que lo observado en las células  $CD4^+$ , el aumento en la expresión de CD25 durante la activación de las células Sag-específicas parece ser transiente. La expresión temprana y temporal de CD25 durante la activación por un superantígeno *in vivo* ha sido reportada previamente por Maxwell y colaboradores, en un modelo de inoculación de SEA, un superantígeno de origen bacteriano<sup>276</sup>.

**Por otra parte, pudimos determinar que la infección con MMTV también produce aumentos en la subpoblación  $V\beta 6^+CD25^+Foxp3^+$ .** Se ha demostrado recientemente que existe en la periferia una población  $CD4^+CD25^-Foxp3^+$  de origen tímico que funciona como reservorio de células Treg, capaz de generar células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  por expansión homeostática o ante un estímulo antigénico<sup>372</sup>. Aunque en un principio se consideraba que sólo las células  $CD4^+CD25^+$  expresaban Foxp3 mientras que en otras subpoblaciones T la expresión no era detectable, un creciente número de trabajos demuestra que una fracción de la población  $CD4^+CD45RB^{low}CD25^-$  en el ratón normal naïve tienen una expresión intermedia de Foxp3 y muestran actividad regulatoria *in vitro* e *in vivo*<sup>289,292,293,295,414</sup>. Se determinó además que la expresión de Foxp3 correlaciona con la actividad supresora de las células, independientemente de la expresión de  $CD25$ <sup>295</sup>. **Esto sugiere que la subpoblación  $V\beta 6^+CD25^-Foxp3^+$  de las PPs podría participar también en el aumento de células con fenotipo regulatorio dentro de la población celular respondedora al Sag viral durante la infección con MMTV.**

**Nuestros resultados muestran que, en conjunto, los aumentos de las subpoblaciones  $CD25^+Foxp3^+$  y  $CD25^-Foxp3^+$  dentro de la población  $V\beta 6^+$  producen un progresivo aumento en el porcentaje de células  $V\beta 6^+$  que expresan Foxp3.** El porcentaje de células reactivas al Sag que expresan Foxp3 llega a ser mayor al 30% al día 15 de infección. Esto es muy significativo teniendo en cuenta que el valor basal del porcentaje de células  $Foxp3^+$  dentro de la población  $V\beta 6$  o dentro de cualquier población  $CD4^+$  en las PPs es alrededor de un 8%. Papiernik y colaboradores<sup>415</sup> mostraron que durante la infección con la variante viral MMTV(SW), cuyo Sag también es reconocido por  $V\beta 6$ , el efecto de delección de los clones reactivos al Sag se observa en las células  $CD4^+V\beta 6^+CD25^-$  mientras que el número de células  $CD4^+V\beta 6^+CD25^+$  se mantiene

constante, aun al final del proceso de deleción. Esta población expresa IL-10 e IL-4, y los autores sugieren que la permanencia de estas células jugaría un rol en el control de la infección viral y la inducción de tolerancia a través del reconocimiento del Sag viral y la producción de IL-10<sup>415</sup>. Aunque en dicho trabajo no se mide la expresión de Foxp3, los resultados están de acuerdo con nuestras observaciones de que el porcentaje de células con fenotipo regulatorio aumenta progresivamente dentro de la población Sag-específica de las PPs.

La purificación de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs de crías infectadas con MMTV nos permitió evaluar la capacidad supresora de estas células, confirmando que no sólo expresan marcadores típicos sino que también tienen función de células regulatorias. **Determinamos que al día 6 de infección con MMTV la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs posee actividad inmunosupresora en un cultivo mixto linfocitario.** Para estos experimentos se purificaron células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de PPs luego de 6 días de infección, ya que previamente habíamos determinado que en este punto la mayoría de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son Foxp3<sup>+</sup>. A pesar de que a este día las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se encuentran proliferando, esto no parece afectar a su capacidad supresora. Varios trabajos han demostrado que ante el estímulo con un antígeno o con LPS las células Treg pueden proliferar y expandirse sin perder sus funciones regulatorias<sup>136,313,314,348</sup>. Sin embargo en ciertas condiciones, como en presencia de DCs maduras o ciertos ligandos de TLR2<sup>242,246,247</sup>, la proliferación de las Tregs se asocia con una disminución temporal en su capacidad inmunorregulatoria, aunque esto no parece suceder durante la infección natural con MMTV.

**La actividad inmunosupresora de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificadas de ratones infectados con MMTV es mayor que la observada en células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de animales no infectados de la misma edad. Esto sugiere que la capacidad supresora de las Tregs de las PPs aumenta cuando son estimuladas por el virus.** Debe notarse que las células de bazo de ratones AKR, utilizadas en el cultivo mixto alogeneico como células presentadoras, expresan, entre otros aloantígenos, el Mls-1<sup>a</sup> (Mtv-7, Sag endógeno), que estimula a células Vβ6<sup>+</sup>; por otro lado, un importante porcentaje de las células CD25<sup>+</sup> purificadas de las PPs son Vβ6<sup>+</sup>. Nishimura y colaboradores<sup>292</sup> han demostrado que células Treg sensibilizadas *in vivo* por un transplante alogeneico muestran una mayor capacidad

supresora en un cultivo mixto alogeneico cuando las células estimuladoras del cultivo y el trasplante que estimuló a las Tregs son de la misma cepa de ratón; es decir, las Tregs muestran una supresión aloantígeno específica. En un comienzo, los estudios *in vitro* postulaban que las Tregs requerían una activación a través de su TCR para ejercer su actividad supresora pero que, una vez activadas, las Tregs eran capaces de suprimir células T con otras especificidades<sup>326</sup>. En la actualidad existe evidencia de que la especificidad antigénica de las Tregs tiene influencia sobre la acción de estas células, sobre todo en modelos de autoinmunidad, en los cuales se mostró que las Tregs órgano-específicas son más protectoras que las Tregs policlonales<sup>349</sup>. En cuanto la especificidad de las Tregs para antígenos exógenos, se ha reportado recientemente que durante la infección crónica de ratones con *Leishmania major*, se produce una acumulación de Tregs que expresan un TCR que reconoce específicamente a *Leishmania* en el sitio de la infección<sup>348</sup>. Estas Tregs poseen funciones supresoras tanto en ensayos de estimulación policlonal como antígeno-específica de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Aunque las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificadas de las PPs de ratones infectados con MMTV no son homogéneas en cuanto a su TCR, una importante proporción de las mismas es específica para el Sag del MMTV, lo cual permite evaluar al menos parcialmente la importancia de la especificidad de las Tregs. En la actualidad estamos investigando la capacidad supresora células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PPs de ratones neonatos infectados con MMTV(LA) mediante la realización de cultivos mixtos en los cuales utilizamos células presentadoras de otras cepas de ratón que no presenten el Mls-1<sup>a</sup> (Mtv-7).

Los experimentos realizados permiten concluir que a medida que avanza la infección con MMTV se produce un aumento progresivo de células CD4<sup>+</sup> con fenotipo y funciones regulatorias. Estas células podrían ser células regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturales, originadas en el timo. En tal caso, su incremento en las PPs podría producirse por un aumento en el tráfico de estas células a las PPs, atraídas por una o más quemoquinas expresadas durante la infección. Otro posible mecanismo, no excluyente con el anterior, sería que el aumento de estas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ocurriera por estimulación de la proliferación inducida por el MMTV. Por otro lado, no podemos descartar que al menos una parte de la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que se acumula en las PPs durante la infección corresponda a células regulatorias inducidas *in situ*. La generación de células Foxp3<sup>+</sup> en la periferia a partir de células Foxp3<sup>-</sup> es un tema que aun no ha sido confirmado por

completo, aunque existen algunos reportes de que esto podría ocurrir. La conversión de células Foxp3<sup>-</sup> en células Foxp3<sup>+</sup> ha sido descrita principalmente en humanos, aunque la posibilidad de contaminación de los cultivos con unas pocas células regulatorias dificulta la interpretación de los ensayos<sup>291,300</sup>. Algunos autores no observaron conversión de células naïve a células Treg FOXP3<sup>+</sup> *in vitro*<sup>293</sup> y otros mostraron que sólo un pequeño grupo de células humanas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> aumentan en forma transiente la expresión de FOXP3, sin adquirir fenotipo o función de células regulatorias<sup>301</sup>. En el ratón, se ha reportado que existe expresión de Foxp3 *de novo* y transiente en células T altamente activadas que han sido estimuladas *in vivo* por DCs que presentan un antígeno exógeno, mientras que sólo bajos niveles de antígeno en ausencia de señales proinflamatorias resulta en el desarrollo de células Treg *de novo*<sup>244</sup>.

Con el objeto de investigar el rol del TLR4 en el aumento de células Treg inducido por el MMTV, comparamos en primer lugar la expresión de Foxp3 en PPs de crías salvajes o deficientes en TLR4. Determinamos por RT-PCR que **la expresión de Foxp3 en las PPs de crías infectadas es menor en ratones de la cepa C.C3H *Tlr4*<sup>Lps-d</sup> que en los ratones control BALB/c**. Luego mostramos que **el incremento en el porcentaje de células Vβ6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> es significativamente menor en las crías C.C3H *Tlr4*<sup>Lps-d</sup> que en las crías BALB/c, tanto al día 2 como al día 6 de infección. También es significativamente menor el aumento de células Vβ6<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>**. Estos resultados sugieren que el TLR4 está involucrado en el aumento de células Treg y en el aumento de células activadas.

La participación del TLR4 en el aumento de células con fenotipo regulatorio CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> específicas para el Sag inducido por el MMTV podría ocurrir en distintos niveles. Por un lado, el MMTV podría interactuar con el TLR4 expresado por las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> induciendo su proliferación. Estudios *in vitro* han demostrado que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> proliferan en respuesta al LPS, en forma dependiente del TLR4<sup>136</sup>. Sin embargo, este no podría ser el único mecanismo involucrado, ya que, como hemos señalado, un porcentaje importante de estas células regulatorias muestran especificidad superantigénica. Además, podría ocurrir que el aumento de células regulatorias dependa del grado de activación inducido por el MMTV. De ser así, el menor número de Tregs en los ratones deficientes en TLR4 podría deberse al menor incremento de células activadas

que observamos en estos animales. Como se señaló anteriormente, también hemos demostrado que la ausencia de un TLR4 funcional afecta al incremento de DCs en las PPs inducido por el MMTV. Dada la importancia de las DCs en la expansión de células efectoras y regulatorias<sup>138,183</sup>, el menor número de DCs en las PPs de ratones mutantes para el TLR4 también puede estar involucrado en el menor aumento de células  $V\beta 6^+CD25^+Foxp3^-$  y  $V\beta 6^+CD25^+Foxp3^+$ . Aunque el aumento en el porcentaje de células regulatorias inducido por el MMTV es menor en los ratones C.C3H  $Tlr4^{Lps-d}$ , no hemos determinado si la función supresora de estas células también se ve afectada en estos animales. A causa de la expresión de un TLR4 no funcional, probablemente la activación de las DCs de los ratones C.C3H  $Tlr4^{Lps-d}$  inducida por el virus sea menor y esto podría afectar a la función regulatoria de las Tregs. En este sentido, se ha demostrado que las DCs maduras, y no las inmaduras, aumentan eficientemente la proliferación de las células  $CD4^+CD25^+$  regulatorias<sup>240,242,243</sup>, aunque en algunos casos dicha proliferación se asocia con una pérdida de la capacidad regulatoria de las Tregs, al menos temporalmente<sup>242,245</sup>. La función regulatoria de las células  $CD4^+CD25^+$  de los ratones C.C3H  $Tlr4^{Lps-d}$  será objeto de estudio en una próxima etapa.

Estudios recientes indican que las células Treg pueden ser activadas y expandidas *in vivo* por virus, bacterias, hongos y parásitos<sup>416</sup>. Se han postulado diversas funciones de las células  $CD4^+CD25^+$  regulatorias durante una infección. En algunos casos se considera que el aumento de células regulatorias en un proceso infeccioso sería beneficioso para el huésped, mientras que en otros casos sería una ventaja para el patógeno<sup>416-419</sup>. Estos roles contradictorios de las Tregs no son mutuamente excluyentes sino que pueden ocurrir simultáneamente. Se ha demostrado que la acción de las células Treg puede ser favorable para el huésped, ya que estas células son capaces de disminuir una respuesta inmunopatológica, disminuyendo el grado de inflamación y daño tisular colateral<sup>420-423</sup>. Belkaid y colaboradores mostraron que la presencia de Tregs también puede aumentar la capacidad de generar de memoria inmunológica<sup>269</sup>. Por otro lado, estas mismas células pueden ser inducidas por ciertos patógenos para subvertir la respuesta inmune del hospedador, inhibiendo las respuestas T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  contra ellos y favoreciendo la persistencia de los mismos<sup>237,421,422,424,425</sup>. En el caso particular del MMTV, las células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  podrían estar actuando de varias formas. Al igual que lo observado en otras infecciones virales<sup>426</sup>, las células Treg podrían suprimir o controlar la respuesta

antiviral. Durante la realización del presente trabajo, un artículo publicado por Jude y colaboradores mostró que la respuesta CD8<sup>+</sup> citotóxica puede eliminar a la variante viral MMTV(C3H) sólo en ratones C3H/HeJ, pero no en ratones C3H/HeN, sugiriendo que en presencia de un TLR4 funcional esta variante de MMTV es capaz de evadir o suprimir la respuesta antiviral<sup>427</sup>. En experimentos *in vitro*, los autores también determinaron que la interacción del MMTV(C3H) con el TLR4 de DCs o macrófagos induce la secreción de IL-10 en células B y sugirieron que el MMTV utiliza este mecanismo para subvertir a la respuesta inmune adaptativa en los ratones C3H/HeN<sup>427</sup>. La presencia de células Treg en las PPs al comienzo de la infección podría cumplir un rol similar, favoreciendo así la propagación del virus. Por otro lado, las Tregs podrían afectar negativamente al MMTV. Teniendo en cuenta la importancia de la respuesta al Sag viral para el establecimiento de la infección, existe la posibilidad de que las Tregs estén controlando la capacidad proliferativa de las células respondedoras al Sag, impidiendo que su expansión sea máxima y retrasando la propagación del MMTV a otros tejidos. También se ha demostrado que las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorias pueden inhibir la proliferación de las células B<sup>328</sup>, la cual es necesaria para que ocurra la amplificación del reservorio viral<sup>21,29</sup>. Por último, las Tregs inducidas durante la infección con MMTV podrían beneficiar al huésped impidiendo el daño tisular que podría causar la exacerbada respuesta que se produce en las PPs. La realización de experimentos de depleción de células CD25<sup>+</sup> *in vivo* será de gran utilidad para determinar las funciones de estas células durante la infección con MMTV.

Debido a los amplios efectos que puede causar la activación inducida a través del TLR4, la interacción entre la proteína Env y este receptor le permite al MMTV ejercer una importante influencia sobre el sistema inmune del hospedador. A lo largo de este trabajo hemos demostrado que diversos eventos ocurridos durante las primeras etapas de la infección con MMTV dependen de la presencia de un TLR4 funcional. Algunos de estos eventos, como por ejemplo el aumento de CD71 en las DCs, parecen favorecer claramente el establecimiento de la infección, mientras que otros, como el aumento de células regulatorias, podrían ser ventajosos o desventajosos para el virus. Cada uno de estos eventos no ocurre en forma aislada, sino que suceden simultáneamente; la combinación de los mismos determinará en última instancia cómo la presencia del TLR4 afecta al resultado de la infección. **La medición directa de los niveles de infección en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ amamantados con hembras infectadas con MMTV(LA) nos permitió**

**determinar que la falta de un TLR4 funcional conduce a una menor eficiencia de infección del MMTV.** Este experimento confirma los resultados obtenidos al comienzo del trabajo utilizando el modelo de animales adultos tolerizados con el ligando del TLR4 LPS, los cuales mostraban menores niveles de infección que los ratones no tolerizados luego de la inoculación subcutánea del MMTV(LA).

**El conjunto de los resultados obtenidos a lo largo este trabajo muestra que la infección con MMTV produce alteraciones importantes en el sistema inmune innato y adaptativo del huésped. El virus es capaz de activar *in vitro* a las DCs en forma dependiente del TLR4 y en menor medida del TLR2. En el sitio de entrada del virus – las placas de Peyer- se observa un incremento de DCs, aumentos en la expresión del receptor de entrada del MMTV en dichas células y un aumento progresivo en el número de células T con fenotipo regulatorio. Estas alteraciones, sumadas a la respuesta de activación T frente al Sag, son dependientes del TLR4. La presencia de un TLR4 funcional correlaciona con importantes aumentos en los niveles de integración viral. Demostramos así que la interacción del MMTV con el TLR4 forma parte de la estrategia de este retrovirus para aumentar la eficiencia de la infección.**

## CONCLUSIONES

---

1. Utilizando un modelo de infección por MMTV en ratones adultos tolerizados con ligandos de TLR4 o TLR2 se determinó que una de estas moléculas o ambas participan en importantes eventos de las primeras etapas de infección por MMTV: activación temprana de células B, reclutamiento de células B vírgenes e integración viral.
2. El MMTV es capaz de inducir la activación de las BMDCs, medida por el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y en la producción de citoquinas y quemoquinas. La activación de las BMDCs es independiente de la expresión de genes virales. Los efectos del virus sobre las BMDCs no son específicos de una variante viral en particular, ni dependen de la cepa murina de la que se obtuvieron las células.
3. Los experimentos de tolerización de BMDCs con LPS y la utilización de BMDCs que expresan un TLR4 no funcional demuestran que el TLR4 cumple un rol fundamental en la activación de BMDCs inducida por el MMTV.
4. El TLR2 también está involucrado en la activación de las BMDCs inducida por el virus, aunque en menor medida que el TLR4.
5. El MMTV es capaz de inducir en las BMDCs un aumento en la expresión de su receptor de entrada a la célula –el CD71– y este efecto se ve significativamente disminuido en ausencia de un TLR4 funcional.
6. La infección con MMTV a través del amamantamiento induce aumentos en el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> y en los niveles de expresión del receptor de entrada del MMTV en estas células en las PPs. Estos efectos no se observan en ratones carentes de un TLR4 funcional.
7. Durante la primera semana de infección con MMTV a través del amamantamiento se produce en las PPs un incremento en el porcentaje y número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Estas células muestran un aumento en la expresión de CTLA-4, CD45RB<sup>low</sup> e IL-10, como así también en la tasa de proliferación celular. La población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> está compuesta por células que presentan un fenotipo de activación (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) o un fenotipo de célula regulatoria (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>). La proporción de estas dos subpoblaciones varía con el tiempo de infección: el número y el porcentaje de células activadas hacen un pico al día 2 y bajan drásticamente a partir

del día 3, mientras que las células con fenotipo regulatorio aumentan progresivamente desde el segundo día de infección hasta, al menos, el día 6.

8. Una parte importante de las células  $CD4^+CD25^+$  inducidas por el MMTV poseen especificidad superantigénica. Dicha especificidad se observa tanto en las células  $CD25^+$  activadas como en aquellas con fenotipo regulatorio. A medida que avanza la infección aumenta progresivamente el porcentaje de células respondedoras al Sag con fenotipo regulatorio.
9. Demostramos que las células  $CD4^+CD25^+$  de las PPs de ratones infectados durante 6 días con MMTV poseen actividad inmunosupresora. Esta actividad es mayor que la observada en células  $CD4^+CD25^+$  de animales no infectados de la misma edad.
10. Tanto la respuesta de activación T frente al Sag como los aumentos de células regulatorias con especificidad superantigénica se encuentran disminuidos en ausencia de un TLR4 funcional
11. Los niveles de infección alcanzados *in vivo* por el MMTV son mayores en los ratones que expresan un TLR4 funcional.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. **Bittner JJ.** 1936. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence. *Science* **84**:162.
2. **Hilgers, J. and M. Sluysen.** 1981. *Mammary Tumors in the Mouse.* Elsevier/North Holland Bimedical Press: Amsterdam.
3. **Smith, G. H.** 1967. Cytochemical studies on the mouse mammary tumor virus. *Cancer Res* **27**:2179-96.
4. **Callahan, R.** 1996. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **39**:33-44.
5. **Varmus, H. E., J. M. Bishop, R. C. Nowinski, and N. H. Sarker.** 1972. Mammary tumour virus specific nucleotide sequences in mouse DNA. *Nat. New Biol.* **238**:189-191.
6. **Acha-Orbea, H. and H. R. MacDonald.** 1995. Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu. Rev. Immunol.* **13**:459-486.
7. **Piazzon, I., I. Nepomnaschy, V. Buggiano, P. Bekinschtein, A. Goldman, P. Berguer, A. Deroche, and G. Lombardi.** 1997. [Superantigens and murine mammary tumor retrovirus]. *Medicina (B Aires)* **57 Suppl 2**:21-33.
8. **Nandi S. and Mc Grath C.M.** 1973. Mammary neoplasia in mice. *Adv. Cancer Res.* **17**:353-414.
9. **Coffin, J. M., S. H. Hughes, and H. E. Varmus.** 2003. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. **Choi, Y., J. W. Kappler, and P. Marrack.** 1991. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature* **350**:203-207.
11. **Acha-Orbea, H., A. N. Shakhov, L. Scarpellino, E. Kolb, V. Muller, A. Vessaz-Shaw, R. Fuchs, K. Blochlinger, P. Rollini, J. Billotte, M. Sarafidou, H. Robson MacDonald, and H. Diggelmann.** 1991. Clonal deletion of V beta 14-bearing T cells in mice transgenic for mammary tumour virus. *Nature* **350**:207-211.
12. **Park, C. G., M. Y. Jung, Y. Choi, and G. M. Winslow.** 1995. Proteolytic processing is required for viral superantigen activity. *J. Exp. Med.* **181**:1899-1904.
13. **Held, W., H. Acha-Orbea, H. R. MacDonald, and G. A. Waanders.** 1994. Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus. *Immunol Today* **15**:184-190.
14. **Luther, S., A. N. Shakhov, I. Xenarios, S. Haga, S. Imai, and H. Acha-Orbea.** 1994. New infectious mammary tumor virus superantigen with V beta-specificity identical to staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Eur. J Immunol* **24**:1757-1764.
15. **Shakhov, A. N., H. Wang, H. Acha-Orbea, R. J. Pauley, and W. Z. Wei.** 1993. A new infectious mammary tumor virus in the milk of mice implanted with C4 hyperplastic alveolar nodules. *Eur. J Immunol* **23**:2765-2769.
16. **Hodes, R. J., M. B. Novick, L. D. Palmer, and J. E. Knepper.** 1993. Association of a V beta 2-specific superantigen with a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus. *J Immunol* **150**:1422-1428.
17. **Brandt-Carlson, C., J. S. Butel, and D. Wheeler.** 1993. Phylogenetic and structural analyses of MMTV LTR ORF sequences of exogenous and endogenous origins. *Virology* **193**:171-185.

18. **Frankel, W. N., C. Rudy, J. M. Coffin, and B. T. Huber.** 1991. Linkage of Mls genes to endogenous mammary tumour viruses of inbred mice. *Nature* **349**:526-528.
19. **Kambhu, S., P. Falldorf, and J. S. Lee.** 1990. Endogenous retroviral long terminal repeats within the HLA-DQ locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**:4927-4931.
20. **Karapetian, O., A. N. Shakhov, J. P. Kraehenbuhl, and H. Acha-Orbea.** 1994. Retroviral infection of neonatal Peyer's patch lymphocytes: the mouse mammary tumor virus model. *J. Exp. Med.* **180**:1511-1516.
21. **Beutner, U., E. Kraus, D. Kitamura, K. Rajewsky, and B. T. Huber.** 1994. B cells are essential for murine mammary tumor virus transmission, but not for presentation of endogenous superantigens. *J Exp. Med.* **179**:1457-1466.
22. **Vacheron, S., S. A. Luther, and H. Acha-Orbea.** 2002. Preferential infection of immature dendritic cells and B cells by mouse mammary tumor virus. *J Immunol* **168**:3470-3476.
23. **Ross, S. R., J. J. Schofield, C. J. Farr, and M. Bucan.** 2002. Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:12386-12390.
24. **Held, W., G. A. Waanders, H. Acha-Orbea, and H. R. MacDonald.** 1994. Reverse transcriptase-dependent and -independent phases of infection with mouse mammary tumor virus: implications for superantigen function. *J Exp. Med.* **180**:2347-2351.
25. **Golovkina, T. V., J. P. Dudley, and S. R. Ross.** 1998. B and T cells are required for mouse mammary tumor virus spread within the mammary gland. *J. Immunol.* **161**:2375-2382.
26. **Ross, S. R.** 1997. Mouse mammary tumor virus and the immune system. *Adv. Pharmacol.* **39**:21-46.
27. **Golovkina, T. V., A. Chervonsky, J. P. Dudley, and S. R. Ross.** 1992. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* **69**:637-645.
28. **Golovkina, T. V., J. A. Prescott, and S. R. Ross.** 1993. Mouse mammary tumor virus-induced tumorigenesis in sag transgenic mice: a laboratory model of natural selection. *J. Virol.* **67**:7690-7694.
29. **Held, W., G. A. Waanders, A. N. Shakhov, L. Scarpellino, H. Acha-Orbea, and H. R. MacDonald.** 1993. Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission. *Cell* **74**:529-540.
30. **Held, W., G. A. Waanders, H. R. MacDonald, and H. Acha-Orbea.** 1994. MHC class II hierarchy of superantigen presentation predicts efficiency of infection with mouse mammary tumor virus. *Int. Immunol* **6**:1403-1407.
31. **Beutner, U., B. McLellan, E. Kraus, and B. T. Huber.** 1996. Lack of MMTV superantigen presentation in MHC class II-deficient mice. *Cell Immunol* **168**:141-147.
32. **Buggiano, V., A. Goldman, I. Nepomnaschy, P. Bekinschtein, P. Berguer, G. Lombardi, A. Deroche, M. V. Francisco, and I. Piazzon.** 1999. Characterization of two infectious mouse mammary tumour viruses: superantigenicity and tumorigenicity. *Scand. J. Immunol.* **49**:269-277.
33. **Golovkina, T. V., I. Piazzon, I. Nepomnaschy, V. Buggiano, O. de, V, and S. R. Ross.** 1997. Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. *J. Virol.* **71**:3895-3903.

34. **Piazzon, I., A. Goldman, S. Torello, I. Nepomnaschy, A. Deroche, and G. Dran.** 1994. Transmission of an Mls-1a-like superantigen to BALB/c mice by foster-nursing on F1 Mls-1bxa mothers. Sex-influenced onset of clonal deletion. *J. Immunol.* **153**:1553-1562.
35. **Newberry, R. D. and R. G. Lorenz.** 2005. Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev.* **206**:6-21.
36. **Mowat, A. M.** 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol* **3**:331-341.
37. **Debard, N., F. Sierro, J. Browning, and J. P. Kraehenbuhl.** 2001. Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* **120**:1173-1182.
38. **Golovkina, T. V., M. Shlomchik, L. Hannum, and A. Chervonsky.** 1999. Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity. *Science* **286**:1965-1968.
39. **Iwasaki, A. and B. L. Kelsall.** 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp. Med.* **191**:1381-1394.
40. **Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp, and S. A. Lira.** 2000. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity.* **12**:495-503.
41. **Callahan, R. and G. H. Smith.** 2000. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene* **19**:992-1001.
42. **Hook, L. M., Y. Agafonova, S. R. Ross, S. J. Turner, and T. V. Golovkina.** 2000. Genetics of mouse mammary tumor virus-induced mammary tumors: linkage of tumor induction to the gag gene. *J. Virol.* **74**:8876-8883.
43. **Katz, E., M. H. Lareef, J. C. Rassa, S. M. Grande, L. B. King, J. Russo, S. R. Ross, and J. G. Monroe.** 2005. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *J Exp Med* **201**:431-9.
44. **Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz.** 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**:1313-1318.
45. **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
46. **Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:4-9.
47. **Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov.** 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197-216.
48. **Pasare, C. and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes. Infect.* **6**:1382-1387.
49. **Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson.** 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**:269-279.
50. **Belvin, M. P. and K. V. Anderson.** 1996. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**:393-416.

51. **Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-983.
52. **Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol* **21**:335-376.
53. **Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-397.
54. **Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**:2085-2088.
55. **Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo.** 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J. Exp. Med.* **189**:615-625.
56. **Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* **162**:3749-3752.
57. **Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto.** 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**:1777-1782.
58. **Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake.** 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**:667-672.
59. **Schromm, A. B., E. Lien, P. Henneke, J. C. Chow, A. Yoshimura, H. Heine, E. Latz, B. G. Monks, D. A. Schwartz, K. Miyake, and D. T. Golenbock.** 2001. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J. Exp. Med.* **194**:79-88.
60. **Saitoh, S., S. Akashi, T. Yamada, N. Tanimura, M. Kobayashi, K. Konno, F. Matsumoto, K. Fukase, S. Kusumoto, Y. Nagai, Y. Kusumoto, A. Kosugi, and K. Miyake.** 2004. Lipid A antagonist, lipid IVA, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int. Immunol.* **16**:961-969.
61. **Miyake, K., Y. Yamashita, M. Ogata, T. Sudo, and M. Kimoto.** 1995. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J. Immunol.* **154**:3333-3340.
62. **Ogata, H., I. Su, K. Miyake, Y. Nagai, S. Akashi, I. Mecklenbrauker, K. Rajewsky, M. Kimoto, and A. Tarakhovsky.** 2000. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J. Exp. Med.* **192**:23-29.
63. **Byrd-Leifer, C. A., E. F. Block, K. Takeda, S. Akira, and A. Ding.** 2001. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur. J Immunol* **31**:2448-2457.
64. **Kawasaki, K., S. Akashi, R. Shimazu, T. Yoshida, K. Miyake, and M. Nishijima.** 2000. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* **275**:2251-2254.

65. **Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg.** 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **1**:398-401.
66. **Haynes, L. M., D. D. Moore, E. A. Kurt-Jones, R. W. Finberg, L. J. Anderson, and R. A. Tripp.** 2001. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* **75**:10730-10737.
67. **Rassa, J. C., J. L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli, and S. R. Ross.** 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2281-6.
68. **Tsan, M. F. and B. Gao.** 2004. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* **76**:514-519.
69. **Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb.** 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* **164**:558-561.
70. **Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, J. A. Boch, O. Bare, P. E. Auron, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood.** 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**:15028-15034.
71. **Vabulas, R. M., S. Braedel, N. Hilf, H. Singh-Jasuja, S. Herter, P. Ahmad-Nejad, C. J. Kirschning, C. Da Costa, H. G. Rammensee, H. Wagner, and H. Schild.** 2002. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* **277**:20847-20853.
72. **Johnson, G. B., G. J. Brunn, Y. Kodaira, and J. L. Platt.** 2002. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* **168**:5233-5239.
73. **Okamura, Y., M. Watari, E. S. Jerud, D. W. Young, S. T. Ishizaka, J. Rose, J. C. Chow, and J. F. Strauss, III.** 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol. Chem.* **276**:10229-10233.
74. **Smiley, S. T., J. A. King, and W. W. Hancock.** 2001. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* **167**:2887-2894.
75. **Termeer, C., F. Benedix, J. Sleeman, C. Fieber, U. Voith, T. Ahrens, K. Miyake, M. Freudenberg, C. Galanos, and J. C. Simon.** 2002. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp. Med.* **195**:99-111.
76. **Gallucci, S. and P. Matzinger.** 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol* **13**:114-119.
77. **Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning.** 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol. Chem.* **274**:17406-17409.
78. **Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, and D. Golenbock.** 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**:1-5.
79. **Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem.** 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:14459-14463.

80. **Lehner, M. D., S. Morath, K. S. Michelsen, R. R. Schumann, and T. Hartung.** 2001. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* **166**:5161-5167.
81. **Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky.** 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**:736-739.
82. **Aliprantis, A. O., R. B. Yang, D. S. Weiss, P. Godowski, and A. Zychlinsky.** 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* **19**:3325-3336.
83. **Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin.** 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**:732-736.
84. **Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf, and D. T. Golenbock.** 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* **274**:33419-33425.
85. **Hirschfeld, M., C. J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J. H. Weis, R. M. Wooten, and J. J. Weis.** 1999. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**:2382-2386.
86. **Means, T. K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton.** 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **163**:3920-3927.
87. **Means, T. K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton.** 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* **163**:6748-6755.
88. **Campos, M. A., I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procopio, L. R. Travassos, J. A. Smith, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli.** 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* **167**:416-423.
89. **Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem.** 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**:811-815.
90. **Ishii, K. J., C. Coban, and S. Akira.** 2005. Manifold mechanisms of toll-like receptor-ligand recognition. *J Clin. Immunol* **25**:511-521.
91. **Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, J. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A. S. Woods, and D. C. Gowda.** 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol. Chem.* **280**:8606-8616.
92. **Echchannaoui, H., K. Frei, C. Schnell, S. L. Leib, W. Zimmerli, and R. Landmann.** 2002. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J. Infect. Dis.* **186**:798-806.

93. **Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira.** 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* **165**:5392-5396.
94. **Cook, D. N., D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz.** 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Immunol.* **5**:975-979.
95. **Hirschfeld, M., J. J. Weis, V. Toshchakov, C. A. Salkowski, M. J. Cody, D. C. Ward, N. Qureshi, S. M. Michalek, and S. N. Vogel.** 2001. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* **69**:1477-1482.
96. **Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, G. Saint, I. D. A. Haake, P. J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D. M. Underhill, C. J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch.** 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol* **2**:346-352.
97. **Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem.** 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:13766-13771.
98. **Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira.** 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**:933-940.
99. **Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira.** 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* **169**:10-14.
100. **Alexopoulou, L., V. Thomas, M. Schnare, Y. Lobet, J. Anguita, R. T. Schoen, R. Medzhitov, E. Fikrig, and R. A. Flavell.** 2002. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in. *Nat. Med.* **8**:878-884.
101. **Dziarski, R. and D. Gupta.** 2005. Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J Endotoxin. Res.* **11**:304-310.
102. **Roach, J. C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M. K. Purcell, K. D. Smith, L. E. Hood, and A. Aderem.** 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:9577-9582.
103. **Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guiet, F. Briere, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri, and E. E. Bates.** 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.* **174**:2942-2950.
104. **Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
105. **Hawn, T. R., A. Verbon, K. D. Lettinga, L. P. Zhao, S. S. Li, R. J. Laws, S. J. Skerrett, B. Beutler, L. Schroeder, A. Nachman, A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem.** 2003. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp. Med.* **198**:1563-1572.
106. **Dunstan, S. J., T. R. Hawn, N. T. Hue, C. P. Parry, V. A. Ho, H. Vinh, T. S. Diep, D. House, J. Wain, A. Aderem, T. T. Hien, and J. J. Farrar.** 2005. Host susceptibility and

- clinical outcomes in toll-like receptor 5-deficient patients with typhoid fever in Vietnam. *J Infect. Dis.* **191**:1068-1071.
107. **Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-738.
  108. **Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler.** 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:3516-3521.
  109. **Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira.** 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740-745.
  110. **Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii, and S. Akira.** 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.* **201**:19-25.
  111. **Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira.** 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**:196-200.
  112. **Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford, and S. Bauer.** 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol* **3**:499.
  113. **Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, and S. Bauer.** 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J Immunol* **33**:2987-2997.
  114. **Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and Reis e Sousa.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**:1529-1531.
  115. **Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer.** 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**:1526-1529.
  116. **Kawai, T. and S. Akira.** 2006. TLR signaling. *Cell Death. Differ.* **13**:816-825.
  117. **Akira, S. and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:499-511.
  118. **Kawai, T. and S. Akira.** 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol* **17**:338-344.
  119. **Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira.** 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J. Immunol.* **166**:5688-5694.
  120. **Hopkins, P. A. and S. Sriskandan.** 2005. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin. Exp. Immunol* **140**:395-407.
  121. **Brint, E. K., D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A. N. McKenzie, L. A. O'Neill, and F. Y. Liew.** 2004. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat. Immunol.* **5**:373-379.

122. **Burns, K., S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert, and J. Tschopp.** 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* **197**:263-268.
123. **Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**:191-202.
124. **Wald, D., J. Qin, Z. Zhao, Y. Qian, M. Naramura, L. Tian, J. Towne, J. E. Sims, G. R. Stark, and X. Li.** 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* **4**:920-927.
125. **Zhang, G. and S. Ghosh.** 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* **277**:7059-7065.
126. **Gingras, S., E. Parganas, A. de Pauw, J. N. Ihle, and P. J. Murray.** 2004. Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **279**:54702-54707.
127. **Boone, D. L., E. E. Turer, E. G. Lee, R. C. Ahmad, M. T. Wheeler, C. Tsui, P. Hurley, M. Chien, S. Chai, O. Hitotsumatsu, E. McNally, C. Pickart, and A. Ma.** 2004. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat. Immunol.* **5**:1052-1060.
128. **Adib-Conquy, M. and J. M. Cavillon.** 2002. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J. Biol. Chem.* **277**:27927-27934.
129. **Hatao, F., M. Muroi, N. Hiki, T. Ogawa, Y. Mimura, M. Kaminishi, and K. Tanamoto.** 2004. Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. *J. Leukoc. Biol.* **76**:904-908.
130. **Medvedev, A. E., A. Lentschat, L. M. Wahl, D. T. Golenbock, and S. N. Vogel.** 2002. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J. Immunol.* **169**:5209-5216.
131. **Mizel, S. B. and J. A. Snipes.** 2002. Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. *J. Biol. Chem.* **277**:22414-22420.
132. **Iwasaki, A. and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**:987-995.
133. **Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin.** 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* **291**:1544-1547.
134. **Poeck, H., M. Wagner, J. Battiany, S. Rothenfusser, D. Wellisch, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* **103**:3058-3064.
135. **Pasare, C. and R. Medzhitov.** 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**:1033-1036.

136. **Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J. Demengeot.** 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**:403-411.
137. **Steinman, R. M. and Z. A. Cohn.** 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**:1142-1162.
138. **Granucci, F., M. Foti, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2005. Dendritic cell biology. *Adv. Immunol.* **88**:193-233.
139. **Quah, B. J. and H. C. O'Neill.** 2005. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol. Med.* **9**:643-654.
140. **Banchereau, J. and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
141. **Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:767-811.
142. **Bell, D., J. W. Young, and J. Banchereau.** 1999. Dendritic cells. *Adv. Immunol.* **72**:255-324.
143. **Wilson, N. S., D. El Sukkari, and J. A. Villadangos.** 2004. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* **103**:2187-2195.
144. **Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig.** 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* **21**:685-711.
145. **Ardavin, C.** 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:582-590.
146. **Shortman, K. and Y. J. Liu.** 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:151-161.
147. **Steinman, R. M. and Z. A. Cohn.** 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp. Med.* **139**:380-397.
148. **del Hoyo, G. M., P. Martin, H. H. Vargas, S. Ruiz, C. F. Arias, and C. Ardavin.** 2002. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**:1043-1047.
149. **Hart, D. N. and J. W. Fabre.** 1981. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J. Exp. Med.* **154**:347-361.
150. **Hart, D. N.** 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**:3245-3287.
151. **Freudenthal, P. S. and R. M. Steinman.** 1990. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**:7698-7702.
152. **Spry, C. J., A. J. Pflug, G. Janossy, and J. H. Humphrey.** 1980. Large mononuclear (veiled) cells like 'Ia-like' membrane antigens in human afferent lymph. *Clin. Exp. Immunol.* **39**:750-755.
153. **Steinman, R. M.** 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271-296.

154. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol* **2**:1144-1150.
155. Kelsall, B. L. and F. Leon. 2005. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol. Rev.* **206**:132-148.
156. Iwasaki, A. and B. L. Kelsall. 2001. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J. Immunol.* **166**:4884-4890.
157. Asselin-Paturel, C., G. Brizard, J. J. Pin, F. Briere, and G. Trinchieri. 2003. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* **171**:6466-6477.
158. Bilsborough, J., T. C. George, A. Norment, and J. L. Viney. 2003. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* **108**:481-492.
159. Castellaneta, A., M. Abe, A. E. Morelli, and A. W. Thomson. 2004. Identification and characterization of intestinal peyer's patch interferon-[alpha] producing (plasmacytoid) dendritic cells. *Human Immunology* **65**:104-113.
160. Leenen, P. J., K. Radosevic, J. S. Voerman, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann, and W. van Ewijk. 1998. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* **160**:2166-2173.
161. De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp. Med.* **184**:1413-1424.
162. Reis e Sousa, S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, and A. Sher. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* **186**:1819-1829.
163. Johansson, C. and B. L. Kelsall. 2005. Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin. Immunol.* **17**:284-294.
164. Balazs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. Kearney. 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity.* **17**:341-352.
165. Garcia, D., V. A. Gulbranson-Judge, M. Khan, P. O'Leary, M. Cascalho, M. Wabl, G. G. Klaus, M. J. Owen, and I. C. MacLennan. 1999. Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur. J Immunol* **29**:3712-3721.
166. Saunders, D., K. Lucas, J. Ismaili, L. Wu, E. Maraskovsky, A. Dunn, and K. Shortman. 1996. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **184**:2185-2196.
167. Inaba, K., M. Inaba, M. Deguchi, K. Hagi, R. Yasumizu, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1993. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:3038-3042.

168. **Traver, D., K. Akashi, M. Manz, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman, and I. L. Weissman.** 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**:2152-2154.
169. **Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, and K. Akashi.** 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**:3333-3341.
170. **O'Garra, A. and G. Trinchieri.** 2004. Are dendritic cells afraid of commitment? *Nat. Immunol.* **5**:1206-1208.
171. **D'Amico, A. and L. Wu.** 2003. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med.* **198**:293-303.
172. **Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I. L. Weissman, and M. G. Manz.** 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**:305-313.
173. **Brasel, K., T. De Smedt, J. L. Smith, and C. R. Maliszewski.** 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**:3029-3039.
174. **Karsunky, H., M. Merad, I. Mende, M. G. Manz, E. G. Engleman, and I. L. Weissman.** 2005. Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors. *Exp. Hematol.* **33**:173-181.
175. **Brasel, K., H. J. McKenna, P. J. Morrissey, K. Charrier, A. E. Morris, C. C. Lee, D. E. Williams, and S. D. Lyman.** 1996. Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* **88**:2004-2012.
176. **Wan, H. and M. Dupasquier.** 2005. Dendritic cells in vivo and in vitro. *Cell Mol. Immunol* **2**:28-35.
177. **Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema.** 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:77-84.
178. **Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia.** 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.
179. **Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba.** 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**:411-416.
180. **Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj.** 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**:1359-1368.
181. **Geuze, H.** 1994. EJCBLecture. A novel lysosomal compartment engaged in antigen presentation. *Eur. J. Cell Biol.* **64**:3-6.
182. **Thery, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena.** 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* **147**:599-610.
183. **Adams, S., D. W. O'Neill, and N. Bhardwaj.** 2005. Recent advances in dendritic cell biology. *J. Clin. Immunol.* **25**:177-188.
184. **Matzinger, P.** 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**:301-305.

185. **Skoberne, M., A. S. Beignon, and N. Bhardwaj.** 2004. Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol. Med.* **10**:251-257.
186. **Pendl, G. G., C. Robert, M. Steinert, R. Thanos, R. Eytner, E. Borges, M. K. Wild, J. B. Lowe, R. C. Fuhlbrigge, T. S. Kupper, D. Vestweber, and S. Grabbe.** 2002. Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* **99**:946-956.
187. **Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux.** 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**:373-386.
188. **Schwarzenberger, K. and M. C. Udey.** 1996. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. *J. Invest Dermatol.* **106**:553-558.
189. **Verbovetski, I., H. Bychkov, U. Trahtemberg, I. Shapira, M. Hareuveni, O. Ben Tal, I. Kutikov, O. Gill, and D. Mevorach.** 2002. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J. Exp. Med.* **196**:1553-1561.
190. **Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Forster.** 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* **21**:279-288.
191. **Guermontprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena.** 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:621-667.
192. **Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman.** 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* **288**:522-527.
193. **Chow, A., D. Toomre, W. Garrett, and I. Mellman.** 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **418**:988-994.
194. **Villadangos, J. A., M. Cardoso, R. J. Steptoe, D. van Berkel, J. Pooley, F. R. Carbone, and K. Shortman.** 2001. MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity.* **14**:739-749.
195. **Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, and R. M. Steinman.** 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* **186**:665-672.
196. **Rescigno, M., S. Citterio, C. Thery, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 1998. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:5229-5234.
197. **Svensson, M. and M. J. Wick.** 1999. Classical MHC class I peptide presentation of a bacterial fusion protein by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**:180-188.
198. **Mitchell, D. A., S. K. Nair, and E. Gilboa.** 1998. Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **28**:1923-1933.

199. **Delamarre, L., H. Holcombe, and I. Mellman.** 2003. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J. Exp. Med.* **198**:111-122.
200. **Datta, S. K., V. Redecke, K. R. Prilliman, K. Takabayashi, M. Corr, T. Tallant, J. DiDonato, R. Dziarski, S. Akira, S. P. Schoenberger, and E. Raz.** 2003. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **170**:4102-4110.
201. **Moody, D. B. and S. A. Porcelli.** 2003. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:11-22.
202. **Joyce, S. and L. Van Kaer.** 2003. CD1-restricted antigen presentation: an oily matter. *Curr. Opin. Immunol.* **15**:95-104.
203. **Foti, M., F. Granucci, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2006. Dendritic cell interactions and cytokine production. *Ernst. Schering. Res. Found. Workshop*61-80.
204. **Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra.** 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* **154**:5071-5079.
205. **O'Garra, A., N. Hosken, S. Macatonia, C. A. Wenner, and K. Murphy.** 1995. The role of macrophage- and dendritic cell-derived IL12 in Th1 phenotype development. *Res. Immunol.* **146**:466-472.
206. **Foti, M., F. Granucci, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2004. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol.* **25**:650-654.
207. **Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna.** 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* **5**:919-923.
208. **Iwasaki, A. and B. L. Kelsall.** 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp. Med.* **190**:229-239.
209. **Cavanagh, L. L. and U. H. von Andrian.** 2002. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* **80**:448-462.
210. **Mempel, T. R., S. E. Henrickson, and U. H. von Andrian.** 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**:154-159.
211. **Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard, and S. Amigorena.** 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat. Immunol.* **5**:1235-1242.
212. **Bromley, S. K., A. Iaboni, S. J. Davis, A. Whitty, J. M. Green, A. S. Shaw, A. Weiss, and M. L. Dustin.** 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat. Immunol.* **2**:1159-1166.
213. **Gett, A. V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat.** 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nat. Immunol.* **4**:355-360.
214. **Amsen, D., J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R. A. Flavell.** 2004. Instruction of Distinct CD4 T Helper Cell Fates by Different Notch Ligands on Antigen-Presenting Cells. *Cell* **117**:515-526.

215. **Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu.** 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2**:725-731.
216. **Maldonado-Lopez, R. and M. Moser.** 2001. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin. Immunol* **13**:275-282.
217. **Netea, M. G., J. W. Van der Meer, R. P. Sutmoller, G. J. Adema, and B. J. Kullberg.** 2005. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3991-3996.
218. **Barton, G. M. and R. Medzhitov.** 2002. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:380-383.
219. **Agrawal, S., A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. Van Dyke, and B. Pulendran.** 2003. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* **171**:4984-4989.
220. **Dillon, S., A. Agrawal, T. Van Dyke, G. Landreth, L. McCauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, and B. Pulendran.** 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J. Immunol.* **172**:4733-4743.
221. **Litinskiy, M. B., B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali, and A. Cerutti.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat. Immunol.* **3**:822-829.
222. **Mackay, F., P. Schneider, P. Rennert, and J. Browning.** 2003. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu. Rev. Immunol.* **21**:231-264.
223. **Clark, R. and T. Kupper.** 2005. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* **125**:629-637.
224. **Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig.** 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp. Med.* **194**:769-779.
225. **Hawiger, D., R. F. Masilamani, E. Bettelli, V. K. Kuchroo, and M. C. Nussenzweig.** 2004. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity.* **20**:695-705.
226. **Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman.** 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp. Med.* **196**:1627-1638.
227. **Baxter, A. G. and P. D. Hodgkin.** 2002. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat. Rev. Immunol* **2**:439-446.
228. **Chen, L.** 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol* **4**:336-347.
229. **Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, C. L. Slingluff, Jr., and A. L. Mellor.** 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**:1867-1870.
230. **Munn, D. H., M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, J. L. Messina, P. Chandler, P. A. Koni, and A. L. Mellor.** 2004. Expression of indoleamine 2,3-

- dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin. Invest* **114**:280-290.
231. **Weiner, H. L.** 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews* **182**:207-214.
232. **Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breitmayer, F. Cottrez, and H. Groux.** 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. **18**:605-617.
233. **Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, and M. G. Roncarolo.** 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* **105**:1162-1169.
234. **Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk.** 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**:1213-1222.
235. **Higgins, S. C., E. C. Lavelle, C. McCann, B. Keogh, E. McNeela, P. Byrne, B. O'Gorman, A. Jarnicki, P. McGuirk, and K. H. Mills.** 2003. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J Immunol* **171**:3119-3127.
236. **Lavelle, E. C., E. McNeela, M. E. Armstrong, O. Leavy, S. C. Higgins, and K. H. Mills.** 2003. Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. *J Immunol* **171**:2384-2392.
237. **McGuirk, P., C. McCann, and K. H. Mills.** 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp. Med.* **195**:221-231.
238. **Tarbell, K. V., S. Yamazaki, and R. M. Steinman.** 2006. The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Semin. Immunol* **18**:93-102.
239. **Yamazaki, S., M. Patel, A. Harper, A. Bonito, H. Fukuyama, M. Pack, K. V. Tarbell, M. Talmor, J. V. Ravetch, K. Inaba, and R. M. Steinman.** 2006. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:2758-2763.
240. **Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R. M. Steinman.** 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp. Med.* **198**:235-247.
241. **Tarbell, K. V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, and R. M. Steinman.** 2004. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp. Med.* **199**:1467-1477.
242. **Fehervari, Z. and S. Sakaguchi.** 2004. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* **16**:1769-1780.
243. **Brinster, C. and E. M. Shevach.** 2005. Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function. *J. Immunol.* **175**:7332-7340.
244. **Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer.** 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* **6**:1219-1227.

245. **Kubo, T., R. D. Hatton, J. Oliver, X. Liu, C. O. Elson, and C. T. Weaver.** 2004. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol* **173**:7249-7258.
246. **Sutmuller, R. P., M. H. den Brok, M. Kramer, E. J. Bennink, L. W. Toonen, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, S. Akira, M. G. Netea, and G. J. Adema.** 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin. Invest* **116**:485-494.
247. **Liu, H., M. Komai-Koma, D. Xu, and F. Y. Liew.** 2006. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:7048-7053.
248. **Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, and N. Suci-Foca.** 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol* **3**:237-243.
249. **Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars.** 2000. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J Immunol* **30**:1538-1543.
250. **Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri.** 2004. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* **172**:4676-4680.
251. **Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdager, and P. Santamaria.** 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunity*. **19**:877-889.
252. **Gershon, R. K. and K. Kondo.** 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**:903-914.
253. **Janeway, C. A., Jr.** 1988. Do suppressor T cells exist? A reply. *Scand. J. Immunol.* **27**:621-623.
254. **Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo.** 1997. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**:737-742.
255. **Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda.** 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**:1151-1164.
256. **Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner.** 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**:1237-1240.
257. **Godfrey, D. I. and M. Kronenberg.** 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin. Invest* **114**:1379-1388.
258. **Jiang, S., S. Tugulea, G. Pennesi, Z. Liu, A. Mulder, S. Lederman, P. Harris, R. Cortesini, and N. Suci-Foca.** 1998. Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum. Immunol* **59**:690-699.
259. **Penhale, W. J., W. J. Irvine, J. R. Inglis, and A. Farmer.** 1976. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin. Exp. Immunol.* **25**:6-16.

260. **Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka.** 1982. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *The Journal of Experimental Medicine* **156**:1577-1586.
261. **Greiner, D. L., J. P. Mordes, E. S. Handler, M. Angelillo, N. Nakamura, and A. A. Rossini.** 1987. Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. *The Journal of Experimental Medicine* **166**:461-475.
262. **Boitard, C., R. Yasunami, M. Dardenne, and J. F. Bach.** 1989. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *The Journal of Experimental Medicine* **169**:1669-1680.
263. **Dieckmann, D., H. Plattner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler.** 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* **193**:1303-1310.
264. **Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk.** 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **193**:1285-1294.
265. **Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi.** 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**:18-32.
266. **Piccirillo, C. A. and E. M. Shevach.** 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* **167**:1137-1140.
267. **Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille.** 2002. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:771-778.
268. **Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama.** 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* **59**:3128-3133.
269. **Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks.** 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* **420**:502-507.
270. **Taylor, P. A., C. J. Lees, and B. R. Blazar.** 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* **99**:3493-3499.
271. **Sakaguchi, S.** 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **22**:531-562.
272. **Kono, T., Y. Minami, and T. Taniguchi.** 1993. The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: role of the beta-chain. *Semin. Immunol.* **5**:299-307.
273. **Rogers, W. O., C. T. Weaver, L. A. Kraus, J. Li, L. Li, and R. P. Bucy.** 1997. Visualization of antigen-specific T cell activation and cytokine expression in vivo. *J Immunol* **158**:649-657.
274. **Yang, C. P., S. M. Sparshott, D. Duffy, P. Garside, and E. B. Bell.** 2006. The phenotype and survival of antigen-stimulated transgenic CD4 T cells in vivo: the influence of persisting antigen. *Int. Immunol* **18**:515-523.
275. **Nelson, B. H. and D. M. Willerford.** 1998. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol* **70**:1-81.

276. **Maxwell, J. R., R. J. Rossi, S. J. McSorley, and A. T. Vella.** 2004. T cell clonal conditioning: a phase occurring early after antigen presentation but before clonal expansion is impacted by Toll-like receptor stimulation. *J Immunol* **172**:248-259.
277. **Wing, K., A. Ekmark, H. Karlsson, A. Rudin, and E. Suri-Payer.** 2002. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* **106**:190-199.
278. **Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler.** 2001. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* **167**:1245-1253.
279. **Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, L. B. Caddle, and R. L. Coffman.** 1993. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* **5**:1461-1471.
280. **Lehmann, J., J. Huehn, R. M. de la, F. Maszyrna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann.** 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:13031-13036.
281. **Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi.** 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**:303-310.
282. **Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie.** 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)/CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **192**:295-302.
283. **Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi.** 2002. Stimulation of CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* **3**:135-142.
284. **McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne.** 2002. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* **16**:311-323.
285. **Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell.** 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**:68-73.
286. **Godfrey, V. L., J. E. Wilkinson, and L. B. Russell.** 1991. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am. J Pathol.* **138**:1379-1387.
287. **Gambineri, E., T. R. Torgerson, and H. D. Ochs.** 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**:430-435.
288. **Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky.** 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**:330-336.
289. **Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi.** 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**:1057-1061.
290. **Khattari, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell.** 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol* **4**:337-342.

291. **Walker, M. R., D. J. Kasprowicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner, and S. F. Ziegler.** 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin. Invest* **112**:1437-1443.
292. **Nishimura, E., T. Sakihama, R. Setoguchi, K. Tanaka, and S. Sakaguchi.** 2004. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* **16**:1189-1201.
293. **Yagi, H., T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii, and S. Sakaguchi.** 2004. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* **16**:1643-1656.
294. **Ono, M., J. Shimizu, Y. Miyachi, and S. Sakaguchi.** 2006. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and. *J. Immunol.* **176**:4748-4756.
295. **Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky.** 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* **22**:329-341.
296. **Ziegler, S. F.** 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol* **24**:209-226.
297. **Wing, K., E. Suri-Payer, and A. Rudin.** 2005. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand. J Immunol* **62**:1-15.
298. **Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Heemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, Z. L. van der, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, T. H. Ottenhoff, and R. E. Toes.** 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol* **66**:13-20.
299. **Roncador, G., P. J. Brown, L. Maestre, S. Hue, J. L. Martinez-Torrecuadrada, K. L. Ling, S. Pratap, C. Toms, B. C. Fox, V. Cerundolo, F. Powrie, and A. H. Banham.** 2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* **35**:1681-1691.
300. **Walker, M. R., B. D. Carson, G. T. Nepom, S. F. Ziegler, and J. H. Buckner.** 2005. De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:4103-4108.
301. **Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs, and A. Y. Rudensky.** 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:6659-6664.
302. **Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl.** 2003. 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.* **198**:1875-1886.
303. **Fu, S., N. Zhang, A. C. Yopp, D. Chen, M. Mao, D. Chen, H. Zhang, Y. Ding, and J. S. Bromberg.** 2004. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am. J Transplant.* **4**:1614-1627.
304. **Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath.** 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J Immunol* **172**:5149-5153.

305. **Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi.** 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10**:1969-1980.
306. **Thornton, A. M. and E. M. Shevach.** 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**:287-296.
307. **Wing, K., S. Lindgren, G. Kollberg, A. Lundgren, R. A. Harris, A. Rudin, S. Lundin, and E. Suri-Payer.** 2003. CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells. *Eur. J Immunol* **33**:579-587.
308. **Lundgren, A., E. Suri-Payer, K. Enarsson, A. M. Svennerholm, and B. S. Lundin.** 2003. Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect. Immun.* **71**:1755-1762.
309. **Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky.** 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **6**:1142-1151.
310. **Bayer, A. L., A. Yu, D. Adeegbe, and T. R. Malek.** 2005. Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period. *J Exp. Med.* **201**:769-777.
311. **Scheffold, A., J. Huhn, and T. Hofer.** 2005. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur. J Immunol* **35**:1336-1341.
312. **Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky.** 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol* **3**:33-41.
313. **Klein, L., K. Khazaie, and H. von Boehmer.** 2003. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:8886-8891.
314. **Walker, L. S., A. Chodos, M. Eggena, H. Dooms, and A. K. Abbas.** 2003. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**:249-258.
315. **Shevach, E. M.** 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:389-400.
316. **Thornton, A. M., C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach.** 2004. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur. J. Immunol.* **34**:366-376.
317. **D'Cruz, L. M. and L. Klein.** 2005. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat. Immunol* **6**:1152-1159.
318. **Sakaguchi, S.** 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**:345-352.
319. **Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone.** 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* **12**:431-440.
320. **Stephens, G. L., R. S. McHugh, M. J. Whitters, D. A. Young, D. Luxenberg, B. M. Carreno, M. Collins, and E. M. Shevach.** 2004. Engagement of glucocorticoid-induced

- TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.* **173**:5008-5020.
321. **Ji, H. B., G. Liao, W. A. Faubion, A. C. Abadia-Molina, C. Cozzo, F. S. Laroux, A. Caton, and C. Terhorst.** 2004. Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol* **172**:5823-5827.
322. **Tone, M., Y. Tone, E. Adams, S. F. Yates, M. R. Frewin, S. P. Cobbold, and H. Waldmann.** 2003. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:15059-15064.
323. **Pasare, C. and R. Medzhitov.** 2004. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity.* **21**:733-741.
324. **Sakaguchi, S.** 2003. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J. Exp. Med.* **197**:397-401.
325. **Peng, G., Z. Guo, Y. Kiniwa, K. S. Voo, W. Peng, T. Fu, D. Y. Wang, Y. Li, H. Y. Wang, and R. F. Wang.** 2005. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* **309**:1380-1384.
326. **Thornton, A. M. and E. M. Shevach.** 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* **164**:183-190.
327. **Curotto de Lafaille, M. A., S. Muriglan, M. J. Sunshine, Y. Lei, N. Kutchukhidze, G. C. Furtado, A. K. Wensky, D. Olivares-Villagomez, and J. J. Lafaille.** 2001. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **194**:1349-1359.
328. **Bystry, R. S., V. Aluvihare, K. A. Welch, M. Kallikourdis, and A. G. Betz.** 2001. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat. Immunol* **2**:1126-1132.
329. **Ghiringhelli, F., C. Menard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P. E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lecesne, C. Robert, J. Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C. Capron, W. Vainchenker, F. Martin, and L. Zitvogel.** 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp. Med.* **202**:1075-1085.
330. **von Boehmer, H.** 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* **6**:338-344.
331. **Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz, and G. Schuler.** 2002. Human CD4(+)/CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp. Med.* **196**:247-253.
332. **Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A. H. Enk.** 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**:255-260.
333. **Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor.** 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:10398-10403.
334. **Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti.** 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol* **4**:1206-1212.

335. **Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley.** 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. **21**:589-601.
336. **Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober.** 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp. Med.* **194**:629-644.
337. **de la, R. M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold.** 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J Immunol* **34**:2480-2488.
338. **Schorle, H., T. Holtschke, T. Hunig, A. Schimpl, and I. Horak.** 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* **352**:621-624.
339. **Almeida, A. R., N. Legrand, M. Papiernik, and A. A. Freitas.** 2002. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol* **169**:4850-4860.
340. **Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, and J. J. Lafaille.** 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J. Exp. Med.* **196**:851-857.
341. **Malek, T. R. and A. L. Bayer.** 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol* **4**:665-674.
342. **Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T. C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira.** 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* **166**:3008-3018.
343. **Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie.** 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **190**:995-1004.
344. **Suri-Payer, E. and H. Cantor.** 2001. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun.* **16**:115-123.
345. **Apostolou, I. and H. von Boehmer.** 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp. Med.* **199**:1401-1408.
346. **Taams, L. S., M. Vukmanovic-Stejic, J. Smith, P. J. Dunne, J. M. Fletcher, F. J. Plunkett, S. B. Ebeling, G. Lombardi, M. H. Rustin, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber, M. Salmon, and A. N. Akbar.** 2002. Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur. J Immunol* **32**:1621-1630.
347. **Kasow, K. A., X. Chen, J. Knowles, D. Wichlan, R. Handgretinger, and J. M. Riberdy.** 2004. Human CD4+CD25+ regulatory T cells share equally complex and comparable repertoires with CD4+. *J Immunol* **172**:6123-6128.
348. **Suffia, I. J., S. K. Reckling, C. A. Piccirillo, R. S. Goldszmid, and Y. Belkaid.** 2006. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J. Exp. Med.* **203**:777-788.
349. **Masteller, E. L., Q. Tang, and J. A. Bluestone.** 2006. Antigen-specific regulatory T cells -- ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin. Immunol* **18**:103-110.
350. **Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille, and M. L. Dustin.** 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **203**:505-511.

351. **Green, E. A., Y. Choi, and R. A. Flavell.** 2002. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity*. **16**:183-191.
352. **Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B. L. Salomon.** 2003. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp. Med.* **198**:737-746.
353. **von Boehmer, H.** 2003. Dynamics of suppressor T cells: in vivo veritas. *J. Exp. Med.* **198**:845-849.
354. **Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone.** 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol* **7**:83-92.
355. **Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, R. M. de la, C. A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann.** 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp. Med.* **199**:303-313.
356. **Chen, Z., A. E. Herman, M. Matos, D. Mathis, and C. Benoist.** 2005. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J Exp. Med.* **202**:1387-1397.
357. **Vogel, S. N., J. S. Wax, P. Y. Perera, C. Padlan, M. Potter, and B. A. Mock.** 1994. Construction of a BALB/c congenic mouse, C.C3H-Lpsd, that expresses the Lpsd allele: analysis of chromosome 4 markers surrounding the Lps gene. *Infect. Immun.* **62**:4454-4459.
358. **Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. **11**:443-451.
359. **Yoshimoto, T., H. Nagase, H. Nakano, A. Matsuzawa, and H. Nariuchi.** 1994. A V beta 8.2-specific superantigen from exogenous mouse mammary tumor virus carried by FM mice. *Eur. J Immunol* **24**:1612-1619.
360. **Le Bon, A., A. C. Wache, and M. Papiernik.** 1999. In vivo elimination of viral superantigen-activated CD4+ T cells: apoptosis occurs at a distance from the activation site. *Int. Immunol.* **11**:373-382.
361. **Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**:77-92.
362. **Fan, H. and J. A. Cook.** 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin. Res.* **10**:71-84.
363. **Dalpke, A. H., M. D. Lehner, T. Hartung, and K. Heeg.** 2005. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology* **116**:203-212.
364. **Dobrovolskaia, M. A., A. E. Medvedev, K. E. Thomas, N. Cuesta, V. Toshchakov, T. Ren, M. J. Cody, S. M. Michalek, N. R. Rice, and S. N. Vogel.** 2003. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J. Immunol.* **170**:508-519.

365. **Jacinto, R., T. Hartung, C. McCall, and L. Li.** 2002. Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced tolerance and cross-tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* **168**:6136-6141.
366. **Martin, P., S. R. Ruiz, G. M. del Hoyo, F. Anjuere, H. H. Vargas, M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin.** 2002. Dramatic increase in lymph node dendritic cell number during infection by the mouse mammary tumor virus occurs by a CD62L-dependent blood-borne DC recruitment. *Blood* **99**:1282-1288.
367. **Michelsen, K. S., A. Aicher, M. Mohaupt, T. Hartung, S. Dimmeler, C. J. Kirschning, and R. R. Schumann.** 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol. Chem.* **276**:25680-25686.
368. **Guillot, L., V. Balloy, F. X. McCormack, D. T. Golenbock, M. Chignard, and M. Si-Tahar.** 2002. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* **168**:5989-5992.
369. **Rossio, J. L., M. T. Esser, K. Suryanarayana, D. K. Schneider, J. W. Bess, Jr., G. M. Vasquez, T. A. Wiltrout, E. Chertova, M. K. Grimes, Q. Sattentau, L. O. Arthur, L. E. Henderson, and J. D. Lifson.** 1998. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J Virol.* **72**:7992-8001.
370. **Czarneski, J., J. C. Rassa, and S. R. Ross.** 2003. Mouse mammary tumor virus and the immune system. *Immunol Res* **27**:469-80.
371. **Moore, K. W., M. R. de Waal, R. L. Coffman, and A. O'Garra.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol* **19**:683-765.
372. **Zelenay, S., T. Lopes-Carvalho, I. Caramalho, M. F. Moraes-Fontes, M. Rebelo, and J. Demengeot.** 2005. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:4091-4096.
373. **Kawai, T. and S. Akira.** 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol* **7**:131-137.
374. **Triantafilou, K. and M. Triantafilou.** 2004. Coxsackievirus B4-induced cytokine production in pancreatic cells is mediated through toll-like receptor 4. *J Virol.* **78**:11313-11320.
375. **Bieback, K., E. Lien, I. M. Klagge, E. Avota, J. Schneider-Schaulies, W. P. Duprex, H. Wagner, C. J. Kirschning, M. ter, V, and S. Schneider-Schaulies.** 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol.* **76**:8729-8736.
376. **Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. W. Finberg.** 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* **77**:4588-4596.
377. **Mengozzi, M. and P. Ghezzi.** 1993. Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. *Eur. Cytokine Netw.* **4**:89-98.
378. **Ziegler-Heitbrock, H. W.** 1995. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm.* **45**:13-26.
379. **Karp, C. L., M. Wysocka, X. Ma, M. Marovich, R. E. Factor, T. Nutman, M. Armant, L. Wahl, P. Cuomo, and G. Trinchieri.** 1998. Potent suppression of IL-12 production

- from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur. J Immunol* **28**:3128-3136.
380. **Wysocka, M., S. Robertson, H. Riemann, J. Caamano, C. Hunter, A. Mackiewicz, L. J. Montaner, G. Trinchieri, and C. L. Karp.** 2001. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol* **166**:7504-7513.
381. **Zuckerman, S. H. and G. F. Evans.** 1992. Endotoxin tolerance: in vivo regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 synthesis is at the transcriptional level. *Cell Immunol* **140**:513-519.
382. **Medvedev, A. E., K. M. Kopydlowski, and S. N. Vogel.** 2000. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J. Immunol.* **164**:5564-5574.
383. **Sato, S., F. Nomura, T. Kawai, O. Takeuchi, P. F. Muhlratt, K. Takeda, and S. Akira.** 2000. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J. Immunol.* **165**:7096-7101.
384. **Nakayama, K., S. Okugawa, S. Yanagimoto, T. Kitazawa, K. Tsukada, M. Kawada, S. Kimura, K. Hirai, Y. Takagaki, and Y. Ota.** 2004. Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages. *J Biol. Chem.* **279**:6629-6634.
385. **Crabtree, T. D., L. Jin, D. P. Raymond, S. J. Pelletier, C. W. Houlgrave, T. G. Gleason, T. L. Pruett, and R. G. Sawyer.** 2001. Preexposure of murine macrophages to CpG oligonucleotide results in a biphasic tumor necrosis factor alpha response to subsequent lipopolysaccharide challenge. *Infect. Immun.* **69**:2123-2129.
386. **Li, C. H., J. H. Wang, and H. P. Redmond.** 2006. Bacterial lipoprotein-induced self-tolerance and cross-tolerance to LPS are associated with reduced IRAK-1 expression and MyD88-IRAK complex formation. *J Leukoc. Biol.* **79**:867-875.
387. **Medvedev, A. E., P. Henneke, A. Schromm, E. Lien, R. Ingalls, M. J. Fenton, D. T. Golenbock, and S. N. Vogel.** 2001. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J. Immunol.* **167**:2257-2267.
388. **Peng, S. L.** 2005. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol* **17**:230-236.
389. **Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**:135-145.
390. **Burzyn, D., J. C. Rassa, D. Kim, I. Nepomnaschy, S. R. Ross, and I. Piazzon.** 2004. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol* **78**:576-84.
391. **Re, F. and J. L. Strominger.** 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol. Chem.* **276**:37692-37699.
392. **Jones, B. W., K. A. Heldwein, T. K. Means, J. J. Saukkonen, and M. J. Fenton.** 2001. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* **60 Suppl 3**:iii6-12.
393. **Burzyn, D., Rassa J.C., D. Kim, I. Nepomnaschy, S. R. Ross, and I. Piazzon.** 2004. Interaction of a Retrovirus with Toll-like Receptors Induces Activation of Dendritic Cells, p. 53-57. *Immunology* 2004.

394. **Murabayashi, N., M. Kurita-Taniguchi, M. Ayata, M. Matsumoto, H. Ogura, and T. Seya.** 2002. Susceptibility of human dendritic cells (DCs) to measles virus (MV) depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes. Infect.* **4**:785-794.
395. **Cravens, P. D. and P. E. Lipsky.** 2002. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol.* **80**:497-505.
396. **Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi, and A. Mantovani.** 1999. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc. Biol.* **66**:1-9.
397. **Shortman, K. and L. Wu.** 2004. Are dendritic cells end cells? *Nat. Immunol.* **5**:1105-1106.
398. **Zhang, M., H. Tang, Z. Guo, H. An, X. Zhu, W. Song, J. Guo, X. Huang, T. Chen, J. Wang, and X. Cao.** 2004. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat. Immunol* **5**:1124-1133.
399. **Dadaglio, G., C. M. Sun, R. Lo-Man, C. A. Siegrist, and C. Leclerc.** 2002. Efficient in vivo priming of specific cytotoxic T cell responses by neonatal dendritic cells. *J Immunol* **168**:2219-2224.
400. **Sun, C. M., L. Fiette, M. Tanguy, C. Leclerc, and R. Lo-Man.** 2003. Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood* **102**:585-591.
401. **Dacic, A., Q. X. Shao, A. D'Amico, M. O'keeffe, W. F. Chen, K. Shortman, and L. Wu.** 2004. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J. Immunol.* **172**:1018-1027.
402. **Jones, C. A., M. Fernandez, K. Herc, L. Bosnjak, M. Miranda-Saksena, R. A. Boadle, and A. Cunningham.** 2003. Herpes simplex virus type 2 induces rapid cell death and functional impairment of murine dendritic cells in vitro. *J Virol.* **77**:11139-11149.
403. **Sato, A. and A. Iwasaki.** 2005. Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cell Mol. Life Sci.* **62**:1333-1338.
404. **Jump, R. L. and A. D. Levine.** 2002. Murine Peyer's patches favor development of an IL-10-secreting, regulatory T cell population. *J Immunol* **168**:6113-6119.
405. **Sansonetti, P. J.** 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol* **4**:953-964.
406. **O'Garra, A. and M. Howard.** 1992. Cytokines and Ly-1 (B1) B cells. *Int. Rev. Immunol* **8**:219-234.
407. **Street, N. E. and T. R. Mosmann.** 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* **5**:171-177.
408. **Pestka, S., C. D. Krause, D. Sarkar, M. R. Walter, Y. Shi, and P. B. Fisher.** 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol* **22**:929-979.
409. **Jonuleit, H. and E. Schmitt.** 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* **171**:6323-6327.
410. **Fehervari, Z. and S. Sakaguchi.** 2004. CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest* **114**:1209-1217.
411. **Beissert, S., A. Schwarz, and T. Schwarz.** 2006. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol.* **126**:15-24.
412. **Chatila, T. and R. S. Geha.** 1992. Superantigens. *Curr. Opin. Immunol* **4**:74-78.

413. **Scherer, M. T., L. Ignatowicz, G. M. Winslow, J. W. Kappler, and P. Marrack.** 1993. Superantigens: bacterial and viral proteins that manipulate the immune system. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:101-128.
414. **Ono, M., J. Shimizu, Y. Miyachi, and S. Sakaguchi.** 2006. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and. *J. Immunol.* **176**:4748-4756.
415. **Papiernik, M., do Carmo Leite-de-MoraesM, C. Pontoux, A. M. Joret, B. Rocha, C. Penit, and M. Dy.** 1997. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J. Immunol.* **158**:4642-4653.
416. **Suvas, S. and B. T. Rouse.** 2005. Regulation of microbial immunity: the suppressor cell renaissance. *Viral Immunol* **18**:411-418.
417. **Mills, K. H.** 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol* **4**:841-855.
418. **Raghavan, S. and J. Holmgren.** 2005. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **44**:121-127.
419. **Belkaid, Y. and B. T. Rouse.** 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol* **6**:353-360.
420. **Raghavan, S., M. Fredriksson, A. M. Svennerholm, J. Holmgren, and E. Suri-Payer.** 2003. Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Clin. Exp. Immunol* **132**:393-400.
421. **Montagnoli, C., A. Bacci, S. Bozza, R. Gaziano, P. Mosci, A. H. Sharpe, and L. Romani.** 2002. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol* **169**:6298-6308.
422. **Hori, S., T. L. Carvalho, and J. Demengeot.** 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur. J. Immunol.* **32**:1282-1291.
423. **Suvas, S., A. K. Azkur, B. S. Kim, U. Kumaraguru, and B. T. Rouse.** 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol* **172**:4123-4132.
424. **Suvas, S., U. Kumaraguru, C. D. Pack, S. Lee, and B. T. Rouse.** 2003. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp. Med.* **198**:889-901.
425. **Beilharz, M. W., L. M. Sammels, A. Paun, K. Shaw, P. van Eeden, M. W. Watson, and M. L. Ashdown.** 2004. Timed ablation of regulatory CD4+ T cells can prevent murine AIDS progression. *J Immunol* **172**:4917-4925.
426. **Vahlenkamp, T. W., M. B. Tompkins, and W. A. Tompkins.** 2005. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet. Immunol Immunopathol.* **108**:219-225.
427. **Jude, B. A., Y. Pobezinskaya, J. Bishop, S. Parke, R. M. Medzhitov, A. V. Chervonsky, and T. V. Golovkina.** 2003. Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nat. Immunol.* **4**:573-578.