

Tesis Doctoral

Influencia de la catepsina L en la población de células T regulatorias CD4+: rol del estroma

Camicia, Gabriela Lorena

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Camicia, Gabriela Lorena. (2011). Influencia de la catepsina L en la población de células T regulatorias CD4+: rol del estroma. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Camicia, Gabriela Lorena. "Influencia de la catepsina L en la población de células T regulatorias CD4+: rol del estroma". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

INFLUENCIA DE LA CATEPSINA L EN LA POBLACIÓN DE CÉLULAS T REGULATORIAS CD4+: ROL DEL ESTROMA

Las células T regulatorias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) son esenciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia lo propio y la homeostasis del sistema inmune. Utilizando ratones CTSL^{nkt/nkt}, portadores de una mutación en el gen que codifica para la proteasa catepsina L (CTSL), demostramos que la falta de actividad de esta enzima está asociada con una severa disminución en el número de células Treg en el timo, aunque no altera la frecuencia de los timocitos CD25⁺Foxp3⁺ en la población CD4 simple positiva. Contrariamente, en los órganos linfoides periféricos la falta de actividad de CTSL correlaciona con un aumento en la proporción de células CD25⁺Foxp3⁺ dentro de la población CD4⁺ y con un incremento en el número de células Treg en los ganglios linfáticos (GL).

Determinamos que en los GL de los ratones CTSL^{nkt/nkt} las tasas de proliferación y apoptosis de las células CD4⁺ Treg y T convencionales (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻) están aumentadas. Estos aumentos afectarían el número de células Treg pero no determinarían el aumento en su frecuencia dentro de la población CD4⁺. La ausencia de actividad de CTSL en las células linfoides influencia la proliferación de las células T convencionales, mientras que la falta de actividad de CTSL en el entorno de los GL aumenta tanto la proliferación de las células T convencionales como la de las Treg. Ensayos *in vitro* sugieren que la inhibición de CTSL induce la expresión de Foxp3 en algunas células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻. Interesantemente, las células estromales derivadas de GL de ratones CTSL^{nkt/nkt} producen más TGF-β1 que las de ratones normales. En conjunto estos resultados indican que la CTSL interviene en la regulación del número y la frecuencia de las células Treg en los órganos linfoides, y sugieren que dicha enzima jugaría un rol en la adquisición del fenotipo iTreg en la periferia.

Demostramos además que las células estromales de los GL son capaces de aumentar la proliferación y la supervivencia *in vitro* de las células Treg.

Estos resultados aportan nuevos conocimientos acerca de la biología de las células Treg y de los mecanismos que regulan el balance entre las células CD4⁺ Treg y T convencionales, pudiendo así contribuir al desarrollo de nuevas terapias inmunológicas.

Palabras clave: Catepsina L, células T regulatorias, células estromales, proliferación, apoptosis.

INFLUENCE OF CATHEPSIN L ON CD4+ REGULATORY T CELL POPULATION: THE ROLE OF STROMA

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) are essential for the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis. Using CTSL^{nkt/nkt} mice, carrying a mutation in the gene encoding the cathepsin L protease (CTSL), we demonstrated that the lack of CTSL activity is associated with a severe decrease in the number of Treg thymocytes, although it does not alter the frequency of CD25⁺Foxp3⁺ cells within the CD4 simple positive pool. On the other hand, the lack of CTSL activity in the secondary lymphoid organs correlates with an increase in the frequency of CD4⁺CD25⁺ cells within the CD4⁺ T cell subset, along with an increase in the lymph nodes (LN) Treg cell number.

We determined that the apoptosis and proliferation rates of both Treg cells and T conventional cells (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻) are increased in the LN of CTSL^{nkt/nkt} mice. These increases would affect the number of Treg cells but they would not determine a higher frequency of Treg cells within the CD4⁺ T cell subset. The absence of CTSL activity in lymphoid cells increases the proliferation levels of T conventional cells, whereas the lack of CTSL activity in the LN microenvironment influenced both, the T conventional and Treg cells proliferation rates. Our results suggest that CTSL inhibition would induce Foxp3 expression within few CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells *in vitro*. Interestingly, CTSL mutant mice LN derived stromal cells produce more TGF-β1 than LN stromal cells from wt mice. Taken together, these results indicate that CTSL influences the number and frequency of lymphoid organs Treg cells and they suggest that this protease would play a role in the peripheral conversion of T conventional cells to Treg phenotype.

We also demonstrated that LN stromal cells are capable to increase both Treg proliferation and survival levels *in vitro*.

Our results provide novel insights into biology of Treg cells and into the mechanisms that regulate the Treg and T conventional cells balance. These findings would contribute to the development of new immunological therapies.

Key words: Cathepsin L, regulatory T cells, stromal cells, proliferation, apoptosis.

Agradecimientos

Quiero agradecer en este espacio a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta han colaborado en el desarrollo de esta Tesis.

A mi Directora, Irene, y a Isabel por darme la posibilidad de realizar esta Tesis, por guiarme con experiencia a lo largo de todos estos años, y por las innumerables correcciones que hicieron que este trabajo sea posible.

A todos los amigos, compañeros, becarios, técnicos, directores, que trabajan o trabajaron en el ILEX y compartieron estos años conmigo. En especial a Andy, Dany, Gabo, Noe y Juli por su inmensa ayuda, por todo su apoyo y por haber compartido tantos buenos y malos momentos juntos. A Tito y a Gaby, por su enorme predisposición, por brindarme siempre toda su ayuda y su paciencia. A Dami, Juancito, Juli G, Jose, Nadezda, Martiniano, Julián y Dalia, por su colaboración y por todas las charlas compartidas. A Vicky, Romi, Ana, Pilar, por tantos congresos y salidas. Y por último, a Julio y a toda la gente del bioterio.

A Ceci, Romi, Pame, Mariana y Mara por brindarme su amistad durante todos estos años.

A Hernán, por su contención, por acompañarme incondicionalmente y permitirme formar una familia hermosa.

A Delfi, por llenarme de felicidad y emoción todos los días, a través de su sonrisa y su crecimiento.

Al resto de mi familia, especialmente a mi mamá y a mi papá, por su apoyo incondicional durante todos estos años y por brindarme siempre toda su ayuda.

INDICE

Abreviaturas	8
INTRODUCCIÓN	9
Células T regulatorias	10
Un poco de historia	10
Células T regulatorias CD4+CD25+	11
Fenotipo de las células T regulatorias CD4+CD25+	13
Células Treg CD4+CD25+Foxp3+ naturales o inducidas	14
Células Treg naturales	16
Células Treg Foxp3+ inducidas	18
Activación y especificidad de las células Treg	20
Mecanismos de acción, células blanco y especificidad de la supresión	22
Órganos linfoides secundarios y estroma	24
Arquitectura de los ganglios linfáticos	24
Células estromales linfoides	26
Fenotipo y organización de las células estromales en los ganglios linfáticos	27
Fibroblastos reticulares (FRs)	27
Células dendríticas foliculares (CDFs)	28
Células reticulares marginales (CRMs)	29
Fibroblastos de la médula ganglionar	29
Células endoteliales linfáticas (CELs)	29
Células endoteliales vasculares (CEVs)	30
Funciones de las células estromales en los ganglios linfáticos	30
A. Migración linfocitaria	30
B. Homeostasis linfoide	32
C. Interacciones con CPAs	33
D. Control de la respuesta inmune	34
E. Tolerancia periférica	35
Catepsina L	37
Funciones de la CTSL	38
Rol de la CTSL en el sistema inmune	40
A. Procesamiento y presentación antigénica en el contexto de las moléculas del CMH de clase II	40
B. Los ratones CTSL ^{nkt/nkt} : Influencia de la CTSL en la población de células T y en la composición de la ECM de los órganos linfoides	42
B.1. Origen de los ratones CTSL ^{nkt/nkt}	42
B.2. Los ratones CTSL ^{nkt/nkt} . Modelo experimental de la influencia de la CTSL sobre el sistema inmune	43

MATERIALES Y MÉTODOS	45
Animales	46
Suspensiones celulares	46
Citometría de flujo	47
Marcación con CFSE	49
Separación magnética de células	49
Ensayos de proliferación <i>in vivo</i>	50
Preparación de placas de cultivo cubiertas con anti-CD3	51
Ensayo de conversión <i>in vitro</i>	51
Ensayo de inhibición de CTSL <i>in vitro</i>	51
Cultivos de células estromales de ganglios linfáticos	52
Obtención de células estromales en suspensión	53
ELISA para TGF- β	53
Extracción de RNA	54
RT-PCR	54
Cultivo mixto linfocitario (CML)	56
Ensayos de viabilidad y apoptosis <i>in vitro</i>	57
Presentación de los resultados	58
Estadística	58

RESULTADOS	59
-------------------	----

CAPÍTULO 1. Influencia de la catepsina L en la población de células T regulatorias CD4+	60
1.1-Células Treg CD4+CD25+Foxp3+ en ratones deficientes en CTSL	60
1.1.1-Los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL ^{nkt/nkt} presentan alteraciones en el número absoluto de células Treg y en su frecuencia dentro de la población T CD4+	60
1.1.2-Capacidad inmunosupresora de las células CD4+CD25+ de los ratones mutantes para CTSL	64
1.1.3-Characterización fenotípica de las células Treg en ratones CTSL ^{nkt/nkt}	65
1.1.4-Células Treg en el timo de los ratones mutantes para CTSL	67
1.1.5-Alteraciones en la frecuencia de células Treg en la población CD4+ de ratones CTSL ^{nkt/nkt} neonatos	67
1.2-Mecanismos periféricos involucrados en el aumento de células Treg en los ratones CTSL ^{nkt/nkt}	70
1.2.1-El incremento en la proporción de células Treg en la población CD4+ de los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL ^{nkt/nkt} no correlaciona con una reducción en su nivel de apoptosis basal	70
1.2.2-La mutación <i>nkt</i> esta asociada con un incremento en los niveles de proliferación basal de las células Treg	73
1.2.3-Conversion de células CD4+CD25-Foxp3- a células Treg en ausencia de actividad de CTSL	78
Resumen del Capítulo 1	81

CAPÍTULO 2. Establecimiento y caracterización fenotípica de cultivos de células estromales derivados de ganglios linfáticos	82
2.1- Establecimiento y caracterización fenotípica de cultivos primarios de células estromales derivadas de ganglios linfáticos (cultivos de CEG)	82
2.2- Establecimiento y caracterización fenotípica de cultivos a largo plazo de células estromales derivadas de ganglios linfáticos (cultivos de LCEG)	85
Resumen del Capítulo 2	91
CAPÍTULO 3. Influencia del microambiente de los ganglios linfáticos en la proliferación de células T CD4+ regulatorias: Rol de la CTSL	92
3.1.- Influencia de las células estromales de los ganglios linfáticos sobre la proliferación de células CD4+ Treg y T convencionales	92
3.3- Influencia de la mutación <i>nkt</i> en las células linfoides y en su microambiente sobre la proliferación de las poblaciones Treg y T convencional	101
Resumen del Capítulo 3	105
CAPÍTULO 4. Influencia de las células estromales derivadas de ganglios linfáticos en la sobrevivencia de las células Treg	106
4.1- Efecto de las células estromales en la sobrevivencia de las células T CD4+	106
4.1.1- Influencia de los cultivos de CEG en la viabilidad <i>in vitro</i> de las células T CD4+	106
4.1.2- Influencia de los cultivos de LCEG en la viabilidad de las células T CD4+	108
4.2- Efecto de las células estromales en la apoptosis de las células Treg	109
4.3- Mecanismos involucrados en el mantenimiento de la viabilidad <i>in vitro</i> de las células Treg y T convencionales mediado por células estromales	112
Resumen del Capítulo 4	116
DISCUSIÓN	117
BIBLIOGRAFÍA	132

ABREVIATURAS

BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina

BSA: seroalbúmina bovina

CDs: Células dendríticas

CDFs: Células dendríticas foliculares

CEG: Células estromales derivadas de ganglios linfáticos

CFSE: 5,6- carboxifluorescein diacetato succinimidil éster

CTSL: catepsina L

CPA: célula presentadora de antígeno

ECM: Matriz extracelular

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FRs: Fibroblastos reticulares

IFM: intensidad de fluorescencia media

IL-: interleuquina

KO: Knock-out

LCEG: Células estromales derivadas de ganglios linfáticos obtenidas por cultivo a largo plazo.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

PBS: buffer fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

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

SBF: suero bovino fetal

SP: timocitos simple positivos (CD4+CD8- o CD4-CD8+)

SPF: libre de patógenos específicos

TCR: receptor de la célula T

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

Treg: célula T CD4+CD25+/- Foxp3+ regulatoria

Introducción

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.

Los vertebrados han desarrollado evolutivamente un sistema inmune complejo capaz de distinguir lo propio de lo no propio, de manera de eliminar patógenos foráneos y células tumorales, manteniendo a la vez tolerancia hacia las células normales y antígenos propios del organismo. Este estado de tolerancia se consigue a través de mecanismos que se han denominado tolerancia central y tolerancia periférica.

La tolerancia central T consiste en la eliminación de los linfocitos autoreactivos durante su maduración tímica. Dado que el proceso no es perfecto y células autoreactivas son capaces de escapar a la periferia, se requiere de otra variedad de mecanismos que se han denominado tolerancia periférica. Dentro de estos mecanismos resulta crítico el papel desempeñado por las células con función regulatoria¹.

Un poco de historia

La existencia de células T con función específicamente supresora o regulatoria ha sido muy discutida. El concepto de células T “supresoras” surge a comienzos de la década del '70 cuando Gershon y Kondo descubren que una subpoblación de células T - distintas de las ya conocidas T colaboradoras- eran capaces de frenar la respuesta inmune². Esta población de células T, denominadas supresoras, fue extensamente estudiada durante los años subsiguientes. Sin embargo, debido a la falta de caracterización y a la ausencia de marcadores específicos su existencia como linaje celular resultó muy controvertida^{3,4}. Fue así, como hacia fines de la década del '80, el concepto de células T supresoras fue abandonado, sugiriéndose que la regulación de la respuesta inmune se produce solamente por células no especializadas, a través de

mecanismos intrínsecos a la activación y diferenciación de células T inducidas por el antígeno⁵.

Sin embargo, nuevos trabajos publicados en la década del '90 hicieron resurgir el concepto de células supresoras o regulatorias^{6,9,10}. En 1995 Sakaguchi y col. describen en ratón, una pequeña población de células T CD4+CD25+, con una potente actividad supresora, a la cual denominan células T regulatorias con el objeto de evitar el escepticismo que aún rodeaba a las células T supresoras⁶. En base a este descubrimiento, hoy en día, las células T CD4+ se encuentran divididas en dos linajes: las células T colaboradoras convencionales y las células T regulatorias. Las células T convencionales controlan la inmunidad adaptativa mediante la activación, de modo antígeno-específico, de otras células efectoras tales como células T citotóxicas CD8+, células B y macrófagos. Por su parte, las células T regulatorias intervienen en la modulación negativa de la respuesta inmune, siendo su actividad esencial para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la homeostasis del sistema inmune^{4,7}.

En poco tiempo se han identificado muchas otras poblaciones de células con capacidad regulatoria o supresora, encontrándose una gran variabilidad en varios aspectos, incluyendo el origen, los mecanismos y blancos de acción, y la especificidad antigénica⁸. Dentro de los diferentes subtipos de células regulatorias que se han descrito hasta el momento pueden mencionarse las células: CD4+CD25+⁶, Tr1⁹, Th3¹⁰, NKT¹¹, CD8+CD28-¹², CD8+CD122+ y CD4-CD8-⁸.

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”.

Células T regulatorias CD4+CD25+

Las células T regulatorias CD4+CD25+ son quizás hoy en día las células regulatorias más estudiadas. En la búsqueda de un marcador de superficie que definiera más específicamente a estas células CD4+ con propiedades inmunorregulatorias, Sakaguchi y col. describieron una población de células T CD4+CD25+ en el ratón, que

constituye aproximadamente un 5-10% de todas las células T CD4+ y un 5% de los timocitos maduros CD4+CD8⁻⁶. 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+CD25+ regulatorias naturales, aunque como se explica más adelante, también existen células T CD4+CD25+ regulatorias inducidas o adaptativas. Una población con fenotipo similar ha sido identificada en humanos^{13,14}.

La importancia de las células CD4+CD25+ en relación al mantenimiento de la autotolerancia inmunológica, resultó evidente a partir de la observación de que la depleción de esas células resultaba en el desarrollo de un conjunto de enfermedades autoinmunes cuando a los ratones depletados se transferían células CD4+CD25⁻⁸. Posteriormente se reportó que las células T regulatorias CD4+CD25+ también cumplían un rol importante durante otros procesos que involucraban una respuesta inmune, como por ejemplo infecciones, tumores, trasplantes y reacciones de injerto contra huésped^{15,16,17,18,19,20}.

En el año 2003, se realiza otro gran avance en el campo de las células T regulatorias CD4+CD25+ con el descubrimiento del factor de transcripción Foxp3 como regulador crítico del desarrollo, la función y la homeostasis de esta población^{21,22}. El gen *Foxp3* fue identificado en el 2001 como el gen defectuoso en ratones Scurfy, los cuales desarrollaban de manera espontánea una severa autoinmunidad/inflamación como resultado de una mutación en un gen localizado en el cromosoma X²³. De forma inmediata, se encontró que mutaciones en el gen *FOXP3* humano, el ortólogo del *Foxp3* murino, eran las responsables de una enfermedad similar en humanos, denominada IPEX (síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al cromosoma X), caracterizada por fenómenos autoinmunes en múltiples órganos endócrinos, eczema y alergias severas^{24,25,26}.

Las similitudes de las enfermedades autoinmunes producidas en ratones por depleción de células CD4+CD25+ con aquellas encontradas en pacientes con IPEX condujeron a varios grupos a investigar el posible rol de Foxp3 en las células T regulatorias. Fue así, como se encontró que Foxp3 era una proteína esencial para el desarrollo y la función de las células T regulatorias CD4+CD25+. Se demostró que las células T CD4+CD25+ periféricas y los timocitos CD4+CD8-CD25+, expresaban el mRNA para *Foxp3* de manera específica, y que la expresión ectópica de *Foxp3* en

células T CD4⁺ convencionales las convierte en células fenotípica y funcionalmente similares a las células T regulatorias naturales^{21,22,27}.

Hoy en día, el factor de transcripción Foxp3 es considerado el marcador más específico del linaje T regulatorio en ratón. Sin embargo, en humanos, muchas células T vírgenes expresan FOXP3 luego de su activación, excluyendo a dicho factor de transcripción como marcador específico del linaje T regulatorio humano^{28,29,30,31,32}.

Fenotipo de las células T regulatorias CD4⁺CD25⁺

Además del ya mencionado Foxp3, existen varios marcadores ampliamente utilizados para la caracterización de las células T regulatorias, entre los que se encuentran: la cadena α del receptor para IL-2 (CD25), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen), GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene), LAG-3 (lymphocyte activation gene-3) y la cadena α del receptor para IL-7 (CD127), entre otros. El nivel de expresión y la naturaleza constitutiva de estos marcadores, los transforma en herramientas útiles para el aislamiento y el estudio de las células T regulatorias en organismos sanos. Sin embargo, ninguno de éstos marcadores es estrictamente específico del linaje T regulatorio.

La molécula CD25 ha sido un buen marcador para identificar a las células T regulatorias CD4⁺ de origen tímico. Sin embargo, todas las células T expresan CD25 luego de la activación³³ siendo la IL-2 un factor indispensable para la expansión clonal de las células T. En un ratón normal, las células CD4⁺CD25⁺ representan el 5-10% de las células CD4⁺ y resultan fácilmente distinguibles de la población CD4⁺CD25⁻. Por lo tanto el aislamiento de células regulatorias CD4⁺CD25⁺ 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⁺ expresan CD25. La mayoría expresa CD25 con intensidad baja o media (CD25^{int}) y sólo de un 1 a un 3% lo expresan con una intensidad alta (CD25^{high})³⁴. Estudios *in vitro* demostraron que es la población CD25^{high} la que posee propiedades inmunosupresoras³⁵. Las células CD4⁺CD25^{int} son consideradas células de memoria generadas luego del encuentro con un antígeno.

Al igual que CD25, el resto de las moléculas de superficie que son expresadas en forma constitutiva por las células T regulatorias se asocian en general con células activadas o de memoria. Así, CTLA-4 es un regulador negativo de la activación de las células T, cuya expresión aumenta en el segundo o tercer día subsiguiente a la activación en todas las células T³⁶. De modo similar, la expresión de GITR³⁷ y LAG-3³⁸ es inducida en células T luego de su activación.

Se ha sugerido que la expresión de CD127 disminuye en células T regulatorias y que esto podría ser utilizado para discriminar entre células T regulatorias CD127^{low} y células T convencionales CD127^{high} en humanos^{39,40}. Sin embargo, recientemente se ha reportado que la mayoría de las células T CD4⁺ disminuyen la expresión de CD127 luego de su activación⁴¹.

De esta manera, en condiciones de activación inmunológica, sólo Foxp3 sería un óptimo marcador de células T regulatorias CD4⁺CD25⁺ en ratón. Por su parte, en los humanos, la búsqueda de marcadores específicos del linaje T regulatorio aún continúa.

A lo largo de esta Tesis utilizaremos el término “Treg” para denominar a las células T con fenotipo regulatorio CD4⁺CD25⁺/-Foxp3⁺.

Células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ naturales o inducidas

Las células Treg pueden desarrollarse en el timo o pueden ser generadas en la periferia frente a determinados estímulos a partir de células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻. En el primer caso se denominan células Treg naturales (nTreg) y en el segundo reciben el nombre de células Treg inducidas, convertidas o adaptativas (iTreg)⁴² (**figura A**).

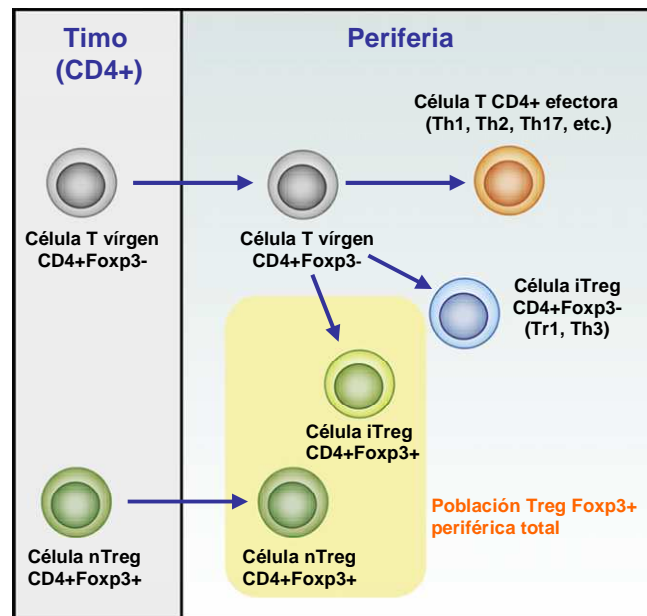


Figura A. Generación de células Treg naturales e inducidas. Las células Treg naturales (nTreg) se originan en el timo y migran hacia los tejidos periféricos. Las células Treg inducidas se diferencian en los órganos linfoides secundarios y en los tejidos. La población de células Treg periféricas incluye tanto a las células nTreg como a las iTreg. Adaptado de Curotto de Lafaille et al. *Immunity*. 2009; 30(5):626-35⁴³.

Si bien las células Tr1 y Th3 forman parte de la subpoblación de células T regulatorias CD4+ inducidas (**figura A**), las mismas no expresan Foxp3 y no serán tratadas en esta Tesis. En el presente trabajo el término iTreg sólo hará referencia a las células Treg de origen periférico que expresan el factor de transcripción Foxp3.

Hasta el momento, no se han encontrado marcadores que permitan diferenciar a las células nTreg de las células iTreg⁴⁴. Recientemente se ha postulado que la expresión del factor de transcripción Helios, podría contribuir a la discriminación entre las células Treg naturales e inducidas, ya que sería un marcador específico de las células nTreg⁴⁵. Sin embargo, los estudios de la expresión de Helios en las nTreg apenas se están iniciando, y no puede descartarse que, al igual que lo sucedido con otras moléculas que se han propuesto para la caracterización de las nTreg, la expresión de Helios también se encuentre en otras subpoblaciones de linfocitos o esté condicionada por factores como la activación.

Recientemente, se ha propuesto un método diferente para caracterizar en forma específica a estas células; se basa en el análisis del patrón de metilación de una región del gen que codifica para Foxp3 (región TSDR, *TReg-cell-specific demethylated region*). En las células nTreg, pero no en las iTreg la región TSDR del gen FoxP3 se encuentra desmetilada, lo que permitiría diferenciar estas dos subpoblaciones a través de una reacción de PCR en tiempo real o por otros métodos de análisis de ADN⁴⁶.

Células Treg naturales

Al igual que todas las células T, las células nTreg se originan en la médula ósea a partir de células progenitoras que luego migran hacia el timo donde tiene lugar el compromiso de linaje y la maduración. Se ha reportado que el desarrollo de estas células requiere un TCR de alta afinidad autoreactivo^{47,48} la molécula coestimuladora CD28⁴⁹ y posiblemente IL-2⁵⁰.

Inicialmente se asumía que la salida de las células T Foxp3+ hacia la periferia estaba retrasada temporalmente ya que los ratones timectomizados al día 3 de vida desarrollaban una variedad de enfermedades autoinmunes⁵¹. Sin embargo, recientemente se ha reportado que los ratones timectomizados tempranamente poseen células T Foxp3+, y se ha propuesto que las enfermedades autoinmunes en esos ratones podrían deberse a que la timectomía al día 3 enriquecería la proporción de células CD4+ patogénicas autoreactivas que escapan a la delección en el timo neonatal⁵². A favor de esta proposición, se ha descrito que los ratones de 3 días de edad ya poseen células Treg en los ganglios linfáticos y que esas células son capaces de suprimir respuestas proliferativas *in vitro*^{53,54}. Además, otro estudio reportó que los ratones timectomizados al día 3 poseen un mayor porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+ en el bazo, y que esas células tienen capacidad supresora⁵⁵.

Como se mencionó anteriormente, numerosas proteínas de superficie son expresadas constitutivamente por la subpoblación Treg, entre ellas, el receptor CD25⁶. Sin embargo, las células Treg son incapaces de fabricar IL-2 debido a una inaccesibilidad de la cromatina en el locus de la IL-2⁵⁶. Como consecuencia, el desarrollo, la supervivencia y la función de las células nTregs resultan absolutamente dependientes de IL-2 parácrina^{57,58,59,60}. De hecho, la IL-2 y el CD28 representan, tal

vez, las moléculas más críticas para el mantenimiento de la homeostasis de las células Treg. Se ha demostrado que los ratones deficientes en CD28 presentan un número reducido de células Treg tanto en el bazo como en los ganglios linfáticos, y que las células Treg resultantes poseen una capacidad supresora reducida⁶¹. En base a estos resultados se postula que el CD28 mantiene la expresión de CD25 en las células Treg y soporta la supervivencia de las mismas aumentando la producción de IL-2 por las células T convencionales^{49,57}.

Otra citoquina que posee un rol importante en el desarrollo de las células Treg es el factor de crecimiento transformante beta, más conocido como TGF- β ⁶². Se ha demostrado que la señalización por TGF- β es requerida para mantener la expresión de Foxp3 y la función regulatoria de las células Treg periféricas tanto *in vivo* como *in vitro*^{63,64}.

Inicialmente, se postuló que Foxp3 constituiría el “regulador maestro” o el “factor de especificación de linaje” del desarrollo de las células Treg^{21,22,65}. Sin embargo, estudios recientes han desafiado esta hipótesis⁶⁶. Con el objeto de determinar la contribución de Foxp3 al compromiso de linaje y la función de las células Treg, dos grupos de investigación generaron, de modo independiente, ratones “GFP-knock-in Foxp3-knock-out”. En estos ratones, se sintetiza una proteína Foxp3 no funcional y la actividad transcripcional del locus es monitoreada por la inserción, en marco, de la proteína GFP^{67,68}. El análisis de las células GFP+Foxp3^{null} mostró que la actividad supresora de las células Treg depende íntegramente de la expresión de un Foxp3 funcional, y que Foxp3 se encarga de estabilizar y amplificar características moleculares que se encuentran pre-establecidas en las células Treg, incluyendo la dependencia de IL-2 parácrina. Estos resultados han llevado a los autores a proponer que el compromiso de linaje en las células nTreg antecede a la inducción de Foxp3⁶⁸. Por su parte, Hill y col. realizaron un meta-análisis del perfil de expresión genético en las células nTreg, el cual mostró que sólo una fracción del perfil transcripcional Treg es inducido por Foxp3, mientras que el resto es regulado por señales tales como IL-2 y TGF- β , y que Foxp3 sólo refuerza su expresión⁶⁹. Más aún, dichos autores identificaron un cluster de genes que son co-regulados con Foxp3 pero no trans-activados por este, prediciendo la existencia de un nivel de regulación río arriba de Foxp3 que determinaría la expresión de Foxp3 y sus genes co-regulados.

Células Treg Foxp3+ inducidas

Las primeras evidencias de que las células T CD4+ vírgenes podían convertirse en células Foxp3+ surgieron de experimentos de transferencia adoptiva en donde células T policlonales vírgenes CD4+CD25- fueron inyectadas en ratones linfopénicos o en ratones conteniendo un repertorio T monoclonal desprovisto de células nTreg^{70,71}. En estas condiciones, donde tiene lugar la proliferación homeostática de los linfocitos del donante, parte de la población donante se convertía en CD25+Foxp3+ y adquiría capacidad supresora. Posteriormente, Knoechel y col. estudiaron la conversión de células T vírgenes a células Treg Foxp3+ durante la expansión periférica, utilizando un sistema experimental en el cual células T CD4+ vírgenes antígeno-específicas fueron transferidas a ratones linfopénicos que expresaban el antígeno como una proteína de secreción sistémica⁷². Bajo estas condiciones, la activación masiva de células T resultaba en una autoinmunidad severa, seguida de una fase de recuperación asociada a la generación *de novo* de células Treg. La generación de estas células iTreg no requería del timo y resultaba dependiente de IL-2.

Pese a que las células nTreg se desarrollan en el controlado microambiente tímico, las células CD4+CD25+Foxp3+ inducidas se desarrollan en la periferia bajo condiciones más variadas. Por ejemplo, las células iTreg aparecen en los ganglios mesentéricos durante la inducción de tolerancia oral^{73,74}, pueden diferenciarse continuamente en la lámina propia intestinal en respuesta a la microbiota y antígenos alimenticios⁷⁵, y son generadas en tejidos con inflamación crónica⁷⁶, tumores⁷⁷ y tejidos transplantados⁷⁸. La comprensión de los diferentes microambientes donde las iTreg pueden desarrollarse *in vivo* es incompleta todavía. Sin embargo, se sabe que el programa elemental para el desarrollo de las células iTreg Foxp3+ involucra estimulación del TCR y las citoquinas TGF- β e IL-2, tanto para la generación *in vivo* como *in vitro*.

La adición de TGF- β a células T CD4+ vírgenes TCR-estimuladas induce la transcripción de Foxp3, la adquisición de actividad supresora *in vitro*, y la habilidad de suprimir la inflamación en un modelo experimental de asma⁷⁹. Chen y col. han demostrado que el TGF- β induce la expresión de Foxp3 en cultivos de células T

vírgenes estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28⁷⁹. El mecanismo mediante el cual el TGF- β induce la transcripción de Foxp3 involucra la cooperación de los factores de transcripción STAT3 y NFAT⁸⁰.

Consistentemente con los resultados encontrados *in vitro*, la neutralización *in vivo* de TGF- β afecta la tolerancia oral e inhibe la diferenciación de células iTreg Foxp3+ antígeno-específicas^{81,74}.

Por su parte, la IL-2 parece ser esencial para la generación y/o la homeostasis de las células iTreg. Mediante experimentos con ratones deficientes en IL-2 y estudios de neutralización de IL-2, Zheng y col. demostraron que la IL-2 es requerida por el TGF- β para inducir la expresión de Foxp3 y la actividad supresora *in vitro*⁸². Asimismo, se ha reportado que la IL-2 puede reemplazar el requerimiento de coestimulación con CD28 para la inducción de Foxp3 por anti-CD3 y TGF- β ⁸³.

Además del requerimiento mínimo de citoquinas para el desarrollo de las células iTreg, otros factores microambientales pueden promover o perjudicar la inducción de células iTreg. Por ejemplo, las citoquinas que inducen la diferenciación de otro tipo de células T colaboradoras como Th1, Th2, Th9 y Th17, antagonizan la diferenciación de células Treg Foxp3+⁸⁴. Este efecto inhibitorio de las citoquinas inflamatorias o de una alta coestimulación en cultivo puede ser suprimido por el ácido retinoico^{85,86}. En este sentido, se ha demostrado que las células dendríticas (CDs) CD103+ aisladas del intestino delgado y del ganglio linfático mesentérico producen TGF- β y ácido retinoico; estas CDs median eficientemente la diferenciación de células T vírgenes convencionales en células Treg Foxp3+^{73,87}.

Pese a que se conocen varios factores involucrados en la inducción de células Foxp3+ en el intestino y el ganglio linfático mesentérico, poco se sabe acerca de la inducción de células Treg en otros tejidos y órganos linfoides. Las CDs CD103+ que median la conversión a células Treg en el intestino son abundantes en el ganglio mesentérico y en la lámina propia pero son poco frecuentes por ejemplo en el bazo. Yamazaki y col. han descrito recientemente una población de CDs CD8+DEC205+ en el bazo que producen TGF- β y son capaces de inducir la diferenciación de células T convencionales en células Treg Foxp3+⁸⁸. Asimismo, se ha reportado que las CDs inmaduras pueden inducir células Treg Foxp3+ en presencia de TGF- β exógeno y

mediante la secreción de TGF- β endógeno, y que la presentación de antígenos propios por las CDs puede inducir células Treg^{89,90}.

El ligando para el receptor de muerte celular programada (PD-L1) es una de las principales moléculas co-inhibitorias que están implicadas en la homeostasis de las células iTreg. Se ha demostrado que el PD-L1 promueve la generación *de novo* de células Treg en sitios donde el TGF- β está presente, tales como sitios de privilegio inmunológico^{91,92}. Aunque el PD-L1 se expresa en las células T, la interacción T-T vía PD-L1 parece no ser suficiente para la conversión de células T naive. En este sentido, el entorno parece ser crucial en la conversión de células T. Resulta de interés que entre los múltiples tipos celulares no hematopoyéticos que expresan PD-1 o su receptor PD-L1 se encuentran las células estromales⁹³.

Activación y especificidad de las células Treg

Como todas las células T CD4+, las células Treg expresan en su superficie un receptor T (TCR) que permite el reconocimiento específico de péptidos antigénicos en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II. Para la activación de las células T convencionales se requiere un reconocimiento específico del antígeno por el TCR y una señal coestimuladora por parte de las células presentadoras de antígeno. Por su parte, la activación de células Treg, también requiere de estas dos señales⁹⁴.

Se ha reportado que tanto la estimulación policlonal como la antígeno específica puede ser útil como primera señal para activar e inducir la función supresora de las células Treg *in vitro*^{95,96}. 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 CD25-⁹⁵.

En un principio se había descrito que una característica distintiva de las células CD4+CD25+ 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. No obstante, en la actualidad se han hallado condiciones particulares que permiten expandir las células Treg en cultivo^{97,98,99,100}. Además, se sabe

que las células Treg pueden proliferar *in vivo* de manera homeostática o inducida por antígenos^{101,102,103,104}.

La especificidad del TCR de las células Treg ha sido muy discutida. Inicialmente se asumía que las células Treg reconocían sólo antígenos propios. Sin embargo, en la actualidad existen numerosos reportes que muestran que las células Treg tienen un repertorio de TCRs muy diverso y son capaces de responder a antígenos bacterianos¹⁰⁵, fúngicos¹⁰⁶, parasitarios^{107,108}, alergenicos¹⁰⁹ y aloantígenos^{110,111}. Investigaciones recientes que involucraron el análisis de cientos de TCRs -incluyendo TCRs infrecuentes- sugieren que la población Treg no reconoce antígenos propios de manera preferencial y que las células Treg expresan un repertorio policlonal de TCR que es comparable con el de las células T convencionales; concluyéndose que la especificidad de las células Treg son los antígenos foráneos^{112,113}. Estos datos sugieren que la autoreactividad sería la excepción más que la regla en el repertorio Treg, tal como lo es para las células T convencionales.

En lo que respecta a la especificidad antigénica de la célula T colaboradora que es suprimida por la célula Treg, la pregunta es si la célula Treg y la T colaboradora necesitan reconocer el mismo antígeno. Ensayos *in vitro* de cultivo mixto han demostrado que células Treg activadas pueden suprimir la proliferación de células T convencionales con diferente especificidad antigénica^{95,96}. También han sido encontradas evidencias *in vivo* de que las células Treg pueden suprimir células T convencionales con distinta especificidad antigénica^{114,115}. No obstante, existen reportes *in vivo* de supresión antígeno-específica^{116,117}.

En cuanto a las señales coestimuladoras, se han descrito diversas moléculas de membrana expresadas por las células Treg que podrían estar involucradas en la transducción de señales coestimuladoras, o que, por el contrario, podrían tener un rol inhibitorio.

Las señales a través del CD28 serían críticas para la generación tímica de las células Treg, como así también para su supervivencia y auto-renovación en la periferia¹¹⁸. Sin embargo, se ha reportado que las señales a través de este receptor junto con señalización a través del TCR, atenuarían la capacidad supresora gatillando su proliferación *in vitro*^{95,96}.

Las células Treg expresan la molécula CTLA-4, mientras que las células T CD4+CD25- efectoras la expresan sólo luego de su activación. Además de mediar en

forma directa la supresión ejercida por las células Treg, se ha postulado que la molécula CTLA-4 sería importante para transducir una señal coestimuladora necesaria para la activación de las células Treg^{59,118}. Por su parte, la señal coestimuladora generada por el ligando de GITR de las células Treg, junto con la estimulación a través del TCR, inhibiría la actividad supresora de estas células^{119,120}.

Las células Treg expresan varios miembros de la familia de TLRs^{121,122}. Se ha reportado que la estimulación de las células Treg murinas con ligandos del TLR2, en combinación con la activación del TCR, aumentaría la proliferación de estas células *in vivo* e *in vitro*, pero causaría una pérdida temporal del fenotipo supresor¹²³. Se reportó además que la estimulación *in vitro* de las células Treg 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 células presentadoras, indicando que el LPS actuaría directamente sobre el TLR4 de las células Treg⁹⁷.

Mecanismos de acción, células blanco y especificidad de la supresión

Numerosos estudios sobre la función reguladora de las células Treg sugieren que pueden haber diferencias importantes entre la supresión observada *in vitro* con respecto a los mecanismos que tendrían lugar *in vivo*.

En el caso de la supresión *in vitro*, existe un consenso general en que la supresión mediada por las células Treg tanto murinas como humanas se produce mediante un mecanismo dependiente del contacto célula-célula¹²⁴.

Con respecto a la supresión *in vitro* de las CDs por parte de las células Treg, el mecanismo más investigado involucra la unión de CTLA-4 a CD80 y CD86 expresados por las CDs, lo que causaría una disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras y podría resultar en la inducción de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en las CDs. Esto provocaría una disminución en la disponibilidad de triptofano y una consecuente disminución de la activación de las células T^{125,126}.

En cuanto a la supresión directa de las células T, se ha descrito que las células Treg podrían tener actividad citolítica dependiente de granzima B¹²⁷ y que el TGF- β de membrana expresado por las células CD4+CD25+ sería esencial para la inhibición por contacto célula-célula¹²⁸. Además se ha reportado que la unión de CTLA-4 a CD80 y

CD86 expresados por las células T blanco podría ocasionar una señal inhibitoria hacia el interior de estas células¹²⁹.

Independientemente del mecanismo involucrado, se ha sugerido que la supresión *in vitro* mediada por la células CD4+CD25+ tendría como uno de sus blancos principales, la inhibición de la producción de IL-2 por parte de las células T efectoras^{95,96}. Sin embargo, no se descarta que la inhibición de la proliferación se deba al consumo de IL-2 por las células Treg¹³⁰. Estas células presentan una mayor expresión del receptor de IL-2, por lo cual competirían fuertemente por dicha citoquina, que es un factor de crecimiento esencial para las células T estimuladas *in vitro*.

En cuanto a la supresión *in vivo*, se ha propuesto que no sólo son posibles todos los mecanismos dependientes de contacto descritos *in vitro*, sino que también pueden estar involucrados otros mecanismos, incluyendo la supresión mediada por IL-10 y TGF- β soluble. Se ha demostrado que las células Treg producen IL-10 *in vivo* y se ha propuesto que la secreción de esta citoquina es necesaria para generar supresión^{131,132}. Otros autores sin embargo han demostrado que en algunos casos la supresión *in vivo* es independiente de IL-10¹³³.

Se ha reportado que las células CD4+CD25+ pueden suprimir la respuesta autoinmune en ratones deficientes en IL-2R, lo cual sugiere que no siempre la competencia por IL-2 o la inhibición de la transcripción del gen de IL-2 sería esencial para la supresión por las células Tregs *in vivo*, y que podrían existir otros blancos afectados por estas células^{71,134}.

Recientemente han sido sugeridos mecanismos adicionales. La expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en la superficie de las células Treg, causaría la degradación de nucleótidos extracelulares en adenosina, la cual se sabe que tiene un efecto inmunosupresor sobre las células del sistema inmune¹³⁵. También se ha sugerido un rol de TRAIL en la inducción de apoptosis en las células blanco a través de la vía TRAIL-DR5¹²¹. Se ha reportado que el transporte de AMPc a través de uniones gap podría ser otro mecanismo de supresión empleado por las células Tregs. Por último, el descubrimiento de la secreción de la citoquina inhibitoria IL-35 por parte de las células Treg, amplió el número de citoquinas posiblemente utilizadas por estas células durante su función regulatoria¹³⁶.

Órganos linfoides secundarios y estroma

La generación de una respuesta inmune efectiva contra agentes patógenos requiere la movilización coordinada y regulada de distintos constituyentes celulares con funciones específicas.

Numerosos estudios han documentado la organización de los componentes celulares del sistema inmune en los órganos linfoides primarios y secundarios. Recientemente, el uso de la microscopía intravital ha permitido a los investigadores observar los eventos dinámicos que tienen lugar en los tejidos linfoides y no linfoides¹³⁷. Sin embargo, son pocos los estudios que han examinado cómo estos eventos son influenciados por el microambiente que los rodea, en particular, las células estromales no-hematopoyéticas y otros tipos celulares que soportan el parénquima de los órganos linfoides y los tejidos periféricos.

Los órganos linfoides secundarios o periféricos incluyen los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas. Estos órganos forman una red de tejidos estructural y funcionalmente heterogéneos diseñados como un sistema de filtración y vigilancia capaces de capturar patógenos y sus antígenos para luego ser presentados de manera apropiada a las células del sistema inmune. La compleja microarquitectura de los órganos linfoides secundarios es soportada por redes de células estromales de origen endotelial y mesenquimal¹³⁸.

A fin de lograr una adecuada comprensión de la presente Tesis, a continuación describiremos la microarquitectura de los ganglios linfáticos y los distintos tipos celulares estromales que los componen.

Arquitectura de los ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos filtran o monitorean el fluido exudado por la piel y los tejidos. Esta función es posible gracias a una microarquitectura única donde distintas

subpoblaciones de células inmunohematopoyéticas se encuentran estratégicamente compartimentalizadas^{139,140,141}.

Los ganglios linfáticos presentan una cápsula y 2 grandes regiones: la corteza y la médula (figura B). En la corteza se distinguen una zona profunda adyacente a la médula, rica en linfocitos T, denominada paracorteza (zona T) y más superficialmente se encuentran las áreas ricas en linfocitos B, integradas por folículos (zona B) que ocasionalmente desarrollan centros germinales durante las respuestas inmunes dependientes de células T. La zona T contiene células CD4+ y CD8+ y subpoblaciones de CDs ancladas a una red de fibras reticulares y células estromales denominadas fibroblastos reticulares (FRs). Los folículos de células B contienen redes de células dendríticas foliculares (CDFs) y una red de células estromales más periférica que bordea la zona T y el seno subcapsular denominadas células reticulares marginales (CRMs)¹⁴².

Por su parte, la médula, es un laberinto de senos linfáticos drenantes separados por cordones medulares que contienen células plasmáticas, algunos macrófagos y linfocitos T de memoria.

Inmediatamente por debajo de la cápsula se encuentra el seno subcapsular, donde los vasos linfáticos aferentes descargan su contenido, transportando antígenos, microorganismos y células tales como linfocitos y CPAs desde de los tejidos.

Los macrófagos se encuentran distribuidos principalmente en el seno medular y en el seno subcapsular, donde capturan y fagocitan grandes partículas que entran al ganglio a través de la linfa.

Las células del endotelio vascular y las del endotelio linfático son otros de los tipos celulares no hematopoyéticos que abundan en los ganglios linfáticos. En la paracorteza, las células del endotelio forman una estructura altamente especializada denominada vénula del endotelio alto (VEA). Las VEAs presentan una morfología distintiva¹⁴³ y expresan moléculas cruciales para la entrada de los linfocitos a los ganglios linfáticos. Por su parte, las células del endotelio linfático expresan varias moléculas involucrados en la entrada de las células en el sistema linfático¹⁴⁴.

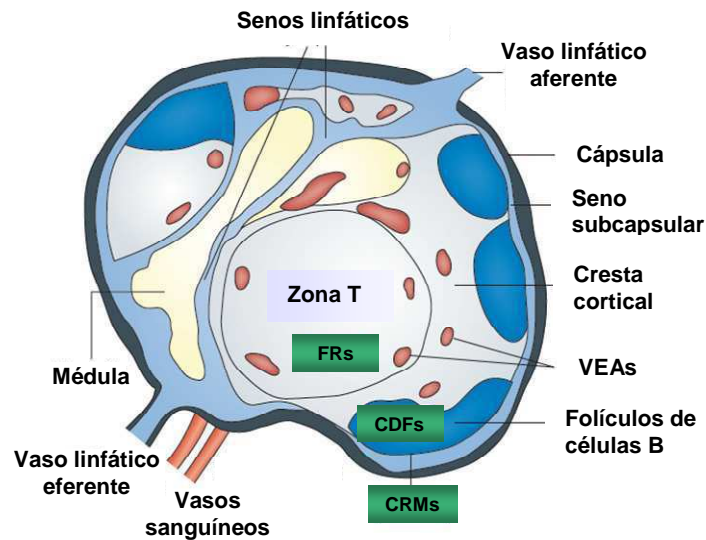


Figura B. Representación esquemática de la organización de los ganglios linfáticos. El esquema muestra los componentes estructurales mayoritarios de los ganglios linfáticos. Se indica además la localización de distintos tipos de células estromales. FRs: fibroblastos reticulares; CDFs: células dendríticas foliculares; CRMs: células reticulares marginales. Adaptado de Mueller y Germain. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(9):618-29¹⁴⁵.

Células estromales linfoides

Las células estromales contribuyen activamente al desarrollo de la respuesta inmune. Además de constituir un soporte altamente especializado para la migración celular¹⁴⁶, las células estromales son capaces de presentar antígenos¹⁴⁷ y proporcionar quemoquinas, citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, necesarios para la entrada, la función, la homeostasis y la supervivencia de las células del sistema inmune^{146,148,149,150}. El fenotipo y la localización de las células estromales, conjuntamente con las señales que las mismas producen, pueden proveer un control regional para nutrir o dirigir la respuesta más apropiada contra patógenos.

Fenotipo y organización de las células estromales en los ganglios linfáticos

Fibroblastos reticulares (FRs)

Hasta hace algunos años, se asumía que el rol que desempeñaban los FRs en los órganos linfoides era netamente estructural, posiblemente asistiendo en la expansión y contracción de los ganglios linfáticos en las respuestas inmunes y facilitando el transporte de antígenos y anticuerpos. Sin embargo, en 1993, Anderson y Shaw propusieron que el transporte de citoquinas desde los vasos linfáticos aferentes hacia las VEAs involucraba conductos constituidos por FRs¹⁵¹. Años más tarde, esta proposición fue demostrada directamente en los ganglios linfáticos¹⁴⁹ y el bazo¹⁵², dando lugar a una nueva apreciación sobre la función del estroma en los órganos linfoides periféricos.

Los FRs son células de origen mesenquimal que se localizan en la zona T de los ganglios linfoides rodeando a las VEAs. Los FRs producen y rodean las fibras reticulares ricas en colágeno, que junto con distintas fibras de la matriz extracelular (ECM) componen una estructura intrincada denominada red reticular. Esta estructura con forma de red soporta toda la arquitectura del ganglio linfático^{138,141,153}.

En contraste con los fibroblastos de los tejidos conectivos, los cuales se encuentran embebidos en la ECM¹⁵⁴, los FRs de los ganglios linfáticos rodean las fibras de la ECM, hallándose en contacto directo con las células inmunes¹³⁸. La red reticular construida por los FRs resulta óptima para proveer en forma simultánea fuerza mecánica al tejido y espacios para la migración celular, actuando como guía para el desplazamiento de los linfocitos a través del ganglio linfático¹⁴⁶.

Los FRs expresan -al igual que los fibroblastos encontrados en diferentes tejidos- un antígeno reconocido por el anticuerpo ER-TR7¹⁵⁵ y pueden ser diferenciados de otros tipos celulares estromales linfoides no-endoteliales por la expresión de podoplanina, más conocida como gp38¹⁵⁶. Asimismo, estas células pueden ser identificadas por su producción de CCL19 y CCL21¹⁵⁰, quemoquinas cruciales para delinear la zona T del ganglio y para promover la migración de los linfocitos y CD que expresan el receptor de quemoquinas CCR7¹⁵⁷.

Tanto en los humanos como en los ratones, los FRs de las zonas T sintetizan distintos componentes de la ECM, tales como colágeno, ER-TR7, fibrilina y los componentes de la membrana basal, laminina y fibronectina. También expresan moléculas intracelulares encontradas en otros fibroblastos, como desmina y actina del

músculo liso. Estos productos estarían involucrados en la formación de las redes de FRs, en la expansión y contracción de la red celular y en la presentación de moléculas como quemoquinas. Además los FRs expresan subunidades de integrinas y las moléculas ICAM-1 (Molécula de Adhesión Intercelular 1) y VCAM-1 (Molécula de Adhesión Vascular 1).

No obstante, aún no ha sido identificado un marcador específico de los FRs y poco se sabe acerca de la expresión de citoquinas y receptores de membrana por parte de estas células.

Células Dendríticas foliculares (CDFs)

Las CDFs son células de origen mesenquimal que se localizan en el centro de los folículos B, formando un red densa en donde las células B buscan antígenos y reciben señales de diferenciación luego de ser activadas. Las CDFs expresan receptores para el Fc tales como CD16, CD23 y CD32, receptores de complemento como CD21 y CD35 y componentes del complemento como C4. La expresión de estas moléculas facilita la captura y presentación de antígenos no procesados, particularmente en la forma de complejos inmunes. Asimismo, esta subpoblación estromal expresa altos niveles de VCAM-1 y MAdCAM-1 (Molécula de Adhesión Celular de Adresina Mucosal), como así también moléculas comunes a todas las subpoblaciones de células estromales en los órganos linfoides como desmina y laminina. Cabe destacar, que las CDFs producen la quemoquina CXCL13, la cual atrae a los folículos células B que expresan el receptor de quemoquina CXCR5 en el estado estacionario¹⁵⁸.

En el transcurso de una respuesta inmune, tienen lugar en el centro germinal una serie de reacciones que conducen a la formación de células plasmáticas de larga vida y células B de memoria. En la “zona clara” del centro germinal, las células B interactúan con CDFs que expresan CXCL13, mientras que en la “zona oscura” ocurren interacciones con células estromales que expresan el ligando de quemoquina CXCL12. Aparentemente, quemoquinas sintetizadas por el estroma retendrían diferencialmente a las células B en distintos estados de activación en los dos compartimientos del centro germinal a diferentes tiempos¹⁵⁹. De esta manera, el movimiento de las células B entre las zonas claras y oscuras, y por ende, el estado de activación y diferenciación de las células B, estaría controlado por células estromales en los folículos de células B.

Células reticulares marginales (CRMs)

Debajo del seno subcapsular de los ganglios linfáticos se ubican, formando un manto, redes de células no hematopoyéticas. Estas células estromales poseen un fenotipo distinto al encontrado en los FRs y en las CDFs, por lo que recientemente fueron consideradas por Katakai y col. como otra subpoblación de células estromales a la cual denominaron CRMs¹⁴².

Las CRMs expresan varios marcadores comunes a otras células estromales, a saber: el antígeno ER-TR7, desmina, laminina, VCAM-1, MADCAM-1 y una molécula reconocida por el anticuerpo 1BL-11^{142,160}. Sin embargo, las CRMs parecen ser únicas en la expresión de RANKL, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral¹⁴². Estas células serían organizadoras integrales de la estructura de los órganos linfoides periféricos durante la organogénesis¹⁴². Muchas CRMs en el borde de los folículos B expresan CXCL13, de modo similar a las CDFs que se localizan centralmente^{142,161}. Además, las CRMs forman una red de conductos funcionales que transporta antígenos desde el seno subcapsular hasta los folículos B¹⁶². Así, las CRMs constituirían una subpoblación especializada de células estromales linfoides que desempeñarían roles importantes en la captura y transporte de antígenos.

Fibroblastos de la médula ganglionar

Una red densa de fibroblastos y fibras reticulares forman un entramado en los cordones medulares, y una red floja en los senos medulares¹⁶³. Muchos macrófagos, células plasmáticas, CDs, linfocitos y mastocitos, pueden ser encontrados en la médula de los ganglios linfáticos¹⁶³; por lo tanto es probable que los fibroblastos medulares de los ganglios linfáticos posean un rol especializado en la inducción de las respuestas inmunes. De hecho, dado que la expresión de CXCL12 se encuentra principalmente restringida a la médula en los ganglios¹⁶⁴, es posible que los fibroblastos situados en esta región desempeñen un rol en direccionar la localización de las células plasmáticas.

Células endoteliales linfáticas (CELs)

El endotelio linfático recubre el sistema vascular linfático, el cual drena el fluido intersticial proveniente de los tejidos y provee el conducto a través del cual las células inmunológicas circulan hacia los ganglios linfáticos.

Las células del endotelio linfático (CELs) producen quemoquinas que atraen células tales como las CD hacia los vasos linfáticos dererantes, a través de los cuales viajan hasta alcanzar los órganos linfoides secundarios, donde estimulan y regulan la respuesta inmune¹⁶⁵. Entre las moléculas expresadas por las CELs se encuentran: la quemoquina CCL21, varias moléculas de adhesión involucradas en la entrada de células en el sistema linfático (VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, VE-caderina, VEGFR3, entre otras)¹⁴⁴, el marcador de linaje endotelial, CD31, también conocido como PECAM-1, y el homólogo de CD44, LYVE1. Además, al igual que los FRs, las CELs también expresan el antígeno ER-TR7, gp38 y laminina.

Células endoteliales vasculares (CEVs)

Las células del endotelio vascular constituyen otro tipo celular de origen endotelial que abunda en los órganos linfoides secundarios.

Los vasos sanguíneos entran a los ganglios linfáticos ramificándose extensamente en la región medular y penetran a través de la corteza. En la paracorteza, las CEVs forman una estructura altamente especializada, la VEA, la cual expresa moléculas tales como PNA_d, más conocida como CD62L y la quemoquina CCL21, esenciales para permitir la entrada de los linfocitos desde la sangre a los ganglios linfáticos^{141,166}.

Además de los ya mencionados CD62L y CCL21, entre las moléculas expresadas por las CEVs podemos citar: CD34, VE-caderina, LT β R, TNFR1, VEGFR2, laminina, colágeno IV y ESAM-1, entre otras.

Funciones de las células estromales en los ganglios linfáticos

A. Migración linfocitaria

Tal como se mencionó anteriormente, la entrada de células, principalmente CPAs y células T activadas, desde los tejidos a los ganglios linfoides ocurre a través del sistema linfático, mientras que la entrada al ganglio de linfocitos desde la sangre tiene lugar a través de las VEAs. Independientemente de la ruta de entrada, después de su ingreso al ganglio linfático las células entran en contacto directo con el microambiente estromal.

En lo que respecta al tráfico de linfocitos T, se ha demostrado que el movimiento de las células T en los tejidos linfoides es altamente dinámico^{167,168}. Los FRs situados en la zona T del ganglio linfático producen altos niveles de CCL21, y en menor medida CCL19¹⁶⁹. La quemoquina CCL21 se une al receptor CCR7 proporcionando a las células T señales de direccionamiento. Se ha descrito que en los ratones *plt/plt* -carentes de expresión de CCL21 y CCL19 en los órganos linfoides- tanto las células T como las CDs que expresan CCR7 presentan una distribución alterada en los órganos linfoides secundarios^{169,170}. Más aún, los FRs y la molécula CCL21 serían los encargados de delimitar las zonas T en los ganglios linfoides y probablemente desempeñen un rol clave en impedir la entrada de las células T vírgenes a los folículos B¹⁴⁶.

Tanto en los ganglios linfáticos como en el bazo, las células T vírgenes se asocian con la red de FRs y avanzan lentamente a través de la misma, la cual actúa como una camino local que define el trayecto de la migración de las células T en el parénquima de los ganglios linfáticos y facilita la interacción de dichas células con las CDs colocalizadas en la misma red reticular¹⁴⁶. Se ha reportado que la movilidad de las células T en los ganglios linfoides es, al menos, parcialmente dependiente de CCL21^{171,172}. Algunos reportes sugieren que otras citoquinas también desempeñarían un rol en la movilidad de las células T a través de la señalización de un receptor acoplado a proteína G α i, dado que el bloqueo de la señalización de este tipo de receptores con la toxina pertussis induce una mayor reducción en el movimiento de la célula T que la eliminación de las señales mediadas por CCR7. No obstante, en ausencia de señalización a través de quemoquinas, las células T conservan algo de movilidad, indicando que señales independientes de proteína G α i contribuirían con este proceso¹⁷¹. De hecho, moléculas de adhesión, integrinas y glicoproteínas como VCAM-1 y podoplanina, derivadas de células estromales proporcionarían tracción a los linfocitos y/o modularían el modo en el que migran a través de los órganos linfoides periféricos.

Las quemoquinas sintetizadas por las células estromales, tales como CCL21, proveen fuertes señales de retención para las células T, permitiéndoles permanecer en el ganglio hasta 12 horas o más cuando se encuentran buscando antígenos¹⁷³. Para continuar con la vigilancia del organismo, las células T deben salir de los órganos linfoides, y lo hacen de un modo S1p (Esfingosina-1 fosfato) dependiente¹⁷⁴. Los niveles de S1p son mayores en la sangre y en la linfa que en los órganos linfoides

secundarios¹⁷⁵. Las células T expresan bajos niveles de S1p cuando se encuentran en la sangre o en la linfa e incrementan la expresión del receptor y la sensibilidad de la respuesta en los órganos linfoides secundarios a lo largo del tiempo¹⁷⁶. Este patrón cíclico de expresión del receptor controla la habilidad de las células T para superar las señales de retención mediadas por CCL21 e ingresar al sistema linfático¹⁷⁷.

En el caso de los linfocitos B, cuando las células B positivas para CXCR5 ingresan al ganglio linfático migran hacia los folículos B en respuesta a la CXCL13 sintetizada por las CDFs. Una vez que salen de las VEAs, las células B se desplazan por la red reticular hasta los folículos B¹⁴⁶ y luego migran en asociación con la red de CDFs. Las CDFs capturan y presentan antígenos y complejos inmunes y expresan varias moléculas accesorias, tales como complemento y receptores Fc, importantes para las respuestas B. Del mismo modo que las células T, los linfocitos B requieren S1p para salir de los órganos linfoides secundarios¹⁷⁸.

B. Homeostasis linfoide

En los adultos jóvenes, las poblaciones de linfocitos maduros que circulan a través de los órganos linfoides periféricos son mantenidas en un nivel constante gracias a la continua liberación de linfocitos por parte del timo y la médula ósea, que resulta equilibrada por la muerte celular en la periferia. En ausencia de activación antigénica, las células T maduras sobreviven al menos durante 8 semanas luego de su emigración tímica. Uno de los factores más importantes involucrados en controlar el tiempo de vida de las células T vírgenes es la IL-7¹⁷⁹. Las células T experimentan una baja tasa de renovación o “turnover” en los órganos linfoides secundarios. Sin embargo, bajo condiciones linfopénicas pueden dividirse varias veces y repoblar parcialmente dichos órganos¹⁸⁰ mediante un proceso que requiere de IL-7¹⁷⁹. Esta proliferación de células T tiene lugar en la zona T de los órganos linfoides periféricos y se encuentra ausente en ratones deficientes en linfotoxina α , los cuales carecen de ganglios linfáticos, zonas T y B organizadas en el bazo, CCL21 y CXCL13, y presentan redes de FRs y CDFs desorganizadas¹⁸¹.

Estas observaciones indican que en los órganos linfoides periféricos, las células T compiten por factores de supervivencia y que el tamaño total de la población linfocitaria estaría regulado por la competencia por tales factores. Mediante experimentos *in vitro* con células estromales derivadas de ganglios linfoides, Zhou y col. demostraron que las

células estromales son capaces de soportar la sobrevivencia en cultivo de células T en el estado estacionario¹⁸². Más recientemente, Link y col. reportaron que los FRs de la zona T serían la principal fuente de IL-7 y CCL19 en los ganglios linfáticos, y que juntos, dichos factores serían muy importantes para la homeostasis de las células T¹⁵⁰. Interesantemente, trabajos utilizando ratones que expresan una IL-7 fusionada a una proteína reportera fluorescente indican que células localizadas cerca del seno subcapsular de los ganglios linfáticos expresarían altos niveles de IL-7¹⁸³, abriendo la posibilidad de que las CMRs también sinteticen IL-7. La competencia por estos nutrientes limitados, como así también la migración a través de los órganos linfoides secundarios para la obtención de tales nutrientes, constituyen, probablemente, parte de los mecanismos finamente regulados que controlan el tamaño de la población T.

Por otro lado, experimentos *in vitro* indican que las células T serían necesarias para la correcta formación de la red reticular¹⁸⁴, abriendo la posibilidad de que la comunicación entre las células inmunes y las células estromales sea importante para la sobrevivencia de ambos tipos celulares.

Finalmente, las células B también requieren un factor de sobrevivencia para su homeostasis. Mediante la síntesis del factor de activación de células B (BAFF), las CDFs controlan la homeostasis de los linfocitos B que expresan el receptor de dicho factor de activación¹⁸⁵.

C. Interacciones con CPAs

Los órganos linfoides secundarios constituyen un sitio ideal para capturar antígenos. En los ganglios linfáticos se localizan subpoblaciones de CDs, tanto residentes como migratorias, positivas para CD11c. Las CDs CD8 α ⁺ residentes se encuentran fuertemente asociadas con la red reticular rica en CCL21^{146,186}. Por su parte, las dos subpoblaciones de CDs migratorias –células de Langerhans y CDs intersticiales– se encuentran asimétricamente distribuidas en el ganglio linfático, localizándose en las zonas T profundas y en la región que separa las zonas T y B, respectivamente¹⁸⁷. La distribución asimétrica de las distintas subpoblaciones de CDs abre la posibilidad de que las células estromales desempeñen un rol en la localización de dichas subpoblaciones.

Para ingresar al sistema linfático las CDs deben expresar el receptor CCR7, mientras que para la migración a las zonas T del ganglio linfático se requiere la expresión de los ligandos de CCR7, CCL19 y/o CCL21. De este modo, la expresión

local de dichas quemoquinas por los FRs promoverían la respuesta inmune mediante la co-estimulación de las células T¹⁸⁸, facilitando la interacción de las células T con las CPAs¹⁸⁹, promoviendo la maduración de las CDs¹⁹⁰ y estimulando la endocitosis y la presentación antigénica por las CDs¹⁹¹.

Las células estromales también contribuyen a la funcionalidad de las CPAs de otros modos. Las CDs que se asocian con los FRs en las zonas T del ganglio linfático recogen antígenos transportados en los conductos y los presentan a células T^{186,192}.

Por su parte, los macrófagos también pueden ser encontrados en asociación con las células estromales de los órganos linfoides. Los macrófagos CD169+ se asientan en un red de CMRs en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos. Estos macrófagos capturan antígenos y luego los transfieren a CDs residentes o migratorias, o bien a células B^{193,194}. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado ninguna evidencia que indique que las células estromales contribuyan con la función de presentación antigénica de estos macrófagos, tal como ocurre con los conductos de FRs y CDs.

D. Control de la respuesta inmune

Las infecciones producen grandes cambios en los órganos linfoides secundarios. En el caso de los ganglios linfoides, luego de una infección, se bloquea el egreso de células por varios días¹⁹⁵. Este cambio en el tráfico celular es debido a la liberación de mediadores de inflamación, que suprimen la salida de células de manera transiente¹⁹⁶. La inflamación induce además un incremento en el diámetro arterial y aumenta la expresión de CCL21 por las VEAs, resultando en un aumento del flujo sanguíneo a través de los ganglios linfoides y un incremento en la entrada de células¹⁹⁷. Se produce además un incremento en la expresión de VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) que resulta en una rápida proliferación de las células del endotelio vascular y en un crecimiento de los vasos sanguíneos¹⁹⁸. La expansión de los senos linfáticos mediada por VEGF-A podría contribuir en el reclutamiento de células tales como CPAs desde los tejidos¹⁹⁹. Si bien las CDs y las células B son cruciales en este proceso, se ha demostrado recientemente que los FRs constituyen el principal tipo celular que expresa el mRNA para VEGF en los ganglios linfáticos²⁰⁰. El remodelamiento que sufren los ganglios linfáticos en un proceso de inflamación, donde incrementan notablemente su tamaño¹⁸⁴, indica que la expansión de la red de células estromales involucraría también la proliferación de los FRs. Esto implica a los FRs como células clave en la modulación

de la celularidad y la función de los órganos linfoides secundarios durante las respuestas inmunes.

Las células T activadas disminuyen la expresión de CCR7 e incrementan la expresión de otros receptores de quemoquinas tales como CCR5 y CXCR3, que les permiten responder a las quemoquinas expresadas en los tejidos inflamados. De modo concomitante, los FRs disminuyen la expresión de CCL19 y CCL21 en los ganglios linfáticos activados, mientras que las CDFs reducen la expresión de CXCL13²⁰¹. Esta marcada reducción en la expresión de quemoquinas por parte de los FRs y las CDFs es máxima en el pico de la respuesta inmune y resulta en un tráfico alterado de células T y B vírgenes, como así también de CDs. De esta forma, la reducción en la expresión de CCL21 en los ganglios linfáticos activados podría alterar la acumulación de células T no-respondedoras y asistir a la formación de células de memoria de larga vida promoviendo el acceso de las células efectoras a factores de supervivencia limitados producidos por el estroma, tales como la IL-7. Los cambios en el nivel de expresión de CXCL13 por parte de las CDFs influenciarían la respuesta de las células B en los centros germinales y limitaría el acceso de células no-activadas.

E. Tolerancia periférica

Tal como se menciona en la sección anterior, las células T que expresan receptores con una alta afinidad por los antígenos propios son delecionadas en el timo. Sin embargo, el mecanismo de deleción no es perfecto y células autoreactivas escapan a la periferia, donde distintos mecanismos de tolerancia periférica evitan la autoinmunidad.

Se cree que para la deleción de células autoreactivas en los ganglios linfáticos - además de la ya descrita supresión mediada por las células Treg- sería importante y estaría involucrada la presentación cruzada de antígenos propios a las células T, mediada por CDs, las cuales pueden tomar antígenos en los tejidos u órganos linfoides periféricos y migrar al ganglio linfático drenante²⁰². No obstante, las CDs no serían el único tipo celular involucrado en esta inducción de tolerancia intranodal. Se ha reportado recientemente que una subpoblación de células estromales en los ganglios linfáticos expresan el regulador de autoinmunidad "AIRE" y una amplia gama de antígenos propios derivados de tejidos^{203,204}. No se sabe aún si estas células constituyen una única subpoblación de células estromales o si diferentes tipos de células estromales

poseen esta propiedad, dado que en un experimento con ratones transgénicos que expresan una proteína de fusión entre AIRE y GFP se han encontrado células que expresan AIRE en la periferia, tanto de origen hematopoyético como no-hematopoyético²⁰³. Se ha reportado que células T CD8+ capaces de interactuar con las células estromales que expresan antígenos propios han sido delecionadas subsecuentemente^{203,204}.

Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para determinar si la interacción con las CDs es requerida para iniciar o completar el proceso tolerogénico, y si diferentes tipos celulares (CDs y células estromales) están involucrados en la tolerización de las células T CD4+ y CD8+.

Catepsina L

La familia de las cisteína proteasas agrupa a una serie de endo y exopeptidasas cuya actividad catalítica depende de la reactividad del grupo tiol de un residuo de cisteína presente en su sitio activo. Existen dos grandes grupos de cisteína proteasas: el grupo CD, que incluye, entre otras, a las caspasas y a las leguminosas, y el grupo CA, cuyos miembros poseen una estructura relacionada con la papaína en el cual se incluyen algunas catepsinas²⁰⁵.

Las catepsinas son glicoproteínas lisosomales de pequeño tamaño (20-40 kDa), sintetizadas como precursores inactivos que requieren un procesamiento proteolítico para activarse. En general, estas proteasas son estables en compartimientos celulares ácidos, tales como lisosomas y endosomas, y son capaces de degradar una gran variedad de sustratos. Pese a esto, durante la última década, se han reportado funciones importantes y específicas llevadas a cabo por catepsinas en el espacio extracelular y en otras localizaciones intracelulares como vesículas secretorias, el citoplasma y el núcleo²⁰⁶.

En los humanos, la familia de las cisteína catepsinas está compuesta por 11 miembros²⁰⁷ (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, y X/Z) que poseen una amplia distribución en los tejidos, aunque presentan diferentes niveles de expresión en cada uno de ellos²⁰⁶. El análisis del fenotipo de ratones knock-out (KO) para diferentes catepsinas ha indicado que éstos no muestran defectos en la degradación de proteínas en el compartimiento endolisosomal, lo que sugiere que estas proteasas presentan solapamiento funcional en este compartimiento celular^{208,209,210}. Sin embargo, se ha observado que las catepsinas presentan funciones específicas e individuales de gran importancia en el funcionamiento normal de un organismo^{211,212}.

La catepsina L (CTSL) es una potente cisteína proteasa lisosomal, sintetizada prácticamente en todas las células del organismo, que se encuentra presente además en el medio extracelular. La CTSL es sintetizada como procatepsina L, transportada en vesículas secretorias a través del aparato de Golgi como procatepsina L y luego almacenada como CTSL madura en los lisosomas²¹³. Las formas activas de la CTSL madura incluyen una forma simple cadena de 30 kDa y otra forma doble cadena. La forma simple cadena madura es clivada en el residuo de Asn169 originando la forma

doble cadena, la cual se encuentra compuesta por dos polipéptidos de 24/25 kDa (cadena pesada) y 6 kDa (cadena liviana) unidos por un puente disulfuro.

Tanto la síntesis como la secreción de la CTSL son reguladas por múltiples factores tales como hormonas, factores de crecimiento y otras proteínas lisosomales²⁰⁵. Una vez activada, la CTSL puede tener un enorme potencial degradativo por lo cual su actividad debe ser finamente regulada. La actividad de la CTSL es en parte controlada por inhibidores de cisteína proteasas lisosomales que incluyen las estefinas, cistatinas y quinínógenos. Las estefinas son inhibidores intracelulares, mientras que las cistatinas y quinínógenos inhiben la actividad extracelular de la CTSL²¹⁴. Adicionalmente, se ha descrito que existen otros inhibidores que poseen dominios de tiroglobulina tipo I, como la tirotropina o el fragmento p41 de la cadena invariante, que actúan específicamente sobre la actividad de la CTSL²¹⁵. Contrariamente, se ha descrito que el INF- γ incrementa la actividad de la CTSL en líneas celulares derivadas de monocitos/macrófagos²¹⁶.

Funciones de la CTSL

La CTSL desempeña un rol importante en el catabolismo proteico general, degradando un amplio espectro de proteínas citoplasmáticas^{211,217}. Se ha reportado además, que dicha enzima es capaz de degradar factores de transcripción nucleares, interviniendo en la regulación del ciclo celular²¹¹.

Durante los últimos años se han acumulado amplias evidencias que indican que la CTSL se encuentra implicada en diversas funciones altamente específicas. Se ha demostrado que la CTSL interviene en el proceso de reciclado durante la extensión del axón y en la formación de sinapsis en el desarrollo postnatal del sistema nervioso central²¹⁸, en la conversión de proneuropéptidos en péptidos neurotransmisores y hormonas peptídicas^{219,220}, en el mantenimiento de la función y estructura cardíaca^{221,222,223}, y en la neo vascularización inducida por células progenitoras endoteliales²²⁴.

Además, se ha reportado que los ratones KO para CTSL sufren de pérdida de pelo periódica, hiperplasia epidérmica, marcado incremento en el espesor de la epidermis interfolicular (combinación de una acantosis hiperplásica con hiperqueratosis)

y una espermatogénesis anormal^{210,225}. Las complicaciones más serias causadas por la deficiencia de CTSL, como ser la dismorfología cardíaca, la acantosis y la espermatogénesis anormal, no tienen lugar en los ratones heterocigotas²¹⁰.

Si bien la CTSL es considerada una proteasa lisosomal, dicha enzima es capaz de localizarse fuera de los lisosomas. Por ejemplo, se ha descrito que la CTSL interviene en el procesamiento de la histona H3 durante la diferenciación de células madre embrionarias en ratón²²⁶. Previamente había sido reportado que estas variantes de CTSL tendrían su origen a partir de una traducción proteica en un codón AUG alternativo situado río abajo del sitio AUG convencional y se localizarían en el núcleo de los fibroblastos, donde serían capaces de clivar el factor de transcripción Cux1²²⁷.

Por otro lado, la CTSL también es secretada al medio extracelular donde puede degradar proteínas extracelulares. En este sentido, la CTSL ha demostrado ser *in vitro* la proteasa lisosomal más activa frente a una serie de componentes de la ECM como la elastina, la laminina y el colágeno^{228,229}. Se ha descrito la participación de la CTSL en diversos procesos que involucran la remodelación de la ECM como la reabsorción ósea, la implantación embrionaria y la involución de la glándula mamaria^{225,230,231,232}. Simultáneamente ha sido implicada en procesos patológicos incluyendo necrosis miofibrilar en miopatías, isquemia miocárdica, respuesta renal tubular a la proteinuria, artritis, invasión tumoral, y desarrollo de metástasis²⁰⁶. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de CTSL se encuentra incrementada en una amplia variedad de tumores malignos (carcinomas mamarios, pulmonares, gástricos, de colon y garganta), melanomas y gliomas^{233,234}. En este sentido se observó además, que el nivel de expresión de CTSL correlaciona positivamente con el grado de malignidad²²⁸. Cabe mencionar, que a diferencia de otras catepsinas que se encuentran elevadas tanto en células tumorales como en las células involucradas en la angiogénesis, la expresión de CTSL se incrementa únicamente en las células cancerosas. Por este motivo, algunos autores han propuesto que la CTSL podría constituir un mejor blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer que otras catepsinas.

Finalmente, en lo que concierne al sistema inmune, se ha demostrado que la CTSL interviene tanto en degradación de la cadena invariante (Ii)²³⁵, como en el procesamiento de los péptidos antigénicos durante la presentación antigénica en el contexto del CMH de clase II en las células del epitelio tímico cortical²³⁶. Por otra parte,

se ha reportado que la expresión tímica de CTSL es esencial para el desarrollo de las células natural killer²³⁷.

Rol de la CTSL en el sistema inmune

A. Procesamiento y presentación antigénica en el contexto de las moléculas del CMH de clase II

Las moléculas del CMH de clase II son expresadas únicamente por un grupo reducido y especializado de células: las CPAs. La función de estas moléculas es unir péptidos generados en las vesículas intracelulares de CDs inmaduras, macrófagos, linfocitos B y otras CPAs, como las células epiteliales de la corteza tímica, y presentar dichos péptidos a las células T CD4+.

Las células epiteliales de la corteza tímica son las encargadas de presentar los antígenos propios a los timocitos en desarrollo. Para ello, las proteínas son endocitadas y fragmentadas por proteasas en el compartimiento endolisosomal, mientras que las cadenas α y β del CMH de clase II son sintetizadas y ensambladas en el retículo endoplasmático²³⁸. Con el objeto de prevenir la unión prematura de los péptidos residentes en el retículo endoplasmático con las moléculas del CMH de clase II, los heterodímeros $\alpha\beta$ de clase II se asocian con la cadena invariante (Ii), una molécula chaperona multifuncional²³⁹. Esta cadena induce la formación de una estructura trimérica ($\alpha\beta$ -Ii)₃ y la direcciona a través del aparato de Golgi hasta el endolisoma²⁴⁰, donde la cadena Ii es degradada por medio de una serie de eventos proteolíticos: Iip41 (o la alternativa Iip31) \rightarrow Iip22 \rightarrow Iip10. El producto final es un fragmento denominado CLIP (class II-associated invariant chain peptide) el cual se mantiene unido al bolsillo antigénico hasta que es procesado proteolíticamente²⁴¹. Este evento genera que se disocie de las moléculas del CMH de clase II permitiendo la unión de los fragmentos peptídicos antigénicos. Las moléculas del CMH de clase II asociadas con péptidos antigénicos son finalmente transportadas a la superficie celular²⁴¹.

Se ha reportado que los ratones deficientes en la cadena Ii tienen una expresión reducida de las moléculas del CMH de clase II en la superficie celular y presentan un pequeño número de linfocitos T CD4+ tanto en el timo como en la periferia^{242,243}.

Estudios utilizando inhibidores específicos sugieren que las cisteína proteasas son responsables de los pasos de la degradación de Ii desde Iip22 hasta CLIP²³⁸. Mediante la utilización de animales KO para la cathepsina S y la CTSL se ha demostrado que estas proteasas juegan un rol importante en la presentación antigénica en el contexto del CMH de clase II^{235,244,245}. Se observó que la CTSL es importante en la presentación de péptidos propios en el contexto del CMH de clase II en las células del epitelio tímico cortical (cTEC), mientras que la cathepsina S participa en la presentación de péptidos en el contexto del CMH en los linfocitos B y las CD4+ de la periferia^{235,244,245}. Nakagawa y col. describieron que los ratones KO para CTSL presentan una reducción entre el 60 y el 80% en el número de linfocitos CD4+ tanto en el timo como en la periferia²³⁵. Los ratones KO para CTSL muestran una acumulación de los fragmentos Iip22 y Iip10 en el estroma tímico y un incremento del CLIP asociado a las moléculas CMH II en la superficie celular, sugiriendo que la CTSL cliva al CLIP en las células del epitelio tímico²³⁵. En concordancia con datos reportados por otros autores²³⁵, se ha demostrado en nuestro laboratorio que ratones portadores de una mutación inactivante en el gen que codifica para la CTSL muestran un impedimento en las etapas tempranas de la selección positiva en el contexto de las moléculas del CMH de clase II²⁴⁶.

Por otro lado, las cathepsinas han sido implicadas en la fragmentación de los péptidos antigénicos presentados en el contexto de las moléculas del CMH de clase II²⁴⁷. En este sentido, se ha descrito que la CTSL interviene en la generación de epitopes antigénicos en los endosomas y en la degradación de moléculas accesorias²⁴⁴. Estudios realizados comparando ratones deficientes para Ii y CMH de clase II, mostraron que si la diversidad y el nivel de expresión de los complejos péptidos propios-CMH II se reducen notablemente se produce una disminución significativa en el número de linfocitos T CD4+^{248,249,250}. Se ha observado, que en los ratones deficientes en CTSL la selección positiva de los linfocitos CD4+ está alterada tanto en el haplotipo I-A^b -cuya presentación antigénica es dependiente de la degradación del Ii- como en el haplotipo I-A^q -donde la presentación antigénica es independiente de la degradación de Ii-. Utilizando animales doble KO para CTSL y Ii se observó una

disminución aún más significativa en la selección positiva de linfocitos T CD4+, similar a los niveles detectados en animales deficientes en las CMH de clase II.

Además, se ha demostrado que la CTSL está presente en las CPAs del bazo como proenzima y su maduración es inducida cuando el ratón es inmunizado con antígenos como ovalbúmina y SLA (soluble *Leishmania* antigen)²⁵¹. Este evento sería importante en el incremento del procesamiento proteolítico de los antígenos endocitados.

B. Los ratones CTSL^{nkt/nkt}: Influencia de la CTSL en la población de células T y en la composición de la ECM de los órganos linfoides

B.1. Origen de los ratones CTSL^{nkt/nkt}

Los ratones CTSL^{nkt/nkt} son portadores de una mutación autosómica recesiva en el gen que codifica para la CTSL.

El alelo mutante nkt surge en el año 1981 en el laboratorio de animales de la Universidad Martin-Luther en Halle-Wittenberg, Alemania, en un stock derivado del Fundador irradiado n°372. En 1991, ratones portadores del alelo nkt fueron introducidos en el bioterio del Instituto Pasteur, Francia, donde fueron cruzados por algunas generaciones con la cepa 129/Sv/Pas y posteriormente intercurzados. Esta cepa parcialmente congénica fue designada a partir de entonces NKT/Pas. Posteriormente, a través de un convenio entre el Instituto Pasteur y nuestro Instituto (ILEX-CONICET), se determinó que los ratones nkt/nkt presentaban una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 13²⁵².

Ratones NKT/Pas fueron transferidos al bioterio del ILEX-CONICET donde se retrocruzaron con ratones de la cepa BALB/c. Luego de series sucesivas de retrocruzas/intercruzas se obtuvieron animales homocigotas para la mutación nkt en un background genético BALB/c. Finalmente, en el 2001, Benavides y col. demuestran que la mutación nkt corresponde a una delección en el gen que codifica para la CTSL²⁵³.

El gen *ctsl* murino posee 7400 pares de bases (pb) distribuidas en 8 exones y 7 intrones²⁵⁴. La delección descrita en los ratones nkt/nkt abarca el final del exón 6 y la

mayor parte del exón 7, dando lugar a un transcrito primario de 1256 pb, 118 pb menor que el mRNA normal para CTSL²⁵³.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que los ratones CTSL^{nkt/nkt} son capaces de sintetizar una forma mutada de la CTSL²⁵⁵. Sin embargo, dado que la delección en el gen *ctsl* abarca residuos de aminoácidos que forman el puente disulfuro entre la cadena pesada y la liviana (esencial para la actividad enzimática de la CTSL)^{256,257} la proteína sintetizada no es funcional.

B.2. Los ratones CTSL^{nkt/nkt}. Modelo experimental de la influencia de la CTSL sobre el sistema inmune

Tal como mencionamos anteriormente, los ratones CTSL^{nkt/nkt} muestran alteraciones en los estadios tempranos de la selección positiva en el contexto de las moléculas del CMH de clase II²⁴⁶. Como consecuencia, y al igual que los ratones KO para CTSL, los mutantes CTSL^{nkt/nkt} presentan una marcada disminución en el porcentaje de células T CD4+ tanto en el timo como en los órganos linfoides periféricos²⁵⁵. Por su parte, el porcentaje de células CD8 SP es normal en el timo mientras que, en correlación con un aumento en su exportación tímica, el porcentaje de linfocitos T CD8+ está aumentado en la periferia²⁵⁵.

Se ha demostrado en nuestro laboratorio que los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} se encuentran hipertrofiados, presentando un incremento en el número total de células linfoides²⁵⁵. De hecho, pese a la escasa producción tímica de células CD4 SP, el número absoluto de células T CD4+ alcanza valores normales en los ganglios linfáticos, debido a un incremento en su tasa de proliferación basal. Por su parte, el número de células T CD8+ se encuentra notablemente incrementado. Se demostró además que estas alteraciones correlacionan con aumentos en la expresión de distintos componentes de la ECM en los ganglios linfáticos, tales como fibronectina, laminina, colágeno I y colágeno IV. Contrariamente, el timo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} muestra una marcada disminución en los niveles de expresión de dichos componentes de la ECM²⁵⁵.

Finalmente, el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} muestra una severa disminución en el número absoluto de células T CD4+ y un incremento en el número absoluto de

linfocitos T CD8+. En cuanto a la composición de la ECM del bazo, hasta el momento no se han detectado alteraciones en ninguno de los componentes estudiados²⁵⁵.

Materiales y Métodos

Animales

Todos los animales fueron criados en el bioterio del ILEX-CONICET, División Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, de acuerdo a la guía para el cuidado y manejo de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud de EEUU (NIH) (National-Research-Council (ed.). 1996. Guide for the care and use of laboratory animals National Academy Press ed, Washington DC).

Se utilizaron ratones CTSL^{nkt/nkt} en background BALB/c con un nivel de retrocruza mayor a N=15. Ratones de la cepa BALB/c (H-2^d) fueron utilizados como control en todos los experimentos y ratones AKR/J (H-2^k) fueron empleados en los ensayos de cultivo mixto linfocitario (CML).

Los ratones CTSL^{nkt/nkt} y sus controles BALB/c fueron producidos y mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), mientras que los ratones AKR/J y los ratones BALB/c utilizados para obtener células linfoides para ensayos de CML o cocultivo con células estromales, fueron criados en un ambiente convencional.

Suspensiones celulares

Para distintos experimentos (citometría de flujo, separación magnética de células, cultivo primario de células, etc) se extrajeron timos, bazos o ganglios linfáticos y se prepararon las suspensiones celulares por pasaje a través de una malla de acero inoxidable, en PBS o medio RPMI 1640 (Sigma, Inc., St Louis, Mo.) suplementados con 3% de suero fetal bovino (SFB).

Para la obtención de células mononucleares de bazo la suspensión celular fue sembrada sobre una solución de Ficoll-Triyosom formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado a 3000 rpm (aceleración rápida sin freno) durante 30 minutos a 16°C en una centrífuga Beckman TJ-6. Luego de la centrifugación, se obtuvo una interfase conteniendo las células mononucleares y un sedimento de eritrocitos y granulocitos. Las células mononucleares fueron recolectadas y lavadas dos veces con medio RPMI 1640 o PBS con 3% de SBF para eliminar los restos de la solución de Ficoll-Triyosom.

Para los ensayos de apoptosis con células de bazo, las células fueron obtenidas en suspensión, cosechadas por centrifugación a 4°C y el precipitado resuspendido

suavemente. Se añadieron 2 ml de solución de lisis de glóbulos rojos (0,15 M de ClNH_4 , 10 mM de NaHCO_3 , 10% de EDTA) y luego de una incubación en hielo con resuspensión suave durante 5 minutos, se agregaron 3-4 ml de medio RPMI 1640 con 6% de SFB. Se colectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 0,2 ml de PBS 3% SFB.

La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de Azul Tripán, requiriéndose un mínimo de 90% de células vivas.

Para el cálculo del número absoluto de linfocitos de bazo, se realizó un recuento celular con TURK previo a la obtención de células mononucleares por gradiente de Ficoll-Triyosom.

Citometría de flujo

Se realizaron marcaciones con anticuerpos conjugados a los siguientes fluorocromos: fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Cy-chrome 5 (Cy), peridinin chlorophyll (PercP) o allophycocianina (APC).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de BD-Pharmingen (San Diego, CA, USA): anti-CD4 (clones H129.19 y RM4-5); anti-CD25 (clones 7D4 y PC61); anti-CD44 (clon IM7); anti-B220 (clon RA3-6B2); anti-CD19 (clon ID3); anti-CD8 (Clon 53-6.7); anti-CD62L (clon MEL-14); anti-CTLA-4 (clon UC10-4F10-11); anti-CD11c (clon HL3); anti-CD11b (clon M1/70); anti-CD40 (clon HM40-3); anti-CD80 (clon 16-10A1); anti-CD178 (clon MFL3); anti-CD44 (clon IM7); anti-I-A^d (clon AMS-32.1); anti-H2-kd (clon SF1-1.1); anti-CD31 (clon MEC 13.1); anti-CD34 (clon RAM34); anti-Sca-1 (clon D7); anti-CD45 (clon 30-F11); anti-BrdU (clon 3D4); anti-Bcl-2 (clon 3F11); los siguientes anticuerpos de BioLegend (San Diego, CA, USA): anti-gp38 (clon 8.1.1) y anti-CD127 (clon SB/199), y anti-Foxp3 (clon FJK-16s) de e-Bioscience (San Diego, CA, USA). Para los controles de isotipo se utilizaron los siguientes anticuerpos (BD-Pharmingen): IgG₁ de rata (clon R3-34); IgG₂ de rata (clon R35-95); IgG₁ de hamster (clon G235-2356); IgG₂ de hamster (clon B81-3), IgG de hamster (clon A19-3).

Marcación de superficie: Para la marcación, entre $2 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^6$ células fueron incubadas con $1 \mu\text{g}$ de anticuerpo/ 10^6 células en un volumen de $200 \mu\text{l}$ durante 30-40 minutos, a 4°C y en la oscuridad. Para la marcación y los lavados se utilizó un buffer de marcación compuesto por PBS, azida sódica (0,1%) y SBF (3 %). Después de dos lavados, 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 Foxp3, BrdU y Bcl-2 se realizaron marcaciones intracelulares. En el caso de Foxp3 se utilizó el kit de marcación intracelular Mouse Foxp3 Staining set (e-Bioscience) y en el caso de BrdU y Bcl-2 el kit de marcación intracelular Cytotfix/Cytoperm (BD-Pharmingen). En primer lugar, se marcaron las células con anticuerpos dirigidos a moléculas de superficie utilizando el protocolo ya mencionado, eliminando el último paso de fijación. Para la marcación de Foxp3 y Bcl-2, se siguieron las instrucciones especificadas por el fabricante: las células fueron tratadas con la solución de fijación y luego con la solución de permeabilización. Se incubaron las células resuspendidas en la solución de permeabilización con un anticuerpo bloqueante de receptores Fc (anti-mouse CD16/32; BD-Pharmingen) para impedir la unión no específica de anticuerpos, y seguidamente con el anticuerpo anti-Foxp3 o anti-Bcl-2. Finalmente, se realizaron dos lavados con la solución de permeabilización y se adquirieron las células en un citómetro del flujo.

Para la marcación de BrdU se realizó una adaptación del protocolo especificado por el fabricante: las células fueron fijadas, permeabilizadas y refijadas. Luego se trataron con $30 \mu\text{g}$ de DNAsa (Sigma) en buffer PBS, NaCl 0,15M, MgCl_2 4,2M, durante 1 hora a temperatura ambiente para exponer la BrdU incorporada en el DNA. Se realizó un lavado con la solución de permeabilización y se incubó con el anticuerpo anti-BrdU en solución de permeabilización por 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas y adquiridas en el citómetro de flujo.

Marcación con anexina V: Para la detección de células apoptóticas con anexina V, $1 \cdot 10^6$ células fueron marcadas en superficie con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 en una solución compuesta por PBS con 3% de SFB. Para los lavados se empleó PBS libre de suero. Luego, se incubaron las células con $1 \mu\text{l}$ de anexina V (BD-Pharmingen)

conjugada a FITC o PE en 0,2 ml de buffer anexina 1X (BD-Pharmingen) durante 30 minutos, a 4°C. Las células fueron adquiridas de forma inmediata en un citómetro de flujo a baja velocidad.

Para los distintos ensayos la adquisición de células se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA) o FACSaria (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los resultados se analizaron utilizando el programa CELLQUEST (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), restando los valores de los controles de isotipo. Las células muertas fueron excluidas basándose en los parámetros de tamaño y complejidad.

Marcación con CFSE

Para la marcación con 5,6-carboxifluorescein diacetato succinimidil éster (CFSE) se resuspendieron 1.10^7 células/ml en PBS con 0,3% de seroalbúmina bovina (BSA) (Gibco, NY, USA) y se incubaron con 10 μ M de CFSE (Molecular probes, Eugene, OR, USA) durante 20 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 controló que la marca de las células fuera homogénea y con una intensidad media de fluorescencia de 10^3 .

Las células marcadas con este protocolo se utilizaron para los experimentos de CML y de proliferación *in vivo*.

Separación magnética de células

La purificación de células (CD4+, CD4+CD25+ o CD4+CD25-) se realizó utilizando el sistema de separación con partículas magnéticas (Miltenyi Biotec, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se obtuvo una suspensión de células de ganglio en el buffer de purificación (BSA 0,5%, EDTA 2 mM en PBS). La purificación de células CD4+ se realizó por selección negativa. La suspensión celular fue incubada con una mezcla de anticuerpos biotinilados anti: CD8a,

CD11b, CD11c, CD19, CD45R, CD49b, CD105, CMH clase II 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 LS o LD (Miltenyi Biotec) colocada en un magneto. Las células CD4⁺ se recuperaron inmediatamente ya que no quedaron retenidas en la columna. La separación de células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ se realizó por selección positiva de las células CD25⁺. Para esto la suspensión de células CD4⁺ 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⁺CD25⁻ se recuperaron inmediatamente ya que no quedaron retenidas en la columna y las células CD4⁺CD25⁺ 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 en todos los casos mayor al 90 %.

Ensayos de proliferación *in vivo*

Ensayo de proliferación con 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU)

Para el ensayo de proliferación con BrdU a largo plazo, ratones adultos BALB/c y CTSL^{nkt/nkt} recibieron durante 7 días un pulso diario de 1 mg de BrdU (Sigma) por vía intraperitoneal (i.p.). Para el ensayo de proliferación a corto plazo los ratones fueron inoculados i.p. durante 2 días consecutivos con 2 mg de BrdU. En ambos casos para obtener un control interno del tratamiento y células para controles de citometría un grupo de ratones fue tratado con PBS. Al día siguiente de la última inoculación los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los ganglios linfáticos y el bazo y se determinó el porcentaje de incorporación de BrdU por citometría de flujo como se indicó anteriormente.

Ensayo de proliferación con CFSE

Ratones BALB/c y CTSL^{nkt/nkt} fueron inoculados por vía endovenosa con 15-20.10⁶ células de ganglio de ratones BALB/c o CTSL^{nkt/nkt} marcadas con CFSE. Al día 7

post-inoculación se obtuvieron los ganglios linfáticos y se analizó por FACS la proliferación de las células CD4+CFSE+ mediante dilución de la marca del CFSE.

Preparación de placas de cultivo cubiertas con anti-CD3

Para la preparación de placas de cultivo cubiertas con anti-CD3 (BD-Biosciences) se añadieron a placas de 96 pocillos con fondo plano alícuotas de 100 μ l de PBS conteniendo un anticuerpo anti-CD3 en la concentración indicada. Luego de una incubación por 3 hs a 37°C, los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS y utilizados de forma inmediata.

Ensayo de conversión *in vitro*

Se purificaron células CD4+CD25- a partir de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} y BALB/c por separación magnética de células. Las células ($2 \cdot 10^6$ células/ml) fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo plano precubiertas con 2 μ g/ml de un anticuerpo anti-CD3 (BD-Biosciences) e incubadas en medio RPMI libre de SFB suplementado con L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 μ g/ml) y 2-mercaptoetanol (50 μ M). Al medio se le añadieron desde el principio 2 μ g/ml de un anticuerpo anti-CD28 (BD-Biosciences), 10 ng/ml de TGF- β (Preprotech) y 100 U/ml de IL-2 (BD-Biosciences). Las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera saturada de agua conteniendo 5% de CO₂. Luego de 4 días de cultivo, las células fueron lavadas y la expresión de Foxp3 determinada por citometría de flujo.

Ensayo de inhibición de CTSL *in vitro*

El ensayo de inhibición *in vitro* de la actividad de CTSL se llevó a cabo sobre placas de 96 pocillos precubiertas con 2 μ g/ml de un anticuerpo anti-CD3 (BD-Biosciences). Células CD4+CD25- de ratones BALB/c obtenidas por separación

magnética ($2 \cdot 10^6$ células/ml) fueron incubadas en medio completo (RPMI con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml, 2-mercaptoetanol 50 μ M y SFB 10%) en presencia de 20 mM de CTSL inhibitor II (Calbiochem) en DMSO. Como control, se incubaron células en un volumen equivalente de DMSO. Las células fueron mantenidas a 37°C bajo una atmósfera con 5% de CO₂. A las 72 hs la expresión de Foxp3 fue determinada por citometría de flujo.

Cultivos de células estromales de ganglios linfáticos

Desarrollo de cultivos primarios de células estromales derivadas de ganglios linfáticos (cultivos de CEG)

Para la obtención de cultivos primarios de células estromales se extrajeron ganglios linfáticos de ratones BALB/c y CTSL^{nkt/nkt}. Los ganglios fueron cortados en pequeños trozos y digeridos con 0,05% de colagenasa IV (GIBCO) en RPMI-SFB 2% durante 30 minutos a 37°C con agitación. El digerido fue filtrado por pasaje a través de una malla de acero inoxidable, lavado 2 veces con RPMI conteniendo 10% de SFB y resuspendido en medio completo con 20% de SFB. Las células fueron contadas y sembradas a una densidad de $15\text{-}25 \cdot 10^6$ o $8\text{-}12 \cdot 10^6$ células por pocillo en placas de 6 o 24 pocillos respectivamente e incubadas a 37°C bajo una atmósfera con 5% de CO₂. Luego de 24 hs, se realizaron generosos lavados con PBS para remover las células no adherentes y se añadió medio de cultivo fresco. Las células adheridas a la placa fueron mantenidas en cultivo por varias semanas hasta alcanzar la confluencia, renovando el medio de cultivo dos veces por semana.

Dado la mayor tasa de crecimiento que presentaron los cultivos derivados de ganglios CTSL^{nkt/nkt} respecto de los wt, para los ensayos con cultivos de células estromales en similar grado de confluencia, se sembró inicialmente la mitad de células CTSL^{nkt/nkt} en la placa de cultivo.

Cultivos a largo plazo de células estromales de ganglios linfáticos (cultivos de LCEG)

Para la obtención de cultivos de células estromales a largo plazo se realizaron sucesivos pasajes o subcultivos de células adherentes de ganglios linfáticos. Inicialmente se partió de cultivos primarios confluentes, a los cuales se les retiró el

medio de cultivo y se les eliminó los restos de SFB mediante 2-3 lavados con PBS. Luego, se adicionó una solución de tripsina-EDTA (GIBCO) (0,25% de tripsina, 0,038% de EDTA) durante 5-10 minutos a 37°C con posterior resuspensión con pipeta. Una vez obtenidas las células en suspensión, la tripsina fue inhibida por el agregado de 2/3 partes de RPMI 10% SFB. Las células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en medio completo con 10% SFB, contadas y sembradas en placas de 24 pocillos a la mitad de la densidad alcanzada en confluencia. De esta manera se realizaron durante varios meses sucesivos subcultivos, con la excepción de que a partir del pasaje n° 2, las células fueron sembradas a 1/3 o 1/4 de la densidad alcanzada en confluencia. Todos los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis con cultivos a largo plazo fueron realizados con los pasajes n° 9-12.

Obtención de células estromales en suspensión

Para la tipificación de células estromales por citometría de flujo los cultivos de estroma fueron establecidos en placas de 6 pocillos. Una vez obtenidas las células en confluencia se les retiró el medio de cultivo y se las incubó por 15 min a 37°C en RPMI conteniendo 0,05% de colagenasa IV (GIBCO). Se aspiró con pipeta la solución de colagenasa y se añadió una solución fría de PBS con 5% de SFB y 0,02 mM de EDTA. Luego de una enérgica resuspensión celular con pipeta manteniendo la placa sobre hielo, las células fueron obtenidas en suspensión. La marcación de superficie se realizó según el protocolo descrito anteriormente.

ELISA para TGF- β

La producción de TGF- β 1 fue detectada en el sobrenadante de cultivos de células estromales utilizando el kit comercial para ELISA de TGF- β 1 de e-Bioscience siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenantes fueron obtenidos a partir de cultivos confluentes de células estromales incubados por 48 hs en medio libre de suero. Una vez colectado el sobrenadante el ensayo fue llevado a cabo en forma inmediata.

Extracción de RNA

La extracción de RNA de células estromales se realizó con el método de TRIzol LS Reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante: las células fueron lisadas sobre la placa de cultivo por el agregado de 500 μ l de TRIzol LS Reagent y homogeneización con pipeta durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para la obtención del RNA, la muestra fue transferida a un tubo eppendorff donde se la incubó a temperatura ambiente con 0,2 ml de cloroformo por 15 min. Luego, la muestra fue separada en una fase acuosa y una fase orgánica mediante centrifugación a 12000 x g durante 10 min a 4°C. La fase acuosa, conteniendo el RNA, fue transferida y el RNA recuperado mediante precipitación con 0,5 ml de isopropanol por 10 minutos a temperatura ambiente y posterior centrifugación a 12000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el RNA lavado con 1 ml de etanol al 75% a 7500 g por 5 min a 4°C. Para la redisolución del RNA, el precipitado fue secado al aire libre, disuelto en 30-40 μ l de agua libre de RNAsas e incubado entre 10 a 30 minutos a 60°C. Para la cuantificación del RNA se midió la absorvancia a 260 nm y se determinó el grado de pureza mediante la relación A260/A280.

RT-PCR

La RT-PCR se realizó en pasos sucesivos de retrotranscripción y posterior PCR. Para la retrotranscripción se partió de 0,5-2 μ g de RNA a los cuales se agregaron los siguientes reactivos en las concentraciones finales indicadas entre paréntesis: oligo(dT)₂₀ (25 μ g/ml), dNTPs (1 mM), buffer de síntesis para AMV (1X), DTT (5 μ M), RNAsin (Promega) (40 U/20 μ l), retrotranscriptasa de AMV (Invitrogen) (15 U/20 μ l), agua libre de nucleasas para completar el volumen a 20 μ l. La retrotranscripción se realizó a 45°C, durante 60 minutos con posterior desnaturalización de la retrotranscriptasa de AMV a 85°C por 5 minutos. El cDNA (1-2 μ l, tomando cantidades iguales de las muestras a comparar) se utilizó para realizar la reacción de PCR. Para la PCR se partió del cDNA obtenido, al cual se agregaron los siguientes reactivos (Invitrogen) en las concentraciones finales indicadas entre paréntesis: dNTPs (0,2 mM),

primers (0,5 μ M cada uno), $MgCl_2$ (1,5 mM), Taq polimerasa (2 U/50 μ l), buffer de reacción para Taq polimerasa (1X), y agua libre de nucleasas para llevar a un volumen de 50 μ l. La amplificación se realizó con un ciclador LABNET MultiGene Gradient Thermal Cycler. En la **tabla I** se detallan las secuencias de los pares de primers utilizados y las condiciones de ciclado. 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.

	Primers	Desnaturalización	Apareamiento	Elongación
HPRT	5' GTTGATACAGGCCAGACTTTGTTG 3' 5' AGGGTAGGCTGGCCTATA 3'	94°C 45 seg	56°C 45 seg	72°C 1 min
FN	5' TACCAAGGTCAATCCACACCCC 3' 5' CAGATGGCAAAGAAAGCAGAGG 3'	94°C 45 seg	60°C 1 min	72°C 1 min
Col I	5' CCTCCCTGTACCTGGGCAGGC 3' 5' CCCTTGGGGCCAGGAAGACC 3'	94°C 45 seg	56°C 1 min	72°C 1 min
Gp38	5' TCCAACGAGATCAAGATGTG 3' 5' CTTTCTTATCTGTTGTCTGCG 3'	94°C 45 seg	56°C 1 min	72°C 1 min
CCL21	5' AGCTATGTGCAAACCCTGAG 3' 5' TCATAGGTGCAAGGACAAGG 3'	94°C 45 seg	56°C 1 min	72°C 1 min
CXCL13 (BLC)	5' CCAGGCAGAATGAGGCTCAG 3' 5' CTCAGCTCCTGCAGGATTGG 3'	94°C 45 seg	58°C 1 min	72°C 1 min
IL-7	5' TATTCTACAATGTTCCATGTTTCTTTTAGA 3' 5' CTTTTCTGTTCCTTTA 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
TGF-β	5' GCTTCAGCTCCACACAGAGAAG 3' 5' GGAGCGCACAATCATGTTGG 3'	94°C 45 seg	60°C 1 min	72°C 1 min

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, 5 minutos) y seguido de una elongación final (72°C, 10 minutos). El número de ciclos se ajustó para cada tipo de muestra como se explicó en el texto.

Cultivo mixto linfocitario (CML)

Las células presentadoras se obtuvieron purificando células mononucleares de bazo de ratones AKR/J 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 $25 \cdot 10^6$ células/ml en RPMI con SBF con mitomicina C (Sigma) (25 $\mu\text{g/ml}$) 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 la mitomicina C.

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

Para evaluar la función supresora de las células Treg se agregaron a los cultivos células CD4⁺CD25⁺ de ganglios linfáticos de ratones BALB/c o CTSL^{nkt/nkt}, purificadas también con columnas magnéticas.

Se utilizó el siguiente medio de cultivo: RPMI con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, 2-mercaptoetanol 50 μM y SBF 10%.

Para los ensayos de función regulatoria se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en “U” y se colocaron en cada pocillo $2 \cdot 10^5$ células presentadoras y $2 \cdot 10^5$ células respondedoras y un número variable de células CD4⁺CD25⁺ purificadas, en un volumen final de 200 μl . Para los ensayos de proliferación en presencia de células estromales se establecieron cultivos confluentes de células estromales en placas de 24 pocillos.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 durante 4 días y luego se recuperaron para su análisis por citometría de flujo. La proliferación de las células respondedoras se evaluó por dilución de la intensidad de fluorescencia del CFSE mediante FACS.

Ensayos de viabilidad y apoptosis *in vitro*

Células de ganglios linfáticos o células CD4+CD25+ y CD4+CD25- purificadas por separación magnética fueron cultivadas a una densidad de $2 \cdot 10^6$ o $4 \cdot 10^5$ células por pocillo en placas de 24 o 96 pocillos respectivamente conteniendo una monocapa de células estromales en confluencia. Como control se incubaron células en una placa de cultivo libre de células estromales. Para los ensayos de inhibición de contacto celular las células fueron cultivadas en una cámara de difusión o transwell (Costar). Los ensayos en placas de 24 pocillos se llevaron a cabo en un volumen final de 2 ml y los realizados en placas de 96 pocillos en un volumen final de 0,2 ml. Las células fueron mantenidas en las diferentes condiciones por distintos periodos de tiempo a 37°C, con una atmósfera de CO₂ al 5%.

Viabilidad y ciclo celular con ioduro de propidio (IP)

Se cosecharon a distintos tiempos las células de ganglio incubadas en presencia de células estromales y se marcaron con un anticuerpo anti-CD4 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 Ca²⁺ ni Mg²⁺) 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), 25 µg/ml ioduro de propidio (IP) (Sigma) en PBS conteniendo 1g/l glucosa) e incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Los porcentajes de células viables y muertas fueron determinados utilizando un citómetro de flujo FACScan. El IP se intercala entre las bases del DNA y permite discriminar entre las células que están en proceso de síntesis o han duplicado su contenido de DNA, de aquellas que no se están dividiendo o han perdido parte de su contenido de DNA al entrar en el proceso de muerte celular.

Apoptosis con anexina V

Para la detección de células apoptóticas, linfocitos de ganglios o células CD4+CD25+ y CD4+CD25- purificadas fueron cosechadas a las 48 hs de cultivo. Las células fueron marcadas utilizando el protocolo de marcación con anexina V descrito previamente.

Presentación de los resultados

Las figuras, tablas y fotos contienen, salvo que se indique, resultados representativos obtenidos de experimentos repetidos de dos a cuatro veces en forma independiente.

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

CAPÍTULO 1. INFLUENCIA DE LA CATEPSINA L EN LA POBLACIÓN DE CÉLULAS T REGULATORIAS CD4+

Los ratones CTSL^{nkt/nkt} son portadores de una delección en el gen que codifica para la cisteína proteasa CTSL. Como consecuencia, estos mutantes sintetizan una CTSL no funcional²⁵⁵. Utilizando los ratones CTSL^{nkt/nkt} se demostró en nuestro laboratorio que la CTSL posee una amplia influencia sobre el sistema inmune, interviniendo, entre otras funciones, en la regulación del número de linfocitos T en los órganos linfoides centrales y periféricos²⁵⁵. En estos ratones, al igual que en los ratones KO para esta proteasa²³⁵, la selección positiva de las células T CD4+ se encuentra alterada²⁴⁶, lo que se evidencia en una severa disminución del número y el porcentaje de timocitos CD4 SP. Como consecuencia, los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} muestran una marcada reducción en el porcentaje de células T CD4+. Así, el número absoluto de linfocitos T CD4+ se encuentra notablemente reducido en el bazo. No obstante, los ganglios linfáticos de estos mutantes están hipertrofiados y el número de células T CD4+ alcanza un nivel normal debido a un incremento en su tasa de proliferación basal²⁵⁵.

1.1- Células Treg CD4+CD25+Foxp3+ en ratones deficientes en CTSL

1.1.1- Los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} presentan alteraciones en el número absoluto de células Treg y en su frecuencia dentro de la población T CD4+

El primer objetivo de esta Tesis fue investigar la influencia de la mutación *nkt* sobre la población de células T CD4+ con fenotipo Treg. Con este fin, se analizó mediante citometría de flujo (FACS) la expresión de los marcadores de células Treg CD25 y Foxp3 en la población T CD4+ de los ratones CTSL^{nkt/nkt}. En todos los ensayos de esta Tesis se utilizaron como control wild type (wt) ratones de la cepa BALB/c.

Como puede observarse en la **figura 1** los ratones CTSL^{nkt/nkt} mostraron un aumento significativo en la proporción de células Foxp3+ dentro de la población T CD4+ de los ganglios linfáticos y el bazo. Este aumento involucró tanto al porcentaje de células con fenotipo Treg CD25+Foxp3+ como al de células T CD25-Foxp3+,

consideradas un reservorio de células Treg en la periferia²⁵⁸ o células Treg en proliferación⁶⁵. Dado que el número absoluto de células T CD4+ en los ganglios linfáticos no difiere entre los ratones CTSL^{nkt/nkt} y los wt²⁵⁵ (**figura 2 A**), este incremento en la proporción de células Treg correlacionó con un aumento significativo en el número absoluto de células CD4+CD25+Foxp3+ en los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} (**figura 2 B**). En el bazo, en cambio, como consecuencia de la reducción en el número de células T CD4+ que exhibe este órgano, el número absoluto de linfocitos Treg resultó disminuido (**figura 2**).

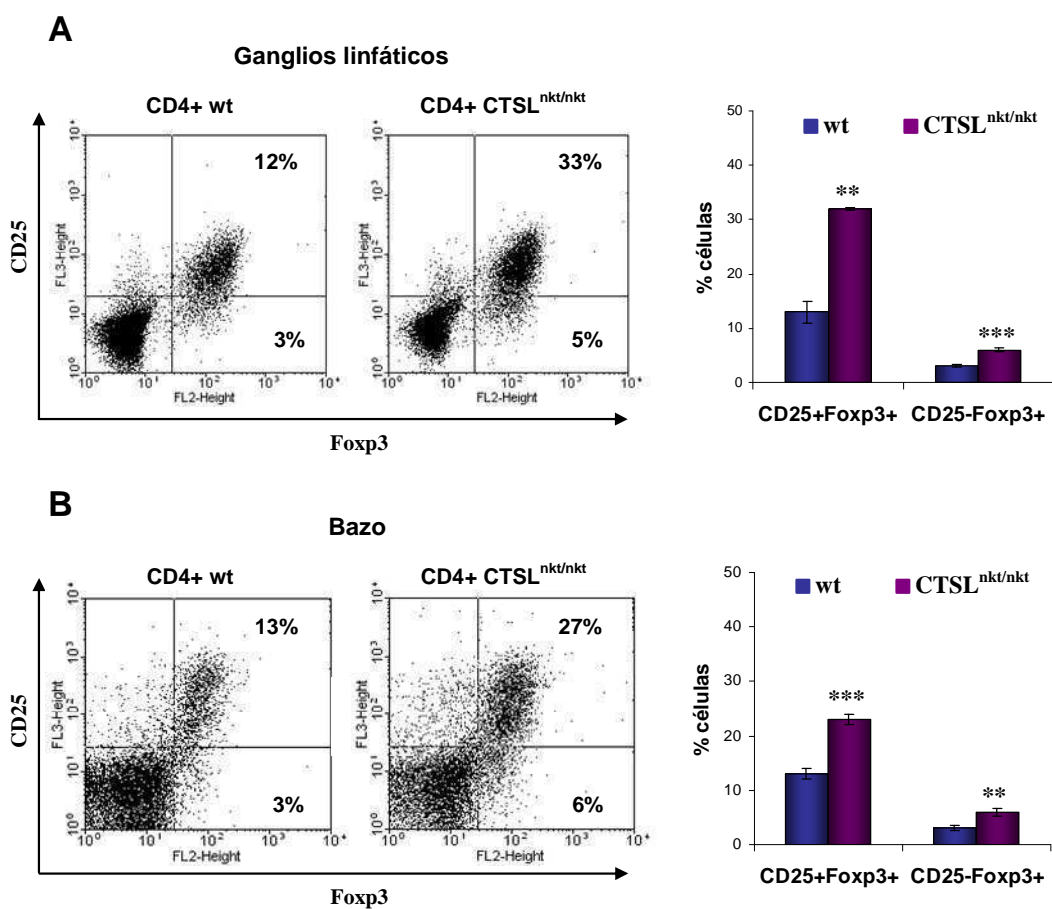


Figura 1: La mutación *nkt* induce alteraciones en la frecuencia de células Treg en la población CD4+ de los órganos linfoides periféricos. Linfocitos de ganglios linfáticos (A) y bazo (B) de ratones CTSL^{nkt/nkt} y wt fueron marcados con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3 conjugados a distintos fluorocromos y analizados por FACS. Se muestran dot plots representativos de la expresión de CD25 y Foxp3 dentro de la población CD4+. Los gráficos de barras indican el porcentaje de células CD25+Foxp3+ y CD25-Foxp3+ en la población CD4+. Los datos se presentan como la media \pm SD; n=4. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

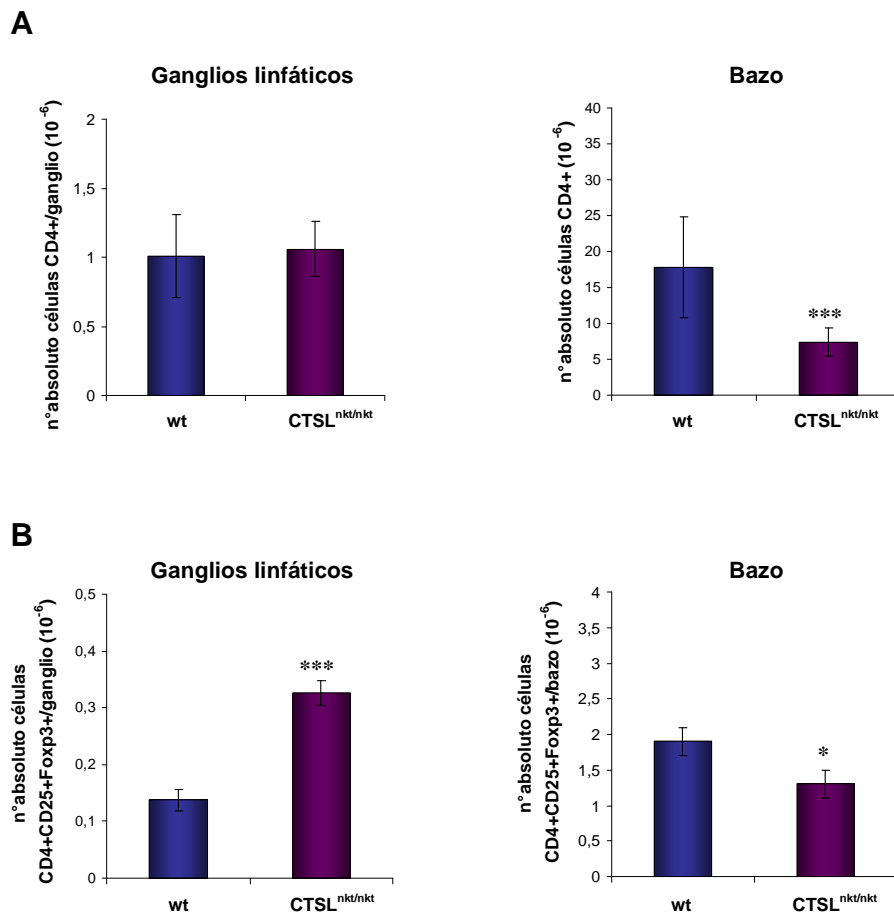


Figura 2. Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos y bazo de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} fueron marcados con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3 y analizados por FACS. (A) Se muestra el número absoluto de células CD4⁺ presentes en los ganglios linfáticos y el bazo de ratones CTSL^{nkt/nkt} (n=12) y sus controles wt (n=10). (B) Se indica el número absoluto de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ presentes en los ganglios linfáticos y el bazo de ratones CTSL^{nkt/nkt} (n=4) y wt (n=4). Los datos se presentan como la media \pm SD. *p<0,05; ***p<0,001. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Además de distinguir a las células con fenotipo regulatorio, la marcación anterior permite diferenciar células con fenotipo activado (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) y células con fenotipo virgen o naive, a las cuales denominaremos de aquí en adelante células T convencionales (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻). Como se ilustra en la **figura 3 A**, la población CD4⁺ de los ganglios linfáticos y el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} mostró un leve incremento –aunque no significativo– en el porcentaje de células CD25⁺Foxp3⁻. El número absoluto de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ mostró una tendencia hacia un

aumento en los ganglios linfáticos y una reducción en el bazo (datos no mostrados). Por su parte, el porcentaje de células T convencionales CD25-Foxp3- dentro de la población CD4+ resultó significativamente reducido tanto en los ganglios linfáticos como en el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} (figura 3 A). Se observó además una disminución en el número absoluto de linfocitos CD4+CD25-Foxp3- en ambos órganos linfoides, la cual resultó particularmente severa en el bazo (figura 3 B).

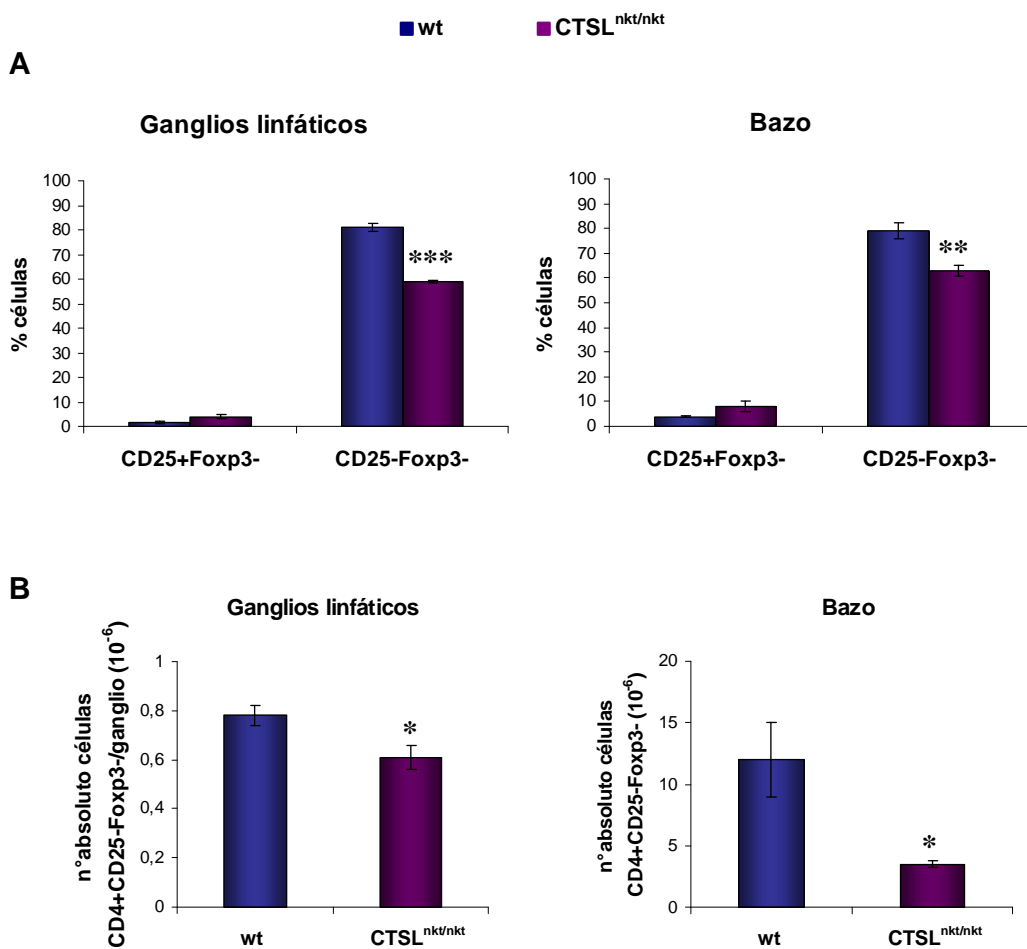


Figura 3: Los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} muestran una disminución en la frecuencia de células CD25-Foxp3- en la población T CD4+ y una disminución en el número absoluto de células CD4+CD25-Foxp3-. Células provenientes de ganglios linfáticos y bazo de ratones CTSL^{nkt/nkt} y sus controles wt fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3 y analizadas por FACS. (A) Porcentaje de células CD25+Foxp3- y CD25-Foxp3- dentro de la población CD4+ de los ganglios linfáticos y el bazo. (B) Se indica el número absoluto de células CD4+CD25-Foxp3- en los ganglios linfáticos y el bazo. Los datos se presentan como la media \pm SD; n=4. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Así, los ganglios linfáticos y el bazo de los ratones mutantes para CTSL muestran dentro de la población T CD4⁺ un importante aumento en el porcentaje de células Treg y una disminución en la frecuencia de células T convencionales. Respecto de los números absolutos, mientras que en los ganglios linfáticos el número absoluto de células Treg está aumentado, el de las células T convencionales se encuentra disminuido. Por su parte, el bazo muestra una disminución tanto en el número absoluto de células Treg como en el de células T convencionales.

1.1.2- Capacidad inmunosupresora de las células CD4⁺CD25⁺ de los ratones mutantes para CTSL

Con el objeto de evaluar la capacidad inmunosupresora de las células Treg de los ratones CTSL^{nkt/nkt}, se purificaron por separación magnética células CD4⁺CD25⁺ de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} y sus controles BALB/c, y se estudió su capacidad supresora en reacciones de cultivo mixto alogeneico. Para este experimento, células CD4⁺CD25⁻ de ganglios linfáticos de ratones BALB/c (respondedoras) fueron marcadas con CFSE y cocultivadas con células mononucleares de bazo de ratones AKR/J pretratadas con mitomicina C. Al cocultivo se agregaron, desde el comienzo, distintos números de células CD4⁺CD25⁺ mutanes para CTSL o wt. Luego de 4 días de cultivo el grado de proliferación de las células CD4⁺ respondedoras fue analizado por dilución de la marca del CFSE. Como se muestra en la **figura 4 A**, el porcentaje de inhibición de la proliferación causado por el agregado de células CD4⁺CD25⁺ mutantes o wt fue similar, resultando mayor el grado de inhibición de la proliferación a mayor concentración de células CD4⁺CD25⁺ (datos no mostrados). Resultados similares fueron obtenidos utilizando como respondedoras células mutantes para CTSL (**figura 4 B**).

Estos resultados indican que las células CD4⁺CD25⁺ derivadas de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} poseen una capacidad inmunosupresora similar a la de aquellas derivadas de ratones wt.

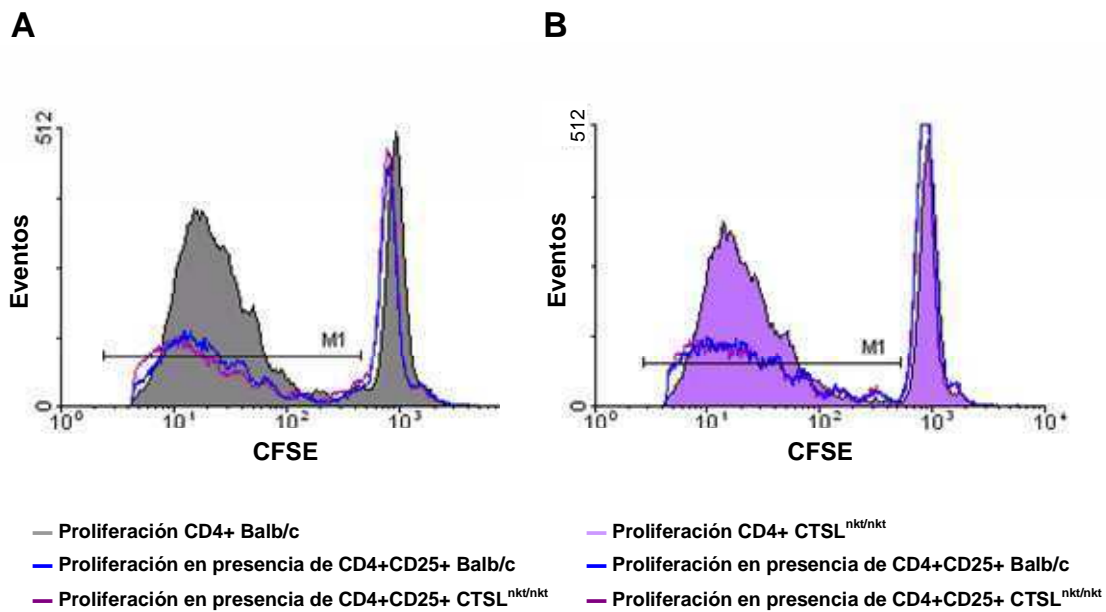


Figura 4: Actividad inmunosupresora de células CD4+CD25+ de ratones mutantes para CTSL. Se realizó un cultivo mixto linfocitario como se describe en Materiales y Métodos ($2 \cdot 10^5$ células presentadoras AKR/J + $2 \cdot 10^5$ células CD4+CD25- respondedoras BALB/c o CTSL^{nkt/nkt} marcadas con CFSE), al cual se le agregaron $0,5 \cdot 10^5$ o $1 \cdot 10^5$ células CD4+CD25+ purificadas de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} o wt. La proliferación se evaluó por FACS como la pérdida de intensidad del colorante CFSE en las células CD4+ respondedoras. A) Histograma representativo de la proliferación de células CD4+ provenientes de ratones wt en presencia o ausencia de $1 \cdot 10^5$ células CD4+CD25+ wt o CTSL^{nkt/nkt}. B) Histograma representativo de la proliferación de células CD4+ provenientes de ratones CTSL^{nkt/nkt} en presencia o ausencia de $1 \cdot 10^5$ células CD4+CD25+ wt o CTSL^{nkt/nkt}. Se muestra un experimento representativo de dos independientes con resultados similares.

1.1.3- Caracterización fenotípica de las células Treg en ratones CTSL^{nkt/nkt}

Para caracterizar la población Treg de los mutantes CTSL^{nkt/nkt}, analizamos en las células CD4+CD25+ la expresión de los marcadores CD62L^{hi}, CD45RB^{low} y CTLA-4. Como se muestra en la **figura 5 A**, todos los marcadores estudiados fueron expresados por un porcentaje similar de células CD4+CD25+ en los ratones CTSL^{nkt/nkt} y sus controles wt. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que las células Treg CD4+CD25+ no expresan o expresan bajos niveles del receptor para la IL-7 (CD127)^{39,40}. En la **figura 5 B** se ilustra la expresión de Foxp3 y CD127 en la población CD4+ de ratones mutantes para CTSL y controles, donde puede apreciarse el bajo nivel

de expresión de CD127 que presentan las células Foxp3⁺. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD127 dentro de la población CD4⁺CD25⁺ de los ganglios linfáticos de los ratones wt y CTSL^{nkt/nkt}.

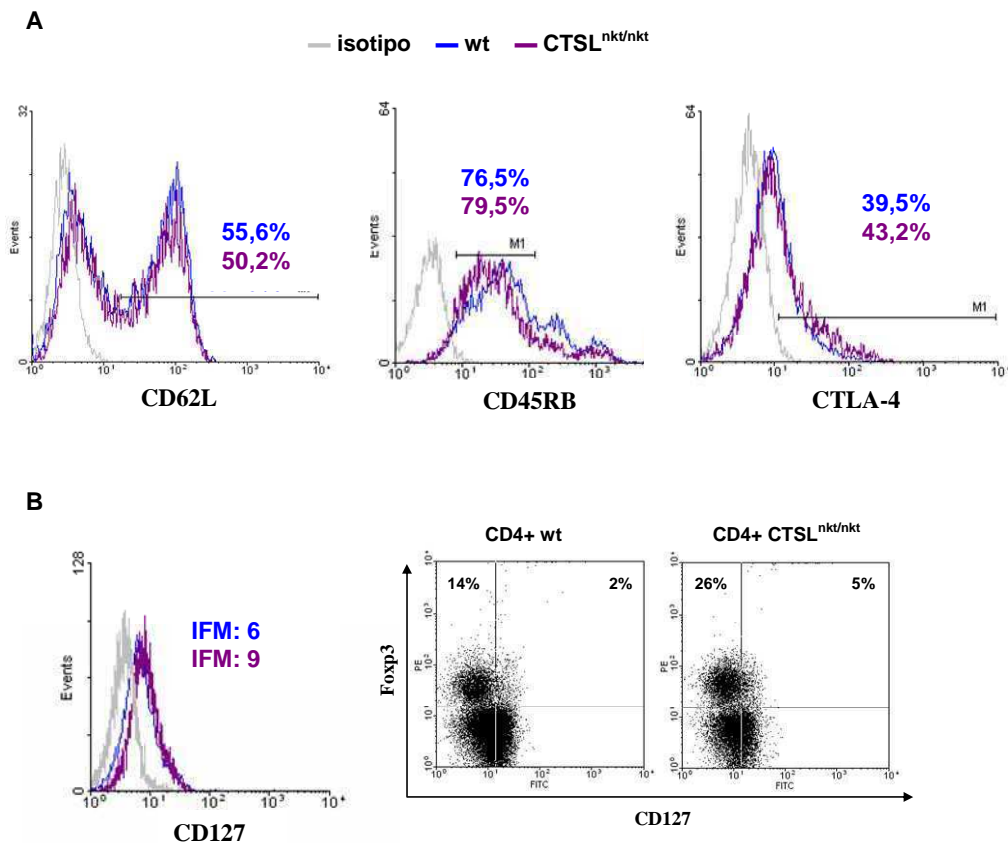


Figura 5: Expresión de CD62L^{hi}, CD45RB^{low}, CTLA-4 y CD127 en la población CD4⁺CD25⁺ de los ganglios linfáticos. Se midió por FACS la expresión de los marcadores CD62L, CD45RB, CTLA-4 (intracelular) y CD127 en la población CD4⁺CD25⁺ de los ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} y sus controles wt. (A) Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD62L, CD45RB y CTLA-4. Se indica el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ positivas para cada marcador. (B) Se muestra la expresión de CD127 dentro de la población CD4⁺CD25⁺ (izquierda) y un dot plot representativo de la expresión de Fopx3 y CD127 en la población CD4⁺ (derecha). El experimento se realizó dos veces con resultados similares.

En conclusión, las células CD4⁺CD25⁺ de los ratones wt y mutantes para CTSL mostraron niveles de expresión similares de distintos marcadores de superficie asociados a las células Treg.

1.1.4- Células Treg en el timo de los ratones mutantes para CTSL

Dados el aumento del porcentaje de células CD25+Foxp3+ en la población CD4+ de los órganos linfoides periféricos en los ratones CTSL^{nkt/nkt} y el aumento en el número absoluto de células Treg en los ganglios linfáticos, investigamos mediante FACS el nivel de células Treg en el timo de dichos mutantes. Como puede observarse en la **figura 6 A**, en los ratones CTSL^{nkt/nkt} el porcentaje de células CD25+Foxp3+ dentro de la población de timocitos CD4 SP resultó similar al de los ratones wt. Además, dadas las reducciones en el porcentaje y el número absoluto de timocitos CD4 SP que presentan los mutantes para CTSL²⁵⁵ (**figura 6 A y B**), tanto el porcentaje de timocitos CD4+CD8-CD25+Foxp3+ dentro de la población total del timo como su número absoluto resultaron notablemente disminuidos (**Figura 6 C y D**).

1.1.5- Alteraciones en la frecuencia de células Treg en la población CD4+ de ratones CTSL^{nkt/nkt} neonatos

Para investigar si la proporción de células Treg dentro de la población T CD4+ periférica de los ratones CTSL^{nkt/nkt} se encontraba alterada desde los primeros días de vida, analizamos el porcentaje de células Foxp3+ en la población CD4+ de los ganglios linfáticos de ratones de entre 7 y 9 días de edad. La **figura 7 A** muestra que la población CD4+ de los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} presentó el triple de células Foxp3+ que la de los ratones control. Además, al igual que en los adultos, el incremento de células Foxp3+ involucró aumentos en las subpoblaciones CD25+Foxp3+ y CD25-Foxp3+ (**figura 7 B**). Sin embargo, a diferencia de lo observado en los ratones adultos, donde la subpoblación CD25-Foxp3+ constituye un mínimo porcentaje del total de células Foxp3+, en los ratones neonatos la proporción de células CD25+Foxp3+ y CD25-Foxp3+ dentro de la población CD4+ presentó valores similares.

En lo que respecta a la proporción de células Foxp3+ en el timo, del mismo modo que en los adultos, la frecuencia de timocitos Foxp3+ dentro de la población CD4 SP fue similar entre los ratones neonatos CTSL^{nkt/nkt} y los controles (**figura 7 C**).

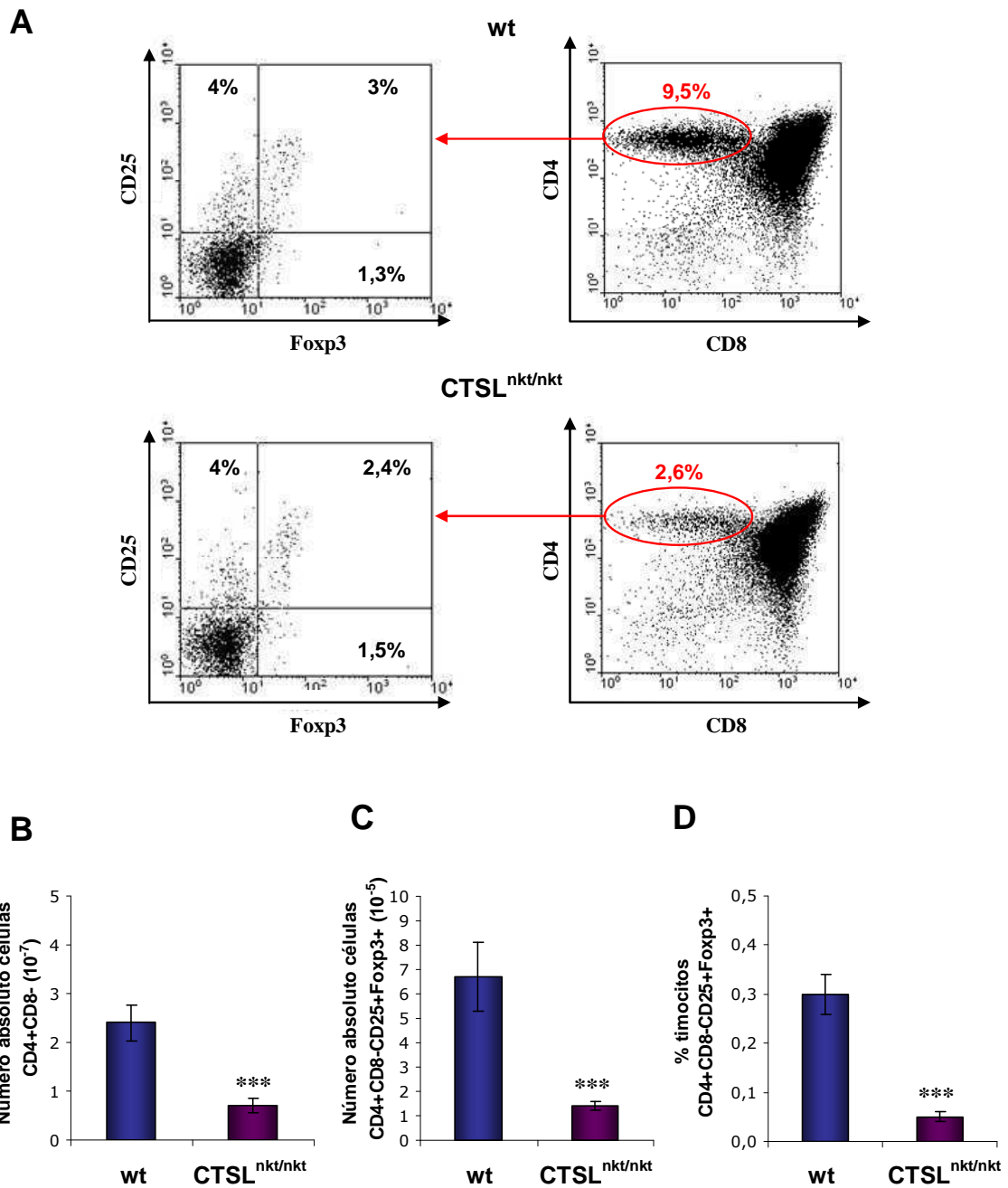


Figura 6: El timo de ratones CTSL^{nkt/nkt} muestra una frecuencia normal de células CD25+Fxp3+ dentro de la población CD4 SP y una disminución en el número absoluto de timocitos Treg. Células de timo de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD8 y anti-Fxp3 conjugados a distintos fluorocromos y analizadas por FACS. (A) Se muestran dot plots representativos de la expresión de CD25 y Fxp3 dentro de la población CD4 SP del timo de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt}. (B) Número absoluto de células CD4 SP. (C) Número absoluto de células CD4+CD8-CD25+Fxp3+. (D) Porcentaje de células CD4+CD8-CD25+Fxp3+ en el timo. Los datos se presentan como la media \pm SD; n=4. ***p<0,001. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

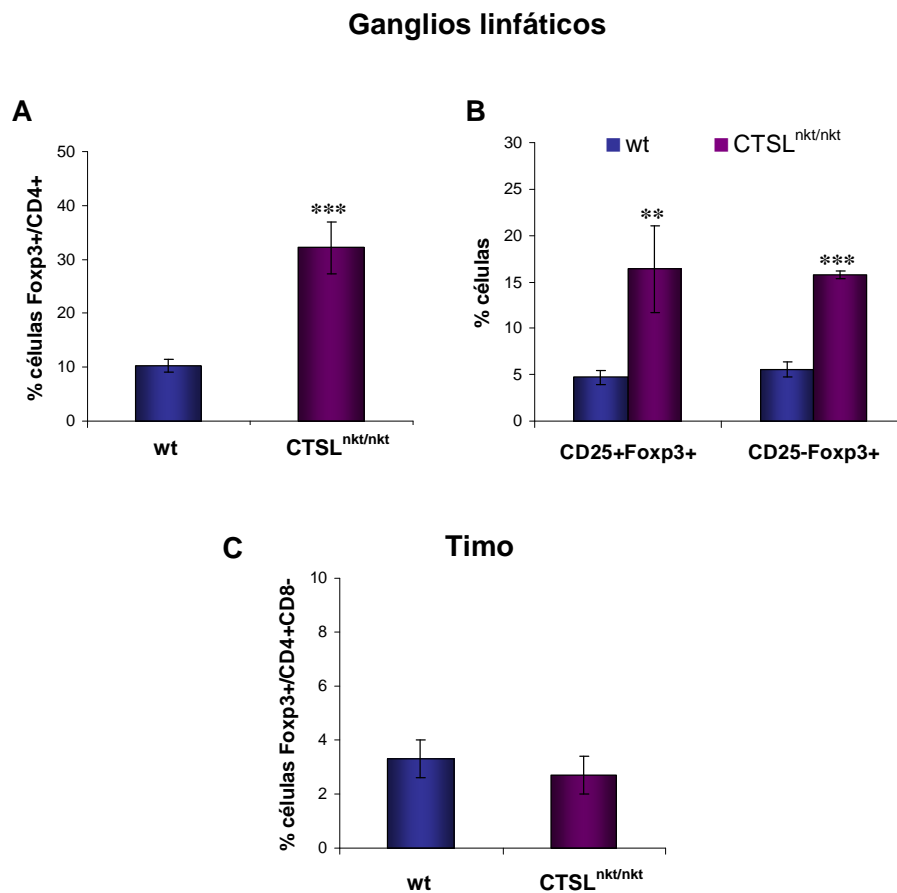


Figura 7: A la semana de vida la población CD4⁺ de los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} ya presenta alteraciones en la proporción de células Treg. Células provenientes de los ganglios linfáticos y el timo de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} de entre 7 y 9 días de vida fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25, anti-CD8 y anti-Foxp3 y analizadas por FACS. (A) Porcentaje de células Foxp3⁺ en la población CD4⁺ de los ganglios linfáticos. (B) Porcentaje de células CD25⁺Foxp3⁺ y CD25⁻Foxp3⁺ dentro de la población CD4⁺ de los ganglios linfáticos. (C) Porcentaje de células Foxp3⁺ en la población CD4⁺CD8⁻ del timo. Los datos se presentan como la media \pm SD de dos ensayos independientes con resultados similares; n=7. **p<0,01; ***p<0,001.

En conjunto nuestros resultados indican que la ausencia de actividad de CTSL correlaciona con un incremento en la proporción de células Treg dentro de la población T CD4⁺ de los órganos linfoides periféricos que no está asociado ni con un aumento en la frecuencia de células Treg dentro de los timocitos CD4 SP ni con un aumento en el número absoluto de células Treg en el timo. El aumento en la proporción de células Treg dentro de la población CD4⁺ periférica se encuentra establecido ya a la primer semana de vida de los ratones CTSL^{nkt/nkt}.

1.2- Mecanismos periféricos involucrados en el aumento de células Treg en los ratones CTSL^{nkt/nkt}

El aumento en la frecuencia de células Treg en la población CD4⁺ de los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} podría deberse a alguno de los siguientes mecanismos no necesariamente excluyentes: aumento en la exportación tímica de células Treg, disminución en sus niveles de apoptosis periférica, incremento en sus niveles de proliferación basal y/o adquisición del fenotipo CD25⁺Foxp3⁺ en la periferia.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la exportación diaria de timocitos CD4⁺ a la periferia está disminuida en los ratones mutantes para CTSL²⁵⁵. Por otro lado, el análisis de la expresión de CD25 y Foxp3 en la población CD4 SP del timo mostró que el número de timocitos Treg se encuentra reducido a un cuarto del de los ratones normales. Aunque no puede descartarse la existencia de una emigración diferencial de timocitos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, estos datos sugieren que el aumento en la frecuencia y el número de células Treg en los órganos linfoides periféricos en los mutantes para CTSL no derivaría de un aumento en su exportación tímica. Sugieren además que el aumento del número y la frecuencia de las células Treg dependerían de mecanismos actuantes en la periferia de los ratones CTSL^{nkt/nkt}.

1.2.1- El incremento en la proporción de células Treg en la población CD4⁺ de los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} no correlaciona con una reducción en su nivel de apoptosis basal

Con el objeto de investigar los factores que determinan el aumento en la frecuencia de células Treg dentro de la población CD4⁺ de los órganos linfoides periféricos en los ratones CTSL^{nkt/nkt}, evaluamos si el nivel de apoptosis basal de los linfocitos Treg se encontraba alterado. Para ello, se investigó el porcentaje de apoptosis de células Treg CD4⁺CD25⁺ en los ganglios linfáticos y el bazo mediante tinción con anexina V y análisis por FACS.

La anexina V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en su cara externa cuando comienza el proceso de apoptosis. Cabe señalar que en estos ensayos no se determinó la expresión de Foxp3 dada la incompatibilidad de esta marcación intracelular con las técnicas utilizadas para determinar niveles de apoptosis. No obstante, en nuestras condiciones experimentales (ratones criados en ambientes libres de patógenos específicos) entre el 85-90% de las células CD4+CD25+ expresan Foxp3 (**figura 1**).

En primer lugar, es importante destacar, que tanto en los ratones CTSL^{nkt/nkt} como en los wt, la subpoblación CD4+CD25+ mostró un mayor porcentaje de células apoptóticas que su contraparte CD4+CD25- (**figura 8**). Por otro lado, en los ratones CTSL^{nkt/nkt} los niveles de apoptosis de las células Treg CD4+CD25+ no resultaron reducidos con respecto a los controles. Más aún, en los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} tanto los niveles de apoptosis de las células CD4+CD25+ como los de las CD4+CD25- resultaron aumentados en un factor de 2 con respecto a los controles (**figura 8 A y B**). Estos datos no avalan la hipótesis de que el aumento en la proporción de células Treg dentro de la población CD4+ en los ganglios de los ratones mutantes para CTSL se deba a una alteración diferencial en los niveles de apoptosis de las poblaciones Treg y T convencional.

En el bazo el porcentaje de células apoptóticas en la población CD4+CD25- de los ratones mutantes duplicó el observado en los ratones wt, mientras que en la subpoblación CD4+CD25+ el aumento no resultó estadísticamente significativo (**figura 8 B**). Estos datos correlacionan con una importante disminución en el número absoluto de esplenocitos CD4+CD25- en los ratones mutantes (wt: $12 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^6$; CTSL^{nkt/nkt}: $3,5 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6$; $p < 0,05$) y una disminución leve en la subpoblación CD4+CD25+ (wt: $1,9 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$; CTSL^{nkt/nkt}: $1,3 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$; $p < 0,05$).

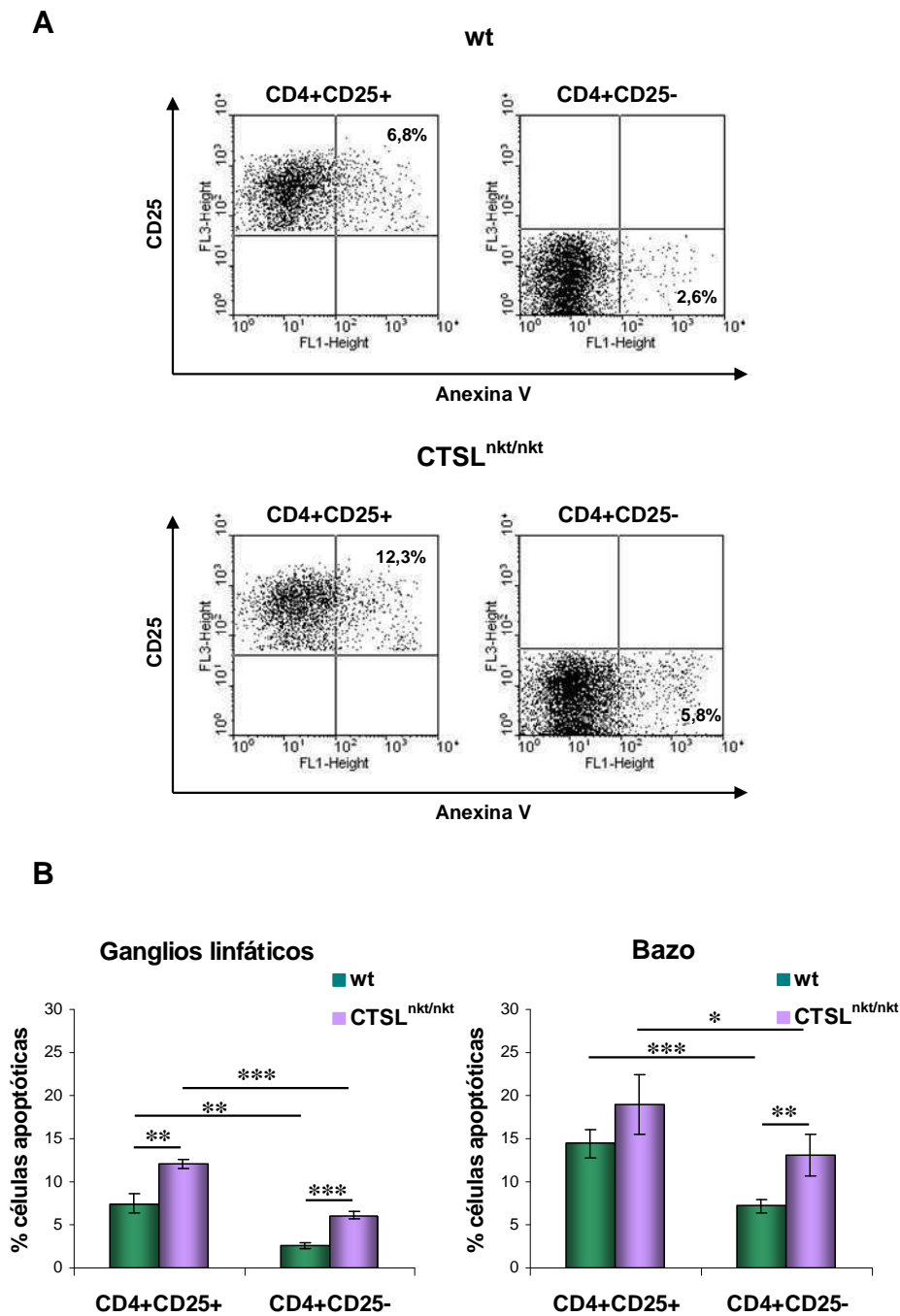


Figura 8: Apoptosis basal de las células Treg y T convencionales. Células de ganglios linfáticos y bazo de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} fueron marcadas en superficie con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado por marcación con anexina V y análisis por FACS. (A) Se muestran histogramas representativos de la detección de células apoptóticas en las poblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- de los ganglios linfáticos. (B) Se indica el porcentaje de células CD4+CD25+ y CD4+CD25+ apoptóticas en los ganglios linfáticos y el bazo de ratones CTSL^{nkt/nkt} y sus controles. Los datos se presentan como la media \pm SD; n=4. *p<0,5; **p<0,01; ***p<0,001. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Estos resultados indican que en los mutantes CTSL^{nkt/nkt} el aumento de la frecuencia de células Treg en la población T CD4⁺ de los ganglios linfáticos no deriva de una disminución en su nivel de apoptosis. Por el contrario, en el bazo, el incremento en la apoptosis de la subpoblación T convencional podría contribuir al aumento en la frecuencia de esplenocitos Treg dentro de la población CD4⁺, abriendo la posibilidad de que distintos mecanismos periféricos estén influenciando el aumento en la proporción de células Treg en dichos órganos linfoides.

1.2.2- La mutación *nkt* está asociada con un incremento en los niveles de proliferación basal de las células Treg

Continuamos analizando la proliferación *in vivo* de la población Treg en los órganos linfoides periféricos de los mutantes CTSL^{nkt/nkt} mediante marcación con 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU). La BrdU es un análogo de timidina capaz de incorporarse al DNA de células en proliferación durante la fase S del ciclo celular, la cual puede detectarse posteriormente utilizando un anticuerpo monoclonal.

El ensayo se llevó a cabo inoculando vía i.p. 2 mg de BrdU durante dos días consecutivos en ratones mutantes y controles. Al día siguiente de la última inoculación los ratones fueron sacrificados y se determinaron los porcentajes de incorporación de BrdU en las poblaciones CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ de los ganglios linfáticos y el bazo.

Como puede observarse en la **figura 9 A**, las células Treg CD4⁺CD25⁺ y las T convencionales CD4⁺CD25⁻ mostraron distintos niveles de incorporación de BrdU. Coincidiendo con resultados reportados por otros autores²⁵⁹, el porcentaje de células BrdU⁺ resultó mayor en la subpoblación Treg que en la T convencional, tanto en los ratones CTSL^{nkt/nkt} como en los wt. En lo que respecta a la incorporación de BrdU por las células Treg, el porcentaje de células BrdU⁺ dentro de la población CD4⁺CD25⁺ de los ganglios linfáticos y el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} resultó entre 2 a 3 veces mayor que en los ratones wt. No obstante, la proliferación de la población CD4⁺CD25⁻ también resultó mayor en los ratones mutantes, tanto en los ganglios linfáticos como en el bazo (**figura 9 A**). La razón entre la incorporación de BrdU por las células Treg y las

células T convencionales en los ratones mutantes resultó similar a la de los ratones wt (figura 9 B).

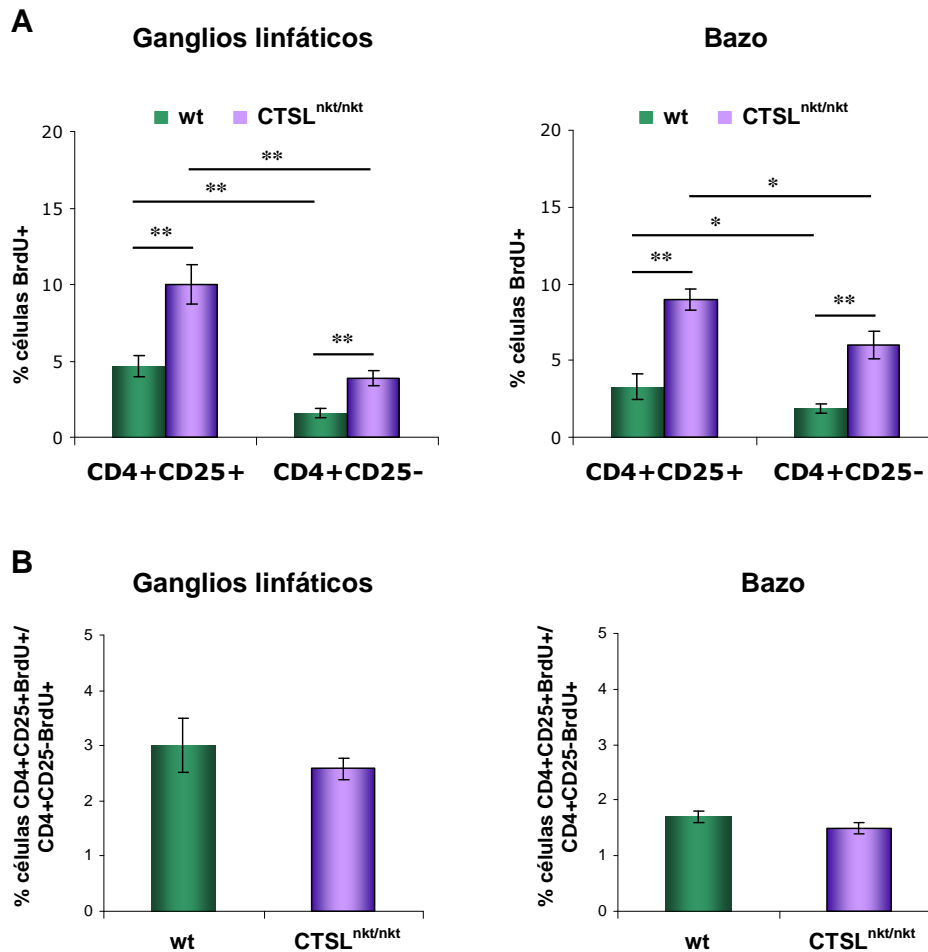


Figura 9: Proliferación basal de células Treg y T convencionales por incorporación de BrdU a corto plazo. Ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} fueron inoculados i.p. con 2 mg de BrdU durante dos días consecutivos. Células de ganglios linfáticos y bazo fueron obtenidas y marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-BrdU y analizadas por FACS. (A) Porcentaje de incorporación de BrdU en células CD4+CD25+ y CD4+CD25-. (B) Se indica el porcentaje de células BrdU+ en la población CD4+CD25+ relativo al porcentaje de células CD4+CD25-BrdU+. Los valores indican la media \pm SD (n=3). *p<0,05; **p<0,01. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes con resultados similares.

Estos resultados indican que las tasas de proliferación basal de las células Treg y T convencionales se encuentran significativamente incrementadas en los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL^{nkt/nkt}. El hecho de que la razón entre la incorporación de BrdU por las células CD4+CD25+ y las CD4+CD25- resulte de una magnitud similar en los ratones mutantes y en los ratones normales sugiere que el incremento en la proliferación no determinaría el aumento en la proporción de células Treg dentro de la población T CD4+ periférica.

Para confirmar estos resultados, realizamos un ensayo de marcación con BrdU a largo plazo. Para ello, ratones CTSL^{nkt/nkt} y sus controles wt fueron inyectados i.p. durante siete días consecutivos con 1 mg de BrdU. Luego del periodo de marcación, los animales fueron sacrificados y la incorporación de BrdU en las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- analizada mediante citometría de flujo.

De manera similar a lo observado en los experimentos de incorporación de BrdU a corto plazo, la frecuencia de células BrdU+ dentro de las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- de los ganglios linfáticos y el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} fue significativamente mayor que en los ratones wt (**figura 10**). Nuevamente, la razón entre la incorporación de BrdU por las células CD4+CD25+ y CD4+CD25- en los ratones CTSL^{nkt/nkt} resultó similar a la de los ratones wt.

Cabe destacar además, que el aumento en la incorporación de BrdU sólo tuvo lugar en la población T CD4+ de los ratones CTSL^{nkt/nkt}, dado que tanto la población de células T citotóxicas, CD8+, como la población de linfocitos B, B220+, presentaron un porcentaje de células BrdU+ similar al de los ratones controles (**figura 11**).

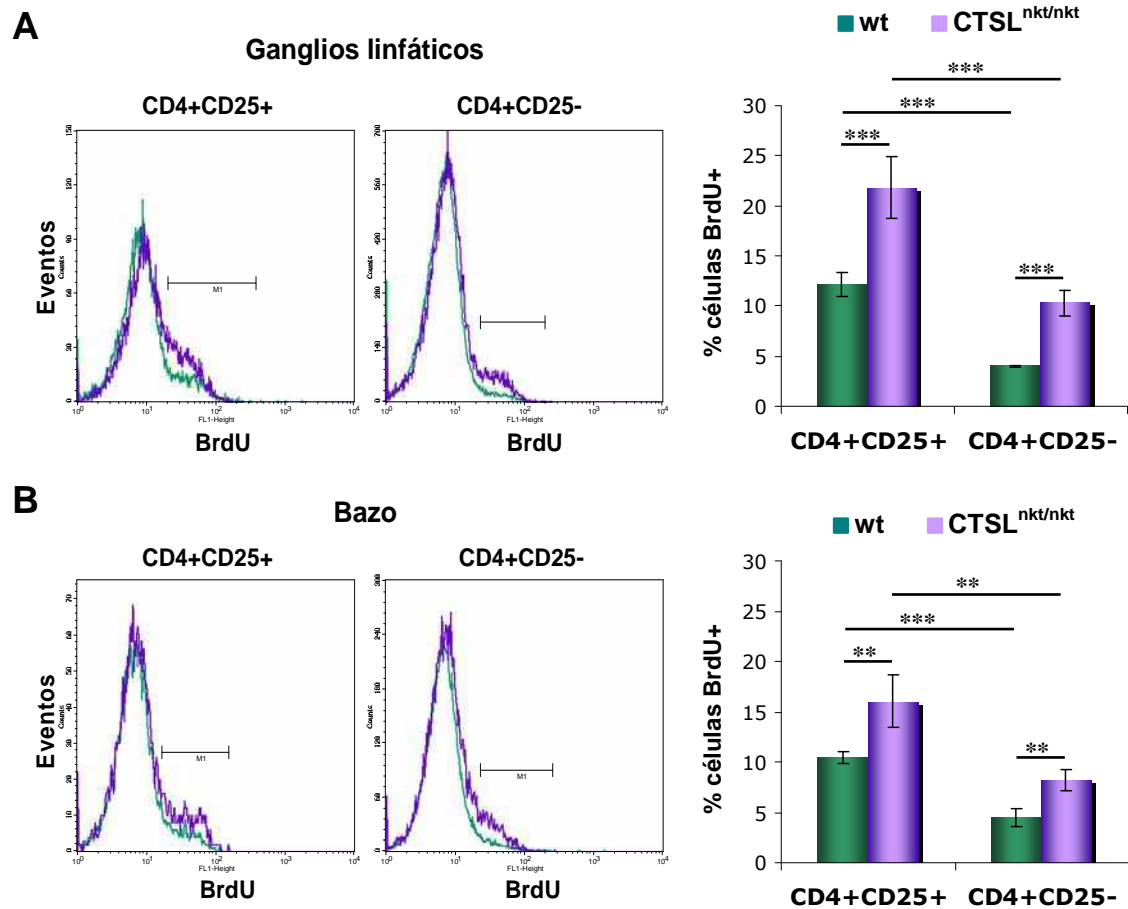


Figura 10: Incorporación de BrdU a largo plazo. Ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} fueron inoculados i.p. con 1mg de BrdU durante siete días consecutivos. Células de ganglios linfáticos y bazo fueron obtenidas y marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-BrdU y analizadas por FACS. Se muestran histogramas representativos de la incorporación de BrdU por células CD4+CD25+ y CD4+CD25- de ganglios linfáticos (A) y bazo (B) de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt}. Los gráficos de barras indican el porcentaje de incorporación de BrdU. Los valores indican la media \pm SD (n=3). **p<0,01; ***p<0,001. Se muestra un experimento representativo de dos independientes con resultados similares.

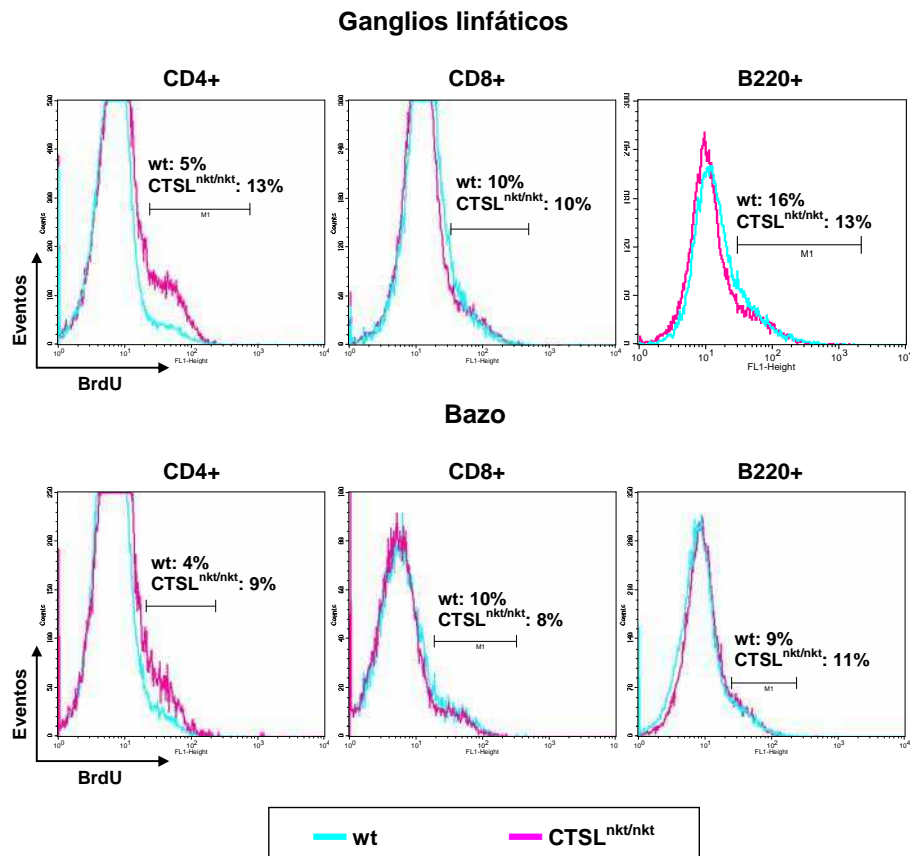


Figura 11: Incorporación de BrdU por linfocitos T y B en ratones mutantes para CTSL. Ratones wt y CTSL^{nkt/nkt} fueron inoculados i.p. con 1 mg de BrdU por siete días consecutivos. Se obtuvieron células de ganglios linfáticos y bazo, se marcaron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-B220 y anti-BrdU, y se analizó por FACS el porcentaje de incorporación de BrdU. Se muestran histogramas representativos de dos experimentos independientes con resultados similares.

El conjunto de estos resultados indica que la falta de actividad de CTSL correlaciona con un incremento en los niveles de proliferación basal de las subpoblaciones CD4⁺ Treg y T convencional en los órganos linfoides periféricos. El hecho de que la razón entre la incorporación de BrdU por las células CD4⁺CD25⁺ y las CD4⁺CD25⁻ resulte de una magnitud similar en los ratones CTSL^{nkt/nkt} y en los wt no avala la hipótesis de que el aumento en la proliferación sea el factor causal del aumento en la proporción de células Treg dentro de la población T CD4⁺ periférica.

1.2.3- Conversión de células CD4+CD25-Foxp3- a células Treg en ausencia de actividad de CTSL

Los resultados obtenidos hasta aquí nos llevaron a investigar si el aumento en la proporción de células Treg incluye un aumento en la conversión de células CD4+CD25-Foxp3- a células CD4+CD25+Foxp3+ en los mutantes para CTSL.

Investigamos en primer lugar si las células T convencionales de los ratones CTSL^{nkt/nkt} presentan una mayor capacidad de conversión a células Treg que las células que poseen una CTSL funcional.

Con este objetivo, comparamos en un sistema *in vitro*, la capacidad de conversión a células Foxp3+ de linfocitos CD4+CD25- derivados de ratones CTSL^{nkt/nkt} y wt. Para ello, células CD4+CD25- provenientes de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} y wt, purificadas mediante separación magnética, fueron activadas con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de TGF- β e IL-2, y mantenidas en cultivo en estas condiciones. Al cuarto día de cultivo se evaluó la conversión a células Treg analizando por FACS el porcentaje de células Foxp3+.

En las condiciones ensayas no se detectaron diferencias en el grado de conversión *in vitro* a células Foxp3+ entre las células CD4+CD25- derivadas de ratones wt y mutantes para CTSL (wt: $32 \pm 2\%$; CTSL^{nkt/nkt}: $33 \pm 2\%$; $p > 0,05$) (**figura 12 A**). No obstante, en las células CD4+CD25- incubadas como control en ausencia de TGF- β e IL-2, observamos un mayor porcentaje de células Foxp3+ en las células derivadas de ratones CTSL^{nkt/nkt} respecto de las provenientes de ratones wt (wt: $4 \pm 1\%$; CTSL^{nkt/nkt}: $7 \pm 0,5\%$; $p < 0,05$) (**figura 12 B**).

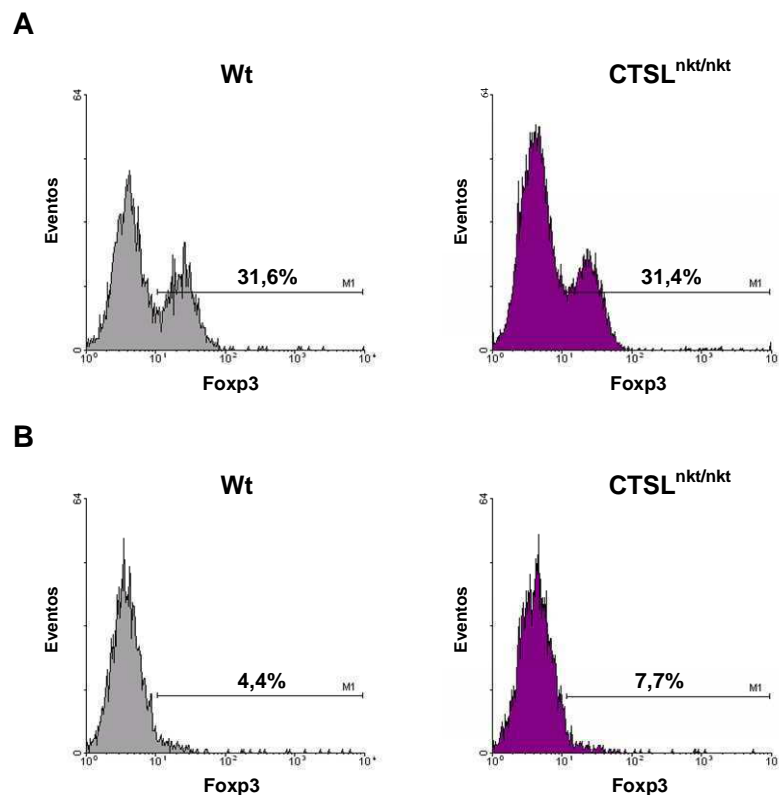


Figura 12. Células T CD4+CD25- provenientes de ratones CTSL^{nkt/nkt} o sus controles wt fueron purificadas por MACS y coestimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de TGF- β e IL-2. Luego de cuatro días de cultivo las células fueron cosechadas y se determinó mediante FACS la expresión de Foxp3. Se muestran histogramas representativos de la expresión de Foxp3+ en células CD4+CD25- cultivadas en presencia (A) o ausencia (B) de TGF- β e IL-2. EL ensayo fue repetido tres veces con resultados similares.

Dado el mayor porcentaje de células Foxp3+ que mostraron las células CD4+CD25- provenientes de ratones CTSL^{nkt/nkt} incubadas en ausencia de TGF- β e IL-2 respecto de las provenientes de ratones normales, evaluamos si la inhibición *in vitro* de la actividad de CTSL promueve la generación de células Treg. Recientemente, Sugita y col. demostraron que células T CD4+ tratadas *in vitro* con los inhibidores de CTSL, CTLA-2 α o CLIK-148, muestran mayores niveles de expresión para Foxp3 que las células T CD4+ incubadas en ausencia de estos inhibidores²⁶⁰.

El experimento se llevó a cabo purificando células T CD4+CD25- derivadas de ratones wt por separación magnética e incubándolas con anti-CD3, en presencia o ausencia de un inhibidor específico para la CTSL (CTSL inhibitor II, Calbiochem).

Como se observa en la **figura 13**, en presencia del inhibidor el porcentaje de células que expresaron Foxp3 fue significativamente mayor que en su ausencia (wt: $4 \pm 3\%$; CTSL^{nkt/nkt}: $11 \pm 2\%$; $p < 0,05$).

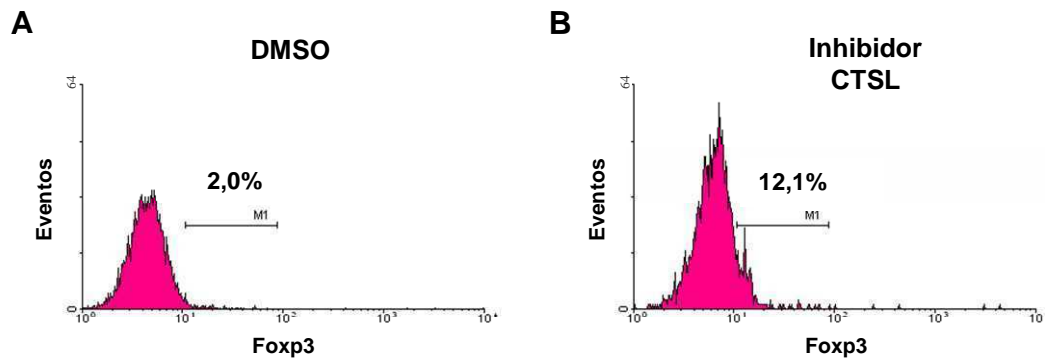


Figura 13. Células CD4+CD25⁻ derivadas de ratones wt fueron purificadas por MACS y estimuladas con anti-CD3 en presencia de un inhibidor para la CTSL (CTSL inhibitor II, 20 μ M en DMSO) o de un volumen equivalente de DMSO. Luego de tres días de cultivo las células fueron cosechadas y se determinó por FACS el porcentaje de células Foxp3⁺. Se muestran histogramas representativos de la expresión de Foxp3⁺ en células CD4+CD25⁻ cultivadas en ausencia (A) o presencia (B) del inhibidor para CTSL de un experimento representativo de 2 independientes.

Estos resultados muestran que la inhibición *in vitro* de la actividad de CTSL en células CD4+CD25⁻ incrementa la proporción de células Foxp3⁺.

RESUMEN DEL CAPÍTULO 1

1. Los órganos linfoides periféricos de los ratones mutantes para CTSL muestran un aumento en la frecuencia de células Treg dentro de la población T CD4+ que no correlaciona con un incremento en la proporción de células Treg en la población CD4 SP del timo. El número absoluto de células Treg en los ratones CTSL^{nkt/nkt} se encuentra incrementado en los ganglios linfáticos, levemente reducido en el bazo y severamente disminuido en el timo.
2. La ausencia de actividad de CTSL genera incrementos en los niveles de apoptosis y proliferación basal de las células T CD4+ con fenotipo regulatorio y convencional. En los ganglios linfáticos, el importante aumento en la proliferación de las células Treg contribuiría al incremento en su número, aunque no queda clara su participación en el incremento en la proporción de células CD25+Foxp3+ dentro de la población T CD4+. En el bazo, el incremento diferencial en el nivel de apoptosis entre las células Treg y T convencionales podría contribuir al desbalance entre células Treg y T convencionales dentro de la población T CD4+.
3. No se detectaron diferencias en el grado de conversión *in vitro* a células Foxp3+ de las células CD4+CD25- derivadas de ratones wt y mutantes para CTSL en presencia de estimulación y altas concentraciones de TGF- β e IL-2. Sin embargo, ensayos realizados a partir de células CD4+CD25- de ratones wt en presencia de un inhibidor de la CTSL permitieron detectar un aumento en el porcentaje de células que expresaban Foxp3, sugiriendo que la falta de actividad de CTSL podría estar asociada a la conversión de células CD4+CD25-Foxp3- a Foxp3+.

CAPÍTULO 2. ESTABLECIAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CULTIVOS DE CÉLULAS ESTROMALES DERIVADOS DE GANGLIOS LINFÁTICOS

El estroma de los ganglios linfáticos está constituido por varios tipos celulares de origen endotelial y mesenquimal que proveen el microambiente adecuado para regular la entrada al ganglio, la proliferación, la supervivencia, y la función de las células del sistema inmune¹⁴⁵. Las células estromales de los ganglios linfáticos son las encargadas de la secreción de una amplia variedad de quemoquinas, citoquinas, factores de crecimiento y la producción de moléculas de adhesión y ECM^{148,149}. La producción de la ECM es llevada a cabo principalmente por los FRs. Mediante la síntesis y entrelazado de varios componentes de la ECM, los FRs son los responsables de la construcción de una complicada red reticular involucrada en la entrada, migración e interacción de los linfocitos en los ganglios linfoides^{146,153,184,261}.

Para contar con una herramienta útil para investigar el efecto del microambiente de los órganos linfoides en la regulación de la población Treg, nos propusimos como objetivo desarrollar cultivos de células estromales de ganglios linfáticos. Dado que los ganglios son más ricos en células T que el bazo, consideramos que el establecimiento y la caracterización de estos cultivos resulta importante para el análisis de las células T. Además, considerando que las células estromales son las encargadas de la producción de la ECM en los ganglios linfáticos, y que los ratones CTSL^{nkt/nkt} muestran un aumento en diversos componentes de la ECM en ese órgano, establecimos cultivos de células estromales derivados de ganglios linfáticos de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt}.

2.1- Establecimiento y caracterización fenotípica de cultivos primarios de células estromales derivadas de ganglios linfáticos (cultivos de CEG)

El establecimiento de cultivos de células estromales de ganglios linfáticos normales resulta extremadamente difícil¹⁸². Por tal motivo, su obtención se realiza habitualmente a partir de ganglios que presentan metástasis tumorales²⁶².

Durante el desarrollo de la presente Tesis se ensayaron distintos protocolos para el establecimiento de cultivos de células estromales con resultados poco satisfactorios, siendo particularmente compleja la obtención de cultivos derivados de ganglios linfáticos wt. Finalmente, logramos establecer cultivos primarios de células estromales de ganglios linfáticos derivados de ratones wt (cultivos de CEG wt) y mutantes para CTSL (cultivos de CEG CTSL^{nkt/nkt}) (**figura 14**). Ambos cultivos resultaron morfológicamente heterogéneos, y mostraron importantes diferencias tanto en su morfología como en su tasa de crecimiento. Los cultivos de CEG CTSL^{nkt/nkt} resultaron de fácil obtención, alcanzando la confluencia a los 15-20 días posteriores a su establecimiento. Por su parte, la obtención de cultivos confluentes de CEG wt demoró más del doble de tiempo (40-50 días).

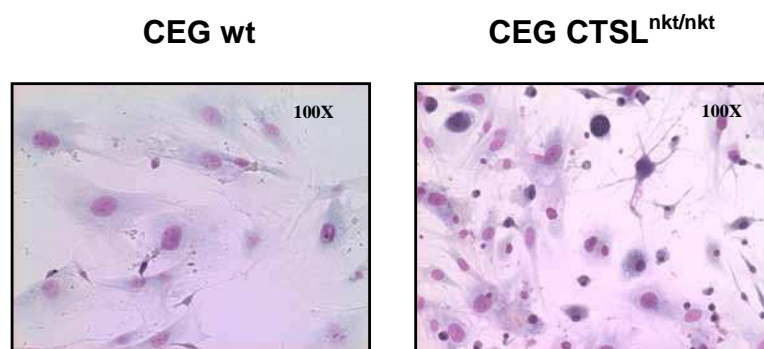


Figura 14: Se muestran imágenes de los cultivos primarios de CEG derivados de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt}. Las células fueron teñidas con tinción 15 sobre la placa de cultivo y visualizadas por microscopia de inversión.

La tipificación de los cultivos de CEG se llevó a cabo analizando la expresión de distintos marcadores de superficie mediante citometría de flujo. Como se indica en la **tabla 1**, el análisis por FACS resultó negativo para los marcadores linfoides CD4, CD8 y B220, para el marcador de linaje endotelial CD31 (PECAM-1), para CD86 (B7-2) y para el marcador de células madre hematopoyéticas, Sca-1. Se observó una alta proporción de células positivas para el marcador de linaje dendrítico, CD11c, para el marcador linaje macrofágico, CD11b (Mac-1), y para el marcador de linaje hematopoyético, CD45. Asimismo, se observó un bajo nivel de expresión para las

moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II), y un alto nivel de expresión para el receptor de ácido hialurónico, CD44 (**figura 15**).

Tabla 1: Tipificación de cultivos primarios de CEG derivados de ratones normales y *CTSL^{nkt/nkt}*.

Marcador	CD4	CD8	B220	CD31	CD11c	CD11b	CD45	CD44	Sca-1	CMHII	CD86
CEG											
CEG wt	+/-	-	-	-	++	++	+++	+++	+/-	+	-
CEG <i>CTSL^{nkt/nkt}</i>	+/-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+/-	+	-

Se obtuvo una suspensión celular a partir de cultivos primarios de CEG tal como se describe en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas con distintos anticuerpos y analizadas por FACS. Los símbolos indican: ausencia de expresión (-), 5-20% células positivas o bajo nivel de expresión (+), 20-60% células positivas o nivel de expresión intermedio (++), > 60% células positivas o alto nivel de expresión (+++).

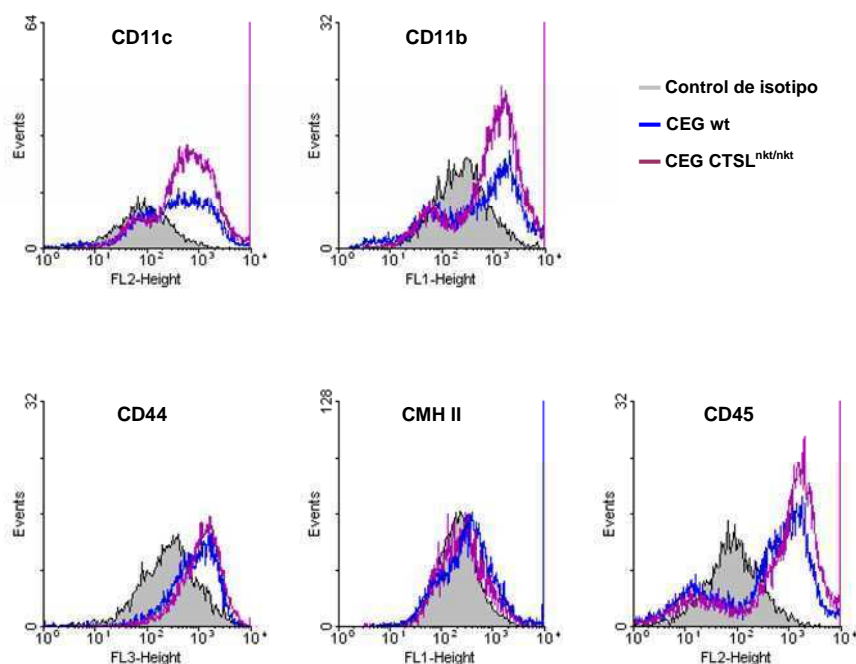


Figura 15: Análisis de marcadores de superficie en CEG wt y mutantes para *CTSL*. Se obtuvo una suspensión celular a partir de cultivos de CEG wt o mutantes para *CTSL* y se analizó por FACS la expresión de distintos marcadores de superficie. Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD11c, CD11b, CD44, CMH II y CD45.

Estos resultados indican la obtención de cultivos de CEG heterogéneos, con un predominio de células de origen hematopoyético, y presencia de diferentes linajes celulares, incluyendo macrófagos y CDs. Sugieren además, una mayor proporción de células de linaje macrófágico/dendrítico en los cultivos derivados de ganglios linfáticos mutantes para CTSL.

En concordancia con la bibliografía¹⁸² consideraremos a esta monocapa heterogénea de células adherentes como representante del estroma primario de los ganglios linfáticos.

2.2- Establecimiento y caracterización fenotípica de cultivos a largo plazo de células estromales derivadas de ganglios linfáticos (cultivos de LCEG)

Dadas la heterogeneidad y la baja tasa de crecimiento de los cultivos primarios de CEG, como así también, la gran dificultad para la sincronización de los cultivos mutantes para CTSL y wt, se decidió establecer líneas celulares estromales por cultivo a largo plazo¹⁸⁴. Para ello, células adherentes provenientes de ganglios de ratones normales y CTSL^{nkt/nkt} fueron mantenidas en cultivo por pasajes sucesivos durante varios meses. A medida que se fue avanzando en los pasajes, los cultivos se fueron enriqueciendo en células de morfología fibroblástica de rápida tasa de crecimiento. Dichas células, alcanzaban rápidamente la confluencia, pero una vez lograda, perdían inmediatamente la capacidad de adhesión a la placa de cultivo impidiendo llevar a cabo los ensayos planificados. Por este motivo, decidimos desarrollar los distintos ensayos con los pasajes n° 9-12, los cuales denominaremos de aquí en más: cultivos de LCEG. Estos pasajes celulares o cultivos de LCEG resultaron mucho más homogéneos que los cultivos primarios, mostrando un predominio de células de morfología fibroblástica tanto en los cultivos derivados de ganglios mutantes para CTSL como en los wt (**figura 16**). Además, tanto los cultivos mutantes para CTSL como los wt presentaron buena tasa de crecimiento, permitiendo una adecuada sincronización entre ambos cultivos.

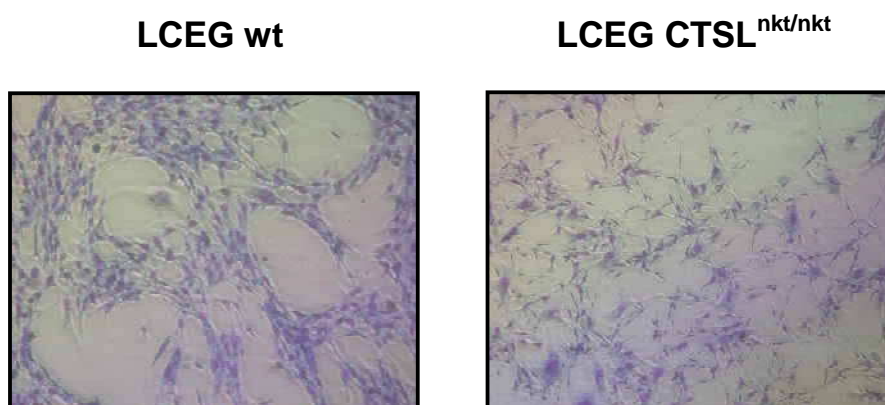


Figura 16: Se muestran imágenes de cultivos de LCEG (pasaje n°11). Las células fueron teñidas con tinción 15 sobre la placa de cultivo y visualizadas por microscopia de inversión.

Para llevar a cabo la caracterización fenotípica de los cultivos de LCEG se realizaron ensayos de citometría de flujo y RT-PCR semicuantitativa.

Como se muestra en la **tabla 2**, el análisis por FACS de marcadores de superficie resultó negativo para CD11c, CD11b, CD31, CD34, CD45 y CMH II, indicando la ausencia de CDs, macrófagos y células de linaje endotelial. Al mismo tiempo, se detectaron altos niveles de expresión para CMH I y para los marcadores CD40 y CD44, y niveles de expresión de Sca-1 bajos a intermedios. Además, se detectó expresión del marcador de FRs, gp38 (**figura 17**).

Tabla 2: Tipificación de cultivos de LCEG derivados de ratones wt y mutantes para CTSL.

Marcador	CD11b	CD11c	CD31	CD34	CD45	CMH II	CMH I	CD44	CD40	Sca-1	gp38
CEG											
CEG wt	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+
CEG CTSL ^{nkt/nkt}	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	++

Se obtuvo una suspensión celular a partir de cultivos de LCEG tal como se describe en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas con distintos anticuerpos y analizadas por FACS. Los símbolos indican: ausencia de expresión (-), bajo nivel de expresión (+), nivel de expresión intermedio (++), alto nivel de expresión (+++).

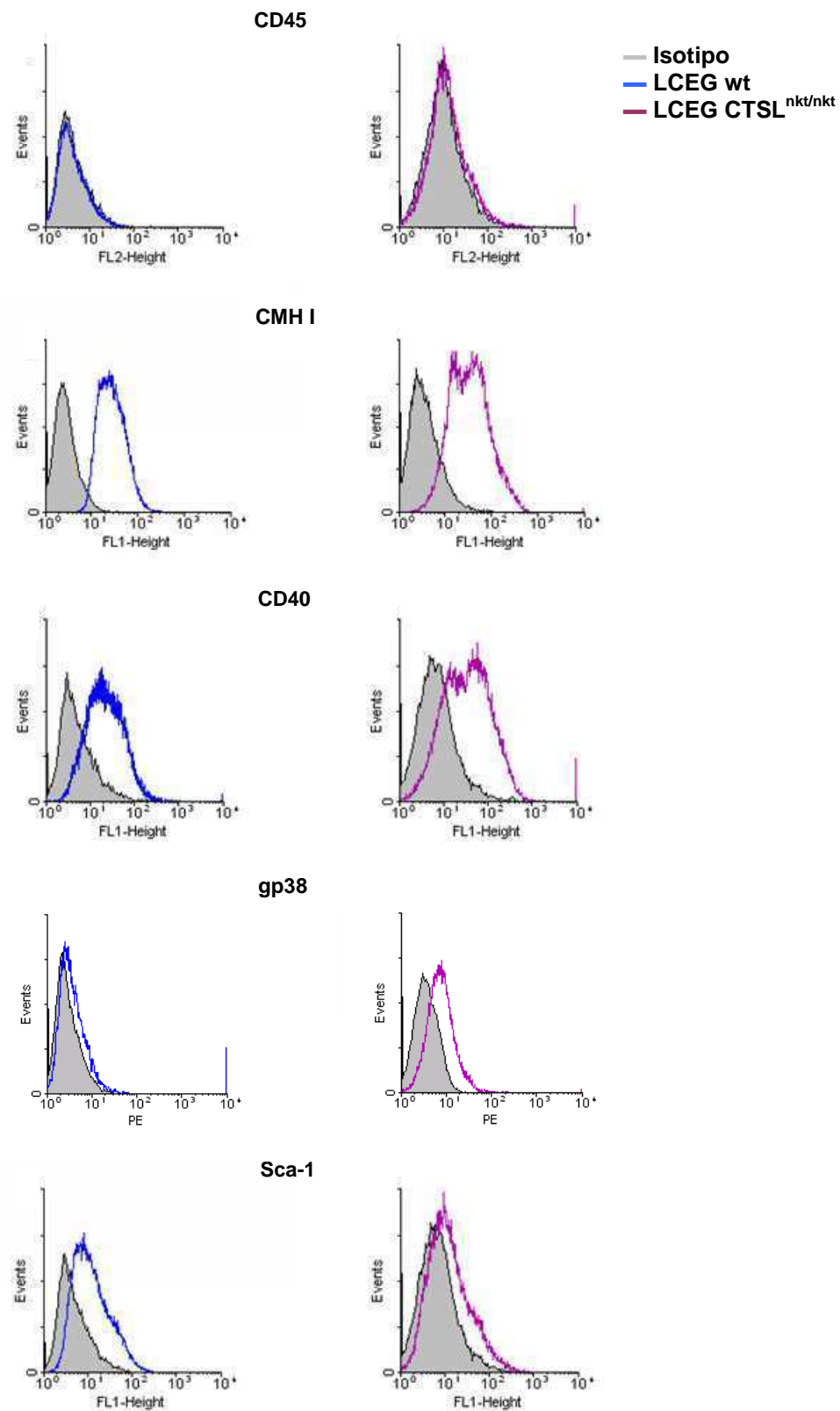


Figura 17: Análisis de marcadores de superficie en LCEG wt y mutantes para CTSL. Se analizó por FACS la expresión de distintos marcadores de superficie en LCEG wt y mutantes para CTSL. Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD45, CMH I, CD40, gp38 y Sca-1.

En coherencia con la observación morfológica, el análisis por FACS indicó la obtención de cultivos celulares relativamente homogéneos, con ausencia de células de linaje hematopoyético (CD45-) y presencia de uno de los principales tipos celulares estromales involucrados en la producción de ECM, los FRs (CD45-, gp38+, CD31-).

Cabe mencionar además, que los cultivos derivados de ratones CTSL^{nkt/nkt} presentaron un mayor nivel de expresión para el marcador gp38 y un menor nivel de expresión de Sca-1 respecto de los cultivos de LCEG derivados de ratones normales.

Se evaluó además por RT-PCR la expresión de genes relacionados con las células estromales, como así también de TGF- β , dado su importante rol en la inducción de células Treg periféricas. Para ello, se extrajo RNA de los cultivos de LCEG y se analizó mediante RT-PCR el perfil de expresión génica. Se detectó expresión de mRNA para todas las proteínas ensayadas, a saber: las citoquinas IL-6 e IL-7, las proteínas de la ECM, fibronectina y colágeno I, las quemoquinas CCL21 y CXCL13 (BLC), esta última sintetizada por CDFs, el marcador de FRs, gp38/podoplanina, y el TGF- β (**figura 18**).

Los resultados obtenidos mostraron una tendencia hacia mayores niveles de expresión de mRNA para fibronectina, TGF- β e IL-6 en los cultivos derivados de ganglios mutantes para CTSL (**figura 18**). Por otra parte, la detección de mRNA para CXCL13, sugiere la presencia de CDFs.

En base a la detección de mRNA para TGF- β en los cultivos de LCEG, y al incremento en su nivel de expresión en las células estromales derivadas de ratones CTSL^{nkt/nkt}, se cuantificaron por la técnica de ELISA los niveles basales de TGF- β 1 en los cultivos de LCEG obtenidos de ratones normales y mutantes para CTSL. La detección por ELISA de TGF- β 1 (**figura 19**) ratificó los resultados obtenidos por RT-PCR semicuantitativa, mostrando una mayor expresión basal de TGF- β 1 en las células estromales derivadas de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt}.

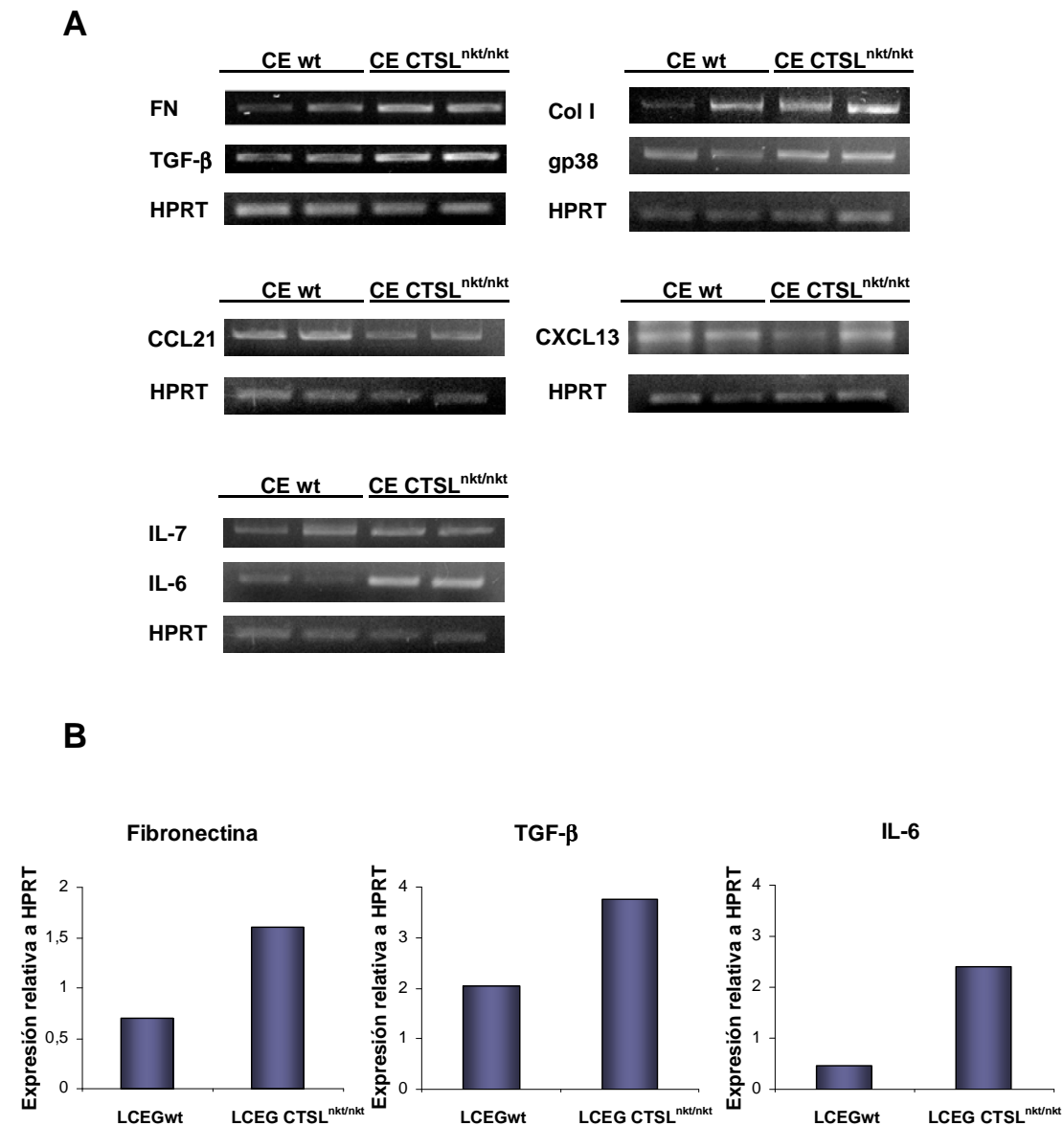


Figura 18: Se extrajo RNA del pasaje n° 11 de LCEG wt y mutantes para CTSL. Se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando primers específicos para medir los niveles de expresión de las proteínas indicadas. (A) Se muestra un ciclo de amplificación representativo. (B) Las bandas fueron cuantificadas con el programa Scion image y los datos relativizados a la expresión de HPRT. Se grafica la expresión relativa de fibronectina, TGF-β e IL-6 con respecto a la expresión de HPRT de la misma muestra. El experimento se realizó tres veces con resultados similares. FN: fibronectina; Col I: colágeno I.

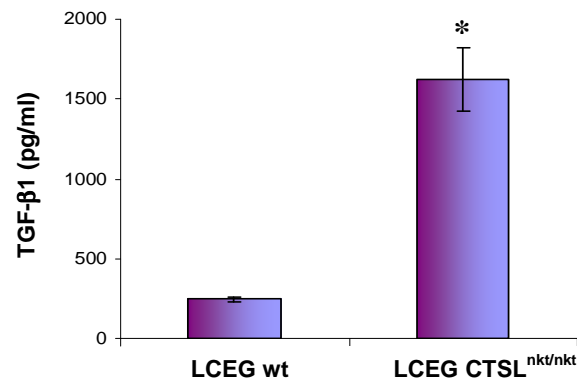


Figura 19: Expresión de TGF-β1 por cultivos de LCEG. Se colectó sobrenadante de 48 hs de cultivos de LCEG (pasaje n°10) mantenidos en ausencia de SFB. La producción de TGF-β1 se midió por ELISA. Los datos indican la media \pm SD (n=3); $p < 0,05$. Se muestran resultados representativos de un ensayo de tres independientes.

En conjunto, estos resultados indican la obtención de cultivos de estroma de buena tasa de crecimiento y morfología fibroblástica, con ausencia de células de linaje hematopoyético, presencia de células de origen mesenquimal como FRs y CDFs, y capacidad para sintetizar, entre otras moléculas, TGF-β1.

RESUMEN DEL CAPÍTULO 2

1. Establecimos y caracterizamos cultivos primarios de células estromales derivados de ganglios linfáticos de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt}. Tanto los cultivos de CEG wt como los mutantes para CTSL resultaron morfológicamente heterogéneos. El análisis por FACS de marcadores de superficie indicó un predominio de células de linaje hematopoyético, con presencia de células de linaje macrofágico y dendrítico. Asimismo, la proporción de células de linaje macrofágico/dendrítico resultó mayor en los cultivos derivados de ratones CTSL^{nkt/nkt}.
2. A partir de los cultivos primarios de CEG, establecimos cultivos de LCEG. Estos cultivos resultaron más homogéneos, mostraron ausencia de células de linaje hematopoyético, presencia de FRs y CDFs, y capacidad para sintetizar, entre otras moléculas, TGF- β . La síntesis de TGF- β resultó notablemente incrementada en los cultivos de LCEG derivados de ratones mutantes para CTSL.

CAPÍTULO 3. INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T CD4+ REGULATORIAS: ROL DE LA CTSL

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} presentan adenomegalia y alteraciones en las poblaciones linfoides, observándose un aumento en el porcentaje y número absoluto de células B y T CD8+, y una disminución en la frecuencia de células T CD4+. No obstante, el número absoluto de células T CD4+ es normal. Se determinó además que la CTSL desempeña un rol importante en la regulación de la composición de la ECM de los órganos linfoides centrales y periféricos, y que a través de esta actividad sobre la ECM interviene en la regulación del número y la composición de las poblaciones linfoides periféricas²⁵⁵. En este sentido, se demostró que los ratones CTSL^{nkt/nkt} presentan alteraciones en la expresión de las glicoproteínas de la ECM en el timo y en los ganglios linfáticos, observándose niveles de laminina, fibronectina y colágenos tipo I y IV disminuidos en el timo y aumentados en los ganglios linfáticos²⁵⁵.

En el Capítulo 1 demostramos que en ausencia de actividad de CTSL los niveles de proliferación basal de las células T CD4+ regulatorias y convencionales están aumentados, mientras que la proliferación de los linfocitos T CD8+ y de las células B no está modificada. En base a estos resultados decidimos investigar si la falta de actividad de CTSL en el microambiente de los ganglios linfáticos influye en la proliferación de las subpoblaciones CD4+ Treg y T convencional.

3.1.- Influencia de las células estromales de los ganglios linfáticos sobre la proliferación de células CD4+ Treg y T convencionales

Con el propósito de investigar si las células estromales afectan la proliferación de los linfocitos CD4+ Treg y T convencionales, y si la falta de actividad de CTSL en el estroma influye en la proliferación de dichas poblaciones linfoides, evaluamos el efecto de los cultivos de CEG wt y mutantes para CTSL sobre la proliferación *in vitro* de células Treg y T convencionales.

Se sabe que las células T naive cultivadas *in vitro* en ausencia de estimulación no proliferan y mueren rápidamente por apoptosis. Por este motivo, evaluamos en primer lugar, si la presencia de células estromales afectaba el ciclo celular y/o el estado de activación de células T CD4⁺ en cultivo. Para ello, incubamos linfocitos provenientes de ganglios linfáticos de ratones normales BALB/c con CEG wt y CTSL^{nkt/nkt}, y analizamos a distintos días de cocultivo (días 0, 1, 2, 3 y 7) en qué fase del ciclo celular se encontraban las células CD4⁺ mediante marcación con yoduro de propidio (IP) y análisis por FACS. El IP es un agente intercalante de ácidos nucleicos utilizado para evaluar viabilidad y ciclo celular por citometría de flujo.

El análisis de la marcación con IP mostró que, en todos los días analizados, alrededor del 99% de los linfocitos CD4⁺ se encontraban en la fase G0/G1 del ciclo celular, hallándose sólo un mínimo porcentaje en la fase S de síntesis de DNA (datos no mostrados).

Para investigar si la presencia de las CEG inducía cambios en el estado de activación de las células CD4⁺, examinamos la expresión de los marcadores de superficie CD62L y CD44 en células CD4⁺ provenientes de ratones wt frescas o cocultivadas con CEG durante 48 hs. Como se muestra en la **figura 20 A**, la población CD4⁺ conservó el fenotipo naive CD62L^{hi}CD44^{lo} después de 48 hs de cocultivo con CEG wt o mutantes para CTSL. Se evaluó además la expresión del marcador temprano de activación linfocitaria, CD69, resultando prácticamente la totalidad de las células CD4⁺ negativas para este marcador (**figura 20 B**). De este modo, se comprobó que las células CD4⁺ cocultivadas con células estromales mantienen un fenotipo naive.

Cabe mencionar, que al igual que la células CD4⁺ cocultivadas con CEG, aproximadamente el 99% de los linfocitos CD4⁺ incubados con LCEG se encontraron en la fase G0/G1 del ciclo celular, y no mostraron alteraciones en su estado de activación (datos no mostrados).

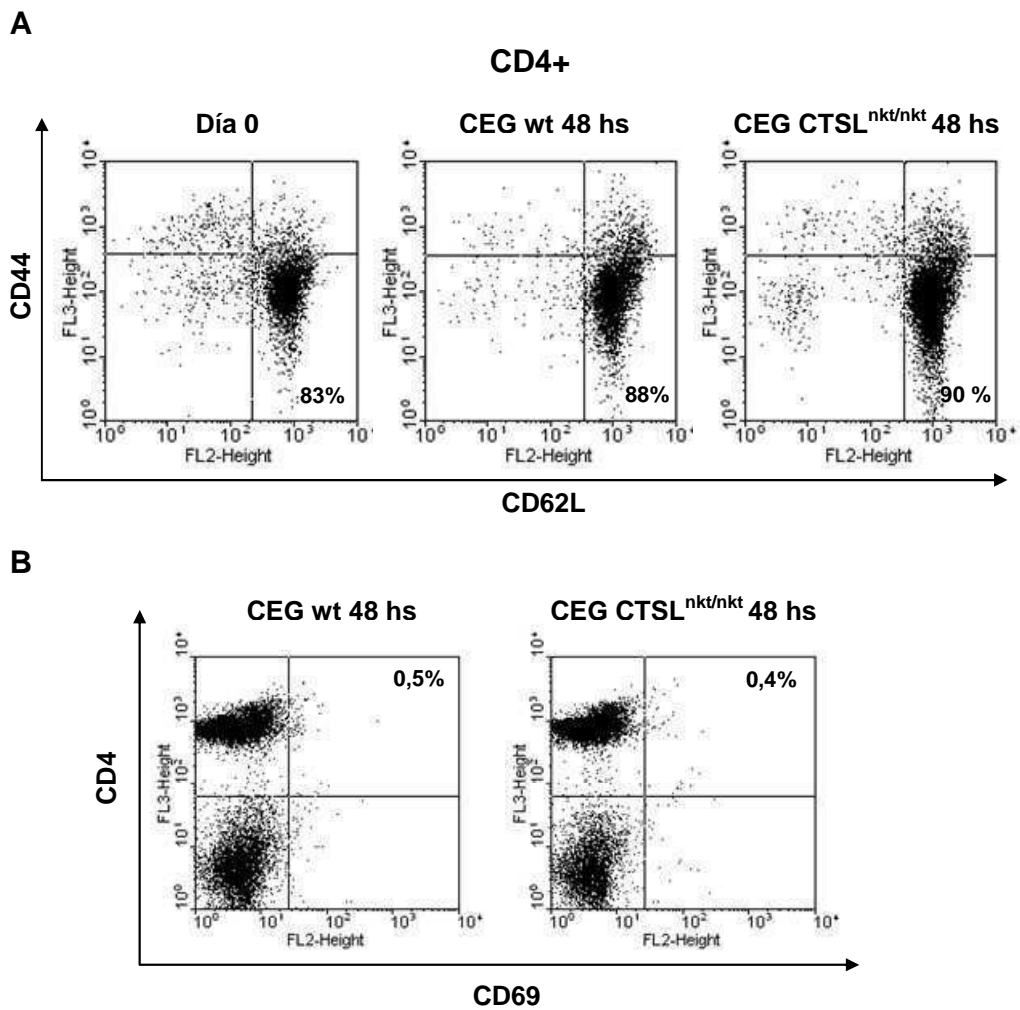


Figura 20. Estado de activación de células CD4+ cocultivadas con estroma. Células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c frescas o cultivadas (2.10^6 células) por 48 hs en presencia de una monocapa de CEG wt o CTSL^{nkt/nkt} fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD62L, anti-CD44 y anti-CD69 conjugados a distintos fluorocromos y analizadas por FACS. Se muestran dot plots representativos de la expresión de CD62L y CD44 (A) y de CD69 (B). Se realizaron tres experimentos con resultados similares.

Estos resultados indican que el cocultivo de células linfoides con células estromales derivadas de ganglios linfáticos no altera el estado de activación ni induce proliferación en la población T CD4+.

Se llevaron a cabo entonces ensayos de cultivo mixto linfocitario en presencia de CEG con el objetivo de analizar el efecto de las CEG en la proliferación de las células CD4+. Para ello, se utilizaron como células respondedoras linfocitos CD4+ purificados por MACS o linfocitos totales de ganglios linfáticos provenientes de ratones BALB/c (marcados con CFSE), y como células estimuladoras, esplenocitos alogeneicos (tratados previamente con mitomicina C para inhibir su proliferación). Los cultivos mixtos linfocitarios se desarrollaron en presencia o ausencia de una monocapa de CEG wt o mutantes para CTSL. Al cuarto día de cocultivo, se evaluó en la población respondedora la proliferación de las subpoblaciones CD4+Foxp3+ y CD4+Foxp3- por dilución de la marca del CFSE.

Como se muestra en la **figura 21**, detectamos proliferación de células CD4+Foxp3+ y CD4+Foxp3- tanto en presencia como en ausencia de CEG, resultando mayor, en ambas condiciones, la proliferación de la subpoblación CD4+Foxp3+. Se observó que la presencia de CEG incrementa de modo significativo la proliferación de la subpoblación CD4+Foxp3+, no observándose diferencias significativas en los cocultivos desarrollados con estroma mutante y wt (CEG wt: $45 \pm 3\%$; CEG CTSL^{nkt/nkt}: $40 \pm 7\%$; sin CEG: $29 \pm 2\%$) (**figura 21 A**). Por su parte, la proliferación de la subpoblación CD4+Foxp3- no resultó alterada por la presencia de CEG (**figura 21 B**). Asimismo, en ausencia de estimulación, no se detectó proliferación ni de células CD4+Foxp3+ ni de CD4+Foxp3-, independientemente de la presencia o no de CEG (datos no mostrados).

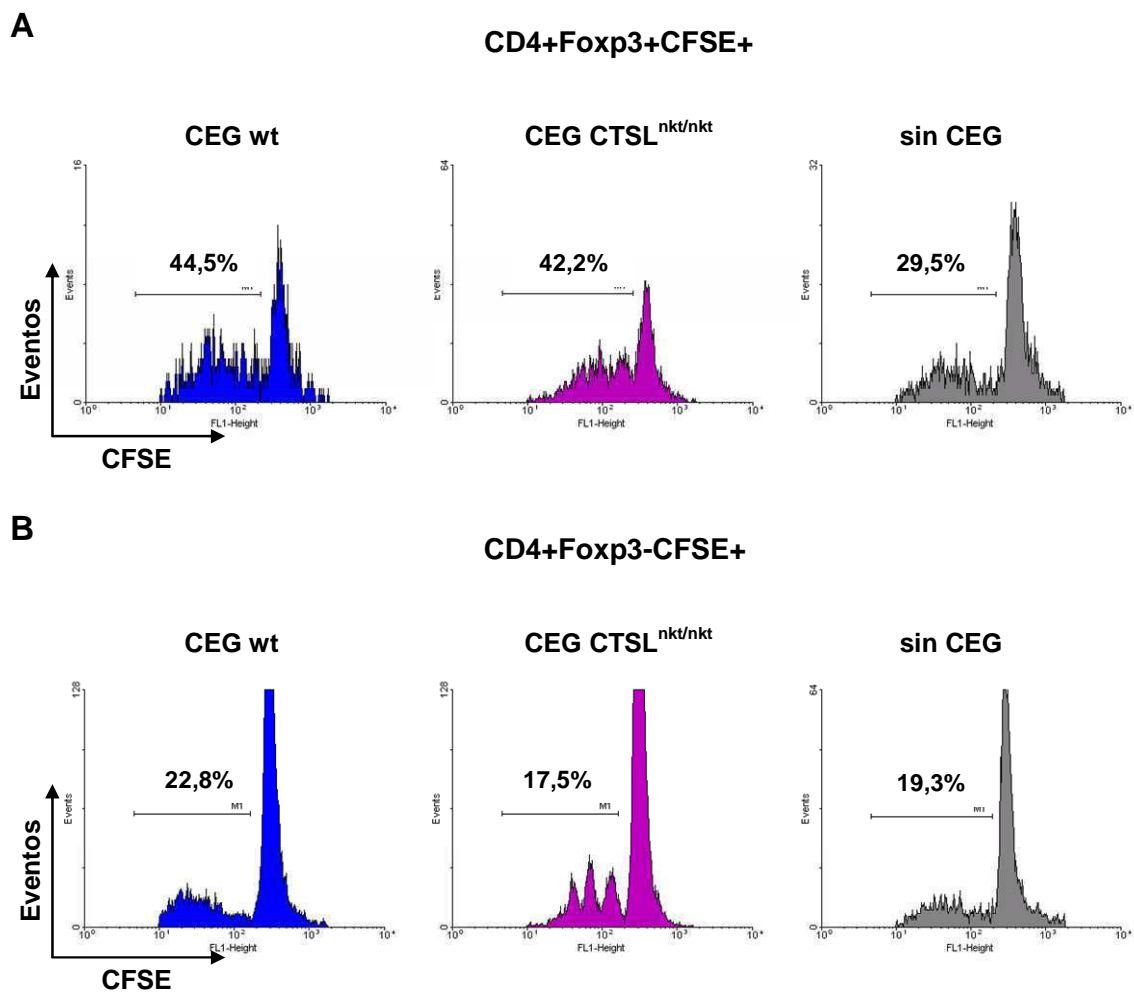


Figura 21: Se realizaron cultivos mixtos linfocitarios (1.10^6 células presentadoras AKR/J + 1.10^6 células respondedoras BALB/c marcadas con CFSE) en presencia o ausencia de una monocapa confluyente de CEG wt o CTSL^{nkt/nkt}. La proliferación se evaluó por FACS como la pérdida de intensidad del colorante CFSE en las subpoblaciones CD4+Foxp3+ (A) y CD4+Foxp3- (B). Se muestran histogramas representativos de un experimento de un total de 3 independientes con resultados similares.

Para evaluar si los cultivos de LCEG conservaban la capacidad de los cultivos primarios de incrementar la proliferación de la población Treg en ensayos de cultivo mixto alogeneico, se llevaron a cabo ensayos como los descritos anteriormente pero utilizando cultivos de LCEG en lugar de cultivos primarios.

Sin embargo, tal como se ilustra en la **figura 22**, las LCEG fueron incapaces de incrementar la proliferación de las células CD4+Foxp3+. Más aún, por motivos que restan ser determinados, las LCEG carentes de actividad de CTSL inhibieron la

proliferación de las células CD4+Foxp3+ (**figura 22 A**). En lo que respecta a la proliferación de la población CD4+Foxp3-, la misma permaneció inalterada por la presencia de LCEG, tal como ocurrió en presencia de cultivos de CEG (**figura 22 B**).

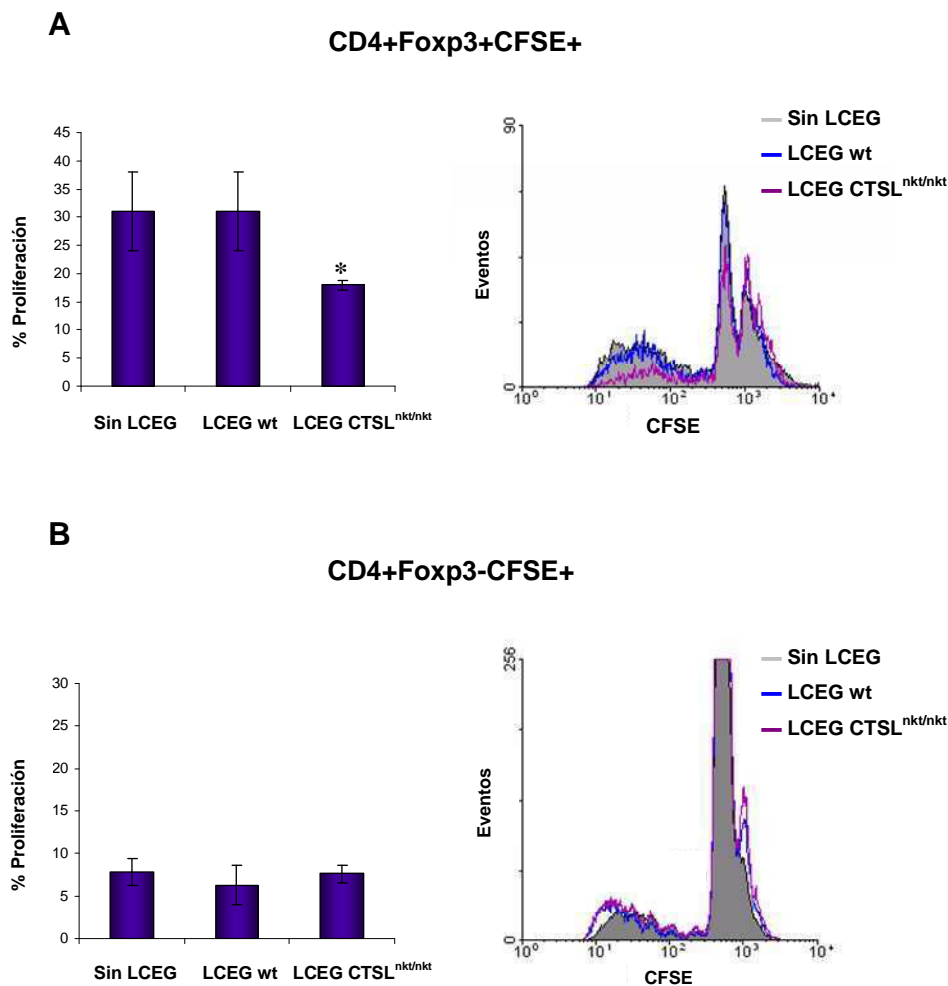


Figura 22: Se llevaron a cabo ensayos de cultivo mixto linfocitario (1.10^6 células presentadoras AKR/J + 1.10^6 células respondedoras BALB/c marcadas con CFSE) en presencia o ausencia de una monocapa de LCEG wt o mutantes para CTSL en confluencia. Se analizó por FACS la proliferación como la pérdida de intensidad del colorante CFSE en las subpoblaciones respondedoras CD4+Foxp3+ (A) y CD4+Foxp3- (B). Se muestran histogramas representativos. Se grafica el promedio del porcentaje de proliferación \pm SD de un experimento representativo de tres. * $p < 0,05$.

Paralelamente, analizamos el porcentaje de células Foxp3 dentro de la población CD4+. Como se muestra en la **figura 23**, no se observaron diferencias en el porcentaje

de células Fcpx3⁺ dentro de la población CD4⁺ cocultivada con CEG wt o mutantes para CTSL. Paradójicamente, a pesar del incremento en la proliferación de las células Fcpx3⁺ en presencia de CEG, el porcentaje de células Fcpx3⁺ dentro de las células CD4⁺ cultivadas en ausencia de CEG duplicó el observado cuando los cultivos se desarrollaron en su presencia (**figura 23**). Resultados similares fueron obtenidos en los cultivos mixtos linfocitarios llevados a cabo en presencia o ausencia de LCEG (**figura 24**).

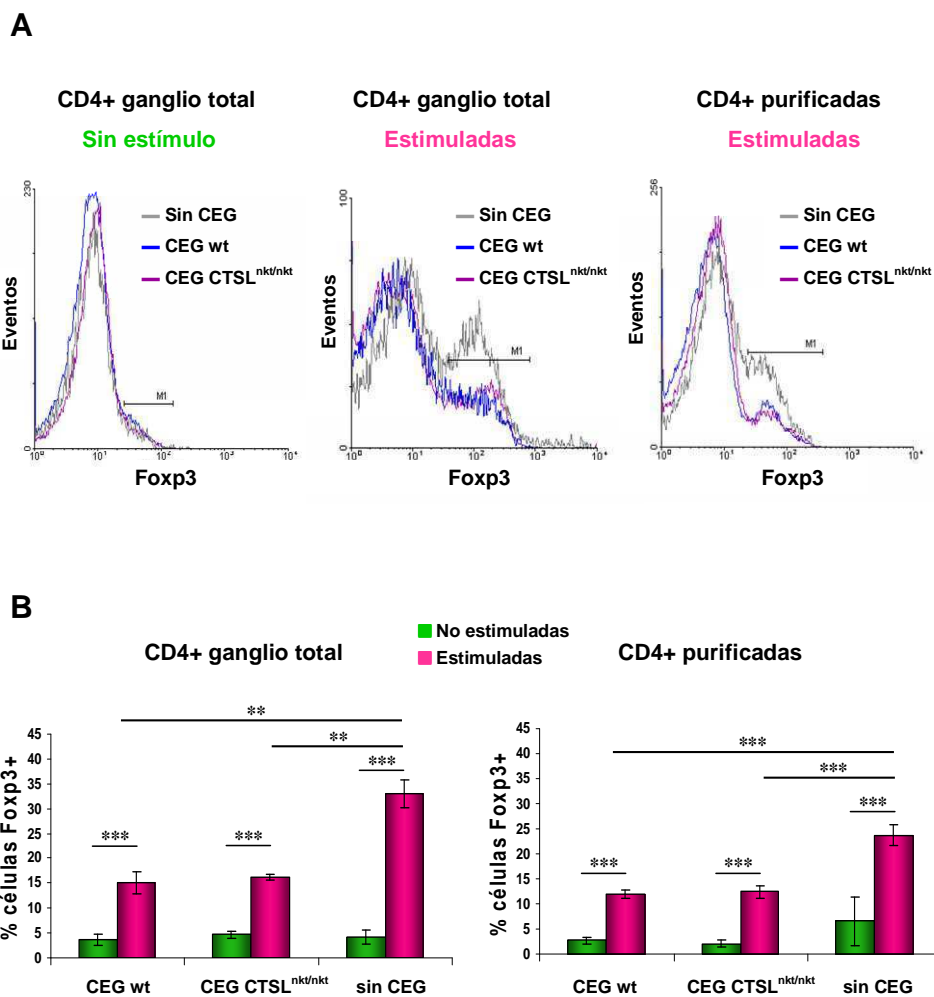


Figura 23: Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones normales o células wt CD4⁺ purificadas por MACS fueron cultivadas con o sin CEG confluentes en ausencia o presencia de estimulación alogeneica (1.10^6 células presentadoras AKR/J + 1.10^6 células respondedoras BALB/c marcadas con CFSE). Luego de 4 días de cocultivo se analizó por FACS el porcentaje de células Fcpx3⁺ dentro de la población CD4⁺ respondedora. (A) Se muestran histogramas representativos. (B) Los valores corresponden al promedio \pm SD (n=3) de un experimento representativo de tres independientes. **p<0,01; ***p<0,001.

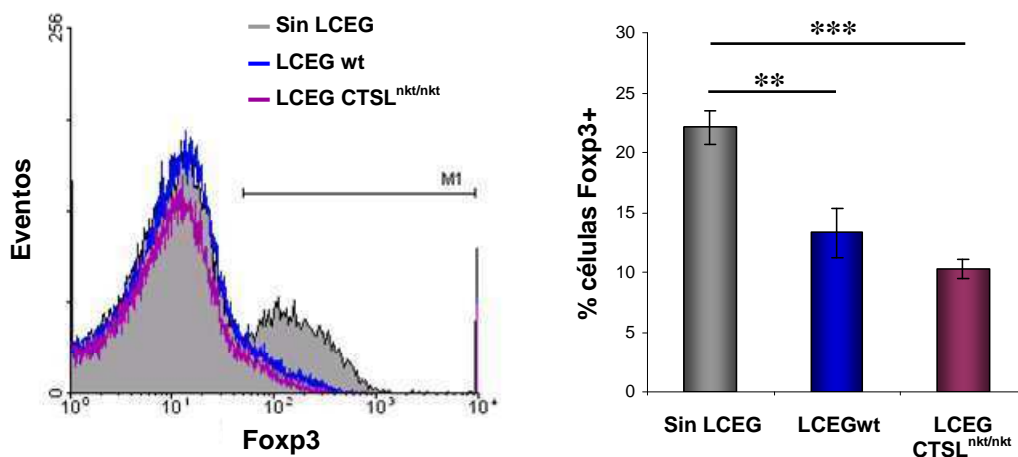


Figura 24: Se realizaron ensayos de cultivo mixto alogeneico en presencia o ausencia de LCEG wt y mutantes para CTSL confluentes como se describe en Materiales y Métodos (1.10^6 células presentadoras AKR/J + 1.10^6 células respondedoras BALB/c marcadas con CFSE). Al cuarto día de cultivo se analizó por FACS el porcentaje de células Foxp3+ dentro de la población CD4+ respondedora. Se muestra un histograma representativo. Los gráficos de barras indican el promedio \pm SD de un experimento de tres independientes con resultados similares (n=3); **p<0,01; ***p<0,001.

Estos resultados sugieren que en estas condiciones experimentales, existiría una diferencia en la sobrevivencia de las células Foxp3+ y Foxp3-. El análisis de los perfiles de tamaño vs. complejidad indicó que en presencia de estroma el porcentaje de células que mostraron un bajo perfil de tamaño vs. complejidad fue escaso (**figura 25**). Postulamos entonces que el cultivo con el estroma incrementaría la viabilidad de las células en cocultivo, y conferiría a las células CD4+Foxp3- una mayor sobrevivencia respecto de las CD4+Foxp3+. De esta manera un aumento en la proporción de células Foxp3- viables dentro de la población CD4+ en presencia de células estromales, se observaría como una disminución en la frecuencia de las células Foxp3+. Como se describirá en el Capítulo 4, hemos observado que en ausencia de estimulación el estroma de los ganglios linfoides incrementa la viabilidad en cultivo de las células T CD4+, ejerciendo un mayor efecto sobre la viabilidad de las células CD4+CD25- que sobre las CD4+CD25+.

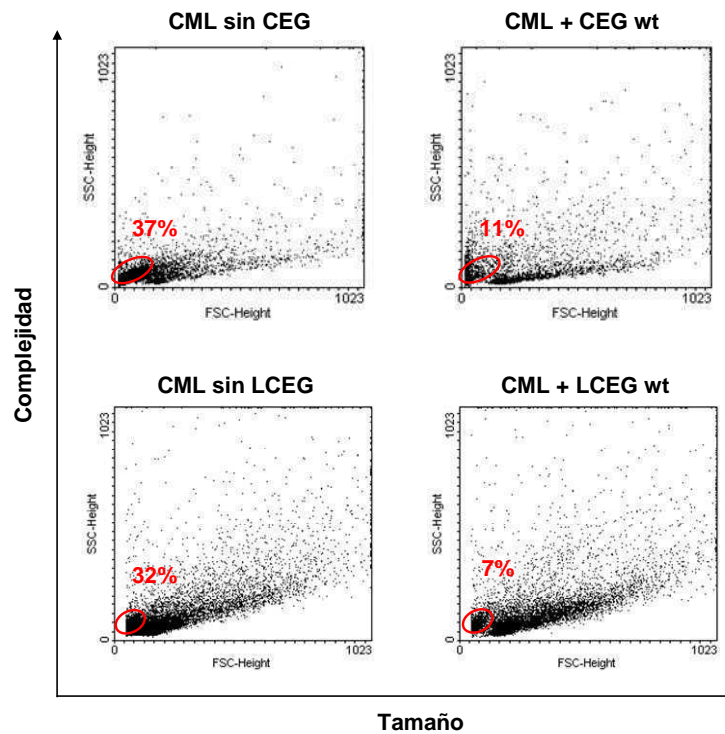


Figura 25: Se muestran perfiles representativos de tamaño vs complejidad de cultivos mixtos linfocitarios (1.10^6 células presentadoras AKR/J + 1.10^6 células respondedoras BALB/c marcadas con CFSE) realizados en presencia o ausencia de células estromales. Se indica el porcentaje de células linfocitarias que muestran un bajo perfil de tamaño vs. complejidad.

En conjunto estos resultados indican que la presencia de CEG en ensayos de cultivo mixto linfocitario incrementa la proliferación de las células CD4+Foxp3+, mientras que no altera la proliferación de las células T convencionales. Asimismo, el o los tipos celulares estromales responsables del aumento en la proliferación de las células CD4+Foxp3+ no estarían presentes en los cultivos de LCEG. Estos resultados sugieren que los FRs y las CDFs no determinarían *per se* el aumento en la proliferación de las células Treg. Por otro lado, en las condiciones experimentales empleadas, no detectamos efectos de la ausencia de actividad de CTSL sobre el aumento de la proliferación de las células Treg mediado por CEG.

Dado que a pesar del aumento en el nivel de proliferación de las células Foxp3+ en presencia de CEG el porcentaje de células Foxp3+ disminuyó, hipotetizamos que las células estromales aumentarían diferencialmente la viabilidad de las células Foxp3-.

3.2- Influencia de la mutación *nkt* en las células linfoides y en su microambiente sobre la proliferación de las poblaciones Treg y T convencional

Por último, investigamos mediante ensayos *in vivo* si las alteraciones en la proliferación de las células CD4⁺ Treg y T convencionales estaban asociadas a la falta de actividad de CTSL en los linfocitos y/o en su entorno. Para ello, células de ganglio de ratones CTSL^{nkt/nkt} o wt fueron marcadas con CFSE e inoculadas en forma endovenosa en ratones normales y mutantes para CTSL. Al día 7 post-inoculación se obtuvieron los ganglios linfáticos y se analizó en primer lugar el porcentaje de proliferación de las células CD4⁺CFSE⁺. La **figura 26** muestra que tanto la proliferación de los linfocitos CD4⁺ provenientes de ratones wt como la de los derivados de ratones CTSL^{nkt/nkt} resultó mayor en el microambiente de los ganglios linfáticos mutantes para CTSL. Al mismo tiempo, tanto en los huéspedes wt como en los CTSL^{nkt/nkt}, los linfocitos CD4⁺ mutantes para CTSL mostraron un nivel de proliferación superior al de las células CD4⁺ wt (**figura 26**).

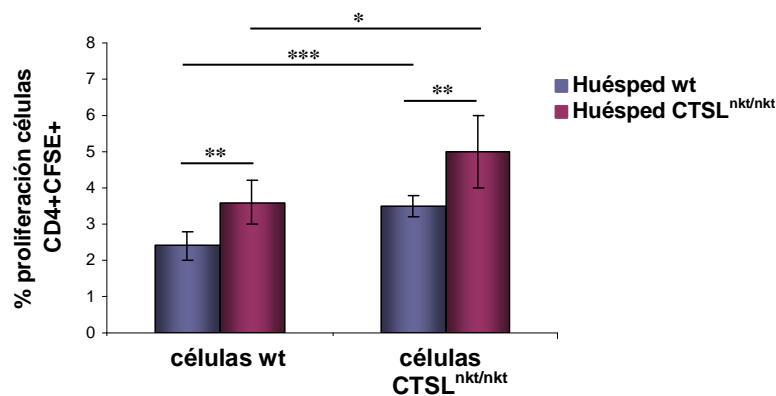


Figura 26: Linfocitos de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} y wt fueron marcados con CFSE e inoculados ($20 \cdot 10^6$ células) en huéspedes normales y mutantes para CTSL. Siete días después, los ratones fueron sacrificados, se obtuvieron células de ganglios linfáticos y se analizó por FACS el nivel de proliferación de la población CD4⁺CFSE⁺ mediante dilución de la marca del CFSE. Los datos representan la media \pm SD de dos ensayos independientes con resultados similares, n=6. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

Estos resultados sugieren que la ausencia de actividad de CTSL en los linfocitos afecta *per se* la proliferación de los linfocitos T CD4+ y que, la ausencia de CTSL funcional en el microambiente de los ganglios linfáticos también influencia la tasa de proliferación de las células T CD4+.

De la misma forma, se analizó en las células CD4+CFSE+, el nivel de proliferación de las subpoblaciones Foxp3- y Foxp3+ para determinar si la falta de actividad de CTSL en los linfocitos y/o en su entorno afectaban de manera diferencial sus respectivas tasas de proliferación.

La **figura 27** muestra que tanto en los huéspedes normales como en los CTSL^{nkt/nkt}, las células CD4+Foxp3- carentes de actividad para CTSL presentaron un nivel de proliferación superior al de las wt. También se observó una mayor proliferación de células CD4+Foxp3- normales y mutantes en los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt}.

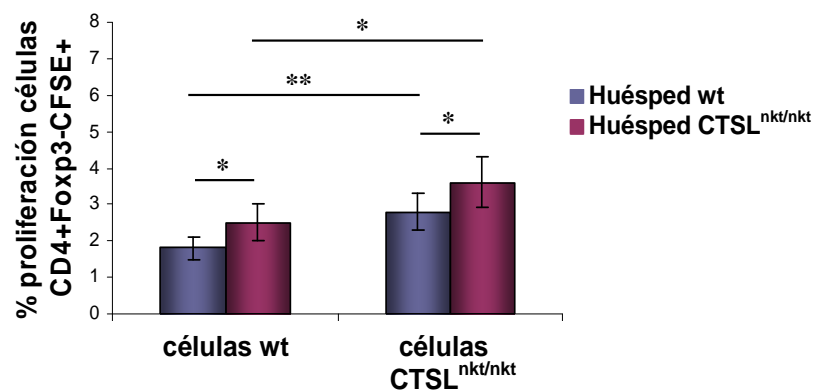


Figura 27: Se inocularon $20 \cdot 10^6$ células provenientes de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} o wt marcadas con CFSE en huéspedes wt y CTSL^{nkt/nkt}. Siete días después, los ratones fueron sacrificados, se obtuvieron células de ganglios linfáticos y se analizó por FACS la proliferación de las células CD4+Foxp3-CFSE+ mediante dilución de la marca del CFSE. Los datos representan la media \pm SD de dos ensayos independientes con resultados similares, n=6. *p<0,05; **p<0,01.

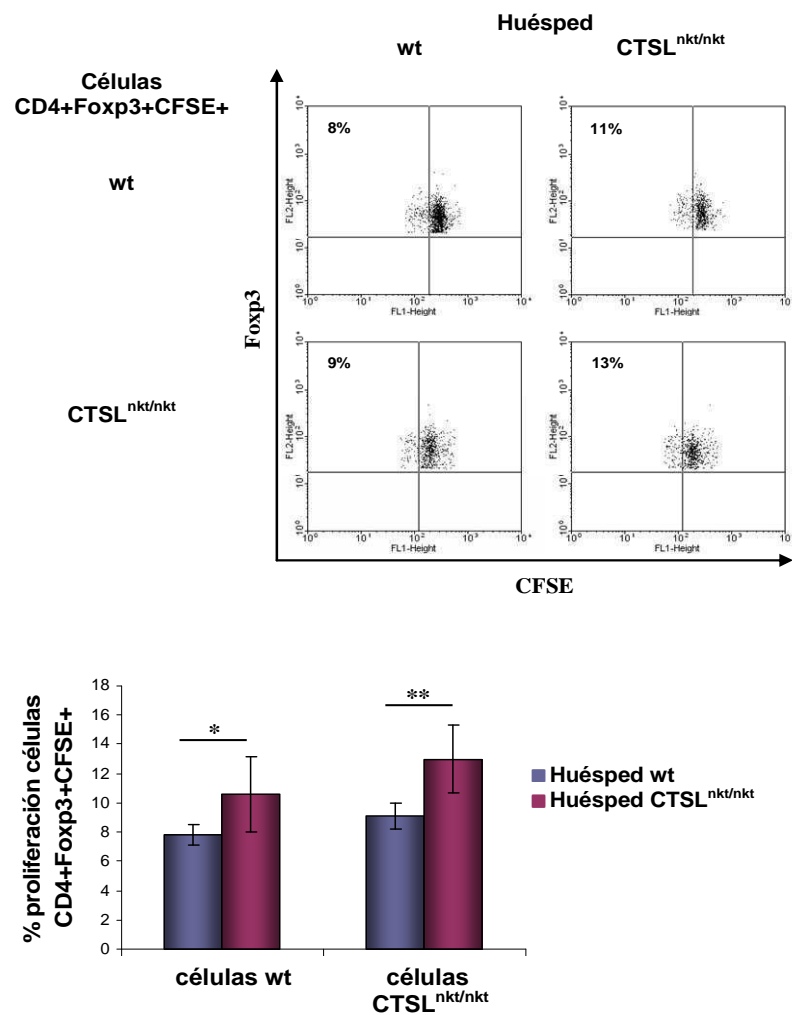


Figura 28: Se inocularon $20 \cdot 10^6$ células provenientes de ganglios linfáticos de ratones $CTSL^{nkt/nkt}$ o wt marcadas con CFSE en huéspedes wt y $CTSL^{nkt/nkt}$. Siete días después, se obtuvieron células de ganglios linfáticos y se analizó por FACS la proliferación de las células $CD4+Foxp3+CFSE+$ por dilución de la marca del CFSE. Se muestran dot plots de un experimento representativo. Los gráficos de barras representan la media \pm SD de dos ensayos independientes con resultados similares, $n=6$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Como puede observarse en la **figura 28**, tanto el nivel de proliferación de los linfocitos $CD4+Foxp3+$ mutantes para CTSL como el de los normales resultó mayor en los ganglios linfáticos de los ratones $CTSL^{nkt/nkt}$. Cuando se compararon los niveles de proliferación de las células mutantes para CTSL con las wt , aunque las diferencias no

fueron significativas, se observó una tendencia hacia mayores niveles de proliferación en las células Treg mutantes para CTSL en cada tipo de huésped analizado.

Cabe mencionar además, que en concordancia con los experimentos de incorporación de BrdU, el nivel de proliferación de las células Treg resultó significativamente mayor que el de las T convencionales.

En conjunto estos resultados sugieren que tanto la mutación *nkt* en los linfocitos como en el microambiente de los ganglios linfoides, aumentan el nivel de proliferación de las células CD4⁺Foxp3⁻. Sugieren además que la proliferación de la subpoblación Treg estaría influenciada por la ausencia de actividad CTSL en el entorno.

RESUMEN DEL CAPÍTULO 3

1. Mediante ensayos de estimulación alogeneica demostramos que las CEG incrementan la proliferación *in vitro* de las células Treg, mientras que no influyen la proliferación *in vitro* de su contraparte T convencional. En las condiciones experimentales ensayadas no se detectaron diferencias en el efecto de las CEG derivadas de ratones wt y CTSL^{nkt/nkt}. Paradójicamente, en ausencia de CEG se observa un aumento en el porcentaje de células Foxp3+. Hipotetizamos que el estroma tendría un efecto diferencial sobre la viabilidad de las células Foxp3+ y Foxp3-. Las LCEG no aumentaron la proliferación de las células Treg, sugiriendo que los FRs y las CDFs no determinarían *per se* el aumento en la proliferación de los linfocitos Treg. Las LCEG derivadas de ganglios de ratones mutantes disminuyeron la proliferación de las células Treg.
2. A través de ensayos *in vivo* de transferencia cruzada de linfocitos demostramos que tanto la falta de actividad de CTSL en las células linfoides como en el microambiente que las rodea, aumentan la tasa de proliferación de las células CD4+Foxp3-, mientras que la proliferación basal de la subpoblación Treg resultó influenciada por la ausencia de actividad de CTSL en su entorno.

CAPÍTULO 4. INFLUENCIA DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DERIVADAS DE GANGLIOS LINFÁTICOS EN LA SOBREVIDA DE LAS CÉLULAS TREG

El número de células T en la periferia se encuentra estrictamente regulado mediante un balance entre la llegada de células desde el timo, la proliferación y la muerte celular. Los linfocitos T naive son células de prolongada supervivencia en interfase que compiten en la periferia por cantidades limitantes de factores de supervivencia que regulan el mantenimiento de un número adecuado de células T^{263,264}. Estudios recientes han demostrado que las células estromales desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la supervivencia linfocitaria en los órganos linfoides periféricos, y se ha identificado en los ganglios linfáticos a los FRs de la zona T como la fuente principal en dicho órgano de IL-7, citoquina crítica para la supervivencia de las células T naive.

En lo que respecta a la población Treg se ha demostrado que la IL-2 es un factor clave para el mantenimiento de su supervivencia^{57,60}, y estudios recientes sugieren que distintas citoquinas de cadena gamma regularían la supervivencia de la población Treg periférica²⁶⁵. Asimismo, se ha sugerido que la señalización a través del CD28 y el TGF- β también serían importantes para promover la supervivencia de dichas células en la periferia^{49,62}. Sin embargo, muchos de los factores involucrados en el mantenimiento de la supervivencia *in vivo* e *in vitro* de la población Treg no han sido aún identificados, y nada se sabe acerca del rol del estroma de los ganglios linfáticos en la supervivencia de la población Treg.

4.1- Efecto de las células estromales en la supervivencia de las células T CD4+

4.1.1- Influencia de los cultivos de CEG en la viabilidad *in vitro* de las células T CD4+

Previamente, Zhou y col. habían reportado que cultivos de células estromales derivados de ganglios linfáticos de ratones KO para el IL-2R β eran capaces de incrementar la supervivencia en cultivo de las células T. Reportaron además, que intentaron establecer líneas celulares estromales pero que sus cultivos perdían la capacidad de prevenir la muerte celular de las células T al cabo de 2 semanas de establecidos¹⁸². En

un estudio más reciente, Link y col. demostraron que los FRs de la zona T de los ganglios linfáticos previenen -mediante la secreción de IL-7 y CCL19- la muerte celular *in vitro* de los linfocitos T vírgenes, aunque son incapaces de prevenir la muerte en cultivo de las células B¹⁵⁰.

Con el objeto de investigar el efecto de nuestros cultivos de estroma sobre la viabilidad de las células T CD4+, incubamos linfocitos provenientes de ganglios linfáticos de ratones normales BALB/c con CEG wt y mutantes para CTSL, y analizamos a distintos días de cocultivo la viabilidad de la población CD4+ por marcación con IP y análisis por FACS.

En concordancia con los reportes mencionados anteriormente, el cocultivo con las células estromales incrementó notablemente la viabilidad de los linfocitos CD4+. Cuando las células fueron cultivadas en medio completo, al día 2 de cultivo se observó aproximadamente un 60 % de células CD4+ viables. La presencia en el cultivo de CEG incrementó este porcentaje a más de un 95%. Esta capacidad de las CEG para incrementar la sobrevivencia de las células T CD4+ se mantuvo inalterada, al menos, durante 8 días, y resultó similar en las CEG wt y mutantes para CTSL (**figura 29**).

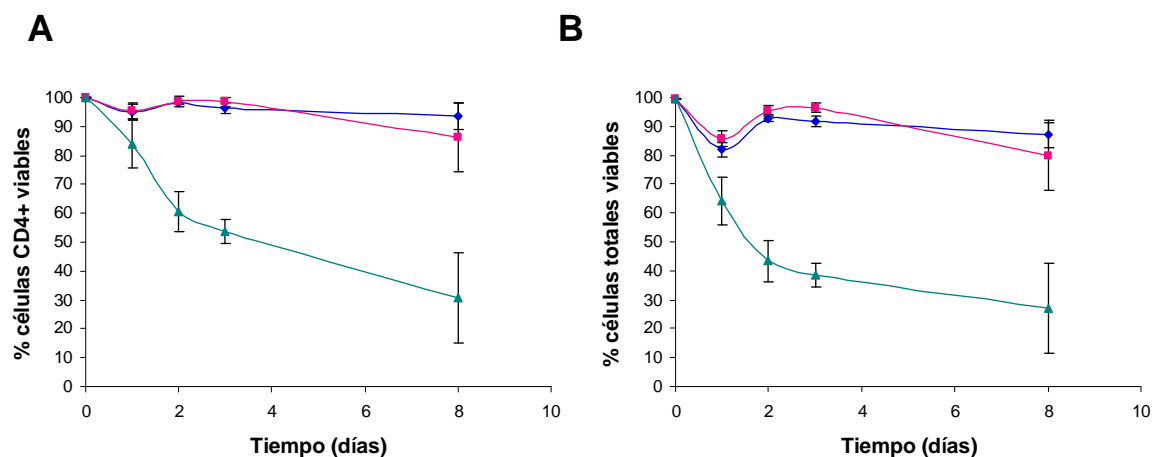


Figura 29: Células de ganglios linfáticos de ratones normales BALB/c ($2 \cdot 10^6$ células) fueron cultivadas en presencia o ausencia de una monocapa de CEG y cosechadas a distintos tiempos. El porcentaje de células viables dentro de la población CD4+ (A) y en el total de linfocitos cultivados (B) se determinó por FACS mediante marcación con IP y anti-CD4. (◆) CEG wt; (■) CEG CTSL^{nkt/nkt}; (▲) ausencia de CEG. Los datos se expresan como la media \pm SD (n=3). Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

De este modo, nuestros cultivos de CEG -al igual que los establecidos por Zhou y col.- incrementan la viabilidad en cultivo de las células T naive CD4+.

4.1.2- Influencia de los cultivos de LCEG en la viabilidad de las células T CD4+

Con el objeto de investigar si los cultivos de LCEG conservaban la capacidad de las cultivos primarios de mantener la viabilidad de las células CD4+ en cultivo, evaluamos mediante marcación con IP y análisis por FACS, la viabilidad de células T CD4+ cocultivadas con LCEG wt y mutantes para CTSL. Como puede observarse en la **figura 30**, la presencia de LCEG mantuvo prácticamente inalterada la viabilidad de las células CD4+ durante los 7 días que duró el ensayo. Por el contrario, cuando las células fueron cultivadas en ausencia de LCEG la viabilidad celular disminuyó en un 50% al cabo de 3 días de cultivo (**figura 30**). En las condiciones ensayadas, el incremento en la viabilidad de las células CD4+ resultó similar en presencia de células estromales wt y CTSL^{nkt/nkt}.

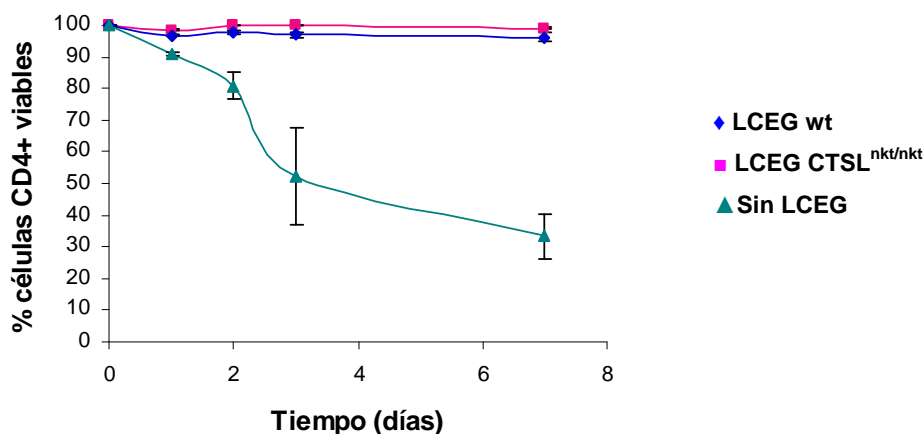


Figura 30: Células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c ($2 \cdot 10^6$ células) fueron cocultivadas con monocapas de LCEG wt y mutantes para CTSL y cosechadas a distintos tiempos. La viabilidad de las células CD4+ fue determinada por marcación con IP y anti-CD4 y análisis por FACS. Los datos se expresan como la media \pm SD (n=3). Se muestra un experimento representativo de dos independientes con resultados similares.

Estos resultados indican que los cultivos de LCEG conservan inalterada la capacidad de los cultivos primarios de mantener la viabilidad *in vitro* de las células T CD4+.

4.2- Efecto de las células estromales en la apoptosis de las células Treg

Continuamos analizando la influencia de las células estromales en la viabilidad de las subpoblaciones Treg y T convencional. Para llevar a cabo este objetivo, cocultivamos linfocitos de ganglios linfáticos o células CD4+CD25+ y CD4+CD25- purificadas por MACS, provenientes de ratones normales, con LCEG wt y CTSL^{nkt/nkt}. A las 48 hs de cocultivo, analizamos los niveles de apoptosis en las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- por marcación con anexina V y análisis por FACS.

Cabe reiterar que en los ensayos de apoptosis no se determinó la expresión de Foxp3 dada la incompatibilidad de esta marcación intracelular con la marcación con anexina V. No obstante, en ensayos paralelos se determinó que en las condiciones experimentales ensayadas, alrededor del 85% de las células CD4+CD25+ expresan el factor de transcripción Foxp3 (**figura 31**).

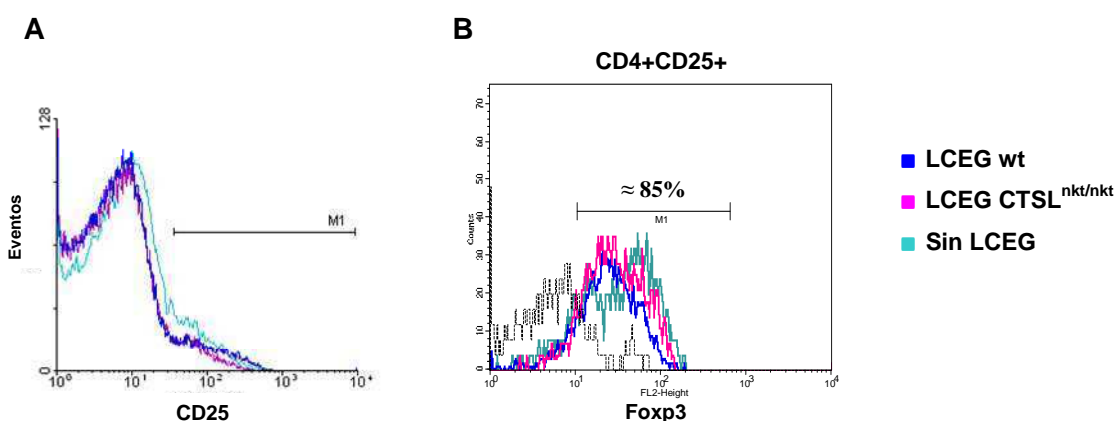


Figura 31: Células de ganglios linfáticos de ratones normales BALB/c fueron cultivadas (1.10^6 células/ml) por 48 hs con LCEG wt o CTSL^{nkt/nkt} en confluencia. Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD25 dentro de la población CD4+ (A) y de la expresión de Foxp3 en la subpoblación CD4+CD25+ (B).

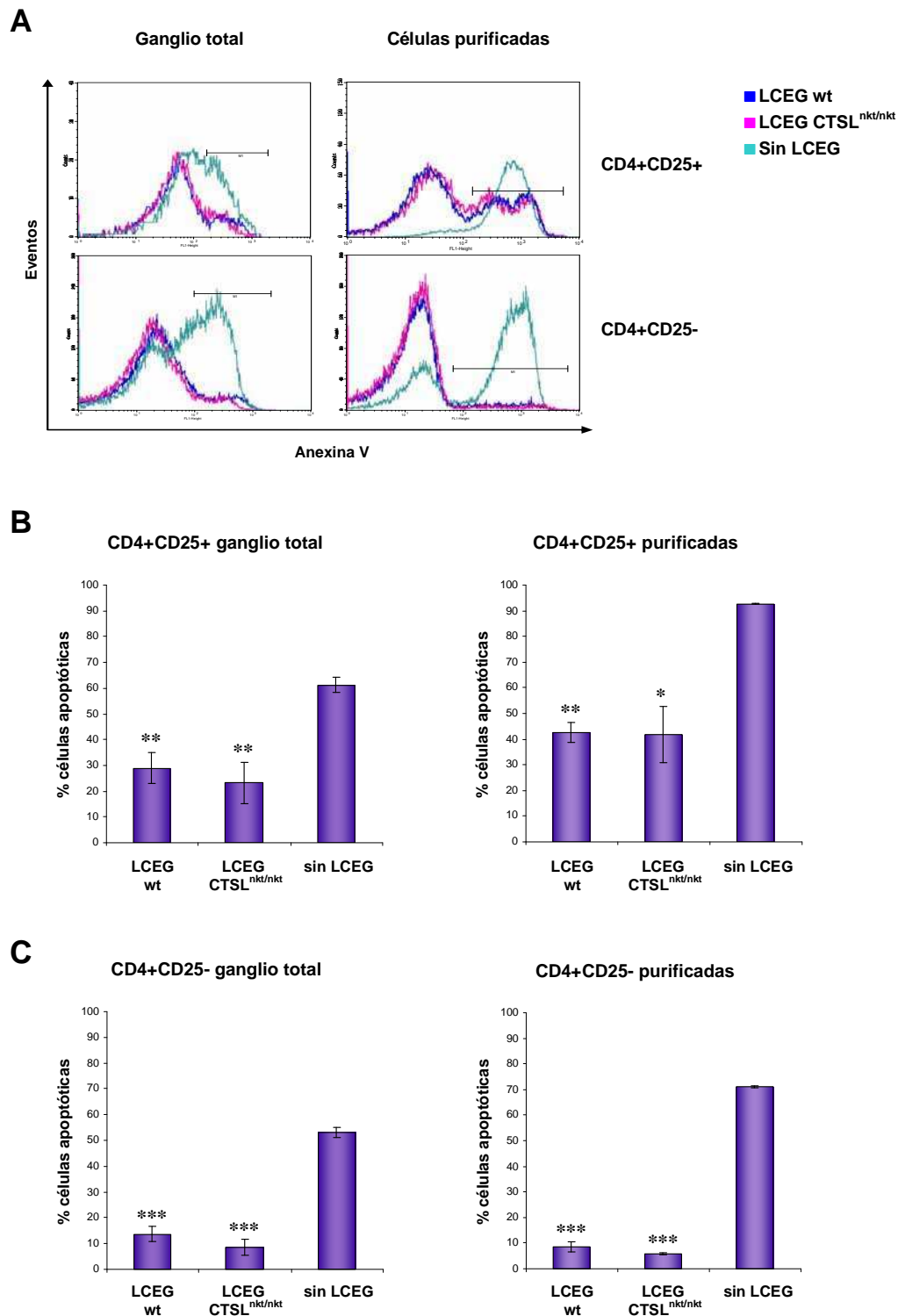


Figura 32. Células de ganglio o células CD4+CD25+ y CD4+CD25- purificadas por MACS provenientes de ratones BALB/c fueron cultivadas (1.10^6 células/ml) por 48 hs con monocapas de LCEG wt o CTSL^{nkt/nkt}. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado por FACS por marcación con anexina V. (A) Se muestran histogramas representativos. Se indican los porcentajes de células apoptóticas CD4+CD25+ (B) y CD4+CD25- (C). Los valores indican la media \pm SD (n=3) de un experimento representativo de tres independientes con resultados similares. *, **, *** Diferencias significativas respecto al control en ausencia de LCEG. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Como puede apreciarse en las **figuras 32 A y B**, el cocultivo con células estromales disminuyó significativamente la apoptosis de las células CD4+CD25+. Asimismo, como se muestra en las **figuras 32 A y C**, las LCEG fueron capaces de disminuir también la apoptosis de los linfocitos CD4+CD25-. Más aún, el rescate de la apoptosis mediado por las LCEG, fue mayor en la población CD4+CD25- que en la CD4+CD25+ (**figura 33**), indicando que la presencia de células estromales posee un efecto diferencial sobre la apoptosis de ambas subpoblaciones. No observamos diferencias significativas en el rescate de la apoptosis mediado por LCEG wt o mutantes para CTSL.

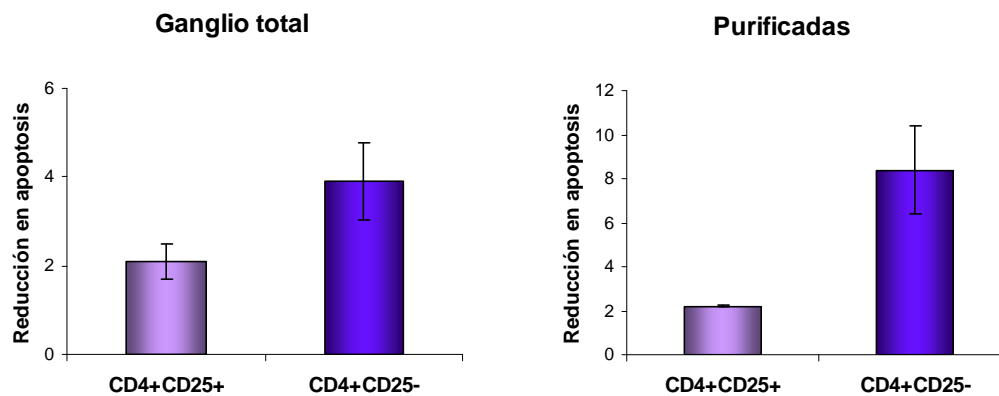


Figura 33. Rescate de la apoptosis por células estromales. Se muestra el grado de disminución de la apoptosis de células CD4+CD25+ y CD4+CD25- purificadas por MACS o de ganglio total cultivadas ($1 \cdot 10^6$ células/ml) en presencia de una monocapa de LCEG wt, respecto a su nivel de apoptosis en ausencia de LCEG.

Estos resultados indican que las LCEG disminuyen considerablemente los niveles de apoptosis en cultivo de las células Treg y T convencionales en estado estacionario. Asimismo, muestran que el rescate de la apoptosis mediado por las células estromales resulta mayor en la población T convencional, sugiriendo que las células Treg y las T convencionales poseen diferentes requerimientos para su supervivencia *in vitro*.

Por otra parte, en las condiciones experimentales utilizadas no se observaron diferencias en el efecto del estroma derivado de ratones wt y mutantes para CTSL.

Todos los ensayos que se describen a continuación fueron llevados a cabo con LCEG wt y CTSL^{nkt/nkt}. Sin embargo, no hemos hallado diferencias significativas entre los experimentos realizados con ambos tipos de células estromales. Por tal motivo, en las siguientes secciones sólo haremos referencia a cultivos de LCEG. A modo informativo, los ensayos que se muestran a continuación han sido realizados con LCEG wt.

4.3- Mecanismos involucrados en el mantenimiento de la viabilidad *in vitro* de las células Treg y T convencionales mediado por células estromales

Para investigar si el rescate de la apoptosis mediado por el estroma era dependiente de la concentración de células estromales, se cultivaron linfocitos de ganglios linfáticos provenientes de ratones wt con diferentes concentraciones de LCEG y se evaluó a las 48 hs de cultivo, el porcentaje de células apoptóticas en las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- por marcación con anexina V y análisis por FACS.

Como se observa en la **figura 34**, el porcentaje de células CD4+CD25+ y CD4+CD25- apoptóticas resultó menor a mayor concentración de LCEG, indicando que el rescate de la apoptosis de ambas subpoblaciones es dependiente de la concentración de células estromales.

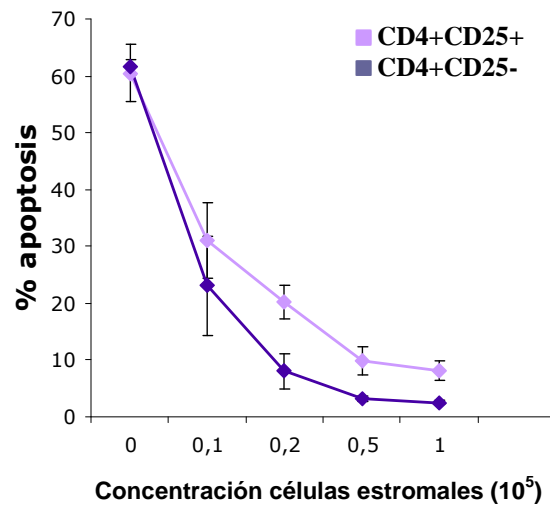
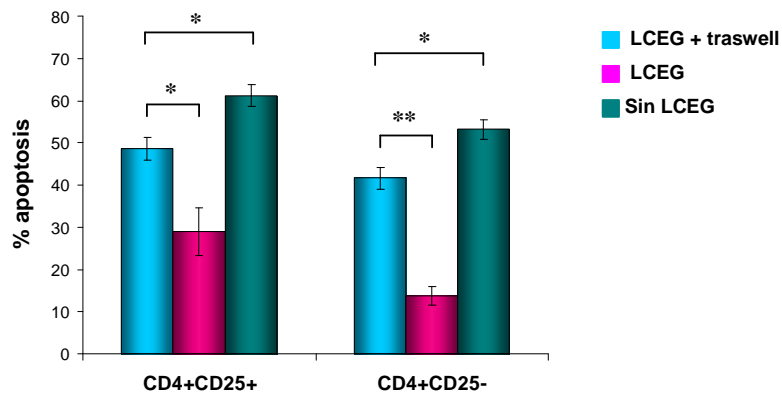


Figura 34. Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c fueron cultivadas (1.10^6 células/ml) por 48 hs con diferentes concentraciones de LCEG. El porcentaje de apoptosis de las células CD4+CD25+ y CD4+CD25- fue determinado por marcación con anexina V y análisis por FACS. Los valores indican la media \pm SD (n=3) de un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Luego, analizamos la influencia del contacto con el estroma en la sobrevivencia de las células Treg y T convencionales. Para ello, se realizaron cocultivos como los descritos anteriormente, pero impidiendo el contacto directo con las células estromales mediante una membrana semipermeable (cámara de transwell). Como se observa en la **figura 35 A** la inhibición del contacto con las células estromales incrementó significativamente la apoptosis de las células CD4+CD25+ y CD4+CD25-, resultando más afectada la viabilidad de la población CD4+CD25- (**figura 35 B**). No obstante, la disminución en el rescate de la apoptosis ocasionada por la inhibición del contacto fue parcial, indicando que la presencia de factores solubles sintetizados por las células estromales, sería importante para el mantenimiento de la viabilidad tanto de las células Treg como de las células T convencionales.

A



B

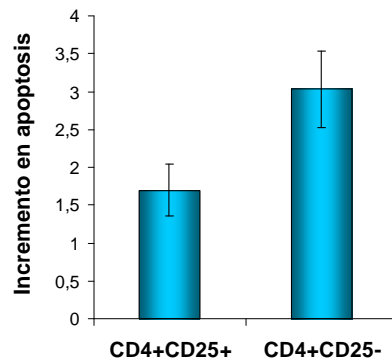


Figura 35: Células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c fueron cultivadas (1.10^6 células/ml) por 48 hs con o sin monocapas de LCEG, en presencia o ausencia de cámaras de transwell. (A) El porcentaje de apoptosis en las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- fue determinado por marcación con anexina V y análisis por FACS. B) Se muestra el incremento en el porcentaje de células apoptóticas en presencia de LCEG + transwells relativo al porcentaje de células apoptóticas en presencia de LCEG. Los valores indican la media \pm SD (n=3). *p<0,05; **p<0,01. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

Finalmente, se investigó si la molécula antiapoptótica Bcl-2 estaba involucrada en el rescate de la apoptosis mediado por las células estromales. El análisis por FACS de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de Bcl-2 en las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- mostró que el incremento en la viabilidad celular correlaciona con una mayor expresión de Bcl-2 en las células Treg y T convencionales (figura 36).

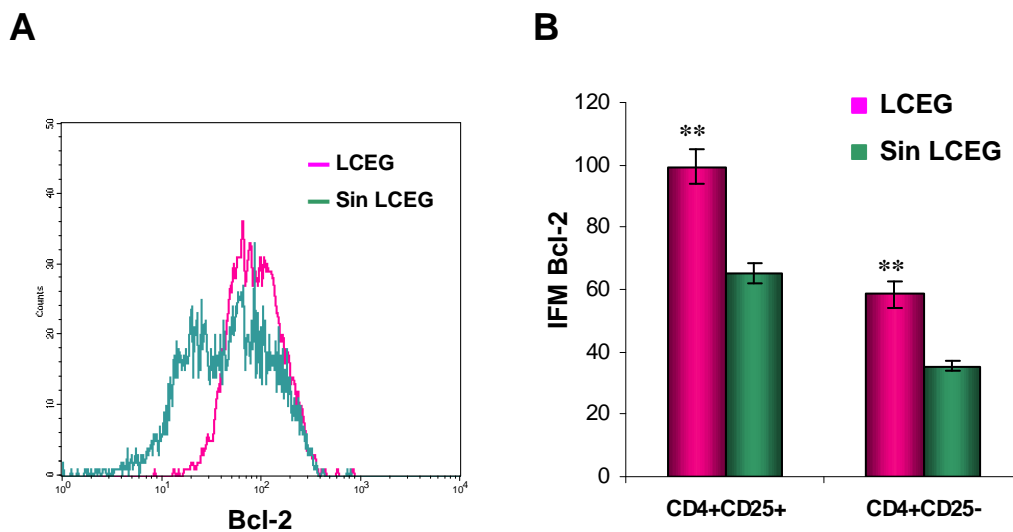


Figura 36. Análisis de la expresión de Bcl-2. Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c fueron incubadas (1.10^6 células/ml) por 48 hs con LCEG en confluencia. La expresión de Bcl-2 en las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- fue determinada por FACS. (A) Se muestra un histograma representativo de la expresión de Bcl-2 en células CD4+CD25+ cultivadas en presencia y ausencia de LCEG. (B) Se indica la IFM de Bcl-2 en las células CD4+CD25+ y CD4+CD25- cultivadas con o sin LCEG. Los valores indican la media \pm SD (n=3). **p<0,01. Se muestra un resultado representativo de tres ensayos independientes.

En conclusión, estos resultados indican que el rescate de la apoptosis de las poblaciones Treg y T convencional es dependiente de la concentración de células estromales y se encuentra mediado, fundamentalmente, por contacto directo con el estroma, interviniendo además, factores de sobrevida solubles sintetizados por éste. Interesantemente, el rescate de la apoptosis de la subpoblación T convencional resultó más dependiente del contacto celular reforzando nuestros resultados anteriores que indicaban distintos requerimientos para el mantenimiento de la sobrevida en cultivo de ambas subpoblaciones. Finalmente, el mecanismo molecular implicado en el rescate de la apoptosis involucraría a la molécula antiapoptótica Bcl-2.

RESUMEN DEL CAPÍTULO 4

- 1. Demostramos que las LCEG disminuyen los niveles de apoptosis *in vitro* de las células Treg y T convencionales en estado estacionario.**
- 2. Determinamos que el rescate de la apoptosis mediado por el estroma resulta mayor en la subpoblación CD4+ T convencional. Tanto en la población Treg como en la T convencional dicho rescate resultó dependiente de la concentración de células estromales e involucró factores de sobrevivencia solubles y principalmente, contacto celular.**
- 3. Sugerimos que el mecanismo molecular implicado en el rescate de la apoptosis involucraría a la molécula antiapoptótica Bcl-2.**

Discusión

El estado de inmunocompetencia de un individuo depende del mantenimiento de un conjunto estable de linfocitos naive, de memoria y regulatorios. Aunque se sabe que existe un control preciso del número y la funcionalidad de las células que componen la población linfocítica periférica, los mecanismos que intervienen en su regulación no han sido aún completamente dilucidados.

Las células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ desempeñan un rol fundamental en el mantenimiento de la tolerancia hacia lo propio y en el control de las enfermedades autoinmunes^{6,7,59}. Además, se encuentran involucradas en la regulación homeostática de la población T^{7,266} y en la modulación de la respuesta inmune hacia aloantígenos, células tumorales y patógenos^{15,17,20}. Estos hallazgos indican que las células Treg desempeñan un rol clave en el sistema inmune, y que su manipulación podría ser utilizada en el desarrollo de nuevas terapias inmunológicas. Por este motivo resulta indispensable disponer de más información básica sobre la biología de este tipo celular.

La proteasa lisosomal CTSL ejerce una amplia influencia sobre el sistema inmune. Se ha demostrado que esta enzima interviene en la selección positiva de los timocitos CD4⁺. Estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando ratones CTSL^{nkt/nkt} mostraron que la falta de actividad de CTSL genera alteraciones en los estadios tempranos de la selección positiva de los timocitos CD4 SP²⁴⁶. Demostramos además que la CTSL regula el nivel de expresión de diversos componentes de la ECM en los órganos linfoides, e influencia el número y la composición de las poblaciones linfoides T centrales y periféricas²⁵⁵. En particular, se observó que pese a la importante disminución en la producción de timocitos CD4⁺, el número absoluto de estas células alcanza valores normales en los ganglios linfáticos de los mutantes CTSL^{nkt/nkt}.

Durante el desarrollo de esta Tesis se investigó la participación de la CTSL en la regulación del número de células CD4⁺ Treg tanto en el timo como en los órganos linfoides secundarios. Se investigó además la influencia del estroma de los ganglios linfáticos en la proliferación y en la supervivencia de dicha población.

Utilizando como modelo experimental ratones CTSL^{nkt/nkt}, determinamos que mientras que en el timo el número absoluto de células Treg se encuentra severamente

disminuido, no se observan alteraciones en la frecuencia de células CD25+Foxp3+ dentro de los timocitos CD4 SP. Contrariamente, los órganos linfoides periféricos mostraron un marcado incremento en la frecuencia de células Treg dentro de la población CD4+. Dicho incremento involucró aumentos tanto en la población CD25+Foxp3+ como en la población CD25-Foxp3+, considerada un reservorio de células Treg o células Treg en proliferación. El número absoluto de células Treg resultó notablemente incrementado en los ganglios linfáticos y levemente reducido en el bazo. Se comprobó además que estas alteraciones en la población Treg del timo y de los órganos linfoides secundarios se encuentran establecidas desde los primeros días de vida de los ratones CTSL^{nkt/nkt}. Finalmente, mediante ensayos de cultivo mixto de linfocitos alogeneico demostramos que las células Treg de los ratones mutantes para CTSL presentan una capacidad supresora similar a la de las células Treg derivadas de ratones wt.

En conclusión, la falta de actividad de CTSL correlacionó con una marcada disminución en el número absoluto de timocitos Treg pero no alteró el balance entre timocitos CD4+CD25+/-Foxp3+ y CD4+CD25-Foxp3-. Contrariamente, en los órganos linfoides periféricos la proporción de linfocitos CD25+/-Foxp3+ en la población CD4+ se encontró aumentada. La falta de actividad para CTSL correlacionó con un aumento significativo en el número absoluto de células Treg en los ganglios linfáticos, mientras que en el bazo se observó una leve reducción.

Aunque no existen reportes previos sobre incrementos en el número absoluto de células Treg en los ganglios linfáticos de ratones carentes de actividad para la CTSL, Maehr y col. reportaron que los ratones NOD KO para la CTSL presentan un aumento en la proporción de células Treg CD4+CD25+ dentro de la población CD4+ del bazo, y que dicho aumento correlaciona con un incremento en los niveles de mRNA para Foxp3 en la población T CD4+²⁶⁷. Estos autores proponen que el desbalance entre las células Treg y las células T agresivas dentro de la población T CD4+ periférica sería el responsable de conferir a los ratones NOD KO para CTSL una fuerte protección contra el desarrollo de la diabetes autoinmune. Por su parte, Hsing y col., en discrepancia con nuestros resultados, reportaron recientemente que los ratones NOD KO para el gen *ctsl* presentan un incremento en el porcentaje de timocitos CD25+Foxp3+ dentro de la

población CD4 SP²⁶⁸. Como explicáramos, no hemos hallado alteraciones en la frecuencia de células Foxp3+ dentro de la población CD4 SP ni en el timo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} adultos ni en el de los neonatos. Por otra parte, no se han informado hasta la fecha datos acerca del número absoluto de células Treg ni en el timo ni en los ganglios linfáticos.

De acuerdo a la secuencia reportada del gen *ctsl* murino²⁵⁴, la delección descrita en los ratones CTSL^{nkt/nkt} involucra la región carboxi-terminal de la CTSL, incluyendo los residuos que participan en la formación del puente disulfuro que une la cadena pesada con la liviana (Cys 269 y Cys 322), esencial para la actividad enzimática^{256,257}. Chauhan y col. sugirieron que una delección en el gen de la *ctsl* humana que abarque las bases codificantes para el extremo carboxi-terminal, incluyendo el residuo Cys 322, determinaría la retención de la proteína en el retículo endoplasmático, debido probablemente a un plegamiento incorrecto²⁶⁹. En nuestro laboratorio se ha demostrado que los mutantes CTSL^{nkt/nkt} efectivamente expresan la forma mutada de la proteína²⁵⁵, abriendo la posibilidad de que existan diferencias entre los ratones KO para CTSL y los mutantes CTSL^{nkt/nkt}.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio²⁵⁵ demostraron que la exportación diaria de timocitos CD4+ a la periferia se encuentra disminuida en los ratones CTSL^{nkt/nkt}. Aunque no puede descartarse la existencia de una emigración diferencial de timocitos CD4+CD25+Foxp3+ respecto a la de las células CD4+CD25-Foxp3- en los mutantes CTSL^{nkt/nkt}, esta disminución en la exportación de timocitos CD4+ junto con los datos que indican que el timo de estos ratones presenta una severa disminución en el número absoluto de células CD4 SP, que dicha población no muestra aumentos en la proporción de células CD25+Foxp3+, y que el número total de timocitos Treg alcanza sólo la cuarta parte del número de estas células en el timo de los ratones normales, hace poco probable que el aumento en la frecuencia de células CD25+Foxp3+ en la población T CD4+ periférica en los mutantes para CTSL sea consecuencia de un aumento en la exportación tímica de células Treg.

Teniendo en cuenta estos resultados, estudiamos si la ausencia de actividad de CTSL alteraba los mecanismos que regulan la homeostasis de las células Treg en la periferia.

Mediante la técnica de incorporación de BrdU a corto y a largo plazo, investigamos la existencia de alteraciones en los niveles de proliferación basal de las células Treg periféricas en los ratones CTSL^{nkt/nkt}. En concordancia con otros autores²⁵⁹, observamos que la tasa proliferativa de la población Treg es superior a la de su contraparte T convencional tanto en los ratones mutantes como en los wt. Interesantemente, hallamos un incremento significativo en la tasa de proliferación basal de las células CD4+CD25+ tanto en los ganglios linfáticos como en el bazo de los mutantes CTSL^{nkt/nkt}. Sin embargo, el análisis de la incorporación de BrdU por las células T convencionales también evidenció un incremento en la tasa de proliferación de dichas células, indicando que la mutación *nkt* está asociada a un aumento en la tasa proliferativa de la población T CD4+, que involucra tanto a la subpoblación Treg como a la T convencional.

La razón entre la tasa proliferativa de la subpoblación CD4+CD25+ y la de las células CD4+CD25- resultó de una magnitud similar en los ratones mutantes y en los ratones normales, tanto en los ganglios linfáticos como en el bazo. Estos resultados no permiten adjudicar el desbalance en la proporción de células Treg y T convencionales dentro de la población T CD4+ a cambios diferenciales en los niveles de proliferación de ambas subpoblaciones. Sin embargo, debe tenerse en cuenta el hecho de que dada la incompatibilidad de la marcación para Foxp3 y BrdU, el análisis de la proliferación *in vivo* de las subpoblaciones Treg y T convencional fue llevado a cabo examinando la incorporación de BrdU por células CD4+CD25+ y CD4+CD25- respectivamente. No obstante, dentro de la población CD4+CD25-, considerada como no regulatoria, un pequeño porcentaje de células presenta el fenotipo CD4+CD25-Foxp3+, consideradas un reservorio de células Treg o, paradójicamente, células Treg en proliferación^{65,258}. Más aún, la frecuencia de la subpoblación CD25-Foxp3+ se encuentra aumentada al doble en la población CD4+ de los ratones CTSL^{nkt/nkt}. De esta manera, se genera un sesgo en el análisis de los datos que abre la posibilidad de que parte del incremento observado en la proliferación basal de la población T CD4+CD25- corresponda a células CD4+CD25-Foxp3+ en proliferación. Si este fuera el caso, el aumento en la proliferación de la población T convencional de los ratones CTSL^{nkt/nkt} podría estar siendo sobrevaluado. Por lo expuesto, la influencia de la proliferación en el desbalance de células Treg y T convencionales en la población CD4+ de los órganos linfoides periféricos de los mutantes CTSL^{nkt/nkt} no puede ser descartada completamente.

Investigamos además si es la ausencia de actividad de CTSL en los linfocitos o en el microambiente de los órganos linfoides periféricos la que determina el incremento en la tasa proliferativa de las células Treg y T convencionales. Los resultados obtenidos *in vivo* mediante ensayos de transferencia cruzada de linfocitos sugieren que tanto la ausencia de actividad de CTSL en las células linfoides como en el microambiente de los ganglios linfáticos afectarían la tasa de proliferación de las células T convencionales. Por su parte, la proliferación de la subpoblación Treg resultaría influenciada por la falta de actividad de CTSL en el entorno de los ganglios linfáticos.

Cuando se analizaron los niveles de apoptosis basales de las poblaciones CD4+ Treg y T convencionales en los órganos linfoides periféricos, el nivel de apoptosis de los linfocitos CD4+CD25+ resultó significativamente mayor que el observado en la población CD4+CD25-, tanto en los ratones wt como en los mutantes para CTSL. En segundo lugar, el nivel de apoptosis basal de las células Treg de los ratones CTSL^{nkt/nkt} no resultó menor al de los ratones wt, indicando que el aumento en el número de linfocitos Treg no deriva de una disminución en la tasa de apoptosis. De hecho, hallamos incrementos tanto en los niveles de apoptosis de las células Treg como en los de las células T convencionales en los ratones CTSL^{nkt/nkt}. En los ganglios linfáticos, la razón entre los niveles de apoptosis en las subpoblaciones CD4+CD25+ y CD4+CD25- alcanzó valores similares en los ratones mutantes y en los normales. Esta similitud no avala la hipótesis de que en los mutantes para CTSL el aumento en la proporción de células Treg dentro de la población CD4+ se deba a una alteración selectiva de los niveles de apoptosis de alguna de las subpoblaciones T CD4+ (Treg o T convencional). En cuanto al bazo, mientras que los niveles de apoptosis observados en los esplenocitos CD4+CD25- de los ratones mutantes duplicaron los observados en los ratones normales, el aumento en el nivel de apoptosis de la subpoblación CD4+CD25+ fue leve, sugiriendo que el aumento diferencial en el nivel de apoptosis podría constituir uno de los mecanismos involucrados en la determinación de la relación CD4+CD25+/CD4+CD25- en este órgano. Estos resultados abren la posibilidad de que en los ganglios linfáticos y el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} distintos mecanismos influyeran el desbalance entre células Treg y T convencionales dentro de la población T CD4+ periférica.

En base a estos resultados podemos concluir que la ausencia de actividad de CTSL correlaciona con alteraciones en la homeostasis de las células T CD4⁺ con fenotipo Treg y T convencional, observándose incrementos tanto en los niveles de apoptosis como en los de proliferación basal de ambas subpoblaciones. Estos datos indican la existencia de un recambio acelerado de células CD4⁺ Treg y T convencionales en los ratones mutantes para CTSL. Mientras que no queda claro el mecanismo por el cual se establece el incremento en la proporción de células CD25⁺Foxp3⁺ dentro de la población T CD4⁺ en los ganglios linfáticos, en el bazo el incremento diferencial en el nivel de apoptosis entre las células Treg y T convencionales podría contribuir al desbalance entre células Treg y T convencionales dentro de la población T CD4⁺. Tanto la falta de actividad de CTSL en los linfocitos como en su entorno alteraron la proliferación de las células T convencionales, mientras que la proliferación de las células Treg resultó influenciada por la falta de actividad de CTSL en el microambiente de los ganglios linfáticos.

Si bien tanto en los ganglios linfáticos como en el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} los niveles basales de apoptosis y proliferación de las células CD4⁺ Treg y T convencionales resultaron incrementados, y la proporción de células Treg dentro de la población CD4⁺ resultó aumentada, el bazo -a diferencia de los ganglios linfáticos- no mostró aumentos en el número absoluto de células Treg y evidenció una reducción considerablemente más severa en el número absoluto de células T convencionales. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que las alteraciones tempranas en la selección positiva de las células CD4⁺ de los mutantes para CTSL se ven reflejadas en la disminución del número absoluto de esplenocitos CD4⁺. Por el contrario, los ganglios de estos mutantes están hipertrofiados, y muestran un incremento en la celularidad total y un número normal de células CD4⁺. Los factores causales de las diferencias en cuanto al número absoluto de células CD4⁺ y sus subpoblaciones entre los ganglios linfáticos y el bazo de los ratones CTSL^{nkt/nkt} no están claros. Sin embargo, los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} presentan un incremento en la expresión de varios componentes de la ECM, mientras que en el bazo no se detectaron alteraciones en la composición de la misma. Se sabe que diferentes factores de crecimiento, entre los que se encuentran el TGF- β , hormonas y diversas quemoquinas

están asociados con componentes de la ECM^{270,271,272}. Esta asociación constituye un factor importante en la regulación de la disponibilidad de dichas moléculas^{270,273,274}. Puede proponerse entonces que el incremento en los componentes de la ECM en los ganglios linfoides podría dar lugar a un aumento en la disponibilidad de nichos linfoides, lo que permitiría el soporte de un mayor número de células T CD4+, incluyendo aquellas con fenotipo Treg. Avalan esta hipótesis la hipertrofia de los ganglios linfáticos y los números aumentados de linfocitos CD8+ y B220+²⁵⁵.

Estudios recientes han demostrado que la sobrevida de las células linfoides en los órganos linfoides secundarios está fuertemente influenciada por su interacción con las células estromales^{145,150}. Asimismo, se postula que los órganos linfoides secundarios participarían en la regulación del número de linfocitos mediante el suministro de un espacio restringido y cantidades limitantes de factores de sobrevida por los cuales competirían las células linfoides^{145,263,264}.

Con el objeto de investigar la influencia de las células estromales en la sobrevida y la proliferación de las células Treg establecimos cultivos de células estromales derivadas de ganglios linfáticos de ratones normales y CTSL^{nkt/nkt}.

Los cultivos primarios de células estromales de ganglios linfáticos (cultivos de CEG) de ratones mutantes para CTSL y wt presentaron diferencias tanto desde el punto de vista fenotípico como en su facilidad de establecimiento. Como explicáramos en Resultados, y de acuerdo a otros autores, denominamos cultivos de CEG a los cultivos primarios obtenidos a partir de células adherentes de ganglios linfáticos. Mientras que los cultivos de CEG derivados de ratones carentes de actividad de CTSL resultaron de rápido establecimiento, los derivados de ganglios de ratones normales demoraron el doble e incluso el triple de tiempo en llegar a confluencia, sugiriendo que, al menos *in vitro*, las células estromales derivadas de los ganglios de los ratones mutantes presentarían una mayor tasa proliferativa. Respecto de los tipos celulares que los integraban, los cultivos de CEG derivados de ratones mutantes presentaron un mayor porcentaje de células de linajes macrófago/dendrítico. En correlación con este resultado, datos preliminares indican que en los ganglios linfoides de los ratones

CTSL^{nkt/nkt} tanto el porcentaje como el número absoluto de CD4⁺ y macrófagos se encontrarían significativamente aumentados.

Dado que en ausencia de estimulación las células T naive no proliferan *in vitro*, llevamos a cabo ensayos de cultivo mixto linfocitario sobre placas precubiertas con CEG. Las CEG fueron capaces de incrementar la proliferación *in vitro* de las células Treg, mientras que no alteraron los niveles de proliferación de su contraparte T convencional. En nuestras condiciones experimentales, no detectamos efectos diferenciales sobre la proliferación de las células Treg en los cocultivos con CEG derivadas de ratones normales y CTSL^{nkt/nkt}. Cuando se determinó el porcentaje de células CD4⁺ que expresaba Foxp3 al finalizar los ensayos encontramos, sorprendentemente, que los cultivos desarrollados en presencia de CEG mostraban una disminución en la frecuencia de células Treg. En base a estos resultados hipotetizamos que el estroma ejercería también un efecto diferencial en la supervivencia de las poblaciones Treg y T convencionales. Como se explica más adelante, comprobamos luego que nuestros cultivos de estroma son capaces de soportar la viabilidad *in vitro* de las células T CD4⁺, siendo dicho efecto mayor sobre la población T convencional que sobre las células Treg. Es de destacar que si bien, la importancia del estroma de los órganos linfoides periféricos en la determinación del número, ubicación y funcionalidad de las poblaciones linfoides es un área de creciente atención^{146,147,150,153,161}, no se han reportado aún datos acerca de la existencia de efectos diferenciales de las células estromales sobre las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ Treg y T convencionales como los aquí reportados.

Los cultivos a largo plazo de células estromales de ganglios linfáticos (cultivos de LCEG) no conservaron la capacidad de incrementar la proliferación de las células Treg, incluso aquellos derivados de ganglios de ratones mutantes disminuyeron el nivel de proliferación de las células Treg. Teniendo en cuenta que los cultivos de LCEG se encontraban muy enriquecidos en células de tipo fibroblastoide (FRs, FDCs) y que durante los sucesivos pasajes, al menos las células CD11b⁺ y CD11c⁺ se perdieron en su totalidad, estos resultados sugieren que no serían ni los FRs ni las FDCs los responsables directos del aumento observado en la proliferación de la población Treg.

En conclusión, hemos determinado que nuestros cultivos de CEG son capaces de estimular la proliferación *in vitro* de las células Treg, y no la de su contraparte T convencional. Ni los FRs ni las FDCs serían los responsables directos del incremento en la proliferación de las células Treg.

Es de amplio conocimiento que las células T naive mantenidas en cultivo mueren rápidamente por apoptosis^{275,276}. Este hecho demuestra que los sistemas tradicionales de cultivo no proporcionan los factores necesarios para la mantener la viabilidad de las células T. Recientemente, Zhou y col. demostraron que las células estromales derivadas de ganglios linfáticos de ratones deficientes en el IL-2R son capaces de incrementar la sobrevida *in vitro* de células T no estimuladas¹⁸². Demostraron además, que si bien diversas citoquinas son capaces de rescatar a las células T no estimuladas de la muerte celular en cultivo, los factores solubles secretados por las células estromales incrementan la sobrevida de las células T de manera más eficiente y por un periodo de tiempo más prolongado. En estudios más recientes, Link y col. reportaron que los FRs serían el único tipo celular de los ganglios linfáticos capaz de prevenir la muerte de los linfocitos T *in vitro*, y que el rescate de la muerte celular estaría mediado por la secreción de IL-7 y CCL19, ligando de CCR7¹⁵⁰.

En coincidencia con reportes anteriores, observamos que nuestros cultivos de células estromales de ganglios linfáticos -tanto los cultivos de CEG como los de LCEG- son capaces de incrementar notablemente la viabilidad en cultivo de células T CD4+ en estado estacionario. Observamos además que el cocultivo de linfocitos derivados de ganglios linfáticos con células estromales no modifica el estado de activación ni induce proliferación en las células T CD4+, sugiriendo un efecto de las células estromales similar al que ocurriría en el estado fisiológico.

Investigamos posteriormente el efecto de las LCEG en la sobrevida *in vitro* de las células Treg. Determinamos que, en ausencia de estimulación, las células estromales son capaces de incrementar significativamente la sobrevida en cultivo de las células Treg. Al mismo tiempo, observamos que el estroma es capaz de aumentar también la sobrevida *in vitro* de las células T convencionales. Observamos además un efecto diferencial en el rescate de la apoptosis de las células Treg y T convencionales mediado

por las LCEG, resultando mayor el rescate de la apoptosis en la subpoblación T convencional, lo que sugiere diferencias en los requerimientos para la supervivencia en cultivo de ambas subpoblaciones.

El rescate de la apoptosis de las células Treg y T convencionales resultó dependiente de la concentración de células estromales. En nuestras condiciones experimentales, no se detectaron diferencias en el rescate de la apoptosis mediado por células estromales wt y carentes de actividad para CTSL. En ambas poblaciones la inhibición de la apoptosis fue mediada, fundamentalmente, por contacto directo con las células estromales, interviniendo además, factores de supervivencia solubles sintetizados por éstas últimas. Interesantemente, el rescate de la apoptosis de la subpoblación CD4⁺CD25⁻ resultó más dependiente de contacto celular. Finalmente, observamos que el incremento en la viabilidad de las células Treg y T convencionales -mediado por las células estromales- correlacionó con un mayor nivel de expresión de Bcl-2. En concordancia con lo reportado por Zhou y col. para células T, estos resultados indican que el mecanismo molecular implicado en el rescate de la apoptosis mediado por las células estromales involucraría el mantenimiento de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. En nuestro conocimiento este es el primer reporte acerca de la influencia de las células estromales de los ganglios linfáticos sobre la regulación de la supervivencia de las células CD4⁺ Treg.

En síntesis, las LCEG disminuyeron notablemente los niveles de apoptosis *in vitro* de las células CD4⁺ Treg y T convencionales en estado estacionario. El rescate de la apoptosis mediado por las LCEG resultó mayor en la subpoblación T convencional, fue dependiente de la concentración de células estromales e involucró factores de supervivencia solubles y, fundamentalmente, contacto celular. Nuestros resultados sugieren que el mecanismo molecular implicado en el rescate de la apoptosis involucraría a la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Las células Treg son generadas mediante dos mecanismos. Por un lado, las células denominadas Treg naturales (nTreg) se originan en el timo; por el otro, la inducción periférica de la expresión de Foxp3 en células T convencionales da lugar a las

células Treg inducidas (iTreg), denominándose a este proceso conversión⁴². No se han detectado aún diferencias fenotípicas entre las células generadas a través de estos dos mecanismos. No obstante, estudios recientes sugieren que, a diferencia de las iTreg, las células nTreg expresarían el factor de transcripción Helios⁴⁵.

El TGF- β desempeña un rol fundamental en el desarrollo, la supervivencia y la expansión periférica de las células Treg, como así también, en la supresión mediada por estas células^{42,62}. Además se ha demostrado que el TGF- β 1 es capaz de promover la generación de células iTreg a partir de células T CD4+CD25-Foxp3^{-79,80}. De hecho, hoy en día, se considera al TGF- β 1 el factor más importante para la conversión de células Treg⁹⁰, y se ha demostrado que su expresión es suficiente para promover la generación de células iTreg bajo condiciones fisiológicas. En este sentido, Peng y col. han reportado que la expresión transiente de TGF- β en los islotes de ratones NOD, promueve la generación *in situ* de células Treg CD4+CD25+ que expresan altos niveles de Foxp3²⁷⁷.

Recientemente, Sugita y col. demostraron mediante ensayos *in vitro* que el epitelio pigmentario de la retina induce aumentos en el número de células Treg²⁶⁰. Estos aumentos estarían asociados a la producción por este epitelio de CTLA-2 α , un inhibidor específico de la CTSL²⁶⁰, estando implicada la señalización a través de TGF- β . Utilizando un modelo de uveítis autoinmune experimental demostraron posteriormente, que el TGF- β promueve la expresión *in vivo* del CTLA-2 α en el epitelio pigmentario de la retina, lo que a su vez induciría la producción de TGF- β por las células T CD4+²⁷⁸.

Para investigar la existencia de diferencias en la capacidad de conversión a células Foxp3+ entre los linfocitos CD4+CD25- carentes de actividad de CTSL y los portadores de una CTSL funcional, realizamos ensayos de conversión *in vitro* incubando células CD4+CD25- en presencia de TGF- β , IL-2, anti-CD3 y anti-CD28⁷⁹. Los resultados obtenidos mostraron que, en las condiciones experimentales ensayadas, el porcentaje de las células CD4+CD25- normales y carentes de actividad para CTSL que expresaron Foxp3 resultó similar. Sin embargo, cabe considerar que -siguiendo los protocolos descritos en la literatura- los ensayos de conversión *in vitro* se desarrollaron en presencia de altas concentraciones de TGF- β exógeno^{79,80}. Por lo tanto, no puede descartarse que la adición de TGF- β exógeno enmascare un posible aumento en la

producción endógena de TGF- β por las células CD4+CD25- carentes de una CTSL funcional, dando como resultado una capacidad similar de conversión *in vitro* a células Foxp3+ independientemente de la presencia o ausencia de actividad de CTSL en las mismas. De hecho, como controles de los ensayos de conversión se incubaron linfocitos CD4+CD25- en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 pero en ausencia de TGF- β e IL-2. Bajo estas condiciones experimentales, aunque el porcentaje de expresión de Foxp3 resultó bajo, los linfocitos derivados de ratones mutantes para CTSL mostraron un porcentaje de células Foxp3+ significativamente mayor que los linfocitos derivados de ratones portadores de una CTSL funcional.

Realizamos entonces ensayos *in vitro* en ausencia de TGF- β exógeno. Comprobamos que la inhibición de la actividad de CTSL en células CD4+CD25- purificadas de ganglios linfáticos de ratones normales estimuladas con anti-CD3, da como resultado la expresión de Foxp3 en un porcentaje de células mayor que en ausencia del inhibidor. Si bien no puede descartarse un incremento en la proliferación de las células CD4+CD25-Foxp3+ en presencia del inhibidor de CTSL, estos resultados abren la posibilidad de que *in vivo* la conversión juegue un rol en el aumento de la proporción de células Treg en los órganos linfoides periféricos de los ratones CTSL^{nkt/nkt}. El hallazgo de importantes incrementos en los niveles de TGF- β 1 producido por las células estromales derivadas de ganglios linfáticos carentes de actividad para CTSL, así como el hecho de que -de acuerdo a resultados preliminares obtenidos mediante ensayos de ELISA- los niveles de TGF- β 1 en el sobrenadante de cultivos derivados de ganglios linfáticos de ratones CTSL^{nkt/nkt} duplicarían los observados en cultivos de ganglios linfáticos de ratones wt, apoyan esta hipótesis.

Numerosos trabajos han demostrado que el TGF- β se une en forma no covalente con el LAP (Latency Associated Peptide)²⁷⁹ y se asocia con otras proteínas de latencia formando un complejo de mayor tamaño (LTBP), que es la forma predominante en que es secretado el TGF- β ²⁸⁰. Las LTBP unen el TGF- β -LAP a componentes de la ECM como fibronectina y fibrillina-1²⁸¹. La activación del TGF- β ocurre a través de diversos mecanismos que pueden involucrar proteasas²⁸², trombospondina-1²⁸³, e integrinas²⁸⁴. Dado que en los ganglios linfáticos de los ratones mutantes para CTSL los niveles de expresión de algunas integrinas, así como los de diversos componentes de la ECM -

entre los cuales se encuentra la fibronectina- están aumentados, puede hipotetizarse que la disponibilidad de TGF- β podría estar aumentada en los ganglios linfáticos de estos mutantes.

Por otra parte, se ha demostrado que las CDs, particularmente aquellas inmaduras, pueden inducir células Treg Foxp3⁺ en presencia de TGF- β exógeno y mediante la secreción de TGF- β endógeno^{89,90}. Además, reportes recientes indican que aumentos en el número de CDs correlacionan con incrementos en el número de células Treg. Como mencionamos anteriormente, nuestros resultados preliminares indican que los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt} presentan aumentos en el número de CDs. Aunque no hemos caracterizado la/s subpoblaciones de CDs que se encuentran incrementadas en los ganglios linfáticos de los ratones CTSL^{nkt/nkt}, no puede descartarse que el aumento en la frecuencia de CDs con capacidad de inducir células Treg^{285,286} constituya uno de los factores implicados en el desbalance entre células Treg y T convencionales en la población CD4⁺ periférica de los ratones CTSL^{nkt/nkt}.

Durante la última década, se ha hecho un gran progreso en la comprensión de la biología de las células Treg. Hoy en día, se sabe que el balance entre células Treg y T efectoras es crítico para el control de las respuestas inmunes. Los tratamientos farmacológicos que tienen como propósito modular este balance podrían constituir una estrategia terapéutica clave tanto para el tratamiento y la prevención de algunas enfermedades inmunológicas, como para el control de las respuestas inmunes fisiológicas contra el cáncer, microorganismos y el trasplante de órganos^{7,287}.

Por otra parte, las propiedades funcionales de las catepsinas han adquirido gran interés en los últimos años debido a su potencial terapéutico. En particular, la CTSL es considerada un posible blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer. Diferentes protocolos proponen el uso de la CTSL o sus inhibidores como parte de terapias frente a diversas neoplasias^{206,234}. En este sentido, el aumento en la frecuencia de células Treg dentro de la población T CD4⁺ determinado por la falta de actividad de CTSL podría constituir un posible efecto no deseado en tratamientos antineoplásicos que incluyen la inhibición de la actividad de esta proteasa.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis demuestran que la falta de actividad de CTSL induce en el timo una marcada disminución en el número absoluto de células Treg, pero no altera el balance entre células CD25⁺Foxp3⁺ y CD25⁻Foxp3⁻ dentro de la población de timocitos CD4 SP. En los órganos linfoides periféricos, la actividad de CTSL influye tanto el número de células Treg como el balance entre el número de células Treg y T convencionales, y regula el recambio o “turnover” de las células CD4⁺ Treg y T convencionales. Sugieren además, que tanto la actividad de CTSL en las células linfoides como en el microentorno de los ganglios linfáticos influenciaría la proliferación de las células T CD4⁺ convencionales. Por su parte, la proliferación de las células Treg estaría influenciada por la expresión de la CTSL en el microambiente de los ganglios linfáticos. Finalmente, nuestros resultados abren la posibilidad de que la actividad de la CTSL sea capaz de influenciar la conversión a células Treg en la periferia.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que el estroma de los ganglios linfáticos influenciaría la proliferación de las células Treg y contribuiría al mantenimiento de la sobrevida de dicha población en el estado estacionario.

Investigaciones futuras que permitan un mayor conocimiento acerca de los mecanismos moleculares mediante los cuales la CTSL influye el balance entre el número de células Treg y T convencionales, como así también, una mejor comprensión de los parámetros que controlan la sobrevida de la población Treg, podrían contribuir tanto a un entendimiento más profundo sobre la biología de las células Treg, como al desarrollo de nuevas terapias inmunológicas.

Bibliografía

1. Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* 2007; **37**:21-3.
2. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970; **18**:723-37.
3. Moller G. Do suppressor T cells exist? *Scand. J. Immunol.* 1988; **27**:247-50.
4. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells –a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 2007; **37**(1):S116-23.
5. Janeway CA, Jr. Do suppressor T cells exist? A reply. *Scand. J. Immunol.* 1988; **27**:621-623.
6. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, and Toda M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995; **155**: 1151-64.
7. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; **10**(7):490-500.
8. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.* 2006; **25**:195-201.
9. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, and Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997; **389**:737-42.
10. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, and Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994; **265**:1237-40.
11. Godfrey DI, and Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* 2004; **114**:1379-88.
12. Jiang S, Tugulea S, Pennesi G, Liu Z, Mulder A, Lederman S, Harris P, Cortesini R, and Suci-Foca N. Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum. Immunol.* 1998; **59**:690-99.
13. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, and Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 2001; **193**:1303-10.
14. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, and Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 2001; **193**:1285-94.
15. Shimizu J, Yamazaki S, and Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 1999; **163**:5211-18.
16. Belkaid Y, Blank RB, and Suffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* 2006; **212**:287-00.

-
17. Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich AR, Ohlen C, Greenberg PD, Stromnes IM, Iwashiro M, Sakaguchi S, Evans LH, Peterson KE, Yang G, and Hasenkrug KJ. Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity*. 2004; **20**:293-03.
18. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, and Sher A. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J. Exp. Med.* 2002; **196**:505-15.
19. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, and Melief CJ. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 2001; **194**:823-32.
20. van Maurik A, Herber M, Wood KJ, and Jones ND. Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J. Immunol.* 2002; **169**:5401-04.
21. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; **299**:1057-61.
22. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003; **4**:330-36.
23. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 2001; **27**:68-73.
24. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, and Bowcock AM. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 2000; **106**:R75-R81.
25. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Prohl S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 2001; **27**:18-20.
26. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 2001; **27**:20-21.
27. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, and Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 2003; **4**:337-42.
28. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 2007; **19**:345-54.
29. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE.

Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* 2005; **66**(1):13-20.

30. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; **37**:129–38.

31. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. 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.* 2006; **103**:6659–64.

32. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood.* 2007; **110**:2983–90.

33. Robb RJ, Munck A, Smith KA. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* 1981; **154**:1455–74.

34. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, and Suri-Payer E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. 2002; *Immunology.* **106**:190-99.

35. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, and Hafler DA. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.* 2001; **167**:1245-53.

36. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994; **1**:405–13.

37. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C. A new member of the tumor necrosis factor/ nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; **94**:6216–21.

38. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* 1990; **171**:1393–05.

39. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 2006; **203**:1693–00.

40. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 2006; **203**:1701–11.

41. Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* 2008; **251**:109–15.

42. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat. Immunol.* 2009; **10**(7):689-95.

-
43. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009; **30**(5):626-35.
44. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2004; **199**:303-13.
45. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2010; **184**(7):3433-41.
46. Polansky JK, Schreiber L, Thelemann C, Ludwig L, Krüger M, Baumgrass R, Cording S, Floess S, Hamann A, Huehn J. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *J. Mol. Med.* 2010; **88**(10):1029-40.
47. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, and Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 2006; **7**:401-10.
48. Liston A, and Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; **19**:176-85.
49. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2003; **171**:3348–52.
50. Bayer AL, Yu A, and Malek TR. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2007; **178**:4062-71.
51. Nishizuka Y, and Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 1969; **166**:753-55.
52. Samy ET, Wheeler KM, Roper RJ, Teuscher C, and Tung KS. Cutting edge: Autoimmune disease in day 3 thymectomized mice is actively controlled by endogenous disease-specific regulatory T cells. *J. Immunol.* 2008; **180**:4366-70.
53. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, and Shevach EM. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.* 2002; **196**:237-46.
54. Suri-Payer E, Amar AZ, McHugh R, Natarajan K, Margulies DH, and Shevach EM. Post-thymectomy autoimmune gastritis: fine specificity and pathogenicity of anti-H/K ATPase-reactive T cells. *Eur. J. Immunol.* 1999; **29**:669-77.
55. Dujardin HC, Burlen-Defranoux O, Boucontet L, Vieira P, Cumano A, and Bandeira A. Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; **101**:14473-78.

-
56. Su L, Creusot RJ, Gallo EM, Chan SM, Utz PJ, Fathman CG, Ermann J. Murine CD4+CD25+ regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J. Immunol.* 2004; **173**:4994–01.
57. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2005; **6**:1142–51.
58. Bayer AL, Yu A, Adeegbe D, Malek TR. Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period. *J. Exp. Med.* 2005; **201**:769–77.
59. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 2005; **6**:345-52.
60. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.* 2009; **30**(5):616-25.
61. Sempowski GD, Cross SJ, Heinly CS, Scarce RM, Haynes BF. CD7 and CD28 are required for murine CD4+CD25+ regulatory T cell homeostasis and prevention of thyroiditis. *J. Immunol.* 2004; **172**:787–94.
62. Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol. Rev.* 2007; **220**:199-13.
63. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2005; **201**:1061–67.
64. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity.* 2006; **25**:441–54.
65. Fontenot JD, Rasmussen JP, William LM, Dooley JL, Farr AG and Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity.* 2005; **22**:329–41.
66. Hori, S. Rethinking the molecular definition of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2008; **38**:928–30.
67. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007; **445**:771–75.
68. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immun.* 2007; **8**: 359–68.
- 69 Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, Mathis D, Benoist C. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity.* 2007; **27**:786–800.
70. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, and Lafaille JJ. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J. Immunol.* 2004; **173**:7259–68.

-
71. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, and Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J. Exp. Med.* 2002; **196**:851–57.
72. Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Bluestone JA, and Abbas AK. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J. Exp. Med.* 2005; **202**:1375–86.
73. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, and Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 2007; **204**:1757–64.
74. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, and Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* 2005; **115**:1923–33.
75. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, and Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 2007; **204**:1775–85.
76. Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, and Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity.* 2008; **29**:114–26.
77. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, and Lee C. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J. Immunol.* 2007; **178**:2883–92.
78. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, and Waldmann H. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol.* 2004; **172**:6003–10.
79. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, and Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003; **198**:1875–86.
80. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, and Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.* 2004; **172**:5149–53.
81. Faria AM, and Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 2005; **206**:232–59.
82. Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, and Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol.* 2007; **178**:2018–27.
83. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, and Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2007; **178**:4022–26.
84. Zhou L, Chong MMW, and Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009; **30**(5):646–55.
85. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, and Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.* 2007; **204**:1765–74.

-
86. Hill JA, Hall JA, Sun CM, Cai Q, Ghyselinck N, Chambon P, Belkaid Y, Mathis D, and Benoist C. Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells. *Immunity*. 2008; **29**:758–70.
87. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, and Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 2007; **204**:1775–85.
88. Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, Nussenzweig MC, and Steinman RM. CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2008; **181**:6923–33.
89. Luo X, Tarbell KV, Yang H, Pothoven K, Bailey SL, Ding R, Steinman RM, Suthanthiran M. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; **104**(8):2821-26.
90. Chen W, Konkel JE. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. *J. Mol. Cell. Biol.* 2010; **2**(1):30-36.
91. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2009; **206**(13):3015–29.
92. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 2010; **236**:219-42.
93. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008; **26**:677-04.
94. Wing K, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand. J. Immunol.* 2005; **62**:1-15.
95. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. 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.* 1998; **10**:1969-80.
96. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 1998; **188**:287-96.
97. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 2003; **197**:403-11.
98. Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 2004; **16**:1769-80.
99. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; **198**:235-47.
100. Putnam AL, Brusko TM, Lee MR, Liu W, Szot GL, Ghosh T, Atkinson MA, Bluestone JA. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2009; **58**(3):652-62.

-
101. Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 2003; **198**:249-58.
102. Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. 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.* 2004; **16**:1189-201.
103. Klein L, Khazaie K, von Boehmer H. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; **100**:8886-91.
104. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2002; **3**:33-41.
105. McGuirk P, McCann C, Mills KH. 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.* 2002; **195**:221-31.
106. Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, Romani L. B7/CD28-dependent CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J. Immunol.* 2002; **169**:6298-08.
107. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002; **420**:502-07.
108. Suffia IJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J. Exp. Med.* 2006; **203**:777-88.
109. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook G, Walker C. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergenspecific regulatory T-cells. *Nat. Med.* 2002; **8**:625-29.
110. van Maurik A, Herber M, Wood KJ, Jones ND. Cutting edge: CD4⁺ CD25⁺ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8⁺ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J. Immunol.* 2002; **169**:5401-04.
111. Ochando JC, Yopp AC, Yang Y, Garin A, Li Y, Boros P, Llodra J, Ding Y, Lira SA, Krieger NR, Bromberg JS. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2005; **174**:6993-05.
112. Pacholczyk R, Kern J, Singh N, Iwashima M, Kraj P, Ignatowicz L. Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity.* 2007; **27**:493-04.
113. Stephens GL, Shevach EM. Foxp3⁺ regulatory T cells: selfishness under scrutiny. *Immunity.* 2007; **27**:417-19.
114. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25⁺ CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 2004; **199**:1467-77.
115. Yu P, Gregg RK, Bell JJ, Ellis JS, Divekar R, Lee HH, Jain R, Waldner H, Hardaway JC, Collins M, Kuchroo VK, Zaghoulani H. Specific T regulatory cells display broad suppressive

functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J. Immunol.* 2005; **174**:6772–80.

116. Tanchot C, Vasseur F, Pontoux C, Garcia C, Sarukhan A. Immune regulation by self-reactive T cells is antigen specific. *J. Immunol.* 2004; **172**:4285–91.

117. Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* 2006; **7**:83–92.

118. Sansom DM, Walker LS. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol. Rev.* 2006; **212**:131–48.

119. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 2002; **3**:135–42.

120. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002; **16**:311–23.

121. van Maren WW, Jacobs JF, de Vries IJ, Nierkens S, Adema GJ. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology.* 2008; **124**:445–52.

122. Dai J, Liu B, Li Z. Regulatory T cells and Toll-like receptors: what is the missing link? *Int. Immunopharmacol.* 2009; **9**:528–33.

123. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2006; **116**:485–94.

124. Rudensky AY, Campbell DJ. In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 2006; **203**:489–92.

125. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003; **4**:1206–12.

126. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, R. Burgess R, Slingluff CL, Mellor AL. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* 2002; **297**:1867–70.

127. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 2005; **174**:1783–86.

128. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 2001; **194**:629–44.

129. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; **101**:10398–03.

-
130. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 2004; **34**:2480-88.
131. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* 2001; **166**:3008-18.
132. Asseman C, Mauze S, M. W. Leach MW, R. L. Coffman RL, and F. Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 1999; **190**:995-1004.
133. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; **2**:389-400.
134. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; **4**:665-74.
135. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 2007; **204**:1257-65.
136. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007; **450**:566-69.
137. Bajenoff M, Germain RN. Seeing is believing: a focus on the contribution of microscopic imaging to our understanding of immune system function. *Eur. J. Immunol.* 2007; **37**:S18–S33.
138. Gretz, JE, Anderson AO, Shaw S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol. Rev.* 1997; **156**:11–24.
139. Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; **17**:399–433.
140. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, H.L. Tang HL, Luther SA, and Ngo VN. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Revs.* 2000; **176**:181–93.
141. von Andrian UH, and Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph node. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; **3**:867–78.
142. Katakai T, Suto H, Sugai M, Gonda H, Togawa A, Suematsu S, Ebisuno Y, Katagiri K, Kinashi T, Shimizu A. Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 2008; **181**:6189–200.
143. Anderson AO, Anderson ND. Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immunology* 1976; **31**:731–48.
144. Cueni LN, Detmar M. The lymphatic system in health and disease. *Lymphat. Res. Biol* 2008; **6**:109–22.

-
145. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system.. *Nat Rev Immunol.* 2009; **9**(9):618-29.
146. Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity.* 2006; **25**: 989-1001.
147. Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, Pinner SE, Bellemare-Pelletier A, Curry MS, Collier AR, Boyd RL, Turley SJ. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J. Exp. Med.* 2010; **207**(4):689-97.
148. Cyster JG. Chemokine and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* 1999; **286**:2098-102.
149. Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, Proudfoot AEI, Shaw S. Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J. Exp. Med.* 2000; **192**:1425-40.
150. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat. Immunol.* 2007; **8**:1255-65.
151. Anderson AO, Shaw S. T cell adhesion to endothelium: the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node. *Semin. Immunol.* 1993; **5**:271–82.
152. Nolte MA, Beliën JA, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WW, van Rooijen N, Kraal G, Mebius RE. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *J. Exp. Med.* 2003; **198**(3):505-12.
153. Katakai T, Hara T, Lee JH, Gonda H, Sugai M and Shimizu A. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int. Immunol.* 2004; **16**: 1133–42.
154. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three- dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2002; **14**:633–39.
155. Van Vliet E, Melis M, Foidart JM, Van Ewijk W. Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.* 1986; **34**:883–90.
156. Farr AG, Berry ML, Kim A, Nelson AJ, Welch MP, Aruffo A. Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med.* 1992; 176(5):1477-82.
157. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95(1):258-63.
158. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Eklund EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature.* 1998; **391**(6669):799-03.

-
159. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007; **27**:190–202.
160. Balogh P, Horvath G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 2004; **52**:1287–98.
161. Mueller SN, Ahmed R. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol.Rev.* 2008; **224**:284–94.
162. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, Mebius RE, von Andrian UH, Carroll MC. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity*. 2009; **30**(2):264-76.
163. Willard-Mack CL. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol. Pathol.* 2006; **34**:409–24.
164. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 2001; **194**(1):45-56.
165. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; **5**:617–28.
166. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today*. 1995; **16**:449–57.
167. Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*. 2002; **296**: 1869–73.
168. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 2004; **427**:154–59.
169. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the *ELC* gene in the *plt/plt* mouse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; **97**:12694–99.
170. Bajenoff M, Glaichenhaus N, Germain RN. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J. Immunol.* 2008; **181**:3947–54.
171. Okada T, Cyster JG. CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J. Immunol.* 2007; **178**:2973–78.
172. Worbs T, Mempel TR, Bolter J, von Andrian UH, Forster R. CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2007; **204**: 489–95.
173. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; **23**:127–59.
174. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature Immunol.* 2007; **8**:1295–01.

-
175. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*. 2005; 309(5741):1735-39.
176. Lo CG, Xu Y, Proia RL, and Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* 2005; **201**:291–01.
177. Pham TH, Okada T, Matloubian M, Lo CG and Cyster JG. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G α i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity*. 2008; **28**:122–33.
178. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004; **427**(6972):355-60.
179. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells *in vivo*. *Nature Immunol.* 2000; **1**:426–32.
180. Goldrath AW, Bogatzki LY, and Bevan MJ. Naïve T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exp. Med.* 2000; **192**:557–64.
181. Dummer W, Ernst B, LeRoy E, Lee D, Surh C. Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J. Immunol.* 2001; **166**:2460–68.
182. Zhou Y-W, Aritake S, Tri Endharti A, Wu J, Hayakawa A, Nakashima I, Suzuki H. Murine lymph node-derived stromal cells effectively support survival but induce no activation/proliferation of peripheral resting T cells *in vitro*. *Immunology*. 2003; **109**: 496–03.
183. Repass JF, Laurent MN, Carter C, Reizis B, Bedford MT, Cardenas K, Narang P, Coles M, Richie ER. IL7-hCD25 and IL7-Cre BAC transgenic mouse lines: new tools for analysis of IL-7 expressing cells. *Genesis*. 2009; **47**(4):281-87.
184. Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2004; **200**: 783–795.
185. Woodland RT, Schmidt MR, and Thompson CB. B_LyS and B cell homeostasis. *Semin. Immunol.* 2006; **18**:318–26.
186. Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB, Sorokin L. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity*. 2005; **22**(1):19-29.
187. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B. Dynamics and function of Langerhans cells *in vivo*: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*. 2005; **22**(5):643-54.
188. Flanagan K, Moroziewicz D, Kwak H, Horig H, Kaufman HL. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4⁺ T cells. *Cell. Immunol.* 2004; **231**:75–84.
189. Friedman RS, Jacobelli J, Krummel MF. Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation. *Nature Immunol.* 2006; **7**:1101–08.

-
190. Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, Ruedl C, Lässig U, Beerli RR, Dietmeier K, Ivanova L, Pfister T, Vogt L, Nakano H, Nembrini C, Saudan P, Kopf M, Bachmann MF. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*. 2005; **22**(4):493-05.
191. Yanagawa Y, Onoe K. CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood*. 2003; **101**:4923–29.
192. Anderson AO, and Shaw S. Conduit for privileged communications in the lymph node. *Immunity*. 2005; **22**:3–5.
193. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr, Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Immunol*. 2007; **9**:54–62.
194. Junt T, Moseman EA, Iannacone M, Massberg S, Lang PA, Boes M, Fink K, Henrickson SE, Shayakhmetov DM, Di Paolo NC, van Rooijen N, Mempel TR, Whelan SP, von Andrian UH. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature*. 2007; **450**(7166):110-14.
195. Hall JG, Morris B. The immediate effect of antigens on the cell output of a lymph node. *Br. J. Exp. Pathol*. 1965; **46**(4):450-54.
196. Shioh LR, Rosen DB, Brdicková N, Xu Y, An J, Lanier LL, Cyster JG, Matloubian M. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*. 2006; **440**(7083):540-44.
197. Soderberg KA, Payne GW, Sato A, Medzhitov R, Segal SS, Iwasaki A. Innate control of adaptive immunity via remodeling of lymph node feed arteriole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2005; **102**(45):16315-20.
198. Anderson ND, Anderson AO, Wyllie RG. Microvascular changes in lymph nodes draining skin allografts. *Am. J. Pathol*. 1975; **81**:131–60.
199. Angeli V, Ginhoux F, Llodrà J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, Merad M, Randolph GJ. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity*. 2006; **24**(2):203-15.
200. Chyou S, Ekland EH, Carpenter AC, Tzeng TC, Tian S, Michaud M, Madri JA, Lu TT. Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. *J. Immunol*. 2008; **181**(6):3887-96.
201. Mueller SN, Hosiawa-Meagher KA, Konieczny BT, Sullivan BM, Bachmann MF, Locksley RM, Ahmed R, Matloubian M. Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science*. 2007; **317**(5838):670-44.
202. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nature Rev. Immunol*. 2007; **7**:543–55.
203. Gardner JM, Devoss JJ, Friedman RS, Wong DJ, Tan YX, Zhou X, Johannes KP, Su MA, Chang HY, Krummel MF, Anderson MS. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science*. 2008; **321**(5890):843-47.

-
204. Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, Heath JK, Turley SJ. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 2007; **8**(2):181-90.
205. Katunuma N, Kakegawa H, Matsunaga Y, Nikawa T, Kominami E. Katunuma N, Kakegawa H, Matsunaga Y, Nikawa T, Kominami E. Different functional share of individual lysosomal cathepsins in normal and pathological conditions. *Agents Actions Suppl.* 1993; **42**:195-10.
206. Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Invest.* 2010; **120**(10):3421-31.
207. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2008; **36**:D320–25.
208. Jean D, Hermann J, Rodrigues-Lima F, Barel M, Balbo M, Frade R. Identification on melanoma cells of p39, a cysteine proteinase that cleaves C3, the third component of complement: amino-acid-sequence identities with procathepsin L. *Biochem J.* 1995; **312**(Pt 3):961-69.
209. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys Acta.* 2000; **1477**(1-2):98-111.
210. Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R, Peters C. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* 2000; **14**(13):2075-86.
211. Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie.* 2008; **90**(2):194–07.
212. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; **6**(10):764–75.
213. Katunuma N. Mechanisms and regulation of lysosomal proteolysis. *Revisiões Sobre Biología Celular.* 1989; **20**:35–61.
214. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 1991; **285**(2):213-9.
215. Guncar G, Pungercic G, Klemencic I, Turk V, Turk D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J.* 1999; **18**(4):793-03.
216. Lah TT, Hawley M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett.* 1995; **363**(1-2):85-9.
217. Walz M, Kellermann S, Bylaite M, Andrée B, Ruther U, Paus R, Kloepper JE, Ruzicka T. Expression of the human Cathepsin L inhibitor hurpin in mice: skin alterations and increased carcinogenesis. *Experimental Dermatology.* 2007; **16**(9):715–23.

-
218. Stahl S, Reinders Y, Asan E, Mothes W, Conzelmann E, Sickmann A, Felbor U. Proteomic analysis of cathepsin B- and L-deficient mouse brain lysosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; **1774**(10):1237–46.
219. Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradzky, K. F., Toneff, T., Bunday, R., Miller, R., Schilling, B., Petermann, I., Dehnert, J., Logvinova, A., Goldsmith, P., Neveu, J. M., Lane, W. S., Gibson, B., Reinheckel, T., Peters, C., Bogyo, M., Hook, V. Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; **100**:9590-95.
220. Hook V, Funkelstein L, Toneff T, Mosier C, Hwang SR. Human pituitary contains dual cathepsin L and prohormone convertase processing pathway components involved in converting POMC into the peptide hormones ACTH, alpha-MSH, and beta-endorphin. *Endocrine*. 2009; **35**:429-37.
221. Stypmann J, Gläser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R, Mönnig G, Haverkamp W, Breithardt G, Schmahl W, Peters C, Reinheckel T. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; **99**:6234–39.
222. Petermann I, Mayer C, Stypmann J, Biniossek ML, Tobin DJ, Engelen MA, Dandekar T, Grune T, Schild L, Peters C, Reinheckel T. Lysosomal, cytoskeletal, and metabolic alterations in cardiomyopathy of cathepsin L knockout mice. *FASEB. J.* 2006; **20**:1266–68.
223. Tang Q, Cai J, Shen D, Bian Z, Yan L, Wang YX, Lan J, Zhuang GQ, Ma WZ, Wang W. Lysosomal cysteine peptidase cathepsin L protects against cardiac hypertrophy through blocking AKT/GSK3beta signaling. *J. Mol. Med.* 2009; **87**:249-60.
224. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, Vajkoczy P, Hofmann WK, Peters C, Pennacchio LA, Abolmaali ND, Chavakis E, Reinheckel T, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat. Med.* 2005; **11**:206–13.
225. Wright WW, Smith L, Kerr C, Charron M. Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. *Biology of Reproduction* . 2003; **68**(2):680–87.
226. Duncan EM, Muratore-Schroeder TL, Cook RG, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell*. 2008; **135**(2):284–94.
227. Goulet B, Baruch A, Moon NS, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A, Bogyo M, Neveu A. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol. Cell*. 2004; **14**(2):207–19.
228. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; **11**(9):1251–66.
229. Maciewicz RA, Etherington DJ. A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem. J.* 1988; **256**(2):433-40.
230. Krieger NS, Sukhatme VP, Bushinsky DA. Conditioned medium from ras oncogene-transformed NIH 3T3 cells induces bone resorption in vitro. *J. Bone. Miner. Res.* 1990; **5**(2):159-64.

-
231. Hamilton RT, Bruns KA, Delgado MA, Shim JK, Fang Y, Denhardt DT, Nilsen-Hamilton M. Developmental expression of cathepsin L and c-rasHa in the mouse placenta. *Mol. Reprod. Dev.* 1991; **30**(4):285-92.
232. Burke MA, Hutter D, Reshamwala RP, Knepper JE. Cathepsin L plays an active role in involution of the mouse mammary gland.. *Dev. Dyn.* 2003; **227**(3):315-22.
233. Dennemärker J, Lohmüller T, Mayerle J, Tacke M, Lerch MM, Coussens LM, Peters C, Reinheckel T. Deficiency for the cysteine protease cathepsin L promotes tumor progression in mouse epidermis. *Oncogene.* 2010; **29**(11):1611-21.
234. Lankelma JM, Voorend DM, Barwari T, Koetsveld J, Van der Spek AH, De Porto AP, Van Rooijen G, Van Noorden CJ. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci.* 2010; **86**(7-8):225-33.
235. Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science.* 1998; **280**:450–453.
236. Hsieh CS, deRoos P, Honey K, Beers C, Rudensky AY. A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J. Immunol.* 2002; **168**(6):2618-25.
237. Honey K, Benlagha K, Beers C, Forbush K, Teyton L, Kleijmeer MJ, Rudensky AY, Bendelac A. Thymocyte expression of cathepsin L is essential for NKT cell development. *Nat. Immunol.* 2002; **3**(11):1069-74.
238. Chapman HA. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; **10**(1):93-102.
239. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature.* 1990; **345**(6276):615-18.
240. Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, Nilsson T, Karlsson L, Schmid SL, Quaranta V, Peterson PA. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature.* 1990; **348**(6302):600-05.
241. Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell.* 1996; **84**(4):505-07.
242. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell.* 1993; **72**(4):635-48.
243. Bikoff EK, Huang LY, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* 1993; **177**(6):1699-12.
244. Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA, Rudensky AY. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* 1999; **10**(2):207-17.

-
245. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*. 1999; **10**(2):197-206.
246. Nepomnaschy I, Lombardi G, Bekinschtein P, Berguer P, Francisco V, de Almeida J, Buggiano V, Pasqualini CD, Piazzon I. Alterations during positive selection in the thymus of nackt CD4-deficient mice. *Scand. J. Immunol.* 2000; **52**(6):555-62.
247. Nakagawa TY, Rudensky AY. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 1999; **172**:121-79.
248. Kovats S, Grubin CE, Eastman S, deRoos P, Dongre A, Van Kaer L, Rudensky AY. Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes in vivo. *J. Exp. Med.* 1998; **187**(2):245-51.
249. Tourne S, Miyazaki T, Wolf P, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Functionality of major histocompatibility complex class II molecules in mice doubly deficient for invariant chain and H-2M complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; **94**(17):9255-60.
250. Barton GM, Rudensky AY. Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. *Science*. 1999; **283**(5398):67-70.
251. Zhang T, Maekawa Y, Sakai T, Nakano Y, Ishii K, Hisaeda H, Kominami E, Katunuma N, Asao T, Himeno K. Splenic cathepsin L is matured from the proform by interferon-gamma after immunization with exogenous antigens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; **283**(2):499-506.
252. Benavides F, Giordano M, Fiette L, Bueno Brunialti AL, Martin Palenzuela N, Vanzulli S, Baldi P, Schmidt R, Dosne Pasqualini C, Guénet J. Nakt (nkt), a new hair loss mutation of the mouse with associated CD4 deficiency. *Immunogenetics*. 1999; **49**(5):413-19.
253. Benavides F, Venables A, Poetschke Klug H, Glasscock E, Rudensky A, Gómez M, Martin Palenzuela N, Guénet JL, Richie ER, Conti CJ. The CD4 T cell-deficient mouse mutation nackt (nkt) involves a deletion in the cathepsin L (CtsL) gene. *Immunogenetics*. 2001; **53**(3):233-42.
254. Chauhan SS, Popescu NC, Ray D, Fleischmann R, Gottesman MM, Troen BR. Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**(2):1039-45.
255. Lombardi G, Burzyn D, Mundiñano J, Berguer P, Bekinschtein P, Costa H, Castillo LF, Goldman A, Meiss R, Piazzon I, Nepomnaschy I. Cathepsin-L influences the expression of extracellular matrix in lymphoid organs and plays a role in the regulation of thymic output and of peripheral T cell number. *J. Immunol.* 2005; **174**(11):7022-32.
256. Dufour E. Sequence homologies, hydrophobic profiles and secondary structures of cathepsins B, H and L: comparison with papain and actinidin. *Biochimie*. 1988; **70**(10):1335-42.
257. Smith SM, Gottesman MM. Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**(34):20487-95.
258. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-fontes MF, Rebelo M and Demengeot J. 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.* 2005; **102**:4091-96.

-
259. Fisson S, Darrasse-Jèze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J. Exp. Med.* 2003; **198**(5):737-46.
260. Sugita S, Horie S, Nakamura O, Futagami Y, Takase H, Keino H, Aburatani H, Katunuma N, Ishidoh K, Yamamoto Y, Mochizuki M. Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. *J. Immunol.* 2008; **181**(11):7525-36.
261. Kaldjian EP, Gretz JE, Anderson AO, Shi Y and Shaw S. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. *Int. Immunol.* 2001; **13**:1243-53.
262. LeBedis C, Chen K, Fallavollita L, Boutros T, Brodt P. Peripheral lymph node stromal cells can promote growth and tumorigenicity of breast carcinoma cells through the release of IGF-I and EGF. *Int. J. Cancer.* 2002; **100**:2-8.
263. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008; **29**(6):848-62.
264. Marrack P, Kappler J. Control of T cell viability. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; **22**: 765-87.
265. Pandiyan P, Lenardo MJ. The control of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell survival. *Biol. Direct.* 2008; **3**:6.
266. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* 2001; **166**(5):3008-18.
267. Maehr R, Mintern JD, Herman AE, Lennon-Duménil AM, Mathis D, Benoist C, Ploegh HL. Cathepsin L is essential for onset of autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Clin. Invest.* 2005; **115**(10):2934-43.
268. Hsing LC, Kirk EA, McMillen TS, Hsiao SH, Caldwell M, Houston B, Rudensky AY, LeBoeuf RC. Roles for cathepsins S, L, and B in insulinitis and diabetes in the NOD mouse. *Autoimmun.* 2010; **34**(2):96-104.
269. Chauhan SS, Ray D, Kane SE, Willingham MC, Gottesman MM. Involvement of carboxy-terminal amino acids in secretion of human lysosomal protease cathepsin L. *Biochemistry.* 1998; **37**: 8584-94.
270. Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, and Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-binding protein. *J. Cell Biol.* 1994; **124**: 171-81.
271. Bhat A, Boyadjiev SA, Senders CW, Leach JK. Differential growth factor adsorption to calvarial osteoblast-secreted extracellular matrices instructs osteoblastic behavior. *PLoS One.* 2011; **6**(10):e25990.
272. Jones JJ, Gockerman A, Busby WH Jr, Camacho-Hubner C, Clemmons DR. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J. Cell. Biol.* 1993; **121**: 679-87.

-
273. Pelletier AJ, W. van der Laan LJ, Hildbrand P, Sian MA, Thompson DA, Dawson PE, Torbett BE, and Salomon DR. Presentation of chemokine SDF-1 by fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood*. 2000; 96:2682–90.
274. Yanagawa Y, Iwabuchi K, and Onoe K. Enhancement of stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology*. 2001; 104:43–49.
275. Perandones CE, Illera VA, Peckham D, Stunz LL, Ashman RF. Regulation of apoptosis in vitro in mature murine spleen T cells. *J. Immunol*. 1993; **151**:3521-29.
276. Teague TK, Marrack P, Kappler JW, Vella AT. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J. Immunol*. 1997; **158**: 5791-96.
277. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF- β regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; **101**(13):4572-77.
278. Sugita S, Horie S, Nakamura O, Maruyama K, Takase H, Usui Y, Takeuchi M, Ishidoh K, Koike M, Uchiyama Y, Peters C, Yamamoto Y, Mochizuki M. Acquisition of T regulatory function in cathepsin L-inhibited T cells by eye-derived CTLA-2 α during inflammatory conditions. *J. Immunol*. 2009; **183**(8):5013-22.
279. Lawrence DA, Pircher R, Krcève-Martinerie C, Jullien P. Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J. Cell. Physiol*. 1984; 121(1):**184**-88.
280. Koli K, Saharinen J, Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF- β . *Microsc. Res. Tech*. 2001; 52(4):354-62.
281. Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazzieri R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB, Sakai LY. Latent transforming growth factor β -binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J. Biol. Chem*. 2003; **278**(4):2750-57.
282. Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor- β activation. *Int. J. Biochem Cell. Biol*. 2008; 40(6-7):1068-78.
283. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000; **11**(1-2):59-69.
284. Sheppard D. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor β . *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(3):395-402.
285. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol*. 2010; **108**:111-65.
286. Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol. Rev*. 2010; **234**(1):142-62.
287. Zhou X, Kong N, Zou H, Brand D, Li X, Liu Z, Zheng SG. Therapeutic potential of TGF- β -induced CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2011; **44**(1):43-50.