



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACION DEL PAPEL DE FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF) 1- α EN LA INDUCCIÓN DE
TOLERANCIA *IN VITRO*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

SILVIA ARACELI TEPALE SEGURA



CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
VOCAL: Q.F.B. GIBRAN PEREZ MONTESINOS
SECRETARIO: Q.F.B. LAURA ANTONIO HERRERA
1er. SUPLENTE: M EN C. GUSTAVO OLVERA GARCIA
2° SUPLENTE: M EN C. OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL
SEGURO SOCIAL**

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “DR. BERNARDO SEPÚLVEDA”

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. LAURA ANTONIO HERRERA

FIRMA

SUPERVISOR TÉCNICO:

SUSTENTANTE (S):

SILVIA ARACELI TEPALE SEGURA

FIRMA

INDÍCE

Índice de Abreviaturas.....	i
Índice de Figuras.....	ii
Resumen.....	v
1. Marco Teorico.....	1

Capítulo 1* El reconocimiento de lo propio y lo no propio en el Sistema Inmunológico: Tolerancia Inmunológica.....**1*

1.1 Tolerancia central: Selección y Eliminación de Linfocitos T autorreactivos en Timo.....	1
1.1.1 Papel de las células presentadoras de antígeno en la tolerancia central).....	4
1.2 Tolerancia Periférica: Eliminación de linfocitos T Autorreactivos más allá del timo.....	5
1.2.1 Delección Clonal Periférica: Eliminación de células T autorreactivas en la periferia.....	6
1.2.2 Anergia: Inactivación de las células T autorreactivas.....	6

Capítulo 2* Diferenciación y Función de los Linfocitos T Reguladores**10*

2.1 Mecanismos de Supresión de los Linfocitos T Reguladores.....	10
2.1.1. Supresión por Citocinas Inhibitorias.....	10
2.1.2. Supresión por Citolisis.....	12
2.1.3. Supresión por Disrupción Metabólica.....	13
2.1.4. Supresión por Targeting de Células Dendríticas.....	14
2.2 Linfocitos T R eguladores c omo c élulas clave p ara la T olerancia Inmunológica.....	16

2.3	El Factor de Transcripción Foxp3 es crucial para la diferenciación de los Linfocitos T Reguladores y su Función Supresora.....	18
-----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.3.1.	Inducción de Foxp3 por Estimulación vía TCR y moléculas de Co-estimulación.....	19
---------------	---------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.3.1.1.	Inducción de Foxp3 por Estimulación vía el TCR.	19
----------	-------------------------------------------------	-----------

2.3.1.2.	Inducción de Foxp3 por Moléculas de Co-estimulación.....	21
----------	----------------------------------------------------------	-----------

2.3.2.	Inducción de Foxp3 por Secreción de Citocinas...	21
---------------	--------------------------------------------------	-----------

2.3.3.	Inducción de Foxp3 por HIF-1 α	23
---------------	---------------------------------------------	-----------

<i>Capítulo 3</i>	El Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia y su participación en el sistema inmunológico.....	25
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

<i>Capítulo 4</i>	Las Células Dendríticas son Inductoras de Tolerancia Inmunológica.....	29
-------------------	------------------------------------------------------------------------	-----------

3.	Pregunta de Investigación.....	33
-----------	--------------------------------	-----------

3.1.	Hipótesis.....	33
-------------	----------------	-----------

3.2.	Objetivo General.....	33
-------------	-----------------------	-----------

3.2.1.	Objetivos Particulares.....	33
---------------	-----------------------------	-----------

4.	Materiales y Métodos.....	34
-----------	---------------------------	-----------

5.	Resultados y Discusión.....	36
-----------	-----------------------------	-----------

6.	Conclusiones.....	46
-----------	-------------------	-----------

7.	Bibliografía.....	47
-----------	-------------------	-----------

INDÍCE DE ABREVIATURAS

PAS. Per: proteína del período circadiano/Arnt: proteína translocadora del receptor nuclear Ah /Sim: proteína que regula el desarrollo del sistema nervioso central de Drosophila.

mTOR. Blanco de Rapamicina en Mamíferos

TRAIL-DR5. Factor de Necrosis Tumoral Asociado a Apoptosis por el Ligando de Receptor de Muerte 5

TNF- α . Factor de Necrosis Tumoral α

DIO. Indolamína 2,3 dioxigenasa

Síndrome IPEX. Síndrome de desregulación, poliendocrinopatía y enteropatía inmune ligado al cromosoma X

Camp. Adenosín Monofosfato Cíclico

CTLA-4. Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico

TSAs. Antígenos Propios Específicos de Tejido

cTEC. Célula Epitelial Timo Cortical

mTEC Célula Epitelial Timo Medular

APC. Célula Presentadora de Antígeno

DCs. Células Dendríticas

cDCs. Células Dendríticas Clásicas

iDCs. Células Dendríticas Inflamatorias

pDCs. Células Dendríticas Plasmacitoides

ICOS. Coestimulador Inducible de las Células T

DISC. Complejo Intracelular de Inducción de Muerte Celular

MHC I. Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I

MHC II. Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II

GNC2. Control General No Depresible 2

NFAT. El Factor Nuclear de Activación de Células T

HRE. Elemento de Respuesta a la Hipoxia

CREB. Elemento de Respuesta Cíclico de AMP

ATF-1. Factor activador de la transcripción

TGFβ. Factor de Crecimiento Transformante β

Foxp3. Factor de Transcripción Forhead Box P3

HIF-1α. Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia 1-α

HIF-1. Factor de transcripción inducible por hipoxia 1

SOCS. Familia de Proteínas Supresoras de la Señalización por Citocinas

FASL. Fas Ligando

Sf. Fenotipo Scurfy

IP3K. Fosfatidil Inositol 3 Cinasa

LGALS-1. Galectina -1

LAG3. Gen 3 de Activación de Linfocitos

GARP. Glicoproteína A

GITR. Glucorticoide inducido por el receptor del Factor de Necrosis Tumoral

ITAM. Inmunoreceptor Motivo de Activación de Tirosinas

IL-10. Interleucina 10

IL-2. Interleucina 2

IL-35. Interleucina 35

KO. knockout

Tef. Linfocitos T Efectores

Treg. Linfocitos T Reguladores

pTreg. Linfocitos T reguladores Periféricos

tTreg. Linfocitos T Reguladores Tímicos

LPS. Lipopolisacárido

AICD. Muerte Celular Inducida por Activación

Nrp-1. Neuropilina-1

PHD-2. Prolil hidroxilasa 2

PHDs. Prolil hidroxilasas

AKT. Proteína Cinasa B

pVHL. Proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau

A2AR. Receptor de Adenosina 2A

TCR. Receptor de Células T

PD-1. Receptor de Muerte Programada

TLRs. Receptores Tipo Toll

AIRE. Regulador Autoinmune

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Tolerancia Central de Linfocitos T.....	3
Figura 2. Mecanismos de Supresión de las Treg.....	15
Figura 3. Diferenciación de Treg y la inducción de Foxp3 en timo y periferia.....	23
Figura 4. El inhibidor específico de la PHD2 IOX-2 induce la acumulación de HIF-1 α en linfocitos T activados.....	27
Figura 5. Estrategia de análisis.....	36
Figura 6. Proliferación de Linfocitos T CD4+ DO11.10+.....	38
Figura 7. La expresión de HIF-1 α y Foxp3 es dependiente de la estimulación de el TCR <i>in vitro</i>	39
Figura 8. La acumulación de HIF-1 α incrementa el porcentaje de células Foxp3+ <i>in vitro</i>	41
Figura 9. El inhibidor de PHD-2 IOX2 no afecta la activación de DCs <i>in vitro</i>	43
Figura 10. El uso del inhibidor de PHD-2 IOX2 no estabiliza a HIF-1 α en las DCs.....	44

RESÚMEN

Los linfocitos T reguladores (Treg), que se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FOXP3 están implicados en la atenuación de la respuesta inmune y son un factor clave en el mantenimiento de la homeostasis de la misma impidiendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Para que la diferenciación de linfocitos T se lleva a cabo es fundamental la participación de tres señales que actúan a los linfocitos T: activación vía el TCR, co-estimulación y activación por citocinas, las cuales son proporcionadas por Células Dendríticas (DCs) con características de activación parcial.

El estado de activación de las DCs puede ser regulado por HIF-1 α a través de la regulación de moléculas de co-estimulación como CD80/CD86 y CD40. Otro blanco de regulación por HIF-1 α es FOXP3. Estos hallazgos se han demostrado en modelos de eliminación de la expresión de HIF-1 α y en modelos de hipoxia, sin embargo desconocemos si la acumulación transitoria de HIF-1 α , con agentes farmacológicos en condiciones de normoxia, puede promover la diferenciación de los linfocitos Treg vía la regulación de la activación de DCs.

Con base en estos antecedentes el objetivo de este trabajo es determinar si el estado de activación de las DCs puede ser regulado por HIF-1 α y a su vez influir en la diferenciación de linfocitos Treg en condiciones de normoxia en un modelo antígeno específico. Los resultados muestran que la activación de las DCs no es un blanco de acción de HIF-1 α en este modelo experimental al no alterar la expresión de moléculas como CD40, CD86 y MHC-II. Sin embargo este factor de transcripción mostro tener un efecto directo sobre el linfocito T favoreciendo la proliferación/diferenciación de linfocitos Treg en un modelo antígeno específico en condiciones de normoxia.

1. MARCO TEÓRICO

Capítulo 1 El reconocimiento de lo propio y lo no propio en el Sistema Inmunológico: Tolerancia Inmunológica.

En el timo, las células T se desarrollan para formar un repertorio funcional de Receptores de Células T (TCRs). Las células T producto de este proceso tienen la capacidad de reconocer antígenos presentados en Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Los antígenos reconocidos pueden provenir de proteínas expresadas por microorganismos o por células del propio organismo (autoantígenos).¹

Las células T que tienen la capacidad de reaccionar en contra de antígenos propios son denominadas "clonas autorreactivas". La activación descontrolada de estas células puede ocasionar daño al tejido y el desarrollo de enfermedades autoinmunes¹.

Una cuestión clave en inmunología es entender cómo el sistema inmunológico es capaz de inhibir respuestas autoinmunes pero permitiendo respuestas inmunes eficaces contra antígenos microbianos, es decir la capacidad de distinguir entre lo propio y lo exógeno.

Aunque durante el desarrollo de los linfocitos T se generan clonas autorreactivas, el sistema inmune es capaz de evitar que dichas células ocasionen daño a los tejidos impidiendo así el desarrollo de enfermedades autoinmunes. El proceso mediante el cual el sistema inmune evita el daño al propio es denominado Tolerancia Inmunológica.²

La tolerancia inmunológica es un proceso que consta de dos componentes principales denominados: Tolerancia central y tolerancia periférica.^{3 4} Algunos de los mecanismos que participan en dichos procesos son: selección clonal anergia y supresión. Este último dependiente de un tipo de linfocitos T denominados Linfocitos T reguladores (Treg).⁵

1.1 Tolerancia central: Selección y Eliminación de Linfocitos T autorreactivos en Timo.

La tolerancia central tiene lugar en el timo y consiste en la eliminación de las clonas autorreactivas antes de que termine su maduración y dichas células salgan a circulación.¹

El timo está compuesto anatómicamente por dos áreas principales: la región externa conocida como corteza y la región interna denominada médula.¹ Ambos compartimentos contienen nichos de selección que coordinan la segregación temporal y la selección de timocitos.¹

En la corteza inicia la maduración de los timocitos, en primer lugar aquellos con TCRs con baja o nula afinidad por péptidos propios unidos a moléculas del MHC propias sufren un tipo de muerte celular denominado "Muerte por Negligencia".² En segundo lugar se lleva a cabo la selección positiva, durante la cual células especializadas presentan antígenos propios a los timocitos en moléculas del MHC clase I y II. Durante este proceso sólo las interacciones TCR-Antígeno-MHC con afinidad intermedia permiten la supervivencia de la célula. Es esta etapa también se define el compromiso hacia un linaje determinado, ya sea, CD4 ó CD8^{6,7}. **(Figura.1)**

La selección negativa de las células T sucede en la médula y consiste en la muerte celular por apoptosis de los linfocitos T que expresan TCRs con alta afinidad a autoantígenos.² **(Figura.1)**. Otra posibilidad para los linfocitos T que expresan TCRs con alta afinidad por péptidos

propios e s su " rescate" para d iferenciarse e n l infocitos Treg, s in embargo los mecanismos que determinan la muerte o supervivencia de estas clonas es aún desconocido⁸

En lo s procesos d e se lección n egativa y p ositiva, a sí c omo e n la generación d e lin focitos T reg tím icos, la participación d e c élulas presentadoras de antígeno (APC) es crucial para el reconocimiento de autoantígenos por e l TCR. E n e l siguiente apartado se hablará del papel de cada uno de los tipos de APCs implicados en la tolerancia central.

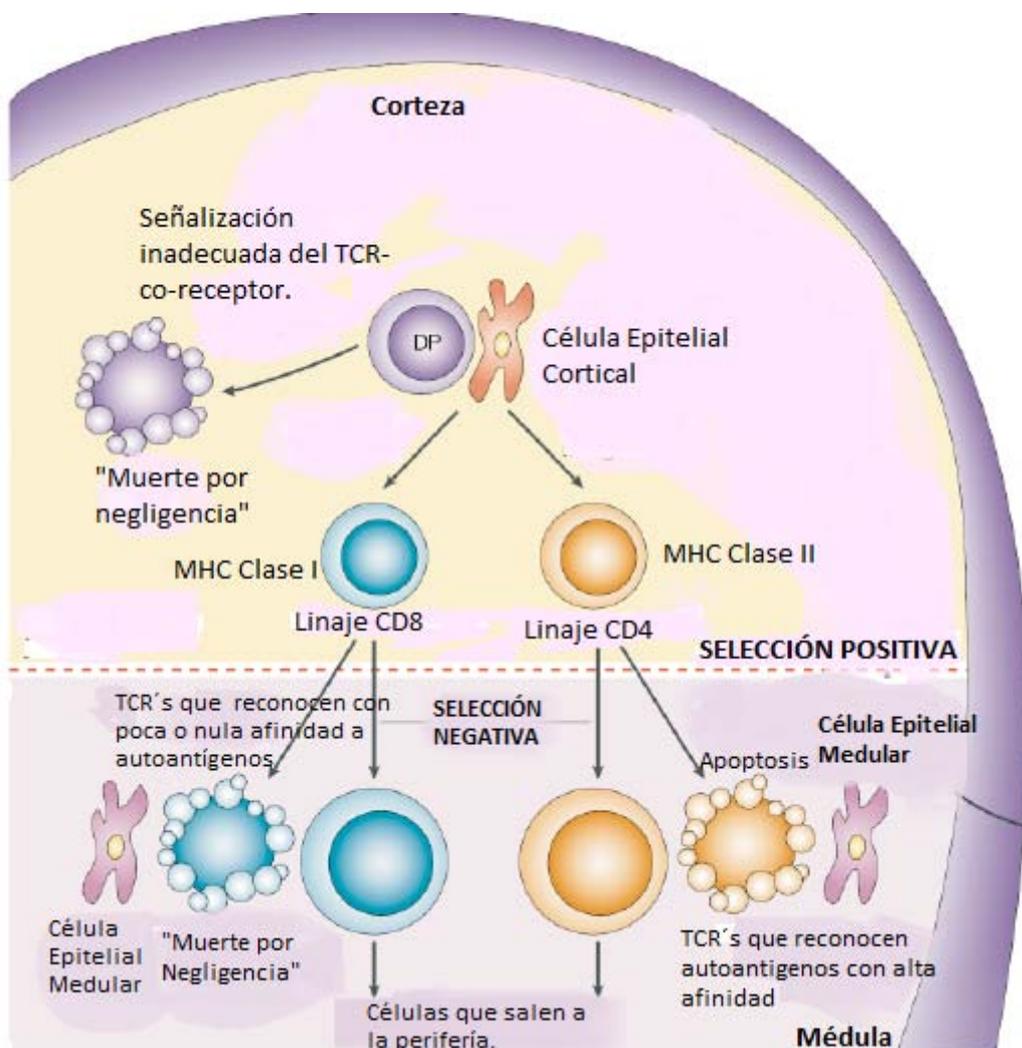


Figura 1. Tolerancia Central de Linfocitos T. La tolerancia central se realiza por medio de dos mecanismos: la selección positiva en la cual se generan timocitos simples positivos (SP) para obtener linfocitos CD4 O CD8 y a su vez se determina si las células T presentan un TCR funcional que permita seguir con el proceso de selección, y la selección negativa en la cual se eliminan los timocitos con baja o nula afinidad por autoantígenos, los linfocitos T con alta afinidad por antígenos

propios así como las células T autoreactivas. Una vez terminado este proceso los linfocitos T salen a la periferia. Modificado de Germain. 2012 Nat Rev Immunol.

1.1.1 Papel de las Células Presentadoras de Antígeno en la tolerancia central.

La regulación de la tolerancia inmunológica depende en gran medida de la participación de APCs especializadas en la presentación de antígenos propios y con la capacidad de proveer las señales involucradas en cada etapa de la tolerancia central.

Las células epiteliales timicas corticales (cTEC) son un tipo de APC que participan activamente en el proceso de tolerancia central. Estas células proveen el microambiente necesario para la generación de linfocitos dobles positivos (CD4+, CD8+), que a su vez se convertirán en linfocitos sencillos positivos CD4 o CD8. La generación de células DP se debe a la capacidad de las cTEC para expresar moléculas del MHC de clase I y II.⁹ A su vez dichas células promueven el movimiento de los timocitos a la médula tímica para llevar a cabo la selección negativa.¹⁰

Por otro lado las células epiteliales tímicas medulares (mTEC) participan de manera crucial en el proceso de tolerancia central, ya que son las únicas APCs en timo capaces de expresar antígenos propios específicos de tejido (TSAs).⁹ Esta capacidad es debida a la expresión del factor de transcripción denominado "Regulador Autoinmune" (AIRE). En las mTEC AIRE promueve la expresión de un amplio repertorio de TSAs.¹¹ Además, Las mTEC también expresan moléculas co estimulatorias como CD40, CD80 y CD86.¹² Estas características en conjunto le permiten mediar eficientemente la delección clonal de células T reactivas a TSAs.

Además de la presencia de mTEC en médula tímica también se ha descrito la existencia de Células Dendríticas (DCs), las cuales han demostrado ser fundamentales en la inducción de tolerancia central. En trabajos realizados por Donskoy y Goldschneider se encontró la existencia de dos subpoblaciones de DCs en timo, la primera de ellas

se desarrolla en tимо mientras que la segunda es derivada de DCs en la periferia que migran a tимо.¹³ Se ha sugerido que estas dos poblaciones pueden tener diferencias funcionales para inducir la supresión de clonas autorreactivas. En un modelo propuesto por Goldschneider y Cone se describió que las DCs originadas en tимо son capaces de inducir selección clonal, mientras que las DCs extratímicas son capaces de regular la selección positiva y generar Treg.¹⁴ A su vez se ha demostrado que *in vivo* las DCs tímicas son capaces de realizar presentación cruzada contribuyendo a la inducción de tolerancia en células CD4⁺ y CD8⁺. En línea con esto se ha encontrado que las Dcs al igual que las mTEC son capaces de presentar TSAs eliminando clonas autorreactivas.¹⁵

Estas diferencias en la ontogenia de las diferentes tipos de APCs que se encuentran en timento les brinda la oportunidad a las diversas poblaciones celulares de adquirir una especialización funcional.

1.2 Tolerancia Periférica: Eliminación de Linfocitos T Autorreactivos más allá del timento

Pese a que los mecanismos de tolerancia central son eficientes algunas clonas de Linfocitos T autorreactivos “escapan” los procesos de selección positiva y negativa, en parte porque no todos los auto-antígenos son expresados en el sitio primario donde se lleva a cabo el desarrollo de los linfocitos.

Para eliminar a las clonas autorreactivas presentes en circulación existen mecanismos de tolerancia en la periferia los cuales son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmune. Este proceso en la periferia es mediado por tres mecanismos principales: selección clonal, anergia y supresión.³

1.2.1 Delección Clonal Periférica: Eliminación de células T autorreactivas en la periferia

La delección de los linfocitos T autorreactivos en periferia como en timo se consigue por la inducción de la muerte celular apoptótica de dichas células. En la periferia, la participación de moléculas como FAS (moléculas implicadas en la señalización para inducción de muerte celular) y FAS ligando (FASL) es importante para mediar la apoptosis de los linfocitos T autorreactivos.¹⁶

Fas (CD95) es un receptor que contiene un dominio intracelular capaz de inducir muerte celular, el cual puede ser activado por su ligando FasL (CD178).¹⁶ Dos cepas de ratón que presentan mutaciones en Fas (Ratones lpr) o FasL (Ratones gld) muestran una acumulación anormal de células T y llegan a desarrollar linfadenopatía progresiva y esplenomegalia.¹⁷

Las células T expresan Fas y la expresión de su ligando (FasL) es inducida después de su activación por antígenos e IL-2. La activación de Fas desencadena la formación de un complejo intracelular que induce la muerte celular (DISC); el cual activa la caspasa 8 que a su vez activa otras caspasas efectoras promoviendo la apoptosis. Esta vía de apoptosis es llamada muerte celular inducida por activación (AICD).¹⁶ Se ha demostrado que ésta vía de muerte celular es crítica para la delección de células T que han sido estimuladas por antígenos propios *in vivo*.¹⁸

1.2.2 Anergia: Inactivación de las células T autorreactivas

La anergia de células T es un mecanismo de tolerancia periférica que se caracteriza por la inactivación funcional de las células T tras el reconocimiento de un antígeno en ausencia de señales de coestimulación, generalmente mediadas por CD28.¹⁹ En estas condiciones las células T no pueden ser completamente activadas, en consecuencia presentan un estado caracterizado por la falta de respuesta a la estimulación a través del TCR, lo que impide la proliferación celular y la secreción de citocinas cuando existe un

segundo encuentro con el antígeno.²⁰ En general la anergia es regulada por moléculas como CD28, PDL-1 y CTLA-4, de las cuales se hablará a detalle más adelante.

La variable más importante para decidir el destino de las células T después de su encuentro con su antígeno y de terminar si será una célula efectora o una célula anérgica es la presencia de señales de coestimulación proporcionadas por la unión de CD28 a sus ligandos, CD80 y CD86 expresados en la membrana de APCs.²¹ La señalización dada por CD28 es crítica para la activación, proliferación y supervivencia de los linfocitos T, en ausencia de estas señales o en presencia de señales inadecuadas no es posible la activación de las cascadas de señalización necesarias para la proliferación de células T.

Una de estas cascadas es la vía PI3K/AKT-mTOR; la importancia de mTOR (receptor blanco de rapamicina en mamíferos) como regulador del destino de las células T ha sido observada en estudios realizados recientemente en modelos de ratón deficientes en componentes del complejo de mTOR.²² La activación de la vía AKT-mTOR es requerida para encender la maquinaria metabólica de las células T regulada a través de la glucólisis y el transporte de nutrientes. Esto establece las bases para la óptima activación, proliferación y diferenciación de las células T.²⁰

Se ha demostrado que la inhibición de mTOR con rapamicina es suficiente para inducir anergia en células T, aún después de la activación con CD3 y CD28.²³ A su vez, estudios recientes muestran que varias vías energéticas pueden participar en la inducción de anergia de células T inhibiendo la activación de mTOR.^{24 25} Estas incluyen la privación de nutrientes o vías independientes de mTOR, tales como el Control General no Depresible 2 (GNC2), una vía de detección de aminoácidos y la señalización de adenosina a través del receptor A2A (A2AR).²⁵

Por otra parte, receptores de co-inhibición como el receptor de muerte programada 1 (PD-1) también juegan un papel importante en la anergia de linfocitos T. PD-1, también conocido como CD279 es un miembro de la familia CD28 que se expresa en células B y T activadas mientras que sus ligandos PD-L1 y PD-L2 tienen diferentes patrones de expresión.²⁶ PD-L2 es expresado de manera inducible sobre todo en DCs y monocitos, mientras que, PD-L1 es expresado constitutivamente en células T, APCs y muchos tipos de células no hematopoyéticas incluyendo células vasculares endoteliales, células de los islotes pancreáticos y neuronas.²⁷

Las señales inhibitorias mediadas por PD-1 dependen de la fuerza en la señal de activación de TCR, resultando en una inhibición más potente cuando existe una baja estimulación del TCR.²⁸ La interacción entre el TCR y PD-1 conduce al reclutamiento de las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, las cuales desfosforilan moléculas clave en la señalización del TCR como PI3K y Akt.²⁹ Esto limita la fase inicial de activación o la expansión de las células T autorreactivas.³⁰

Finalmente, la primera evidencia de que PD-1 juega un papel crítico en el control de la tolerancia inmunológica y el desarrollo de autoinmunidad proviene del fenotipo de ratones que carecen de PD-1 (Pcd1^{-/-}), los cuales desarrollan una enfermedad autoinmune denominada Lupus.³¹

Otra molécula de co-inhibición importante en la inducción de anergia es el Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico (CTLA-4).³² CTLA-4 se induce de manera tardía durante la activación de los linfocitos T y es capaz de unirse a moléculas coestimuladoras de la familia B7, promoviendo una señalización negativa.³³ Funcionalmente CTLA-4 ha demostrado inhibir la proliferación de células T, la progresión del ciclo celular y la producción de IL-2.³⁴ Las evidencias de las propiedades inmunoregulatoras de CTLA-4 se observaron en ratones deficientes en CTLA-4, los cuales desarrollan una enfermedad

autoinmune linfoproliferativa que resulta en la muerte de los animales.³⁵ Por otro lado el bloqueo de CTLA-4 en células CD4+ antígeno específicas activadas a dosis elevadas del antígeno muestran resistencia a la inducción de anergia.³⁶ Estos resultados sugieren que CTLA-4 es una molécula crítica para ayudar a mantener la tolerancia inmunológica en la periferia.

Capítulo 2 Diferenciación y Función de los Linfocitos T Reguladores

2.1 Mecanismos de Supresión de los Linfocitos T Reguladores.

El tercer mecanismo para regular a los linfocitos T autorreactivos en la periferia es llevado a cabo por los linfocitos T reguladores. Definir los mecanismos por los cuales actúan las células T reguladoras es de vital importancia, no solo para entender los procesos por los cuales regulan la tolerancia, sino también, para elucidar nuevos blancos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Los mecanismos de supresión utilizados por las T reg se pueden agrupar en 4 categorías básicas: supresión por citocinas, supresión por citólisis, supresión por disrupción metabólica y supresión por la modulación de la maduración y función de DCs.³⁷

2.1.1. Supresión por Citocinas Inhibitorias

La secreción de citocinas inhibitorias por células T reg ha sido ampliamente estudiada en diferentes modelos experimentales. Este mecanismo fue uno de los primeros en ser estudiado para entender como los linfocitos T reg ejercen su acción supresora. Las citocinas inhibitorias como Interleucina 10 (IL-10) y el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) han sido el foco de atención en la regulación de este mecanismo. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la IL-35 participa de manera importante en este mecanismo de supresión.³⁸

Las principales vías por las cuales IL-10 y TGF- β actúan son inhibiendo directamente las respuestas efectoras Th1 y Th2 (Impidiendo la activación de macrófagos y DCs), inhibición de la actividad citotóxica de los linfocitos CD8 e impidiendo la proliferación de linfocitos T efectores³⁸.

En modelos de asma el aumento en la expresión de IL-10 es capaz de contrarrestar la respuesta de linfocitos T efectores (Tef).⁴⁰ Así mismo, la expresión de TGF- β es capaz de suprimir la respuesta efectora en respuestas alérgicas.⁴⁰ Sumado a la secreción de TGF β , las Treg expresan TGF- β en la membrana celular lo cual permite mediar la supresión a través del contacto célula-célula.⁴¹ (**FIGURA 2**) Esto se ha demostrado en modelos de diabetes tipo 1, en donde la infiltración de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos a los islotes pancreáticos puede ser regulada por Treg que expresan TGF- β en la membrana.⁴¹

Recientemente se ha descrito que la participación de Interleucina 35 (IL-35) es requerida para lograr una mayor capacidad supresora. IL-35 es un miembro de la familia de citocinas heterodiméricas de IL-12, que está formada por la unión del producto del 3er gen inducible del virus de Epstein-Barr (Ebi3), y p35 (también conocida como IL12A; que normalmente se une con p40 para formar IL-12).⁴²

En estudios realizados en ratones carentes de Ebi3 e IL12A (Ebi3^{-/-}, Il12a^{-/-}) se observa una drástica disminución en la actividad supresora de las Treg *in vitro* e *in vivo* al no controlar la proliferación de los Tef en un modelo de inflamación intestinal.⁴² Basándose en estos resultados se ha sugerido que IL-35 es importante para lograr la máxima capacidad supresora de los linfocitos T reguladores. En línea con esto se ha encontrado que la expresión de IL-35 es suficiente para lograr el efecto supresor de las Treg. Esta evidencia provino de estudios en donde la expresión ectópica de IL-35 confiere el fenotipo regulador a linfocitos CD4 "naive", mientras que el uso de IL-35 recombinante es capaz de suprimir la proliferación de las células T en estudios realizados *in vitro*.⁴²

2.1.2. Supresión por Citolisis

Se ha descrito que los linfocitos Treg de humano y ratón pueden ser activados para promover la expresión de granzima A y granzima B. La granzima A es capaz de eliminar linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ activados, **(Figura 2)** así como otros tipos celulares utilizando la vía de las perforinas e independiente de la vía de Fas-FasL.⁴³ En cambio la supresión mediada por granzima B es independiente de la vía de perforinas.⁴⁴ **(Figura 2)** En trabajos realizados por Zhao y Shevach se demostró que en Treg deficientes en la producción de granzima B, la capacidad supresora se ve disminuida⁴⁵

Por otro lado Ren y colaboradores mostraron la capacidad de los Treg para inducir apoptosis de las células T efectoras a través de TRAIL-DR5 (Factor de Necrosis Tumoral Asociado a Apoptosis por el Ligando de Receptor de Muerte 5), tanto *in vivo* como *in vitro*; y que a su vez el bloqueo de DR5 induce una disminución en la actividad supresora y citolítica de las Treg *in vitro*.⁴⁶

Otra molécula implicada en este mecanismo es Galectina-1 (también conocida como LGALS-1), la cual es un miembro altamente conservado de la familia de las proteínas de unión a β -Galactosidasa y es regulada por la activación vía el TCR. LGALS-1 se une a diferentes proteínas, tales como CD45 (una tirosín-fosfatasa importante en la diferenciación celular) y CD43 (proteína transmembranal implicada en la activación de linfocitos T) y es expresada por los Treg.⁴⁷ La unión de LGALS-1 a estas proteínas induce apoptosis e inhibe la proliferación y secreción de citocinas pro inflamatorias de los Tefe. Estudios muestran que el bloqueo o deficiencia de LGALS1 disminuye la capacidad supresora de los Treg.⁴⁷

2.1.3. Supresión por Disrupción Metabólica

La participación de diferentes marcadores de superficie expresados en las Treg para mediar la supresión de clonas autorreactivas y Tef ha sido descrita recientemente.⁴⁸

Uno de estos marcadores es CD25, el cual se expresa de manera constitutiva en las Treg, permite el agotamiento de Interleucina 2 (IL-2) en el ambiente celular afectando la división de las células T efectoras (Tef) al disminuir uno de los factores esenciales que necesitan para proliferar y sobrevivir.⁴⁹

La IL-2 juega un papel fundamental en la activación de células T reguladoras tanto *in vivo* como *in vitro* y a su vez, mantiene la expresión de CD25 en la superficie de la membrana de dichas células.⁵⁰⁻⁵¹ La principal fuente de IL-2 responsable de mantener y activar a los linfocitos Treg *in vivo* parecen ser células Tef. De esta manera la expresión de IL-2 es controlada por retroalimentación negativa entre Tef y Treg, es decir, las células Tef mantienen y activan las células Treg, mientras que, las Treg inhiben la producción de IL-2 en las células Tef.⁵²

Otros marcadores de superficie recientemente descritos son CD39 (ATPasa/ADPasa) y CD73 (5'ectonucleotidasa), dos ectoenzimas expresadas en la superficie de los linfocitos Treg. Ambas moléculas participan en la degradación de ATP a adenosina, molécula capaz de suprimir la función de células Tef a través de la activación del receptor de adenosina. 2A⁵³⁻⁵⁴ (**Figura 2**) Interesantemente, la unión de adenosina al receptor 2A parece no sólo inhibir las funciones de las células Tef, sino también induce la generación de Treg en la periferia al inhibir la expresión de IL-6⁵⁵ (responsable de inhibir la generación de Treg y promover la secreción de citoquinas proinflamatorias).⁵⁶

Por otro lado, las células T reg también demostraron suprimir la función efectora de los linfocitos T al incrementar la expresión de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc) en las células Tef. El incremento de esta molécula inhibe la expresión de IL-2, evitando la proliferación de células T autorreactivas y efectoras promoviendo su apoptosis⁵⁷ **(Figura 2)**.

2.1.4. Supresión por Targeting de Células Dendríticas

Además del efecto directo de los linfocitos T reguladores sobre la función de los linfocitos T efectores, los Treg también pueden modular la maduración y/o función de las DCs, las cuales son requeridas para la activación de las células efectoras.⁵⁸

Una de las principales moléculas implicadas en este mecanismo es CTLA-4, la cual se ha propuesto se une a moléculas de co-estimulación CD80 y CD86 evitando la adecuada maduración de las DCs, impidiendo así la diferenciación y activación de los linfocitos T.⁵⁹ Se ha descrito que el bloqueo o deficiencia de esta molécula disminuye la capacidad supresora de las Treg.⁶¹ **(Figura 2)** Sumado a esto, la unión de CTLA-4 a estos ligandos permite la activación de la vía metabólica DIO (Indolamina 2,3 dioxigenasa) en las DCs lo que resulta en la producción de quinurenina, un potente inmunosupresor capaz de inducir apoptosis en las células efectoras.⁶⁰

Estudios recientes han mostrado que la maduración de las DCs también puede ser modulada por el Gen 3 de Activación de Linfocitos (LAG3; también conocido como CD223). LAG3 puede unirse al MHC-II con alta afinidad, promoviendo la activación del Inmunoreceptor de Activación de Tirosinas (ITAM), el cual regula la señal inhibitoria suprimiendo la maduración de las DCs y su capacidad inmunoestimuladora⁶¹ **(Figura 2)**.

Otra molécula importante en este mecanismo es la Neuropilina-1 (Nrp-1). Nrp-1 es un receptor de semaforinas (moléculas implicadas en la sinapsis neurológica) clase III y un correceptor para el Factor de Crecimiento Vascular y Endotelial.⁶² NRP-1 se expresa en las células Treg y puede ser inducida por la expresión ectópica de FOXP3 en células T FOXP3⁻, NRP-1 promueve interacciones de larga duración entre las células Treg y DCs inmaduras durante la sinapsis inmunológica. El bloqueo de NRP-1 disminuye la frecuencia de interacciones de larga duración, mientras que la expresión ectópica de NRP-1 en células T FOXP3⁻ aumenta el número de dichas interacciones.⁶²

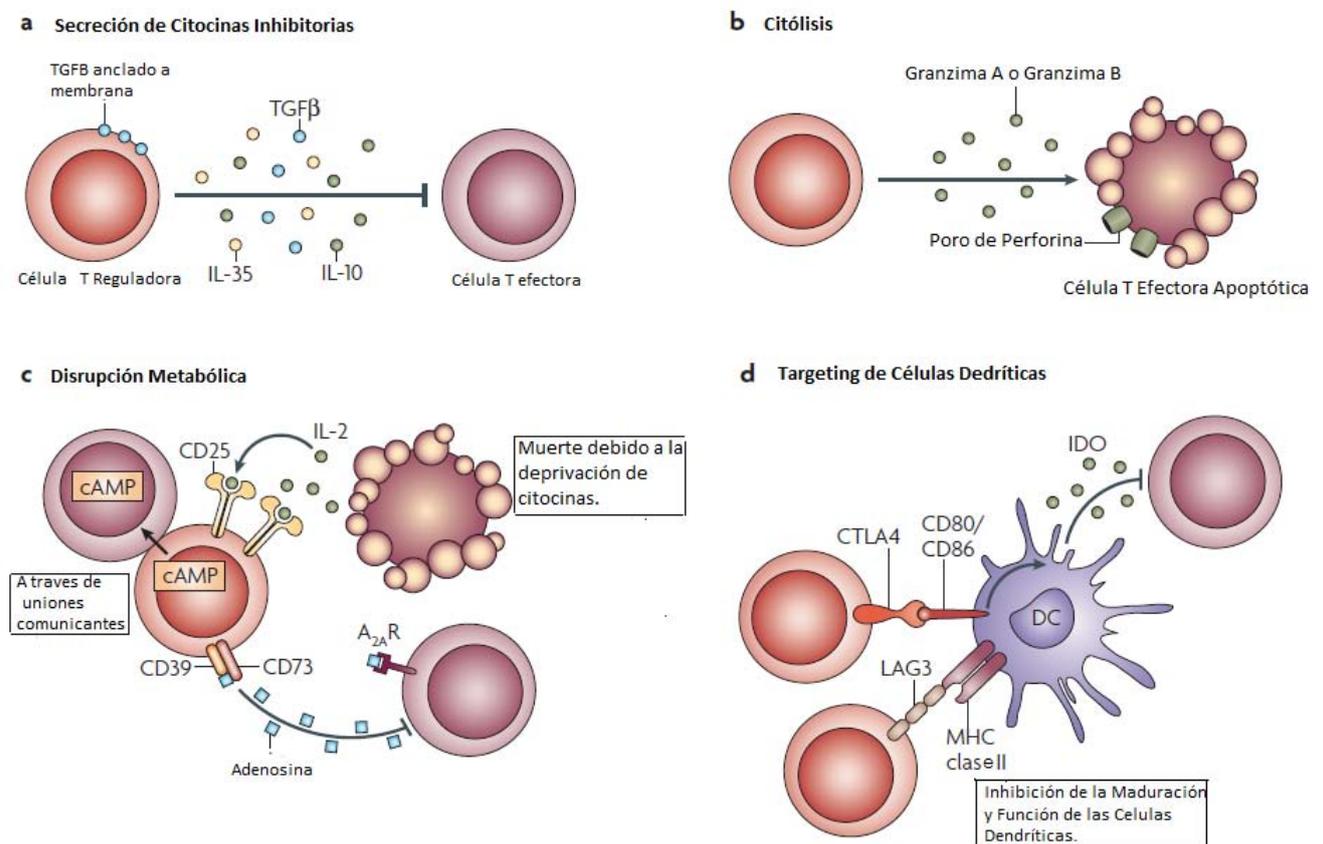


Figura 2. Mecanismos de Supresión de las Treg. a) La secreción de citocinas inhibitorias incluye la participación de IL-10, IL-35 Y TGF-β. b) La Citólisis incluye mecanismos de supresión dependientes de Granzima A y B. c) La disrupción metabólica incluye la privación de citocinas para inducir apoptosis, la generación de AMP cíclico (AMPc), y la generación de adenosina por CD39- y CD73 a través de 2AR. d) El targeting de DCs incluye mecanismos que modulan la maduración y/o función de DCs, tales

como, inhibición de la maduración de Dcs mediada por LAG3 y CTLA-4. Esta última activa la vía metabólica IDO para inhibir a las células T efectoras.

2.2 Linfocitos T reguladores son células clave para la Tolerancia inmunológica.

Las primeras evidencias que revelaron la existencia de un subconjunto de células tímicas capaces de mediar la tolerancia inmunológica provienen de experimentos realizados en ratones a los cuales les fue extraído el timo a los 2 y 4 días de su nacimiento. La timectomía de los roedores tuvo como resultado lesiones mediadas por linfocitos T, las cuales podían ser aliviadas con la transferencia de timocitos o esplenocitos de ratones adultos.^{63 64 65}

La población capaz de mantener la tolerancia inmune se identificó como linfocitos T $CD4^+$ con alta expresión del marcador CD25 (cadena α del receptor de interleucina 2); los cuales fueron capaces de suprimir la respuesta inmune en distintos modelos experimentales, tales como colitis inflamatoria y modelos de asma y alergia.⁶⁶

Estos hallazgos sugieren que el timo además de mediar la tolerancia central puede regular la tolerancia inmunológica mediante la producción de una población de linfocitos T con fenotipo regulador. Así pues, el timo no solo produce las células T autorreactivas, sino que también produce linfocitos T capaces de eliminarlas.⁶⁷ Estos linfocitos T fueron denominados Linfocitos T reguladores (Treg).

Los linfocitos Treg se pueden clasificar en dos categorías principales dependiendo del lugar en donde se lleve a cabo su diferenciación. Los linfocitos Treg que se diferencian en timo son denominados linfocitos Treg tímicos (tTreg) y constituyen aproximadamente el 10% de los linfocitos $CD4^+$ en la periferia de individuos sanos. Los tTreg se diferencian de precursores inmaduros en el timo dando lugar a una célula con fenotipo $CD4^+CD25^+$.⁶⁸ Por otro lado los linfocitos $CD4^+$

“naive” que bajo ciertos estímulos se diferencian en la periferia a linfocitos Treg son denominados linfocitos Treg Periféricos (pTReg).⁶⁹

En la actualidad no existe un receptor de superficie o alguna molécula capaz de diferenciar un linfocito regulador tímico de un linfocito regulador periférico, sin embargo existen marcadores de superficie presentes en ambas poblaciones celulares que permiten diferenciarlas de linfocitos T cooperadores.

Además de la expresión de CD4 y CD25 las células Treg se caracterizan por la expresión de otros receptores de superficie, tales como: CD45RB^{LOW},^{70 71} CTLA-4, CD103 (una alfa integrina mediadora de la retención linfocítica en tejidos epiteliales), CD134 (también llamado OX40 una nueva molécula de co-estimulación que pertenece a la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (R-TNF)), CD62L (una molécula de adhesión también llamada L-Selectina),⁵² GITR (Glucocorticoide inducido por el receptor del Factor de Necrosis Tumoral)⁷² GARP (una proteína transmembranal llamada Glucoproteína A con Repeticiones Predominantes), CD39 (ATPasa/ADPasa)⁵³, CD73 (5'ectonucleotidasa)⁵⁴, TGF- β que se encuentra unido a la superficie celular, ICOS (Coestimulador Inducible de las Células T)⁵², Neuropilina-1⁶² y Galectina-1.⁴⁷

Los linfocitos Treg tímicos y periféricos también comparten vías de señalización necesarias para el establecimiento del programa transcripcional necesario para su diferenciación y función supresora tales como: activación vía el TCR y señales de co-estimulación, citocinas como IL-2 y TGF- β , por mencionar algunos.⁴⁸ Estos estímulos activan vías de señalización que dan lugar principalmente a la expresión de factor de transcripción Foxp3.⁶⁸

2.3 El Factor de Transcripción F o x p 3 es crucial para la diferenciación de los linfocitos T Re guladores y su Función Supresora.

En 2001 se identificó una mutación en el gen que codifica a F o x p 3 (localizado en el cromosoma X) como la responsable de la enfermedad en ratones con fenotipo S c u r f y (sf), los cuales desarrollan de forma espontánea autoinmunidad severa letal. La enfermedad se caracteriza por la proliferación descontrolada de linfocitos T $CD4^+ CD8^-$, infiltración extensa a diferentes órganos y elevación de numerosas citoquinas pro-inflamatorias causando la muerte de machos homocigotos.^{73 74}

La mutación en el cromosoma X en el gen que codifica para F o x p 3 también fue encontrada en pacientes con Síndrome IPEX (Síndrome de desregulación, poli endocrinopatía y enteropatía inmune ligado al cromosoma X) el cual está asociado con enfermedades autoinmunes en múltiples órganos endócrinos (como diabetes tipo I y tiroiditis), enfermedad inflamatoria intestinal, alergia grave y dermatitis atópica.⁷⁵

La supervivencia de los ratones S c u r f y está condicionada a la transferencia de linfocitos T $CD4^+ CD25^+$ y en humanos es necesaria terapia inmunosupresora así como trasplante de médula ósea,⁷⁶ lo cual refleja el papel crucial de los linfocitos T reg F o x p 3⁺ en el mantenimiento de la homeostasis en el sistema inmunológico.

En estudios realizados por Sakaguchi y Rudensky se demostró que las células Treg expresan F o x p 3, el cual es considerado el factor de transcripción maestro del programa de diferenciación de estas células.^{72 76} La evidencia que muestra la importancia de la expresión de F o x p 3 en la diferenciación de las células Treg proviene de

experimentos *in vivo* y *in vitro* de células CD4⁺ y células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, en donde éstas últimas mostraron ser capaces de suprimir la respuesta de las células Tef, al contrario de aquellas que presentan un fenotipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻.⁷⁶ A su vez se demostró que la expresión ectópica de Foxp3 es suficiente para activar el programa de inmunosupresión de células T CD4⁺CD25⁻ y modular la función supresora de las Treg.⁷⁶ A su vez en un modelo de colitis autoinmune se encontró que la respuesta de linfocitos Tef se ve suprimida por la transferencia de células Foxp3⁺.⁷²

2.3.1 Inducción de Foxp3 por estimulación vía TCR y Moléculas de Co-estimulación

2.3.1.1 Inducción de Foxp3 vía TCR

Las primeras evidencias que mostraron la importancia de la señalización del TCR para la inducción de Foxp3, provinieron de los trabajos realizados por Olivares-Villagómez y colaboradores. Los resultados mostraron que ratones cuyos linfocitos T expresan un TCR transgénico para un péptido de la proteína básica de mielina y que además no expresan RAG1, careciendo así de recombinación de las cadenas endógenas del TCR, carecen de linfocitos Treg y desarrollan encefalomiелitis. Estudios posteriores demostraron que en estos ratones la expresión en timo del antígeno para el TCR transgénico⁷⁸ es suficiente para inducir la diferenciación de linfocitos Treg Foxp3⁺.⁷⁸

Por otro lado estudios realizados por Kretschmer y colaboradores demostraron que la estimulación *in vitro* con TGF- β , anti-CD3 y anti-CD28 en células Foxp3⁻, induce la expresión de Foxp3. Esta expresión

fue asociada a la activación subóptima del TCR *in vitro* promovida por TGF- β .⁷⁹

En 2010, Gottschalk y colaboradores; demostraron que la inducción de Foxp3 *in vivo* puede lograrse por estimulación del TCR a bajas concentraciones de antígeno, siempre y cuando este antígeno sea reconocido por el TCR con alta afinidad.⁸⁰ Sumado a esto los autores mostraron que la inducción *in vitro* de Foxp3 es dependiente de la densidad del ligando, así como de la afinidad con la que reconoce al TCR.⁸⁰ En conjunto estos datos de muestran que la afinidad y densidad del ligando son factores clave en la inducción de la expresión de Foxp3.⁸⁰

Se ha reportado que las Treg tanto de humanos como de roedores, muestran un patrón distinto de señalización río abajo después de la activación del TCR. En estudios realizados por Sauer y Haxhinasto se demostró que después de la señalización vía TCR, la inhibición de la vía de señalización Fosfatidil Inositol 3 Cinasa (IP3K), la Proteína Cinasa B (AKT), y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) es fundamental para inducir la expresión de Foxp3.^{81 82}

En dichos estudios se demostró que la activación de la vía IP3K/AKT/mTOR es inhibida en presencia de TGF- β . En línea con esto los resultados indican que la activación constitutiva de AKT en células CD4+CD25- estimuladas con anti-CD3 y anti CD28 en presencia de TGF- β e IL-2, no son capaces de inducir la expresión de Foxp3.^{81 82} Sumado a esto, se observó que aun después de la activación constitutiva de AKT; el bloqueo de mTOR (el blanco directo río abajo de AKT) con rapamicina rescata la expresión de Foxp3.^{81 82}

En línea con lo anterior, Sauer y colaboradores demostraron que la activación vía TCR/CD28 en células CD4+CD25- seguida del bloqueo de PI3K/mTOR resulta en la inducción de Foxp3.⁸¹ En este estudio los autores también muestran que la inhibición de esta vía de

señalización resulta en la activación del programa transcripcional de las Treg, promoviendo la activación de genes como IL2ra, Ctla4, y miembros de la Familia de Proteínas Supresoras de la Señalización por Citocinas (SOCS).

En conjunto estos hallazgos han establecido que la estimulación del TCR subóptima con bajas concentraciones de antígenos de alta afinidad y la inhibición de la vía IP3K/AKT/mTOR induce la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ CD25⁻.

2.3.1.2 Inducción de Foxp3 por señales de Co-estimulación

Además de la señalización del TCR, las señales de co-estimulación por CD28 (Receptor co-estimulador de células T) participan de manera importante en la diferenciación de células Treg (**FIGURA 3**). En ratones deficientes de CD28 se observa una marcada disminución en la frecuencia de células Treg,⁸³ lo que sugiere que la acción coordinada de CD28 y la señalización del TCR es crucial en la diferenciación de las células reguladoras.

Por otro lado, varios factores de transcripción por debajo de la cascada de activación del TCR y CD28 participan en la regulación de Foxp3 y por tanto la diferenciación de Treg. Entre ellos se encuentran el Factor Nuclear de Activación de Células T (NFAT), el Factor Nuclear de Activación β (NF- κ B) y el factor de transcripción denominado, Proteína Activadora 1 (AP-1). De acuerdo con lo observado se propone que la regulación positiva de NFAT y AP-1 de la transcripción Foxp3 es por su unión al sitio promotor de este último Factor de Transcripción.⁸⁴ Además, se ha descrito que el dímero Elemento de Respuesta Cíclico de AMP (CREB)/ factor activador de la transcripción (ATF-1) puede unirse a una región reguladora del locus de Foxp3.⁸⁵

2.3.2 INDUCCIÓN DE FOXP3 POR CITOCINAS

Se ha observado que en ratones deficientes en IL-2 o IL-2 α R existe una marcada disminución en la población de timocitos Foxp3⁺.⁵² La IL-2 contribuye en la diferenciación de los linfocitos Treg al inducir la activación a bajo del factor de transcripción STAT5, éste coopera en la expresión de Foxp3 al unirse directamente a su secuencia promotora.⁹⁰ Además, la eliminación inducida de un alelo de STAT5 tiene como consecuencia una disminución en la población CD4⁺ Foxp3⁺, en tanto que la expresión ectópica de STAT5 permite la expansión de células Treg aún en ausencia de IL-2.⁹⁰

Por otra parte la inhibición de T β RI, una subunidad del receptor de la citocina TGF- β , resulta en disminución transitoria en la generación de Treg durante las primeras semanas de vida en ratones wildtype.⁹¹ En 2007 Tone y colaboradores demostraron que TGF- β puede unirse a una secuencia conservada de NFAT induciendo la expresión del gen que codifica para Foxp3 en timocitos, la cual como ya se mencionó es esencial para inducción de Foxp3 y la generación de Tregs.⁹² En este mismo estudio se demostró que TGF- β puede mediar la supervivencia de Treg o de sus precursores al inhibir la vía de Bim por la cual las células T autorreactivas son eliminadas y de esta manera aumentar el pool de precursores de Treg. También se ha reportado que la activación de Smad3 vía la señalización del receptor de TGF- β , es importante en la inducción de Foxp3.⁹²

Por otro lado, la evidencia sugiere que la participación de la IL-10 también es importante en la regulación de Foxp3. Esta hipótesis provino de estudios realizados en ratones knockout (KO) para IL-10, los cuales desarrollan inflamación espontánea en el intestino delgado.⁹³ A su vez se observó que en células Foxp3⁺, la ablación en la secreción de IL-10 tiene como resultado el desarrollo de inflamación en el intestino.⁵⁶ Finalmente también se ha reportado en un modelo de colitis que la deficiencia o inhibición total en la secreción de IL-10 resulta en la pérdida de la expresión de Foxp3 en

condiciones inflamatorias impidiendo resolver la respuesta inflamatoria.⁹⁴

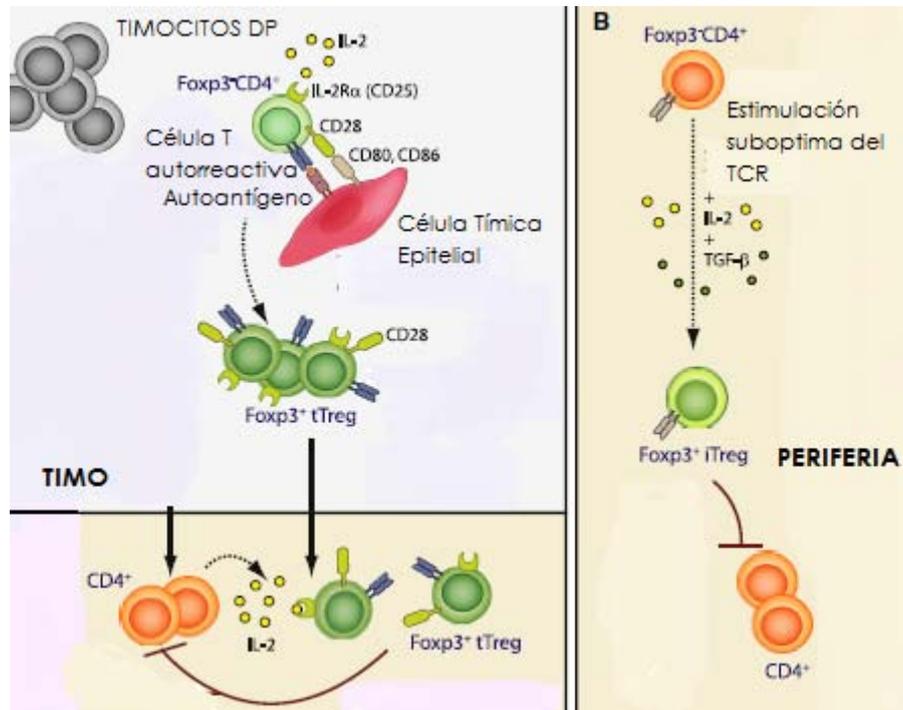


Figura 3. Diferenciación de Treg y la inducción de Foxp3 en timo y periferia. A) La inducción de Treg Foxp3⁺ en timo está dada por tres señales: 1) de la estimulación del TCR por antígenos propios presentados por cTec vía MHC II, 2) la señalización de moléculas de coestimulación (C D28) inducida por ligandos (CD80, C D86) expresados en la superficie de APCs y 3) alta expresión del receptor de IL-2 (CD25) regulado por IL-2. B) En la periferia la inducción de Foxp3 está dada por estimulación vía el TCR bajo ciertos estímulos como TGFβ o IL-10. Modificado de Josefowicz y Rudensky Immunity 2009.

2.3.3 Inducción de Foxp3 por HIF-1α

Durante el desarrollo de las células T, los progenitores linfoides migran desde la médula ósea al timo, el cual es conocido por ser un órgano hipóxico en condiciones fisiológicas.⁹⁵ De la misma manera los linfocitos T están expuestos a microambientes hipóxicos durante el desarrollo de una respuesta inflamatoria.⁹⁶

De acuerdo con esto se ha descrito que la diferenciación y desarrollo de las Treg se lleva a cabo en condiciones hipóxicas. La evidencia sugiere que la función inmunosupresora de las Treg puede ser regulada en gran parte por i) El Factor de Transcripción Inducible por hipoxia 1 α y por ii) las bajas concentraciones de oxígeno en los tejidos que pueden estimular la generación de adenosina extracelular y promueve la señalización de A2AR, que como ya se mencionó permite la formación de cAMP para impedir la activación de las células T efectoras o autorreactivas.

Las primeras evidencias de que HIF-1 α promueve la expresión de Foxp3 provienen de estudios realizados en células Jurkat, bajo condiciones hipóxicas las células fueron capaces de regular a la alta la expresión de Foxp3.⁹⁶ A su vez los autores observaron que el cultivo en hipoxia favorece la frecuencia de los linfocitos Treg Foxp3⁺ en cultivos de células polimorfonucleares provenientes de humano y esplenocitos de ratón.⁹⁶ Sumado a esto se ha demostrado que HIF-1 α es capaz de unirse a una región en el promotor de Foxp3 conocida como Elemento de Respuesta a la Hipoxia (HRE).⁹⁷ Este hallazgo demostró uno de los mecanismos a través de cual la hipoxia favorece la diferenciación de células Treg Foxp3⁺.

Debido al papel de HIF-1 α en la inducción de Foxp3 y por lo tanto en la diferenciación de las células Treg, es importante conocer cómo es regulada la expresión y actividad de éste factor de transcripción así como su relevancia en células del sistema inmune que son determinantes en la diferenciación de los linfocitos Treg: las células dendríticas.

Capítulo 3 El Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia y su participación en el sistema inmunológico.

El factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es considerado el regulador maestro durante la respuesta celular en condiciones hipoxicas.⁹⁸ HIF-1 α induce la expresión de genes involucrados en la eritropoyesis, glucólisis, angiogénesis y metabolismo del ATP al unirse a los HRE dentro de las secuencias de estos genes.⁹⁹

HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos proteínas básicas de la familia PAS (Per: proteína del periodo circadiano/Arnt: proteína translocadora del receptor nuclear Ah/Sim: proteína que regula el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*.), la subunidad HIF-1 β que es expresada constitutivamente y la subunidad HIF-1 α cuya expresión es regulada por las concentraciones de oxígeno celulares.¹⁰⁰ En presencia de oxígeno, el hierro y el 2-oxoglutarato permiten la hidroxilación de los residuos de prolina de HIF-1 α , reacción que es catalizada por las Prolil hidroxilasas (PHDs).⁹⁹ Los péptidos hidroxilados interactúan con un complejo de E3-ubiquitin-ligasa perteneciente a la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL), lo cual permite su ubiquitinación para su posterior degradación vía proteasoma.¹⁰⁰ Sin embargo, en condiciones de hipoxia las PHDs son inhibidas favoreciendo la estabilización de la subunidad α permitiendo su translocación al núcleo, en donde se dimériza con la subunidad β uniéndose a los HRE.⁹⁹

La evidencia de la importancia de HIF-1 α en el sistema inmunológico y en la regulación de la inflamación provino de análisis genéticos, en los cuales se observó que la disrupción genética homocigota en genes que codifican para HIF-1 α (HIF-1 $\alpha^{-/-}$)

evaluadas en un modelo de quimeras de ratón, resulta en el desarrollo normal de células B causando autoinmunidad.¹⁰¹ A su vez la delección selectiva en genes de HIF-1 α en granulocitos, macrófagos y monocitos mostró una disminución en la respuesta inflamatoria, tales como la motilidad, invasividad y destrucción bacteriana de estas células endógenas.¹⁰² Sumado a esto la disminución de esta respuesta inflamatoria está ligada a defectos en el metabolismo, caracterizados por una disminución en la velocidad de la glicolisis y la generación de energía.¹⁰²

En las células T, además de los ambientes hipóxicos se han reportado otros mecanismos por los cuales se puede regular la estabilización/expresión de HIF-1 α . En primer lugar, se ha observado que la estimulación del TCR resulta en un incremento en la expresión de HIF-1 α , la cual se ve potenciada tras la estimulación del TCR en ambientes hipóxicos. El aumento en la síntesis de la proteína que codifica para HIF-1 α se ha ligado a la vía mTOR/PI3K.¹⁰³

Un segundo mecanismo reportado para la inducción de HIF-1 α en las células T, es mediado por citocinas como IL-6, la cual activa el factor de transcripción STAT3. Dang y colaboradores demostraron que en presencia de IL-6, STAT3 puede unirse a la región promotora de HIF-1 α promoviendo su transcripción.¹⁰⁴ Esta hipótesis se ve reforzada por las observaciones realizadas en ratones KO deficientes de STAT3, los cuales muestran una baja expresión de HIF-1 α .¹⁰⁴ Por otro lado McMahon y colaboradores demostraron que TGF- β puede mediar la acumulación de HIF-1 α al inhibir la síntesis de PHD-2, a su vez el autor muestra que la inhibición de TGF- β promueve la degradación de HIF-1 α al incrementar la expresión basal de PHD-2.¹⁰⁵

Como ya se ha descrito, las bajas concentraciones de oxígeno intracelular permiten la estabilización de HIF-1 α en la célula a l

inhibir a las PHDs. Sin embargo, en modelos experimentales la estabilización de HIF-1 α también puede ser inducida por drogas farmacológicas que actúan inhibiendo a las PDHs.¹⁰⁶ Dentro de estas moléculas inhibitorias se encuentran los derivados de 8-hidroxiquinilonas, los cuales inhiben de manera específica las PHD-2.^{107 108} En estudios realizados en nuestra unidad de trabajo el uso de un inhibidor de PHD-2, denominado IOX2 (1-bencill-4-hidroxi-2-oxi-1, 2-dihidroquinolona-3-carbonil glicina) ha permitido evaluar el papel de HIF-1 α en la diferenciación y activación de linfocitos T al favorecer su acumulación intracelular (Figura 4).

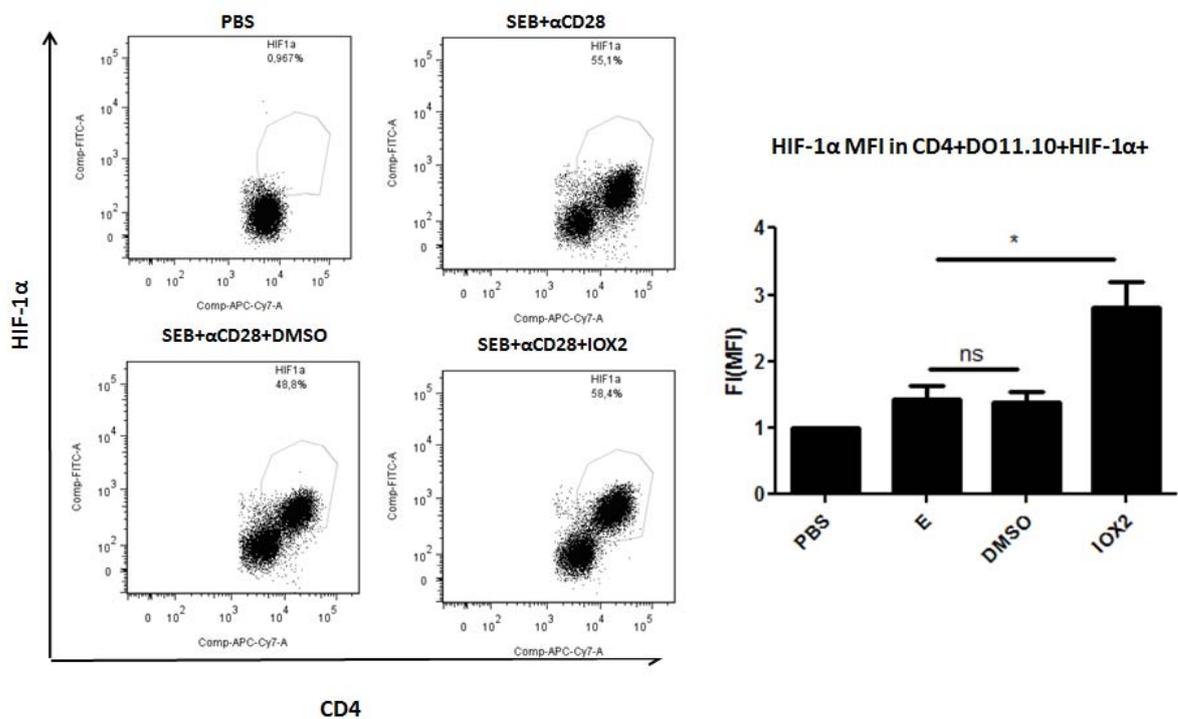


Figura 4. El inhibidor específico de la PHD2 IOX-2 induce la acumulación de HIF-1 α en linfocitos T activados. Se muestra un dot plot representativo del análisis de la expresión de HIF-1 α por citometría de flujo así como el análisis de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de HIF-1 α (N=3). E splenocitos de ratones DO11.10 fueron estimulados *in vitro* con el superantígeno B de *Staphylococcus aureus* (SEB) + anti-CD28 por 48h. Posteriormente se agregó a los cultivos DMSO o IOX2 100 μ M por 24 h. Laura Antonio, 2014. Manuscrito en preparación.

Hasta a hora se ha descrito el papel de HIF-1 α en la inducción de FOXP3 al ser regulado directamente en el linfocito T, es decir a través de modelos en los que se regula negativa o positivamente a HIF-1 α , sin embargo no se ha explorado a fondo el papel que su actividad transcripcional tendría en las células dendríticas, las cuales son cruciales en la inducción de tolerancia inmunológica así como en la diferenciación de linfocitos T.

Capítulo 4 Las Células Dendríticas son Inductoras de Tolerancia Inmunológica

Las células dendríticas pueden ser clasificadas en tres grandes grupos: Células Dendríticas Plasmacitoides (pDCs), Células Dendríticas Clásicas (cDCs) y Células Dendríticas Inflamatorias (iDCs) las cuales han mostrado derivarse de monocitos circulantes durante el proceso inflamatorio.¹⁰⁹ La evidencia hasta ahora señala que las cDCs son la principal población implicada en la proliferación de células T, así como en la inducción de tolerancia inmunológica.¹⁰⁹

Las cDCs se caracterizan por la expresión de CD11c, MHC II y CD8α.¹¹⁰ Una vez que expresan altos niveles de moléculas de co-estimulación, tales como, CD80, CD86 y CD40 (Moléculas de co-estimulación que pertenece a la familia de receptores de TNF)¹¹¹ se consideran como DCs maduras debido a que estas moléculas les permiten inducir la activación y diferenciación de los linfocitos T cooperadores. Cuando estas señales de co-estimulación no son las adecuadas para diferenciar y activar a los linfocitos T, las DCs son denominadas DCs tolerogénicas.¹¹²

Las primeras evidencias de que las DCs participan en la regulación de la tolerancia inmunológica provinieron de los estudios realizados por Brocker, quien utilizó el promotor de CD11c para expresar MHC de clase II en DCs específicamente. Los resultados mostraron que la expresión de moléculas del MHC-II en DCs de timo fue suficiente para eliminar a las clones autorreactivas durante la selección negativa.¹¹² A su vez la participación de las DCs en el mantenimiento de la tolerancia periférica fue demostrada en estudios en donde se observó que las DCs presentan antígenos propios y migran continuamente a los

órganos linfoides secundarios.¹¹³ Las DCs tolerogénicas presentan antígenos a las células T pero las señales de co-estimulación otorgadas no son suficientes para inducir la diferenciación de linfocitos T cooperadores,¹¹² lo cual conduce a anergia o delección clonal.⁵⁸ A través de este mecanismo se permite la eliminación de linfocitos T autorreactivos.

Estudios realizados en un modelo de ratón, muestran la existencia de un subconjunto de DC residentes de ganglio linfático que expresan FASL y por lo tanto son capaces de mediar la apoptosis de los linfocitos T autorreactivos.¹¹⁴ Otra evidencia que señala la participación de células dendríticas en el proceso de tolerancia periférica se obtuvo de estudios *in vivo*, en donde las DCs fueron pulsadas vía direccionamiento de antígenos con el anticuerpo anti-DEC-205 (un receptor endocítico que se expresa en la superficie de APCs e áreas donde se encuentran los linfocitos T en los órganos linfoides) acoplado al antígeno.^{115 116} A través de esta técnica en ausencia de co-estimulación, se induce la proliferación de células T, pero no la activación sostenida de los linfocitos T o la polarización hacia una de las respuestas efectoras (Th1, Th2, Th17), lo que sugiere que las DCs con fenotipo tolerogénico están implicadas en la eliminación de clones autorreactivos *in vivo*.¹¹⁶

El direccionamiento de antígeno en modelos transgénicos antígeno específicos a DCs también promueve la inducción de linfocitos Treg.¹¹⁷ Siguiendo con esta línea, otro estudio que muestra la capacidad de las DCs para inducir Treg fue realizado en ratones deficientes del ligando para flt3 (un ligando para el receptor de la citocina FLT3, la cual regula la proliferación de las células progenitoras linfoides en etapas tempranas), los resultados muestran un decremento notable en la población de DCs y a su vez una marcada disminución en las frecuencias de Tregs. Este

efecto puede ser revertido después de la administración de ligando soluble de FTL3 ocasionando un aumento en ambas poblaciones celulares.¹¹⁸

La inducción de DCs tolerogénicas es mediada por agentes antiinflamatorios e inmunosupresores tanto *in vitro* como *in vivo*.⁵⁸ Tal es el caso de la IL-10, una citocina capaz de alterar el ciclo de activación de las células dendríticas.⁵⁸ Las propiedades inmunosupresoras de la IL-10 tienen como resultado reducción en la expresión de moléculas como: MHC-II, moléculas de co-estimulación y moléculas de adhesión.⁵⁸

Otra molécula que puede alterar el ciclo de activación de las DCs es el TGF- β , el cual modula las propiedades funcionales de DCs y es capaz de alterar la presentación de antígenos, al regular a la baja la expresión de moléculas de co-estimulación como, CD80 Y CD86 y disminuir la expresión de MHC-II en la superficie celular, además de disminuir la expresión de citocinas inflamatorias como TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral α), IL-1 β aun en presencia de LPS; lo que trae como consecuencia una alteración en la diferenciación de los linfocitos T.¹¹⁹ Asimismo en un estudio demostró que las DCs CD8 α^+ son capaces de expresar TGF- β y la proteína de unión a TGF- β , el cual está relacionado con la inducción de células FOXP3 $^+$.^{92 120} Asimismo la evidencia experimental muestra que las células DCs CD8 α^+ son capaces de inducir una mayor cantidad de precursores de Treg que las DCs CD8 α^- .¹²⁰

Por otro lado, y como se ha mencionado que el targeting de DCs a través de moléculas como PD-L1, CTLA-4 y LAG3 puede inducir un fenotipo tolerogénico, al impedir la activación adecuada para desarrollar una respuesta inflamatoria, proporcionando a sí un medio para controlar la activación de células T y la tolerancia inmunológica.²⁷

Se ha descrito que HIF-1 α también puede regular el fenotipo de activación de las DCs. En cultivos de DCs derivadas de monocitos humanos en condiciones hipóxicas se observó una disminución en la capacidad migratoria de dichas células.^{121 122} A su vez las bajas concentraciones de oxígeno mostraron afectar las funciones de las DCs, disminuyendo su capacidad para endocitar antígenos y modificar la expresión de receptores de quimiocinas como: CCR3, CX3CR1 y CCR2 durante una respuesta inflamatoria.¹²³

El cultivo de DCs derivadas de monocitos humanos con LPS en condiciones hipóxicas inhibe su activación al disminuir la expresión de moléculas de coestimulación, lo que resulta en disminución en la proliferación de células T.¹²⁴ Sin embargo, a bajas concentraciones de oxígeno las DCs inducen la expresión de genes que producen citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β ¹²⁴ y promueven la expresión de receptores de quimiocinas.¹²⁵ Estos resultados muestran que HIF-1 α puede promover un fenotipo tolerogénico o pro-inflamatorio en DCs dependiendo del nivel de expresión de este factor de transcripción.

Por otro lado, la activación mediante TLRs (Receptores Tipo Toll), induce la estabilización de HIF-1 α en las DCs, activando su maquinaria metabólica de manera similar a otras células del sistema inmune en condiciones hipóxicas, al activar la glucólisis y promoviendo la activación y función adecuada de DCs.^{126 127}

Finalmente se ha observado que la estabilización de HIF-1 α usando inhibidores farmacológicos de las PHDs induce un aumento en la expresión de MHC-II y moléculas de co-estimulación en DCs, que a su vez indujo la proliferación de las células T efectoras. El aumento de esta población celular dio lugar a elevados títulos de anticuerpos en un modelo de inmunización antígeno específico de OVA (Ovoalbumina).¹²⁸

Con base en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es evaluar el papel que juega HIF-1 α en el estado de activación de las DCs y el impacto que esto tiene en la inducción de una respuesta de tolerancia.

3. Pregunta de investigación

¿El Factor de Transcripción HIF-1 α regula la activación de las células Dendríticas (DCs) promoviendo la diferenciación de los linfocitos T reguladores?

3.1. HIPÓTESIS

La regulación del estado de activación de las Células Dendríticas por el Factor de Transcripción HIF-1 α promoverá la diferenciación de los linfocitos T reguladores.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el estado de activación de las células dendríticas es regulado por el factor de Transcripción HIF-1 α para promover la diferenciación de los linfocitos T reguladores

3.2.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si existe proliferación de linfocitos T CD4⁺ DO11.10⁺ en presencia de OVA al ser estimulados vía TCR.
- Determinar si la expresión de HIF-1 α y Foxp3 es dependiente de la estimulación de TCR en un modelo antígeno específico.
- Evaluar si la acumulación de HIF-1 α intracelular incrementa el porcentaje de células Foxp3⁺ en un modelo antígeno específico.
- Evaluar el efecto de la droga IOX2 en el estado de activación de DCs.
- Evaluar si la acumulación de HIF-1 α en DCs puede ser regulado por la droga IOX2.

4. Materiales y Métodos

Ratones

Se utilizaron tres cepas de ratones: ratones DO11.10 que expresan un TCR transgénico para un péptido de OVA (323-339) presentado en moléculas MHC-II, ratones BALB/c wildtype y ratones MHCII-GFP con fondo genético C57BL/6 que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de expresión de moléculas del MHC-II.

Purificación de Células Totales de ganglio y bazo

Se obtuvieron de ganglios y bazo de ratón C57/BL6 MHCII-GFP por maceración y digestión con colagenasa, posteriormente se pusieron en cultivo con RPMI suplementado en presencia o ausencia de IOX-2 y con o sin LPS durante 5 h. Finalmente fueron teñidas con anti-CD11c-PECy7, anti-CD4-APC/Cy7, anti-TCR β -Percp/Cy5, MHC-II-GFP-FITC y anti-HIF-1 α -APC para su análisis por citometría de flujo.

Purificación de Células Dendríticas

Las DCs se obtuvieron de ganglios y bazo de ratones por digestión con colagenasa y fueron seleccionadas positivamente con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo Anti-CD11c. Para los ensayos de co-cultivo con linfocitos T las DCs fueron obtenidas de ratones Balb/C y fueron pulsadas toda la noche con ovoalbúmina (OVA) a diferentes concentraciones (30, 100 y 300 μ g). Para la determinación de la expresión de moléculas de co-estimulación las DCs se obtuvieron de ratones C57/BL6 MHCII-GFP y fueron cultivadas por 16 h bajo las siguientes condiciones: vehículo (DMSO), IOX2 (100 μ M), LPS (100 ng/ μ l)+DMSO, LPS (100 ng/ μ l)+IOX2 (100 μ M).

Linfocitos T CD4+:

Los linfocitos T CD4+ se obtuvieron de ganglios y bazo de ratones DO11.10 por selección negativa utilizando los siguientes sobrenadantes de hibridomas obtenidos de rata; TIB05 (anti-CD8), RA36B2 (anti-B220), NIMR4 (anti-MHCII) y F4/80 (antígeno expresado por macrófagos). Tras una incubación de 40 min y el lavado de las células éstas se incuban en placas recubiertas con Anti-IgG de rata por 40 min. Finalmente las células no adheridas a la placa (CD4+) se tiñen con el marcador de proliferación celular CTV (Cell Tracker Violet).

Cocultivo de DCs y Linfocitos T CD4+.

Las DCs pulsadas con OVA se cultivaron en conjunto con los linfocitos CD4⁺ en una proporción 1:1 o 1:3 con o sin IOX2 (100 µM) durante 5 días para lograr su activación y proliferación.

Citometría de Flujo

La inmunofenotipificación de los linfocitos T se realizó incubando a las células por 15 min a temperatura ambiente con los anticuerpos acoplados a fluorocromos anti-CD4-APC/CY7 y anti-DO11.10 TCR-PE/CY7. Posteriormente las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando el kit nuclear factor permeabilization and fixation buffer set (Biologend). Para el análisis de los factores de transcripción las células se incubaron con los anticuerpos anti-HIF-1α-FITC y anti-FOXP3-PE. Para evaluar la expresión de moléculas de co-estimulación en las DCs las células se incubaron con: anti-CD11c Biotina (y revelado con streptoavidina-PE-Cy7), anti-CD86-PE y anti-CD40-PE. Las tinciones fueron analizadas en un citómetro BD CANTO-II.

Los resultados de citometría fueron analizados con el programa Flowjo versión 7.6

Análisis Estadístico: Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.01 para realizar ANOVA de una vía.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar cada una de las variables en los diferentes experimentos realizados, se utilizó la técnica de citometría de flujo y se siguió la estrategia de análisis detallada en la Figura 5.

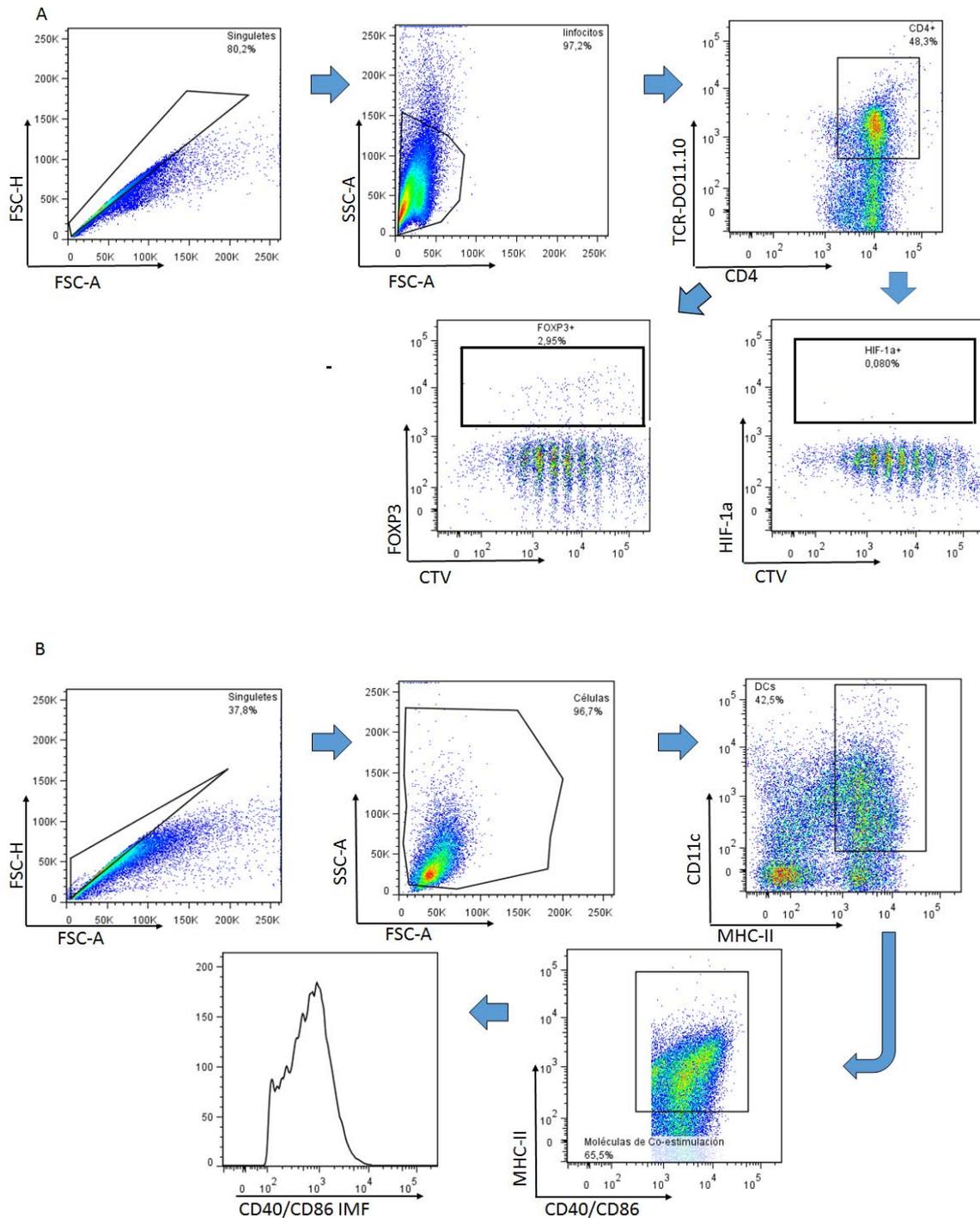


FIGURA 5. Estrategia de análisis. (A) Para el análisis de la activación de los linfocitos T en co-cultivo las células fueron teñidas con anticuerpos anti-antígenos de superficie y anti-factores de transcripción. Se consideraron únicamente los eventos sencillos (singuletes) de acuerdo a su comportamiento lineal en función de los parámetros de altura (FCS-H) y área (FSC-A), seguido de la eliminación de las partículas más pequeñas (debris) utilizando los parámetros complejidad (SSC-A) y tamaño (FSC-A). Posteriormente se seleccionaron las células dobles positivas para los marcadores TCR-DO11.10 y CD4, finalmente de esta población se determinó el porcentaje de células proliferantes positivas para los factores de transcripción HIF-1 α y FOXP3. (B) La estrategia de análisis para las DCs fue como en (A). A partir de la población "células" se seleccionó a aquellas positivas para la expresión de CD11c y MHC-II. En esta población se determinó el porcentaje de células con expresión de CD86 y CD40 a partir de la cual se analizó la intensidad media de fluorescencia de dichas moléculas.

En primer lugar de terminamos las condiciones óptimas de estimulación de TCR para la inducción tanto de HIF-1 α como de Foxp3. El modelo de activación consistió en co-cultivos de linfocitos T CD4 de ratones DO11.10 marcados con el marcador de proliferación CTV junto con DCs purificadas de ratones Balb/c y pulsadas con diferentes cantidades de OVA (10,30, 100 y 300 μ g).

Una forma de estudiar la activación de los linfocitos T consiste en la determinación de la proliferación. El marcaje de las células, previa a la estimulación, con moléculas fluorescentes, como carboxifluoresceína o CTV, que se unen covalentemente a las proteínas del citosol, permite monitorear a las células proliferantes, pues cada célula resultante de una división celular "hereda" una porción del colorante que es menor a la de la célula madre.¹²⁹ De esta manera observamos la máxima inducción de proliferación con 300 μ g de OVA en el co-cultivo 1:1 (**Figura 6A**), mientras que en el co-cultivo 1:3 las DCs cargadas con 100 μ g de OVA indujeron mayor proliferación de los linfocitos T en comparación con las DCs cargadas con menores cantidades de OVA (**Figura 6B**).

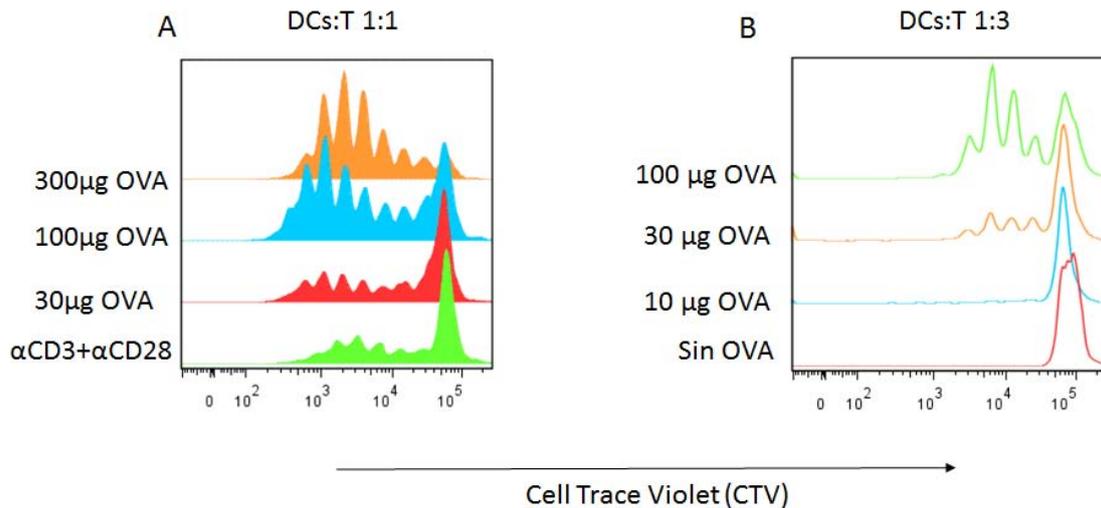


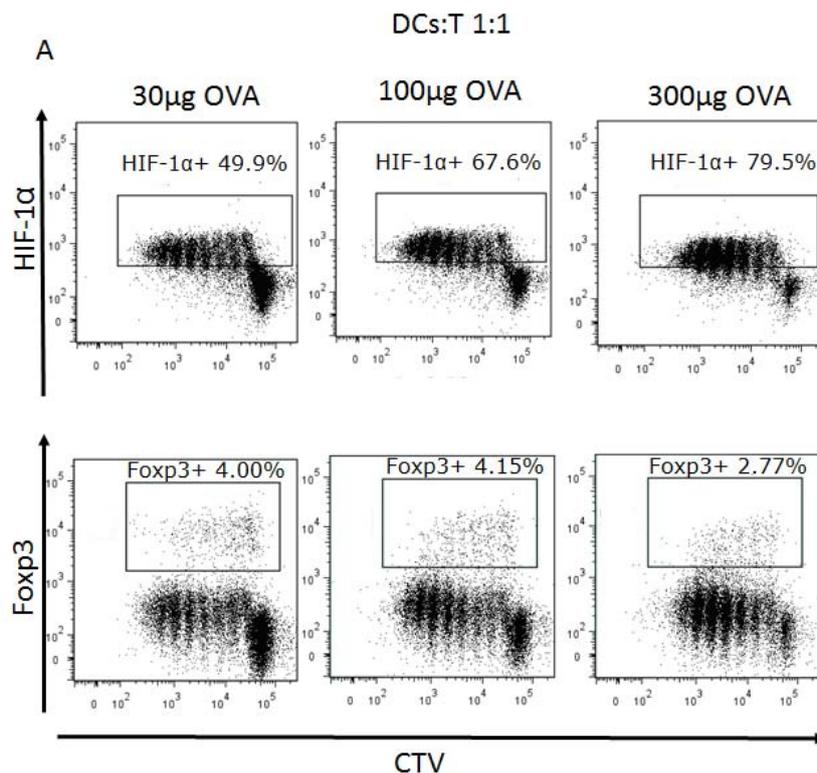
Figura 6. Proliferación de Linfocitos T CD4+ DO11.10+. Co-cultivo de Linfocitos T CD4+ de ratones DO11.10, marcados con el colorante CTV, con DCs de ratones BALB/c. Después de 5 días en cultivo las células fueron analizadas por citometría de flujo. (A) Histograma representativo de la proliferación de linfocitos T CD4+DO11.10+ co-cultivados con DCs en una proporción 1:1 y pre-cargadas con 30, 100 o 300 µg de OVA. Se muestra también la proliferación de células estimuladas únicamente con α -CD3 (concentración 0.543 µg) + α -CD28 (concentración 0.5 µg). (B) Análisis de proliferación de linfocito T CD4+DO11.10+ co-cultivados como en (A) en una relación 1:3 linfocito T:DC. Las DCs fueron pre-cargadas con 10, 30 y 100 µg de OVA.

Bajo las condiciones de activación arriba mencionadas estudiamos la relación de la intensidad de la activación vía el TCR con la expresión del factor de transcripción HIF-1 α . En la literatura se ha descrito que la activación policlonal con anticuerpos activadores anti-CD3 y anti-CD28 es capaz de inducir la expresión de HIF-1 α , sin embargo se desconoce si su expresión es dependiente de la concentración de antígeno en un sistema de activación antígeno específico. Nuestros resultados indican que la expresión de HIF-1 α depende de la intensidad de la señalización vía el TCR, pues a cantidades mayores de antígeno hay más linfocitos T HIF-1 α + en las condiciones de co-cultivo 1:1 y 1:3 (**Figura 7A y 7B**), es más en el co-cultivo 1:3 es menor el porcentaje de células HIF-1 α + en comparación con el co-

cultivo 1:1 y sólo las células proliferantes expresan a este factor de transcripción.

En nuestras condiciones de activación observamos que a menor cantidad de OVA hay menor proliferación de linfocitos T Foxp3+ en el co-cultivo 1:1 (**Figura 7A**), mientras que en el co-cultivo 1:3 la proliferación de los linfocitos T Foxp3+ fue favorecida por la mayor cantidad de antígeno (**Figura 7B**). En la literatura se ha descrito que bajas concentraciones de péptidos de alta afinidad por su TCR favorecen la diferenciación y proliferación de los linfocitos T reg Foxp3+. Por lo tanto nuestros resultados concuerdan con lo reportado por numerosos grupos de investigación.

Dado que en condiciones fisiológicas la probabilidad de que una DC se encuentre con un linfocito T específico para el antígeno que presente es baja y debido al alto porcentaje de células HIF-1 α + inducido por el sistema de co-cultivo 1:1, consideramos más apropiado al modelo de activación 1:3 para estudiar el efecto de la acumulación de HIF-1 α en la diferenciación de los linfocitos Treg.



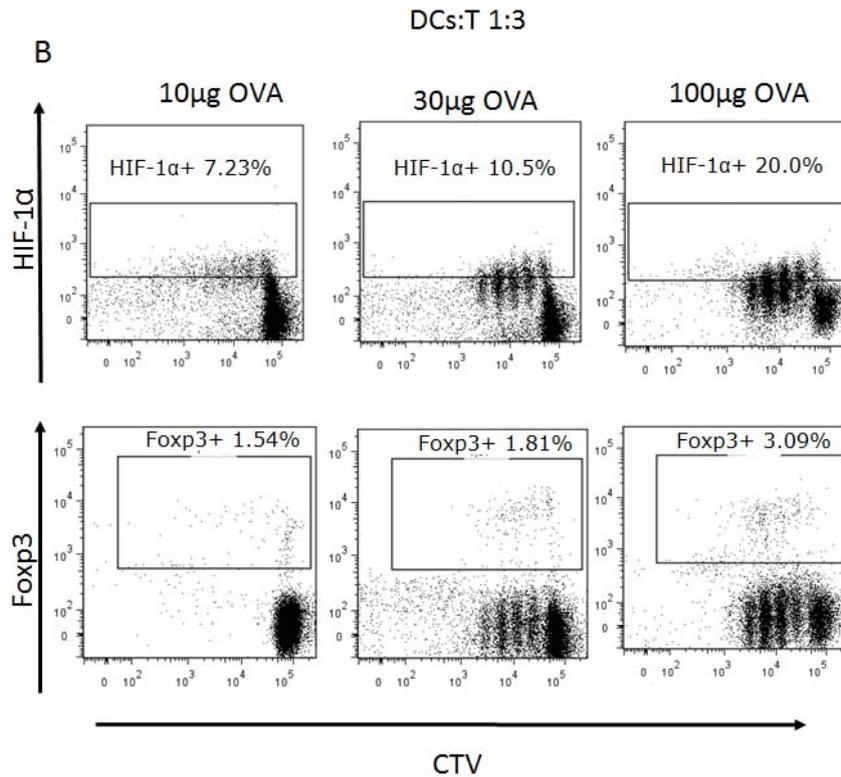


Figura 7. La expresión de HIF-1α y Foxp3 es dependiente de la estimulación del TCR *in vitro*. Co-cultivo de linfocitos T CD4 de ratones DO11.10, marcados con el colorante CTV, con DCs de ratones BALB/c. Después de 5 días en cultivo las células fueron analizadas por citometría de flujo. (A) Histograma representativo de la expresión de HIF-1α y Foxp3 en linfocitos T CD4+DO11.10+ proliferantes. Los linfocitos T CD4 fueron co-cultivados con DCs en una proporción 1:1 y pre-cargadas con 30, 100 o 300 μg de OVA. (B) Histograma representativo de la expresión de HIF-1α y Foxp3 en linfocitos T CD4+DO11.10+ proliferantes. Los linfocitos T CD4 fueron co-cultivados con DCs en una proporción 1:3 y pre-cargadas con 10, 30 o 100 μg de OVA.

Para lograr la acumulación de HIF-1α en la célula utilizamos al inhibidor específico de la PHD-2 IOX2. Bajo nuestras condiciones de activación observamos que la adición de esta molécula, desde el inicio de los co-cultivos, incrementó el porcentaje de linfocitos T HIF-1α+ inducido por la activación del TCR (**Figura 8**). Asimismo, la adición de IOX2 incrementó el porcentaje de células T Foxp3+ en comparación con las células que recibieron el vehículo. Nuestros resultados sugieren que la acumulación de HIF-1α en el linfocito T

incrementa la proliferación y posiblemente la diferenciación de los linfocitos Treg Foxp3+.

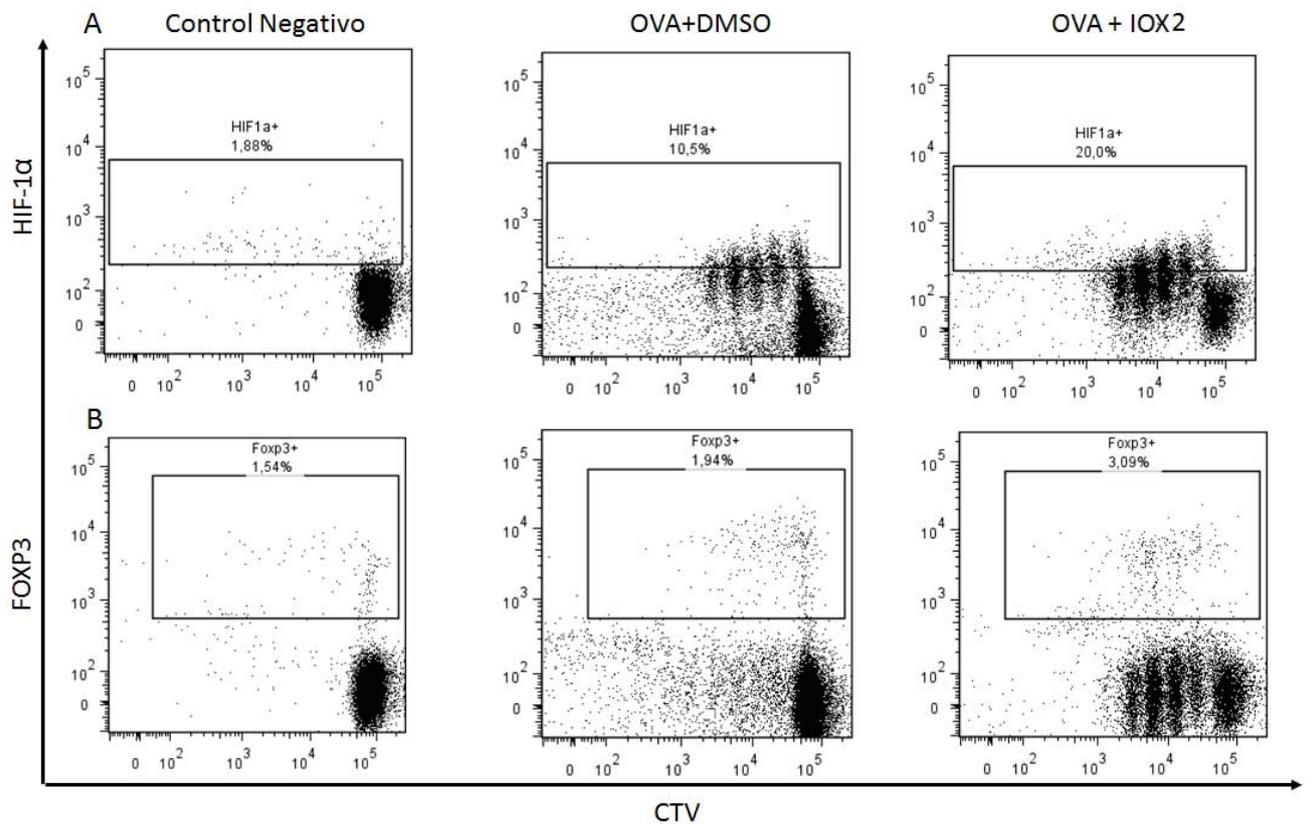


Figura 8. La acumulación de HIF-1 α incrementa el porcentaje de células Foxp3+ *in vitro*. Co-cultivo de linfocitos T CD4 de ratones DO11.10, marcados con el colorante CTV, con DCs (1:3) de ratones BALB/c pre-cargadas con 100 μ g de OVA. Al inicio del co-cultivo se agregó IOX2 100 μ M o DMSO. Después de 5 días en cultivo las células fueron analizadas por citometría de flujo. (A) DOT BLOT representativo de la expresión de HIF-1 α y (B) Foxp3 en linfocitos T CD4+DO11.10+ proliferantes.

Para determinar si la diferenciación de células FOXP3+ inducido por IOX2 se debe también a la modulación del fenotipo de activación de las DC, se purificaron DCs de ratones MHC-II-GFP las cuales fueron cultivadas en presencia o ausencia de LPS y en presencia o ausencia de IOX-2. Después de 16 h realizó una tinción extracelular para evaluar la expresión de las moléculas de co-estimulación CD40, CD86 y MHC-II.

Se ha reportado que el fenotipo de maduración de DCs puede ser modulado por HIF-1 α ^{127 128} disminuyendo la expresión de moléculas de co-estimulación y promoviendo un ambiente tolerogénico, en el cual la diferenciación de las Treg puede ser regulada por la participación de DCs tolerogénicas¹¹⁷. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en DCs activadas con LPS en presencia de IOX-2 la expresión de las moléculas de co-estimulación no se ve afectada al ser comparada con las DCs activadas con LPS en presencia de DMSO. Esto se observa en la IMF de terminada para cada variable analizada. **(Figura 9A)** De igual manera, al realizar la comparación entre las DCs sin activar con o sin IOX-2 no se observa un cambio significativo en la IMF. **(Figura 9A)**

Para determinar si existía una diferencia estadística significativa en las IMF de las 2 moléculas de co-estimulación evaluadas y en la expresión de MHC-II en los diferentes grupos de DCs, se realizó el análisis estadístico usando ANOVA de una vía. **(Figura 9B)** Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre la expresión de CD40, CD86 y MHC-II. En conjunto estos resultados indican que el incremento inducido por IOX-2 de la proliferación/diferenciación de linfocitos Treg Foxp3+ no es mediado por el estado de activación de las DCs.

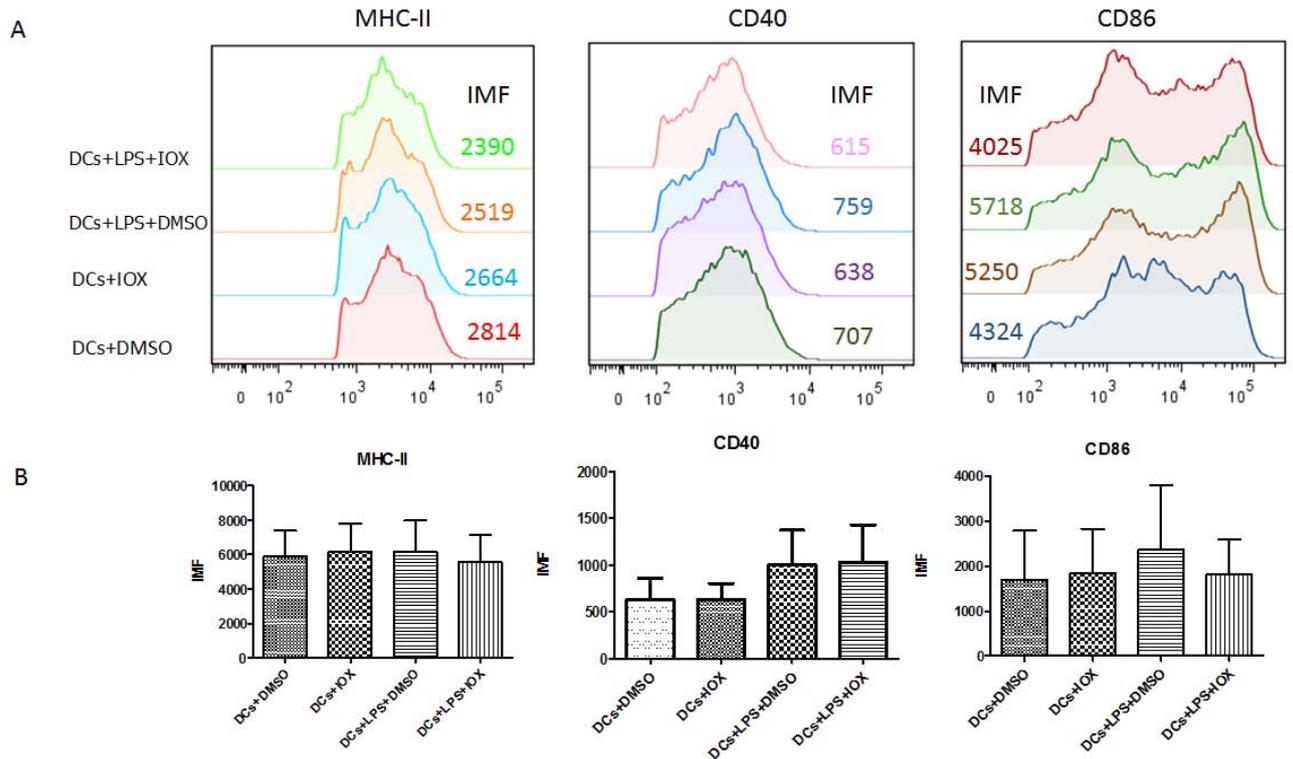


Figura 9. El inhibidor de PHD-2 IOX2 no afecta la activación de DCS *in vitro*. DCs aisladas de ratones MHC-II-GFP fueron cultivadas en presencia/ausencia de LPS y con /sin IOX-2. Después de 16 h se evaluó la expresión de moléculas de co-estimulación CD40 Y CD86 y la expresión de MHC-II. (B) Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía.

Para comprobar que IOX2 induce la acumulación de HIF-1α en las DCs, purificamos células CD11c+ de ratones MHC-II-GFP y las cultivamos con o sin LPS en presencia de DMSO o IOX2 por 5 h. En estas condiciones no observamos la acumulación de HIF-1α en las células CD11c+GFP+ (**Figura 10A**). Los resultados muestran que no hay diferencia estadística significativa en la expresión de HIF-1α aun en presencia de IOX2 (**Figura 10B**). En la literatura se ha descrito la acumulación de HIF-1α con inhibidores inespecíficos de PHDs en células dendríticas derivadas de médula ósea así como en macrófagos derivados de células RAW 264.7¹²⁸ o bien en condiciones de

hipoxia¹²⁷. Es posible que la inhibición únicamente de PHD-2 no sea suficiente para inducir la acumulación de HIF-1 α en DCs maduras.

Por lo tanto en un sistema de co-cultivo de linfocitos T con DCs maduras, la acumulación de HIF-1 α en los linfocitos T es suficiente para incrementar la proliferación/diferenciación de linfocitos T reg Foxp3+.

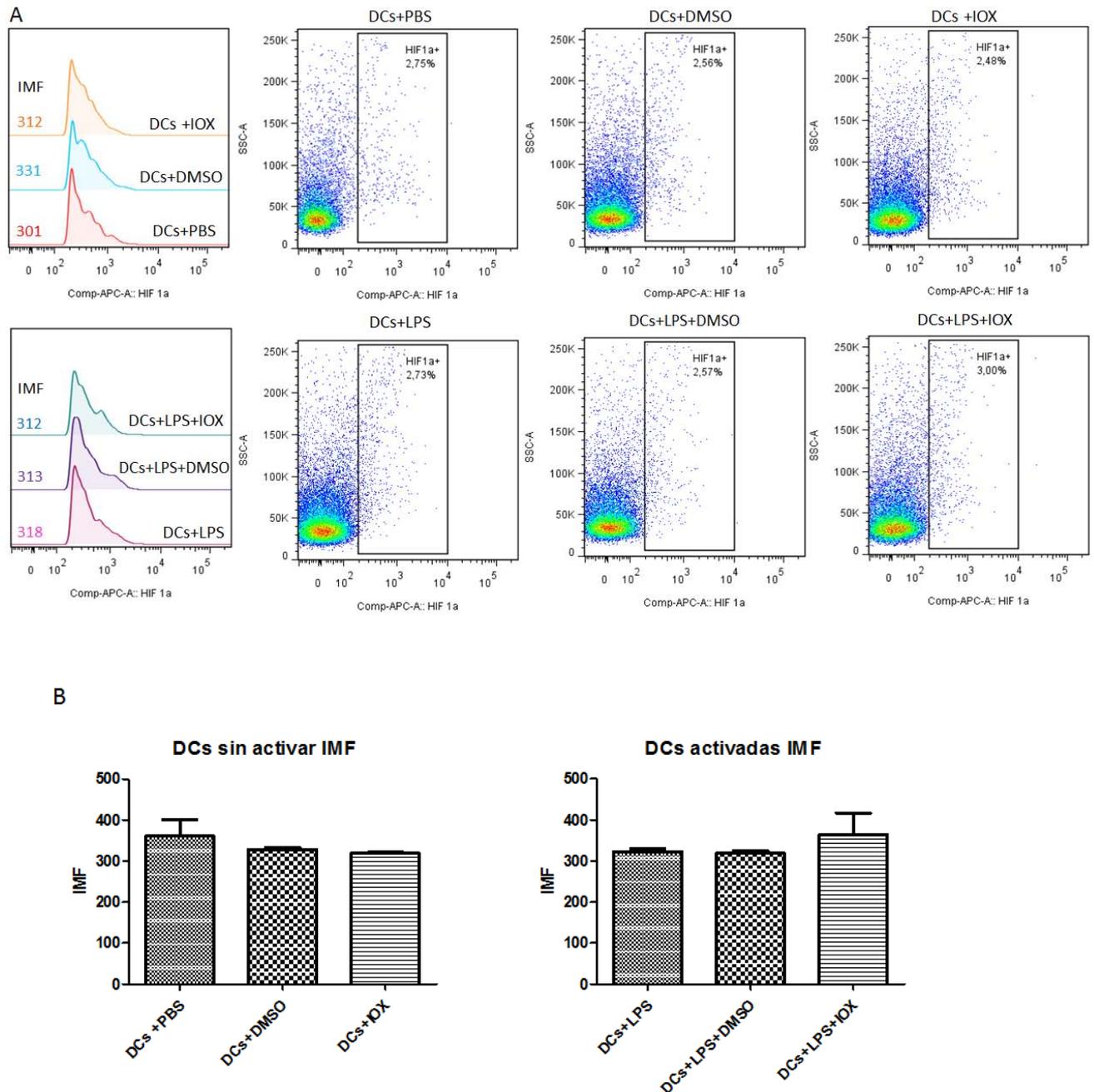


Figura 10. El uso del inhibidor de PHD-2 IOX2 no estabiliza a HIF-1 α en las DCs. DCs aisladas de ratones MHC-II-GFP fueron

cultivadas en presencia/ausencia de LPS y con / sin IOX-2. Después de 5 h se evaluó (A) el porcentaje de células HIF-1 α ⁺ y (B) la expresión de HIF-1 α . Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía.

6. Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten concluir que la generación y proliferación de células T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ es dependiente de la estimulación vía el TCR con bajas concentraciones de antígeno, y que a su vez la expresión de los factores de transcripción HIF-1 α y Foxp3 en ratones transgénicos DO11.10 es dependiente de la activación del TCR. Esta activación del TCR y el uso de la molécula IOX-2 permiten estabilizar a HIF-1 α en las células CD4 antígeno específicas *in vitro*, siendo este último capaz de modular la expresión de Foxp3; favoreciendo su expresión y aumentando el porcentaje de células Foxp3⁺

Sin embargo la estabilización de HIF-1 α en DCs usando IOX-2 no regula el estado de activación de las DCs, al no alterar la expresión de diferentes moléculas de co-estimulación (CD40, CD86 y MHC-II). Estos resultados indican que aunque HIF-1 α incrementa la proliferación/diferenciación de linfocitos Treg Foxp3⁺, este efecto no es debido a un incremento de DCs tolerogénicas en este modelo experimental.

7. Bibliografía

1. Xing, Y . *et al.* T -Cell tolerance: Central and peripheral. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–15 (2012).
2. Stritesky, G. L., *et al.* Selection of Self-Reactive T Cells in the Thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 95–114 (2012).
3. Sakaguchi, S . *et al.* Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**, 345–352 (2005).
4. Ziegler, S. F . *et al.* FOXP3 and the regulation of T reg/Th17 differentiation. *Microbes Infect.* **11**, 594–598 (2009).
5. Kyewski, B. *et al.* A Central Role for Central Tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 571–606 (2006).
6. Davey, G. M. *et al.* Preselection Thymocytes are more sensitive to T Cell Receptor Stimulation Than Mature T Cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1867–1874 (1998).
7. Lucas, B., *et al.* Divergent changes in the sensitivity of maturing T cells to structurally related ligands underlies formation of a useful T cell repertoire. *Immunity* **10**, 367–76 (1999).
8. Hogquist, K. *et al.* Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 772–782 (2005).
9. Klein, L ., *et al.* Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
10. McCaughy, T . M . *et al.* Central tolerance: What have we learned from mice? *Semin. Immunopathol.* **30**, 399–409

- (2008).
11. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* (80-.). **298**, 1395–1401 (2002).
 12. Anderson, M. S. *et al.* The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**, 227–239 (2005).
 13. Donskoy, E. *et al.* Two Developmentally Distinct Populations of Dendritic Cells Inhabit the Adult Mouse Thymus: Demonstration by Differential Importation of Hematogenous Precursors Under Steady State Conditions. *J. Immunol.* **170**, 3514–3521 (2003).
 14. Goldschneider, I. *et al.* A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. *Trends Immunol.* **24**, 77–81 (2003).
 15. Gallegos, A. M. *et al.* Central Tolerance to Tissue-specific Antigens Mediated by Direct and Indirect Antigen Presentation. *J. Exp. Med.* **200**, 1039–1049 (2004).
 16. Strasser, A. *et al.* T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol.* **25**, 610–615 (2004).
 17. Cohen, P. L. *et al.* Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 243–269 (1991).
 18. Kawabe, Y. *et al.* Programmed Cell Death and Extrathymic Reduction of VB8+ CD4+ T Cells in Mice Tolerant to Staphylococcus aureus Enterotoxin B. *Nature* **349**, 245–8 (1991).
 19. Valdor, R. *et al.* Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. *Semin. Immunol.* **25**, 313–320 (2013).
 20. Chappert, P. *et al.* Induction of T cell anergy: Integration of

- environmental cues and infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 552–559 (2010).
21. Bour-Jordan, H. *et al.* Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol. Rev.* **241**, 180–205 (2011).
 22. Delgoffe, G. M. *et al.* The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment. *Immunity* **30**, 832–844 (2009).
 23. Powell, J. D. *et al.* Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *J. Immunol.* **162**, 2775–2784 (1999).
 24. Powell, J. D. *et al.* The Mammalian Target of Rapamycin: Linking T Cell Differentiation, Function, and Metabolism. *Immunity* **33**, 301–311 (2010).
 25. Zheng, Y. *et al.* Anergic T cells are metabolically anergic. *J. Immunol.* **183**, 6095–6101 (2009).
 26. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261–268 (2001).
 27. Ishida, M. *et al.* Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol. Lett.* **84**, 57–62 (2002).
 28. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027–34 (2000).
 29. Parry, R. V. *et al.* CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms †. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9543–9553 (2005).

30. Probst, H. C., *et al.* Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* **6**, 280–286 (2005).
31. Nishimura, H., *et al.* Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151 (1999).
32. Mueller, D. L., *et al.* Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **11**, 21–27 (2010).
33. Vanasek, T. L., *et al.* Antagonistic roles for CTLA-4 and the mammalian target of rapamycin in the regulation of clonal anergy: enhanced cell cycle progression promotes recall antigen responsiveness. *J. Immunol.* **167**, 5636–5644 (2001).
34. Walunas, B. T. L., *et al.* CTLA-4 Ligation Blocks CD28-dependent T Cell Activation by Th1 cells. Walunas, Christina Y. Bakker, and Jeffrey A. Bluestone. **183**, (1996).
35. Tivol, E. A., *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541–547 (1995).
36. Perez, V. L. *et al.* Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **6**, 411–417 (1997).
37. Vignali, D., *et al.* How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–32 (2008).
38. Tang, Q. *et al.* The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**, 239–244 (2008).
39. Joetham, A. *et al.* Naturally Occurring Lung CD4⁺CD25⁺ T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF- β . *J. Immunol.* **178**, 1433–1442 (2007).

40. Kearley, J ., *et al.* Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.* **202**, 1539–47 (2005).
41. Green, E. A., *et al.*, R. a. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10878–83 (2003).
42. Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–569 (2007).
43. Grossman, W. J. *et al.* Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Analysis* **104**, 2840–2848 (2004).
44. Gondek, D .C . *et al.* Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4 + CD25 + Regulatory Cells Involves a . *J. Immunol.* **174**, 8–10 (2005).
45. Zhao, D.-M., *et al.* Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* **107**, 3925–3932 (2006).
46. Ren, X . *et al.* Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ.* **14**, 2076–2084 (2007).
47. Garín, M .I . *et al.* Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4 + CD25 + T cells Short title: Key role of galectin-1 in regulatory T cells. **109**, 2058–2066 (2006).
48. Josefowicz, S. Z ., *et al.* Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
49. Thornton, B. A., *et al.* Interleukin 2 Production. **188**, (1998).

50. Furtado, G. C., *et al.* Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J. Exp. Med.* **196**, 851–857 (2002).
51. Thornton, A. M., *et al.* Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* **172**, 6519–6523 (2004).
52. Fontenot, J. D., *et al.* A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **6**, 1142–1151 (2005).
53. Deaglio, S., *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–65 (2007).
54. Kobie, J. J., *et al.* T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* **177**, 6780–6786 (2006).
55. Zarek, P. E., *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. **111**, 251–259 (2014).
56. Rubtsov, Y. P., *et al.* Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* **28**, 546–558 (2008).
57. Bopp, T., *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1303–10 (2007).
58. Mahnke, K., *et al.* Immature, but not inactive: The tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* **80**,

- 477–483 (2002).
59. Cederbom, L ., *et al.* Stimulatory M olecules o n A ntigen-Presenting Cells. *Cell* 1538–1543 (2000).
 60. Fallarino, F . *et al.* Modulation o f t rypthophan c atabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1206–1212 (2003).
 61. Liang, B . *et al.* Regulatory T c ells i nhhibit d endritic c ells b y lymphocyte a ctivation ge ne-3 e ngagement o f M HC cl ass II. *J. Immunol.* **180**, 5916–26 (2008).
 62. Sarris, M., *et al.* Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* **28**, 402–413 (2008).
 63. Masanao Asano. M., *et al.* A u t o i m m u n e Disease as a C o n s e q u e n c e o f D e v e l o p m e n t a l A b n o r m a l i t y o f a T Cell Subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**, 387-396 (1996).
 64. Sakaguchi, B . Y . S ., *et al.* Study o n C ellular E vents i n P o s t -thymectomy A utoimmune O ophoritis i n M ice *J. Exp. Med.* **156**, 1565-1576 (1982).
 65. Nishizuka, Y . *et al.* Thymus a nd R eproduction: S ex-Linked Dysgenesis o f t h e G o n a d a f t e r N e o n a t a l T h y m e c t o m y i n M i c e . *Science* 166 753–755 (1969).
 66. Sakaguchi, S ., *et al.* Immunologic S e l f - T o l e r a n c e M a i n t a i n e d . *J. Immunol.* **155**, 1151–64 (1995).
 67. Itoh, M . *et al.* Thymus a nd a utoimmunity: p r o d u c t i o n o f CD25+CD4+ n a t u r a l l y a n e r g i c a n d s u p p r e s s i v e T c e l l s a s a k e y function o f t h e t h y m u s i n m a i n t a i n i n g i m m u n o l o g i c s e l f -tolerance. *J Immunol* **162**, 5317–5326 (1999).
 68. Benoist, C . *et al.* Treg c ells, l i f e h i s t o r y , a n d d i v e r s i t y . *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).

69. Forward, L. *et al.* Emerging Challenges in Regulatory. *Science* **317**, 627–629 (2007).
70. Annacker, O. *et al.* CD25⁺ CD4⁺ T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4⁺ T Cells Through the Production of IL-10. *J Immunol* **166**, 3008–3018 (2000)
71. Harder, J. *et al.* CD25 Is a Marker for CD4⁺ Thymocytes That Prevent Autoimmune Diabetes in Rats, But Peripheral T Cells with This Function Are Found in Both CD25⁺ and CD25⁻ Subpopulations. *J Immunol* **165**, 3105–3111 (2013)
72. Hori, S., *et al.* Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).
73. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68–73 (2001).
74. Blair, P. J. *et al.* CD4⁺CD8⁻ T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J. Immunol.* **153**, 3764–3774 (1994).
75. Gambineri, E., *et al.* Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**, 430–5 (2003).
76. Fontenot, J. D., *et al.* Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).
77. Josefowicz, S. Z., *et al.* Control of Regulatory T Cell Lineage Commitment and Maintenance. *Immunity* **30**, 616–625 (2009).
78. Olivares-Villagómez, D., *et al.* Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin

- basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **188**, 1883–1894 (1998).
79. Kretschmer, K. *et al.* Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* **6**, 1219–1227 (2005).
 80. Gottschalk, R. A., *et al.* TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 *in vivo*. *J. Exp. Med.* **207**, 1701–11 (2010).
 81. Sauer, S. *et al.* T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7797–7802 (2008).
 82. Haxhinasto, S., *et al.* The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. *J. Exp. Med.* **205**, 565–574 (2008).
 83. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–440 (2000).
 84. Mantel, P. Y. *et al.* Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* **176**, 3593–3602 (2006).
 85. Kim, H.-P. *et al.* CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J. Exp. Med.* **204**, 1543–1551 (2007).
 86. Schmidt-Supprian, M. *et al.* Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4566–71 (2004).
 87. Barnes, M. J. *et al.* Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery. *PLoS*

- Biol.* **7**, 0513–0524 (2009).
88. Molinero, L. L. *et al.* CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **182**, 6736–43 (2009).
 89. Sriskantharajah, S. *et al.* Proteolysis of NF-kappaB1 p105 is essential for T cell antigen receptor-induced proliferation. *Nat. Immunol.* **10**, 38–47 (2009).
 90. Burchill, M. A. *et al.* Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* **28**, 112–121 (2008).
 91. Liu, Y. *et al.* A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **9**, 632–640 (2008).
 92. Tone, Y. *et al.* Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* **9**, 194–202 (2008).
 93. Kühn, R., *et al.* Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
 94. Murai, M. *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.* **10**, 1178–84 (2009).
 95. Hale, L. P., *et al.* Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**, H1467–H1477 (2002).
 96. Ben-Shoshan, J., *et al.* Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2412–2418 (2008).

97. Clambey, E. T. *et al.* PNAS Plus: Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2784–E2793 (2012).
98. McNamee, E. N., *et al.* Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol. Res.* **55**, 58–70 (2013).
99. Chun, Y. S., *et al.* Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J. Korean Med. Sci.* **17**, 581–588 (2002).
100. Sitkovsky, M. *et al.* Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 712–721 (2005).
101. Kojima, H. *et al.* Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha-deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2170–2174 (2002).
102. Cramer, T. *et al.* HIF-1 α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. **112**, 645–657 (2003).
103. Endo, M., *et al.* HIF-1 α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation *J Immunol.* **112**, 645–657 (2005)
104. Dang, E. V. *et al.* Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**, 772–784 (2011).
105. McMahon, S., *et al.* Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 24171–81 (2006).
106. Fraisl, P., *et al.* Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 139–152 (2009).

107. Warshakoon, N. C. *et al.* Structure-based design, synthesis, and SAR evaluation of a new series of 8-hydroxyquinolines as HIF-1 α prolyl hydroxylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 5517–5522 (2006).
108. Nangaku, M. *et al.* A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2548–2554 (2007).
109. Osorio, F., *et al.* Role of dendritic cells in the induction of lymphocyte tolerance. *Front. Immunol.* **6**, 1–12 (2015).
110. Merad, M., *et al.* The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
111. Inaba, K., *et al.* Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J. Exp. Med.* **172**, 631–640 (1990).
112. Gallucci, S., *et al.* Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1249–1255 (1999).
113. Inaba, K. *et al.* High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* **186**, 665–672 (1997).
114. Süss, G. *et al.* A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**, 1789–1796 (1996).
115. Bonifaz, L. *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **196**,

- 1627–1638 (2002).
116. Hawiger, D . *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* **194**, 769–779 (2001).
 117. Enk, A. H. *et al.* Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *BLOOD* **101**, 4862–4869 (2003).
 118. Darrasse-Jeze, G . *et al.* Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **206**, 1853–1862 (2009).
 119. Geissmann, F . *et al.* TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J. Immunol.* **162**, 4567–4575 (1999).
 120. Yamazaki, S . *et al.* CD8⁺ CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **181**, 6923–33 (2008).
 121. Qu, X. *et al.* Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 668–673 (2005).
 122. Zhao, W . *et al.* Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and the migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **35**, 3468–3477 (2005).
 123. Elia, A. R . *et al.* Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1472–82 (2008).
 124. Mancino, A. *et al.* Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Cell* **112**, 3723–3734 (2008).
 125. Ricciardi, A. *et al.* Transcriptome of Hypoxic Immature Dendritic

- Cells: Modulation of Chemokine / Receptor Expression. *Mol. Cancer Res.* **6**, 175–185 (2008).
126. Krawczyk, C. M. *et al.* Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* **115**, 4742–4749 (2010).
127. Jantsch, J. *et al.* Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function. *J. Immunol.* **180**, 4697–4705 (2008).
128. Bhandari, T. *et al.* HIF-1 α influences myeloid cell antigen presentation and response to subcutaneous OVA vaccination. *J. Mol. Med.* **91**, 1199–1205 (2013).
129. Filby, A. *et al.* Appraising the suitability of succinimidyl and lipophilic fluorescent dyes to track proliferation in non-quiescent cells by dye dilution. *Methods* **82**, 29–37 (2015)