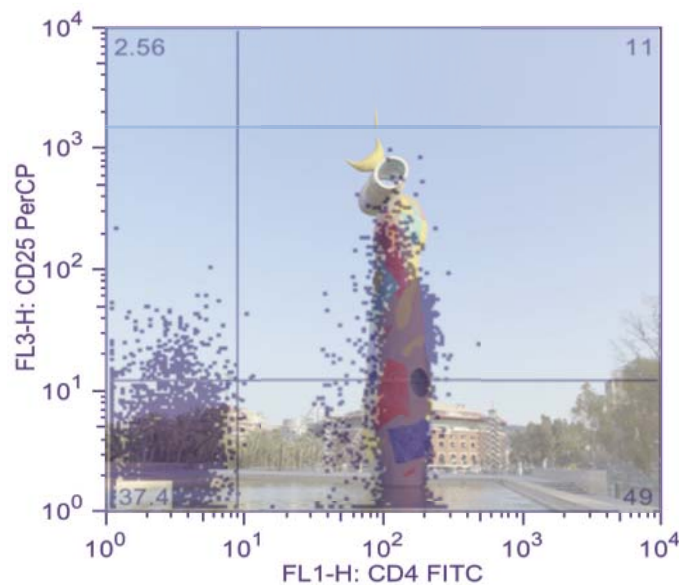


Laboratori d'Immunologia Cel.lular
Institut de Biotecnologia i Biomedicina
Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

Caracterització fenotípica i funcional de les cèl.lules T reguladores (naturals) en salut i malaltia (diabetis tipus 1)



Cristina Xufré Ballesteros

2015

Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i
Immunologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Memòria presentada per:

Cristina Xufre Ballesteros

Per optar al grau de:

DOCTOR EN IMMUNOLOGIA

Tesi realitzada al laboratori d'Immunologia Cel.lular de
l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat
Autònoma de Barcelona sota la direcció de la Dra.
Mercè Martí Ripoll.

La doctoranda

La directora

Cristina Xufre
Ballesteros

Mercè Martí Ripoll
Professora titular
d'Immunologia, UAB

Barcelona, Decembre de 2015

Dedicada als meus pares Josep i Rosa,
i a la meva germana Laura

ÍNDEX

Abreviatures	11
Resum	13
Introducció	15
1. Introducció bàsica del sistema immunitari	17
1.1.El sistema immunitari	17
1.2.Els limfòcits T	18
2. El sistema immunitari i la tolerancia immunològica	19
2.1. Tolerància central i selecció tímica	19
2.2.Tolerància perifèrica i recirculació limfocitària	21
2.3. Recirculació limfocitària	23
3. Caracterització de les Tregs: origen, fenotip i funció	23
3.1.Història de les Tregs	23
3.2.Generació de les nTreg	25
3.3.CD25 com a molécula clau per les Tregs	26
3.4.Marcadors de cèl.lules Tregs	27
3.5.Epigènètica de FOXP3	28
3.6.Tipus de cèl.lules Tregs FOXP3+: naturals i induïdes	28
3.7.Mecanismes de supressió	32
4. Tregs i autoimmunitat	37
4.1. Etiologia de la T1D	38
4.2. T1D és una malaltia autoimmunitària	39
4.3. Paper Tregs en T1D	40
Hipòtesi	43
Objetius	45
Materials i mètodes	49
1. Mostres i el seu processament per l'obtenció de limfòcits	50
1.1 Sang total o derivats sanguinis	50
1.1.1. Centrifugació en gradient de densitat	50
1.2. Timus humans pediàtrics	51
1.2.1. Processament dels timus	53
2. Immunofenotipatge per citometria de flux	54
2.1. Immunofenotipatge de sang i derivats sanguinis	54
2.1.1. Tinció superficial	54
2.1.2. Tinció citoplasmàtica	54
2.1.3. Adquisició de la mostra i anàlisi de les dades	54
2.2. Immunofenotipatge de les mostres de timus	55
2.2.1. Tinció superficial	55
2.2.2. Tinció citoplasmàtica	55
2.2.3. Adquisició de la mostra i anàlisi de les dades	58
3. Aïllament de cèl.lules T	58
3.1. Separació magnètica de cèl.lules T reguladores	58
3.2. Separació de cèl.lules T reguladores mitjançant citometria de flux	59
4. Metodologia REM de cultiu de cèl.lules T	60
5. Assajos funcionals	60

5.1. Assajos d'apoptosi	60
5.2. Assajos de supressió	61
6. Tècniques de biologia molecular	61
6.1. Extracció d'RNA	61
6.2 Validació i quantificació de les mostres d'RNA	62
6.3. Retro-transcripció	63
6.4. PCR convencional de GAPDH	64
6.5. PCR quantitativa	65
6.5.1. Quantificació relativa (mètode del Ct comparatiu o mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$)	65
7. Assajos proteòmics	67
8. Anàlisi estadística de les dades	68
Resultats i discussió	71
Capítol 1: Cèl.lules Treguladores al timus i la seva evolució amb l'edat en mostres pediàtriques	
Resultats	73
1.1. Estudi de les cèl.lules Treg naturals i altres poblacions de timòcits en mostres de timus humans pediàtrics	73
1.1.1 Anàlisi de l'expressió de CD25 als timòcits de les mostres humanes	73
1.1.2. Anàlisi de la freqüència de les poblacions d'estudi	75
1.1.3. Verificació de la naturalesa reguladora de les CD4SPCD25 ⁺ de timus	76
1.1.4. Caracterització fenotípica de les poblacions CD4SPCD25 ⁺ i DPCD25 ⁺ a les mostres de timus humans pediàtrics	77
1.1.4.1. Presentació dels marcadors per a l'anàlisi fenotípica	77
1.1.4.2. Anàlisi de l'expressió dels marcadors a les poblacions d'estudi	77
1.2. Estudi de l'evolució de les poblacions de timòcits en mostres humanes pediàtriques amb l'edat	79
1.2.1. Evolució de les poblacions de timòcits d'estudi amb l'edat	80
1.2.1.1. Timòcits DN, DP, CD4SP i CD8SP	80
1.2.1.2. Timòcits CD4SPCD25 ⁺ i DPCD25 ⁺	81
1.2.2. Evolució de les poblacions de timòcits d'estudi amb l'edat segons anàlisi de marcadors d'activació i de Tregs	82
1.2.2.1. Evolució del comportament dels marcadors en les poblacions d'estudi amb l'edat a les mostres de timus humans: percentatge de positivitat i intensitat d'expressió (MFI)	83
Annex 1	89
Discussió	93
Capítol 2: Búsqueda de marcadors de les cèl.lules T reguladores a perifèria i a timus	
Resultats	99
2.1. Validació mitjançant estudis d'expressió gènica de les proteïnes diferencialment expressades en les poblacions de cèl.lules T estudiades	101
2.1.1. Selecció dels gens a estudiar per qPCR	102
2.1.2. Interpretació de les dades generades per la PCR quantitativa Taqman®	105

2.1.3. Mostres usades en els assajos de PCR quantitativa Taqman®	106
2.2. Determinació de la naturalesa reguladora de les mostres de Tregs aïllades de perifèria comparativa de l'expressió gènica de les Tregs de perifèria amb Tregs de timus	107
2.3. Comparativa de l'expressió gènica de les Tregs de perifèria amb Tregs de timus	108
2.4. Comparativa de l'expressió gènica de les Tregs en repòs i post-activació	111
2.4.1. Anàlisi transcripcional de la fracció reguladora en repòs	111
2.4.2. Anàlisi transcripcional de cèl.lules reguladores activades	112
Annex 2	117
Discussió	123
Capítol 3: Cèl.lules T reguladores a perifèria, estudi en individus sans i individus amb diabetis autoimmune	
Resultats	127
3.1. Anàlisi de la freqüència de les fraccions cel·lulars TCD4 ⁺ segons l'expressió de CD25 a les mostres de sang perifèrica de controls i pacients	128
3.1.1. Estratègia d'anàlisi de les fraccions cel·lulars TCD4 ⁺ segons CD25 i grups d'estudi	128
3.1.2. El percentatge de CD25 ^T però no el de cèl.lules CD25 ^{bright} està disminuït en pacients respecte controls	129
3.2. Disminució de les cèl.lules TCD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺ circulants en els pacients T1D	130
3.3. El baix percentatge de cèl.lules T GITR ⁺ es manté després de l'expansió in vitro de T _{reg} de pacients T1D	135
3.4. El baix percentatge de cèl.lules T GITR ⁺ no afecta a la capacitat de supressió de les cèl.lules T _{reg} expandides de pacients T1D	136
3.5. El baix percentatge de GITR en les cèl.lules T CD25 ⁺⁺ FOXP3 ⁺ de pacients T1D es manté en cultiu a curt termini sota condicions subòptimes d'estimulació	137
3.6. Les cèl.lules T CD25 ⁺⁺ FOXP3 ⁺ de pacients T1D són més susceptibles a l'apoptosi que les seves equivalents de controls	139
Discussió	141
Discussió final	145
Conclusions	151
Apèndix	155
Bibliografia	157

Abreviatures

APC – Cèl.lula presentadora professional
β-ME – β- Mercaptoetanol
CD – Grup de diferenciació
CD25 – Ccadena alfa del receptor de la IL-2
CD122 – Cadena beta del receptor de la IL-2
CD127 – Cadena alfa del receptor de la IL-7
CD45RO – Proteïna tirosina fosfatasa receptor C, isoforma O
c.p.m. – Comptes per minut
CTLA-4 – antígen 4 associat al limfòcit T citotòxic
DEPC – Dietilpirocarbonat
DC – cèl.lula dendrítica
DNA – Àcid desoxiribonucleic
dNTPs – Desoxiribonucleòtids trifosfats
dUTP – Desoxiuridina trifosfat
FACS – Separació cel.lular assistida per fluorescència
FITC – Isotiocianat de fluoresceïna
FOXP3 – *Forkhead box P3*
g. – Força centrífuga relativa (o rcf)
GAPDH – Gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (gen *housekeeping*)
GITR – Membre 18 de la superfamília dels receptors del TNF
IMDM – Medi de cultiu sintètic altament enriquit per a creixement cel.lular ràpid
iTreg – Cèl.lula T reguladora induïda
MFI – Intensitat mitja de fluorescència
min. – Minut
M-MLV – Transcriptasa reversa
mRNA – RNA missatger
NK – Cèl.lula citocida natural
NKT – Cèl.lula T amb propietats NK
nTreg – Cèl.lula T reguladora natural
PBMCs – Cèl.lules mononuclears de sang perifèrica
PBS – Tampó fosfat salí
PCR – Reacció en cadena de la polimerasa
PE – Ficoeritrina
PE-Cy7 – Ficoeritrina-cianina 7

PerCP – Clorofil·la peridinina

PGK1 – Fosfogliceroquinasa 1 (gen *housekeeping*)

RNA – Àcid ribonucleic

RPMI 1640 – Medi de cultiu cel·lular amb gran quantitat de fosfats utilitzat per al manteniment de cèl·lules primàries i línies cel·lulars principalment d'origen humà

rRNA – RNA ribosòmic

s. – Segon

SFB – Sèrum fetal boví

T1D – Diabetis tipus 1

TA – Temperatura ambient

Teff – Cèl·lules T efectores CD4⁺CD25⁻

Treg – Cèl·lula T reguladora CD4⁺CD25⁺

UV – Llum ultraviolada

Resum

Les cèl.lules T reguladores naturals (nTregs) són limfòcits que es generen durant la selecció tímica i que formen part dels mecanismes que té el sistema immunitari per mantenir la seva homeostasi i controlar respostes autoreactives que poden conduir a l'autoimmunitat. Les nTregs són emigrants tímics que expressen de forma estable FOXP3, gràcies a canvis epigenètics que ocorren durant la seva maduració i que li permeten mantenir les funcions supressores. Les nTregs expressen també la cadena α del receptor de la IL-2, CD25, i això els hi confereix un fenotip activat. A més de CD25, les nTregs expressen altres marcadors com són: CTLA-4, GITR, CD127lo, CCR6, entre altres, i que són molècules que també s'indueixen en cèl.lules T activades durant la resposta.

Tot i ser un marcador exclusiu al timus, l'expressió intracel·lular de FOXP3 el fa incompatible amb el seu ús per la purificació de les nTregs. Més endavant es va descriure que les cèl.lules T humanes activades també poden convertir-se en FOXP3⁺ i adquirir un fenotip supressor, tot i que la seva expressió és transitòria. Aquest fet, juntament amb l'absència de marcadors exclusius, fa que l'ús d'aquestes cèl.lules en immunoteràpia representi encara un repte. Per això, a partir de diverses aproximacions hem estudiat el fenotip de les cèl.lules T reguladores al timus i a la perifèria.

De l'estudi exhaustiu d'una àmplia col·lecció de timus pediàtrics (n=35) d'edats compreses entre els 2 dies i els 8 anys, hem confirmat que la freqüència de les poblacions tímiques varia amb l'edat, tal i com s'havia descrit prèviament. A més, i per primera vegada, s'ha observat que la freqüència de les nTregs disminueix amb l'edat. El fenotip d'aquesta població és estable amb el temps, a excepció de CD95, membre de la família del TNF involucrat en apoptosi i activació cel·lulars. La freqüència de cèl.lules CD95⁺ dins de la població de nTregs incrementa amb l'edat, i suggeriria un augment en susceptibilitat a l'apoptosi mediada per CD95 que explicaria la davallada d'aquesta població amb l'edat.

Un cop les nTregs s'exporten des de timus a la perifèria, es barregen amb cèl.lules T activades i cèl.lules T de memòria amb les que comparteixen diversos marcadors. En el nostre laboratori vam abordar la cerca de molècules característiques de nTreg fent servir una aproximació proteòmica seguida d'una anàlisi d'expressió gènica. De la comparació de cèl.lules nTreg de timus i nTreg de perifèria vam definir la galectina3 com a marcador d'aquesta població que s'adquireix a perifèria. En cèl.lules Treg activades, funcionalment supressores, la seva expressió es troba a nivells similars de dos dels marcadors característics d'aquestes cèl.lules, FOXP3 i CTLA4.

Finalment, es va abordar l'estudi d'aquesta població en pacients amb diabetes tipus 1. Es va fer un estudi exhaustiu de caracterització fenotípica en mostres de sang de pacients en comparació amb controls, que va revelar una disminució de GITR en les Tregs. Aquest defecte no afectava a la seva capacitat de supressió, en canvi podria estar associat a una major susceptibilitat a l'apoptosi.

Introducció

1. Introducció bàsica del sistema immunitari

1.1. El sistema immunitari

El sistema immunitari (SI) té com a objectiu protegir l'organisme d'infeccions per patògens i ho fa mitjançant una sèrie de processos que es coneixen com a resposta immunitària. Les primeres defenses de què disposa el SI constitueixen el sistema immunitari innat, format per barreres físiques (pell i mucoses, la saliva i el moc), i també cèl.lules fagocítiques, macròfags i neutròfils, i cèl.lules NK, que són citolítiques, que s'acompanyen de limfòcits no convencionals com les *innate lymphoid cells*, entre altres. Aquests elements del SI innat actuen de forma ràpida i sempre de la mateixa manera enfront els agents externs que entren en contacte amb l'organisme. Les molècules que estan relacionades amb el SI innat són receptors especialitzats (PRRs) en reconèixer estructures repetitives característiques de microorganismes (MAMPs), que van des de molècules estructurals de la membrana i paret bacteriana, fins a material genètic procedent dels patògens. La resposta immunitària innata no està restringida per un microorganisme o agent extern, ja que les molècules que detecten els senyals de perill estan codificats al DNA germinal, a diferència de la resposta que genera el SI adaptatiu, en la que els receptors encarregats de reconèixer antígen són restringits i específics d'un antígen o determinant antigènic concret i estan codificats a partir de reordenaments de material genètic dels limfòcits T i B. Per tant, l'altra branca del sistema immunitari és el que es coneix com resposta adaptativa i que involucra l'activació de cèl.lules T i B que expressen un receptor d'antigen (TCR i BCR, respectivament) que, en termes generals, és específic per cada antígen. L'avantatge que el SI adaptatiu es posi en marxa és que genera memòria immunològica, és a dir, part de les cèl.lules que s'han activat en un primer encontre amb un microorganisme, resten en forma de cèl.lules semi-activades que en un segon encontre actuaran de forma més ràpida i intensa.

Hi ha dos tipus d'immunitat específica, la immunitat humoral i la immunitat cel.lular, que juntes proporcionen una resposta adequada per fer front a microbis extracel.lulars i intracel.lulars, respectivament. Tot i que no són excloents, la immunitat humoral és la predominant enfront de patògens extracel.lulars, i el principal mecanisme efector està conduït pels anticossos específics que es formen durant la resposta, que opsonitzen i faciliten la fagocitosi, activen el sistema del complement, i neutralitzen els patògens. En canvi, la resposta cel.lular és la que engloba els processos on principalment estan

involucrades les cèl.lules T. El mecanisme efector està liderat per les cèl.lules TCD4⁺ o Th (cèl.lules T *helper* o col.laboradores) i TCD8⁺ (cèl.lules T citotòxiques). El SI ha d'estar regulat, ja que un cop acabada l'exposició a l'antigen, els mecanismes efectors que s'han posat en marxa han de tornar al seu estat d'homeostasi, i això és especialment important per la resposta adaptativa, ja que per absència o mal funcionament dels mecanismes de regulació, es poden induir respostes autoreactives que condueixen a autoimmunitat.

1.2. Els limfòcits T

Els limfòcits T maduren al timus des d'on surten a circulació com a cèl.lules T madures o pre-immunes. Les cèl.lules T reconeixen antigen a través d'un receptor especialitzat denominat receptor de cèl.lula T (TCR), que interacciona amb les molècules del Complex Principal d'Histocompatibilitat (MHC) encarregades de presentar pèptids procedents d'antígens processats. El TCR està constituït per dues cadenes polipeptídiques i s'han descrit dos tipus de poblacions de limfòcits T depenent del tipus de cadenes que el formen: els limfòcits T alfa-beta (TCR $\alpha\beta$ format per una cadena alfa i una cadena beta), i els gamma-delta (TCR $\gamma\delta$, format per una cadena gamma i una delta). Els limfòcits T $\alpha\beta$ són majoritaris en circulació (90-99% de les cèl.lules T madures perifèriques en humans[1]) i els millor estudiats en quant a la seva funció i la seva implicació en autoimmunitat. El TCR s'expressa conjuntament amb CD3 que és un complex proteic dels mamífers compost de quatre cadenes diferents (CD3 γ , CD3 δ i dues vegades el CD3 ϵ) que s'associen amb un dímer de la cadena ζ per generar un senyal d'activació després de la interacció específica del TCR amb l'antigen. A més, els limfòcits T $\alpha\beta$ poden ser positius per CD4 o per CD8, dos correceptors que per una banda restringeixen el reconeixement d'antigen presentat per les molècules de MHC de classe II o classe I, respectivament, i per l'altra, la seva expressió està associada a un mecanisme funcional ben determinat: els limfòcits TCD4 són *helper*, és a dir, el seu mecanisme efector és principalment ajudar a altres cèl.lules del sistema immunitari adequant el microambient en què es produeix la resposta per la producció de citocines, i les cèl.lules TCD8 també anomenades citotòxiques per la seva capacitat de lisar la cèl.lula amb la que interaccionen.

2. Sistema immunitari i tolerància

2.1. Tolerància central i selecció tímica

El sistema immunitari adaptatiu s'activa davant d'estructures externes i estranyes, però no deixen de ser molècules que algunes d'elles comparteixen característiques amb estructures pròpies. La manca de resposta del sistema immunitari contra autoantígens es coneix com a tolerància immunològica. Segons la localització on s'ha generat, parlem de tolerància central o de tolerància perifèrica. La tolerància central es dona als òrgans limfoides primaris generadors de limfòcits madurs T i B, que són respectivament timus i medul·la òssia. I la tolerància perifèrica té lloc als òrgans limfoides secundaris (ganglis limfàtics, melsa, MALT, BALT) i als teixits perifèrics.

El timus s'encarrega de la selecció i la maduració dels precursors de cèl·lules T que procedeixen de la medul·la òssia, i com a òrgan de tolerància central, genera un repertori de cèl·lules T "no autoreactiu" (de baixa afinitat pels antígens propis) i restringit per l'haplotip de l'MHC de l'individu. Al període fetal, els precursors de cèl·lules T es troben a fetge, i d'allà viatgen a timus. Més endavant en la gestació, aquests precursors hematopoiètics colonitzaran la medul·la òssia [2] i des d'aquesta localització els precursors arribaran al timus per esdevenir limfòcits T *naive*, preimmunes i amb maduresa per respondre a antígens quan sigui necessari.

El timus es troba situat a la regió anterior del mediastí, a sobre del cor, i es troba dividit en lòbuls. El teixit connectiu que embolcalla l'òrgan s'anomena càpsula. A cada lòbul s'hi troben dues zones ben diferenciades: el còrtex i la medul·la. L'espai que hi ha entre còrtex i medul·la es coneix com a zona cortico-medul·lar, i és on arriben els precursors al timus mitjançant les vècules de l'endoteli alt. Els precursors T durant la seva estada al timus reben el nom de timòcits. Els diferents estadis de desenvolupament que pateixen els timòcits es classifiquen en funció del seu fenotip de marcadors que van expressant-se i ho deixen de fer més endavant, però els marcadors que determinen les principals etapes de la maduració i selecció dels timòcits són CD4, CD8 i el TCR. En el seu viatge a través de les diferents regions tímiques, els timòcits interaccionen amb les cèl·lules de l'estroma tímica, que al còrtex són cèl·lules epitelials tímiques corticals i macròfags, i a medul·la, on es troben els corpuscles de Hassall, són majoritàriament cèl·lules epitelials medul·lars i cèl·lules dendrítiques. Els senyals que aquestes interaccions proporcionen indueixen als timòcits al seu compromís de diferenciació a cèl·lula T.

Quan entren a timus, els timòcits són cèl.lules doble negatives $CD4^-CD8^-$ (timòcits DN, amb 4 estadis de diferenciació anomenats DN1-DN4) sense expressió de TCR que migren cap a la zona subcapsular. A l'estadi DN3 es dona la divergència dels llinatges $T\alpha\beta$ i $T\gamma\delta$ ([3]. La selecció i maduració que pateixen les cèl.lules $T\gamma\delta$ estan encara poc definits, i els processos que es descriuen a continuació afecten al llinatge de cèl.lules $T\alpha\beta$.

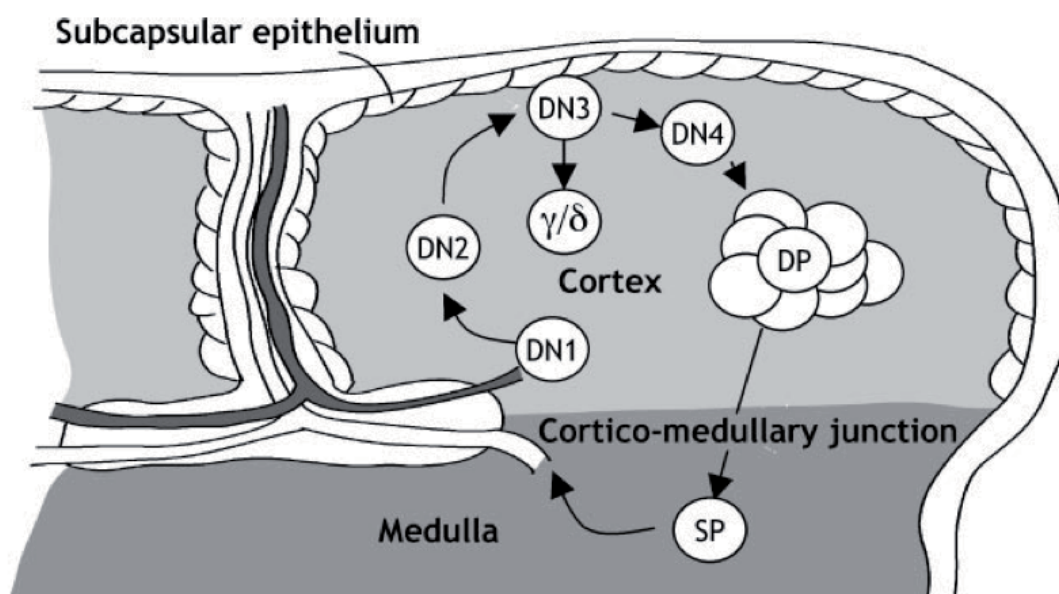


Figura 1. Selecció tímica del llinatge $T\alpha\beta$. Els progenitors de medulla òssia (DN1) entren al timus adult a prop de la regió cortico-medular. Els timòcits migren cap a la zona subcapsular i a l'estadi DN3 divergeix el llinatge $T\gamma\delta$. Els timòcits DN4 reordenen TCR β i el seu aparellament exitós amb el pre-T α induïx una proliferació extensiva i l'expressió de CD4 i CD8 (DP). Llavors té lloc el reordenament del TCR α i els timòcits corticals pateixen la selecció positiva. Es regula a la baixa un dels dos receptors i els timòcits SP migren a medulla per sotmetre's a la selecció negativa. Aquella petita fracció de cèl.lules T que sobreviu a aquests punts de control surt de timus cap a la circulació sanguínia. (Extret de Starr, Jameson & Hogquist Ann Rev Immunol 2003).

El reordenament productiu del gen de la cadena beta del TCR (TRBV) induïx l'expressió dels coreceptors CD4 i CD8, i parlem llavors de timòcits $CD4^+CD8^+$ doble positius (timòcits DP). En aquestes cèl.lules s'inicia l'expressió del pre-TCR: la cadena β reordenada s'uneix a una cadena constant pre-T α . La senyalització a través del pre-TCR activarà el reordenament de la cadena alfa del TCR (TCR α), que un cop reordenada amb èxit substituirà la pre-T α per donar lloc al complex final del TCR $\alpha\beta$. Els timòcits DP amb TCR a membrana pateixen una elevada taxa de divisió, són timòcits corticals i interaccionen amb les molècules del MHC de classe I i II expressades a les cèl.lules epitelials corticals per "avaluar" el seu TCR en el procés de

selecció positiva. El reconeixement de les molècules d'HLA presentades per l'estroma cortical dona senyals de supervivència als timòcits, mentre que la resta mor per apoptosi. La interacció amb HLA de classe I regula a la baixa l'expressió de CD4 i genera timòcits CD8 de positivitat única (timòcits CD8SP, *CD8 Single Positive*), i contràriament, la interacció amb HLA de classe II regula a la baixa el coreceptor CD8 i els timòcits DP evolucionen a timòcits CD4 de positivitat única (timòcits CD4SP).

Les cèl.lules CD4SP i CD8SP viatgen a la medul.la, on se sotmeten a la selecció negativa. Aquest procés assegura que aquells timòcits que reconeixen amb elevada afinitat els complexos MHC-pèptid que l'estroma medul.lar, principalment les cèl.lules dendrítiques i les pròpies cèl.lules epitelias tímiques medul.lars, els presenta, rebent senyals d'inducció d'apoptosi. Tan sols un 5% dels precursors de cèl.lules T que entren a timus assolixen tots els passos de maduració i selecció tímiques, i surten finalment per via sanguínia a circulació perifèrica com a cèl.lules T madures i verges[1].

Durant la vida, el timus abasteix la perifèria de forma contínua amb noves cèl.lules T *naïve*, com hem dit, educades per ser sensibles a antígens estranys i no reaccionar a antígens propis [4]. Tot i que la seva mida segueix creixent fins que arriba a un màxim en mida a la pubertat, els seus compartiments funcionals (medul.la i cortex) i la producció de cèl.lules T disminueixen després dels primers anys de vida en endavant. Es tracta d'un procés conegut com a involució, que es defineix per un decrement de la mida, pes i activitat de la glàndula amb l'edat. Es creu que aquest procés resulta dels elevats nivells d'hormones sexuals circulants especialment a la pubertat, una menor població de cèl.lules precursors del moll de l'os, i canvis al microambient tímic [5]. Tot i que el timus es manté com a lloc de diferenciació i maduració de cèl.lules T en l'edat adulta, aquest òrgan degenera en la seva major part a teixit adipós a la vellesa [6]. Es creu que la involució del timus és un dels factors que més contribueix al declivi associat amb l'edat que pateix el sistema immune i que es coneix com a immunosenescència.

2.2. Tolerància perifèrica i recirculació limfocitària

Tot i els mecanismes de tolerància central, hi ha cèl.lules T autoreactives que escapen de la selecció tímica i arriben a perifèria, on es poden trobar amb situacions que poden activar aquestes cèl.lules (per acció de la microbiota o per mimetisme molecular amb pèptids de patògens) i es generin respostes autoreactives que conduixin a processos d'autoimmunitat [7]. Els mecanismes de tolerància perifèrica s'encarreguen de

mantenir aquestes cèl.lules sota control, i inclouen: òrgans immunoprivilegiats en els que l'accès dels limfòcits circulants està desfavorit, el desenvolupament de no resposta de cèl.lules T funcionals o anèrgia clonal per manca de molècules coestimuladores o baix nombre de complexos pMHC específics [8]. Aquests mecanismes es coneixen com a tolerància perifèrica passiva, per diferenciar-los de la que exerceixen les cèl.lules Treguladores sobre els limfòcits T autoreactius, que es coneix com a tolerància perifèrica activa o dominant.

A banda de les cèl.lules Treg $CD4^+CD25^+$ naturals (nTreg) (veure més endavant apartat 3.2), hi ha altres cèl.lules T que també posseeixen activitat reguladora, principalment són limfòcits $TCD4^+$, però també s'han descrit cèl.lules T reguladores dins de les $CD8^+$. Moltes d'aquestes cèl.lules són reguladores induïdes, és a dir, que adquireixen les funcions reguladores a través d'estimulació antigènica específica en un context de citocines concret a la perifèria [9]–[11]. De cèl.lules T reguladores induïdes hi ha les $TCD4^+CD25^+FOXP3^+$ (veure més endavant apartat 3.6) i les $FOXP3^-$, que són les Tr1 secretores d'IL-10 [12], les Th3 secretores de $TGF\beta$ [13] i certes $TCD4^+CD8^-$ [14] i $TCD8^+CD28^-$ [15]. Aquestes cèl.lules contrasten amb les nTregs, que es desenvolupen a timus com a subpoblació especialitzada per a la funció supressora.

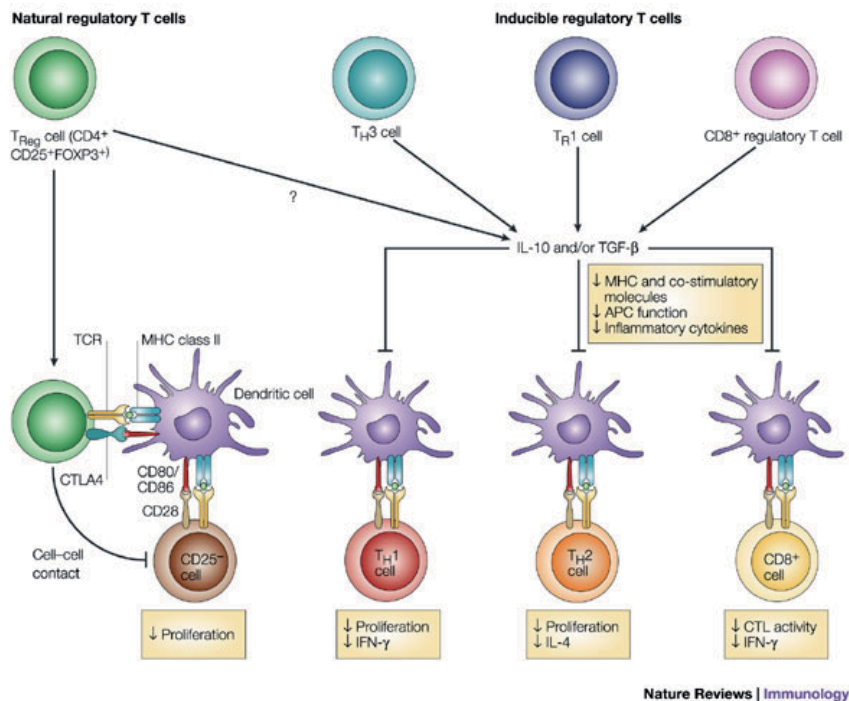


Figura 2. Cèl.lules T reguladores naturals i cèl.lules T induïdes. Les cèl.lules Treguladores naturals s'originen al timus i migren a la perifèria, on constitueixen entre 5-10% del total de cèl.lules T en ratolí. Altres poblacions poden ser induïdes a la perifèria sota la influència de DC semi-madures, IL-10 o $TGF\beta$. Entre aquestes cèl.lules trobem alguns subtipus de $TCD4^+$: Tr1 i Th3. També existeixen cèl.lules $TCD8^+$ reguladores que secreten IL-10. (Extret de Kingston HG. Mills. Nature Reviews Immunology 2004).

2.3. Recirculació limfocitària

La població de cèl.lules T madures a perifèria recircula de sang a limfa, passant pels limfonodes i òrgans linfoïdes secundaris, que és on es donarà la resposta immunitària. Per això la recollida a la perifèria de la limfa és conduïda als òrgans linfoïdes secundaris proximals on els limfòcits i cèl.lules dendrítiques accedeixen principalment des de la circulació sanguínia. La recirculació limfàtica és un procés altament controlat i de diversos passos, regulat per l'expressió de receptors de *homing* als limfòcits (selectines) els seus lligands expressats a les cèl.lules d'endoteli alt (HEVs) i afavorit per receptors de quimiocines que interaccionen amb les quimiocines produïdes per les cèl.lules estromals i les integrines, que en resposta a la interacció del receptor de quimiocina amb el seu lligand indueixen sofrir un canvi de conformació, permeten l'adhereència final entre limfòcit i endoteli, per finalment fer la transvasació a través d'aquest [16]. Un cop als limfonodes, els limfòcits passen un temps (dies) i retornen a la circulació sanguínia per seguir la recirculació.

Estudis recents demostren que les cèl.lules T, tant CD4 com CD8, també recirculen al timus, i que la seva entrada es veu facilitada si es troben activades [17]. Se'ls hi atribueixen funcions diverses que no són mutuament excloents, com ara: proveir un dipòsit de cèl.lules T memòria, eliminar antigens estranys en moments d'infecció, induir selecció negativa a antígens que aquestes cèl.lules expressen o han adquirit de forma passiva, mediar la selecció positiva, entre d'altres.

3. Caracterització de les Tregs: origen, fenotip i funció

3.1. Història de les Tregs

Les primeres nocions que el timus produeix cèl.lules T amb capacitat supressora es van revelar amb experiments de timectomia [18]. A més de la previsible limfopènia de cèl.lules T, la timectomia natal induïa una malaltia autoimmunitària multiorgànica [19]. Les cèl.lules T perifèriques dels ratolins timectomitzats van donar lloc a un ampli espectre de lesions autoimmunitàries òrgan-específiques en els ratolins limfopènics, demostrant que la tolerància central elimina de forma incompleta les cèl.lules T patogèniques. L'autoimmunitat induïda per la timectomia depenia fortament de l'edat del ratolí. La malaltia més severa s'indueix en neonats timectomitzats a dia 2-3 després del naixement, i després es tornaven progressivament més resistents a l'autoimmunitat amb l'edat. La transferència d'esplenòcits d'individus adults no tractats ni

timectomitzats prevenia el desenvolupament de la malaltia [20]. Per altra part, la transferència d'esplenòcits era suficient per prevenir o remetre l'autoimmunitat induïda per la timectomia, per tant existia una fracció de cèl.lules T amb capacitat supressora. Per purificar la subpoblació de cèl.lules T amb capacitat reguladora, les cèl.lules T perifèriques es van seleccionar negativament en base a l'expressió de diferents molècules de superfície. Diferents grups van usar estratègies semblants basades en transferir a ratolins timectomitzats poblacions d'esplenòcits deplecionades de subgrups de cèl.lules T amb molècules de superfície candidates, i avaluaven l'abilitat de prevenir l'aparició d'autoimmunitat. Sakaguchi [21] va demostrar inicialment que les cèl.lules CD5⁺ jugaven un paper en la prevenció de l'autoimmunitat. En un model alternatiu d'inducció de la malaltia, els esplenòcits deplecionats de cèl.lules CD5⁺ es transferien de forma adoptiva en ratolins limfopènics on s'indueix autoimmunitat multiorgànica [22]. Per tant, es va concloure que la població reguladora estava continguda a la població CD5⁺. Més endavant, es va determinar que tant l'activitat protectora com la patogènica residia en el compartiment TCD4⁺ [23]–[25]. De forma independent, Powrie i Mason van utilitzar l'expressió diferencial de CD45RB entre les cèl.lules TCD4⁺ per distingir les T convencionals de les reguladores en models de transferència adoptiva d'inducció d'autoimmunitat en rates [26]. Els seus resultats van indicar que les cèl.lules T autoreactives presents en les fraccions CD5⁻ o CD45RB^{hi} normalment es troben en un estant dorment gràcies a l'efecte immunomodulador de les cèl.lules CD5⁺ o CD45RB^{lo} [27], cèl.lules T amb fenotip activat. Després d'esforços per definir marcadors de superfície que segreguessin amb la capacitat supressora, el grup de Sakaguchi va identificar les cèl.lules TCD4⁺CD25⁺ com a la població reguladora que es veia afectada en els ratolins timectomitzats neonatalment [28]. Aquestes cèl.lules T reguladores CD4⁺CD25⁺ eren capaces de prevenir l'autoimmunitat no només en ratolins timectomitzats neonatalment sinó també en animals limfopènics [29], [30]. Això es va demostrar per la inducció d'autoimmunitat multiorgànica que presentava un fenotip similar a la dels ratolins timectomitzats en néixer, per la transferència d'esplenòcits deplecionats de cèl.lules TCD25⁺ en hostes limfopènics.

L'elucidació de la genètica del desordre autoimmune conegut com a *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome* va proveir el següent gran avenç en el camp [31]. Com el seu nom indica, l'IPEX es manifesta per una colecció de síndromes autoimmunes que es presenten típicament en la infància en mascles afectats. Una patologia anàloga lligada al cromosoma X es va descriure per al ratolí *scurfy*, que porta una mutació espontània. Tot i que la mutació *scurfy* es va aïllar el 1959, i la síndrome IPEX es va descriure el 1982, el gen mutat en els pacients IPEX i

els ratolins *scurfy* no es va identificar fins el 2001 en *foxp3*, un factor de transcripció de la família *forkhead winged-helix* [32]–[36].

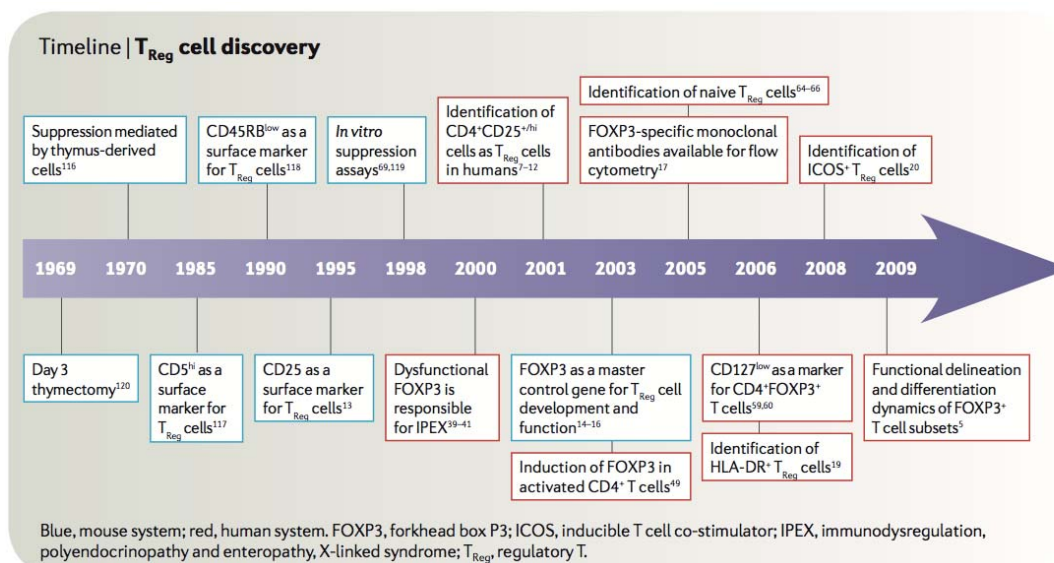


Figura 3. Selecció tímica del llinatge $T\alpha\beta$. Els progenitors de medulla òssia (DN1) entren al timus adult a prop de la regió cortico-medul·lar. Els timòcits migren cap a la zona subcapsular i a l'estadi DN3 divergeix el llinatge Tgd. Els timòcits DN4 reordenen TCRb i el seu aparellament exitós amb el pre-Ta induïx una proliferació extensiva i l'expressió de CD4 i CD8 (DP). (Extret de Sakaguchi S. Nature Reviews in Immunology. 2010).

3.2. Generació de les nTreg

La demostració de la capacitat supressora dels timòcits suggeria que les cèl·lules T reguladores es generaven al timus [21]. No obstant, en un inici es va hipotetitzar que les cèl·lules Treg constituïen una població transitòria de cèl·lules T activades que limita les respostes immunitàries a autoantígens i patògens, ja que molts dels marcadors de superfície que s'expressen a les Tregs són compartits amb les cèl·lules T $CD4^+$ activades convencionals. En aquest context, es pensava que les cèl·lules Treg aïllades de timus representaven cèl·lules T madures recirculants que havien adquirit capacitat supressora després de reconèixer antigen a teixits perifèrics. Tanmateix, una proporció significativa de cèl·lules T en desenvolupament molt probablement es comprometen al llinatge de Treg dins del timus, ja que les cèl·lules $CD4^+CD25^+$ amb habilitat supressora es detecten en ratolins neonats abans de la generació perifèrica de cèl·lules activades $CD25^+$ a melsa [37]. A més, les anàlisis dels ratolins $Foxp3^{GFP}$, en què la seqüència de la proteïna fluorescent GFP es troba insertada dins del marc de lectura a l'exò 2 de *foxp3*, va demostrar que essencialment tots els timòcits $CD4^+Foxp3^+$ expressaven nivells baixos però detectables de CD8, mentre que les cèl·lules $TCD4^+Foxp3^+$ a perifèria no tenien expressió de CD8 [38]. Es coneix que les Treg tímiques es generen principalment a les unions cortico-medul·lars del timus, i provenen dels timòcits $CD4SP$

semimadurs o madurs [39]–[41]. De forma general es considera que l'estimulació a través del TCR és un factor essencial tot i que insuficient per al desenvolupament d'aquesta població, i que es requereixen senyals coestimuladores addicionals. En aquest context, CD28, IL-2 i altres senyals a través del receptor γ_c [42]–[46] promouen l'adquisició del destí de Treg. Diversos models s'han proposat per explicar el desenvolupament de les Treg a timus [47], [48]. Entre aquests models, la sugerència que els senyals d'elevada afinitat a través del TCR als precursors de les Treg promouen el desenvolupament d'aquesta població són dominants [49]. Aquest model suggereix que la diferenciació de les nTreg s'inicia a través del reconeixement del TCR d'autoantigens amb elevada afinitat al timus, i així l'afinitat del TCR és un factor intrínsec i determinant per promoure el desenvolupament de les Treg al timus [50]–[53]. Un segon model proposa que el desenvolupament de les Treg es pot subdividir en dos passos, on l'estimulació a través del TCR condueix a la generació de timòcits CD25⁺Foxp3⁻ a partir de timòcits CD4SP, que després es convertiran en Foxp3⁺CD25⁺Treg en resposta a la IL-2 [43], [54]. No obstant, sembla probable que els senyals de la IL-2 mantinguin la viabilitat de les Treg i protegeixin les cèl·lules que expressen Foxp3 de patir apoptosi al timus [15], [55].

3.3. CD25 com a molècula clau per les Treg

Després del descobriment de CD25 com a marcador útil per distingir les cèl·lules Treg d'altres cèl·lules T en animals normals, diversos estudis van revelar que la molècula no era solament un marcador per les Treg sinó que era essencial per a la seva funció. Els ratolins deficients en IL-2, que de forma espontània desenvolupaven autoimmunitat i inflamació severes, presentaven un número reduït de cèl·lules TCD4⁺CD25⁺ tot i mantenir un número normal de cèl·lules T i una composició normal dels grups CD4/CD8 [30], [56]. Les quimeres de medul·la òssia de cèl·lules T deficients en IL-2 i cèl·lules T amb IL-2 intacta no desenvolupaven ni autoimmunitat ni inflamació i presentaven una generació normal de Treg CD4⁺CD25⁺ [57]. Els ratolins deficients en CD25 (cadena α del receptor de la IL-2) o CD122 (cadena β del receptor de la IL-2) es veien afectats de simptomatologia similar, autoimmunitat i inflamació, que es podia prevenir per inoculació de cèl·lules T CD4⁺CD25⁺ normal [58]–[60]. A més, la neutralització de la IL-2 circulant per l'administració d'anticossos monoclonals anti-IL-2 reduïa de forma selectiva les cèl·lules TCD4⁺CD25⁺ en ratolins normals i en conseqüència provocava autoimmunitat [61]. Aquestes troballes de forma colectiva indiquen que la IL-2 és un element de creixement i factor de supervivència per les

nTreg, i que el CD25 com a component del receptor de la IL-2 d'elevada afinitat és per tant una molècula indispensable per al seu manteniment.

3.4. Marcadors de cèl.lules Treg

La població de cèl.lules T CD4⁺CD25⁺ està enriquida en activitat supressora, però aquest fenotip ha mostrat ser insuficient per a la purificació homogènia de Treg en humans. CD25 com a marcador de Treg en humans té limitacions, ja que no està restringit a les cèl.lules T i tampoc es pot usar per distingir entre Treg i cèl.lules Teff activades. Mentre que la població murina de cèl.lules TCD4⁺CD25⁺ és relativament homogènia i altament enriquida en Treg, en humans les cèl.lules CD25⁺ poden contenir les dues poblacions, Treg i Teff. Per obtenir cèl.lules Treg amb puresa elevada cal seleccionar la població de cèl.lules TCD4⁺CD25^{hi}, que té la funció reguladora [62]. Un número elevat d'altres marcadors existeixen per definir les Treg, i inclouen GITR, CTLA-4, CD45RB, CD62L, Nrp1 i LAG-3. Tanmateix, tampoc permeten discriminar de forma exclusiva les Treg ja que la seva expressió també es regula a l'alça durant l'activació de les cèl.lules T, i per tant les trobem expressades a les cèl.lules Teff. Un avanç significatiu en l'objectiu de definir de forma més precisa la població de Treg va tenir lloc quan es va identificar el factor de transcripció FOXP3 com a molècula necessària pel seu desenvolupament [63]. Cal emfatitzar que en humans les cèl.lules FOXP3⁺ poden ser CD25^{low} or CD25^{high}. A causa d'una diferent susceptibilitat a l'apoptosi mediada per CD95, s'ha observat que les Treg d'individus adults poden subdividir-se en dues subpoblacions [64]. Una població pot aïllar-se de sang de cordó o sang perifèrica d'adult i es caracteritza per un fenotip característic de cèl.lula T *naïve*, CD45RA^{high}, CD45RO^{low}, CD95^{low}. Per tant, aquestes cèl.lules es coneixen com a Treg *naïve*, expressen nivells de CD25 similars als de les Teff i són resistents a l'apoptosi. L'altra població s'assembla a cèl.lules memòria pel seu fenotip, CD45RA^{low}, CD45RO^{high}, CD95^{high}. La majoria d'aquestes cèl.lules Treg memòria expressen alts nivells de CD25 i són sensibles a l'apoptosi mediada per CD95. Estudis recents demostren que la baixa expressió de la cadena alfa del receptor de la IL-7 (CD127) es pot usar per distingir les cèl.lules Treg de les cèl.lules T activades [65], [66]. La població CD4⁺CD25⁺CD127^{low} conté aproximadament un 80% de cèl.lules FOXP3⁺, que representa un percentatge majoritari que el de la població CD4⁺CD25^{high} [65].

3.5. Epigenètica de Foxp3

Una fracció minoritària de cèl.lules T Foxp3⁺ presenten plasticitat i es transformen en cèl.lules no reguladores mitjançant la pèrdua de FOXP3 [67], [68]. A més, tant les cèl.lules TCD4⁺ humanes com les murines expressen de forma transitòria Foxp3 sense adquirir funció supressora [69]–[71]. Aquestes observacions suggereixen l'existència de dos tipus de cèl.lules T Foxp3⁺, Treg funcionalment estables i cèl.lules Foxp3⁺ no reguladores *naïve*. Tot i que les dues poblacions expressen Foxp3, a les no reguladores Foxp3⁺ *naïve* els hi manca una part significativa de caraterístiques moleculars específiques de Treg com ara modificacions epigenètiques. Les cèl.lules Treg estan associades a la hipometilació del DNA en el locus de Foxp3 en una seqüència conservada no codificant 2 (CNS2) i s'ha demostrat que és necessària per l'expressió estable de Foxp3 [72], [73]. A més, la desmetilació del DNA té lloc simultàniament en diversos gens coneguts com a "signatura de Treg", com *Foxp3*, *Ctcf4*, *Ikzf2* (Helios), *Ikzf4* (Eos), and *Tnfrsf18* (GITR) [74]. Aquests canvis són específics pel desenvolupament de Treg al timus i no induïts en resposta a TCR o estimulació amb TGFβ [74], [75]. En concordància, cèl.lules iTreg generades *in vitro* i cèl.lules no-Treg Foxp3⁺ *naïve* observades en humans i ratolins demostren la manca de DNA hipometilació específica de Treg, que correlaciona amb una manca d'una part significativa de l'expressió gènica del tipus de Treg i estabilitat de l'expressió molecular de la signatura de Treg [71], [74], [76]. Així, una elevada correlació de patró de desmetilació específica de Treg amb estabilitat a llarg plaç i la funció de les Treg suggereix que el patró epigenètic pot ser un marcador de confiança per usar conjuntament amb l'expressió de Foxp3 per identificar aquelles cèl.lules Treg que han completat el seu compromís de llinatge.

3.6. Tipus de cèl.lules Treg FOXP3⁺: naturals i induïdes

La tolerància immunològica és una característica clau del sistema immunitari que està dissenyat per preservar els teixits propis i alhora permetre respostes efectives contra infeccions. Les cèl.lules T autoreactives són eliminades de forma central al timus, i a la perifèria, les cèl.lules T autoreactives que han escapat d'aquesta tolerància central es mantenen sota control per un número de mecanismes immunoreguladors intrínsecs i extrínsecs, entre els quals les Treg jugen un paper crucial. La importància de les Treg en el manteniment de la tolerància central als teixits propis s'evidencia en ratolins i humans per la malaltia autoimmunitària fatal que es desenvolupa quan hi ha pèrdua de

funció de FOXP3 per mutacions funcionals al gen, el factor de transcripció mestre que s'expressa de forma selectiva a les Tregs [34]–[36]. Les Tregs es generen al timus (nTregs) i fora del timus a la perifèria (iTregs) com a conseqüència de la inducció de FOXP3 després d'exposició antigènica [77]. El descobriment que el TGF- β induïx l'expressió de FOXP3 i l'activitat supressora en cèl·lules T convencionals *in vitro* va generar possibilitats que *in vivo* es generessin tant en ratolí [9], [78] com en humans [79]. No obstant, els senyals que condueixen a la generació d'iTregs *in vivo* estan poc definits. Històricament, dosis subimmunogèniques d'antigen [80] i també expressió endògena d'antigen forani en un ambient limfopènic [81] induïen iTregs *in vivo*. Ara cada cop és més clar que les iTregs s'originen en diverses condicions i poden constituir una porció significativa de Tregs a la perifèria, en teixits especialment, com ara la lamina pròpia [82]. Aquest fet també genera la pregunta de si aquests grups de Tregs són funcionalment similars, o si les iTregs són solament un producte secundari de l'exposició antigènica a la perifèria. Els experiments de timectomia neonatal en ratolí suggereixen fortament que les Tregs que es generen a timus són claus en la tolerància immunològica, i les Tregs generades a perifèria no són suficients per mantenir les cèl·lules autorreactives sota control [28], [29], [83]. No obstant, de forma recent, les iTregs han demostrat funcions indispensables en el control de respostes autoimmunes sota certes condicions inflamatòries [84]–[86]. Amb els avanços recents en l'habilitat de distingir les Tregs d'origen tímic vs. les d'origen perifèric amb l'ús de neuropilin1 i Helios, estan emergent diferències específiques entre els dos grups en quant a expressió gènica, modificacions epigenètiques i estabilitat de l'expressió de FOXP3.

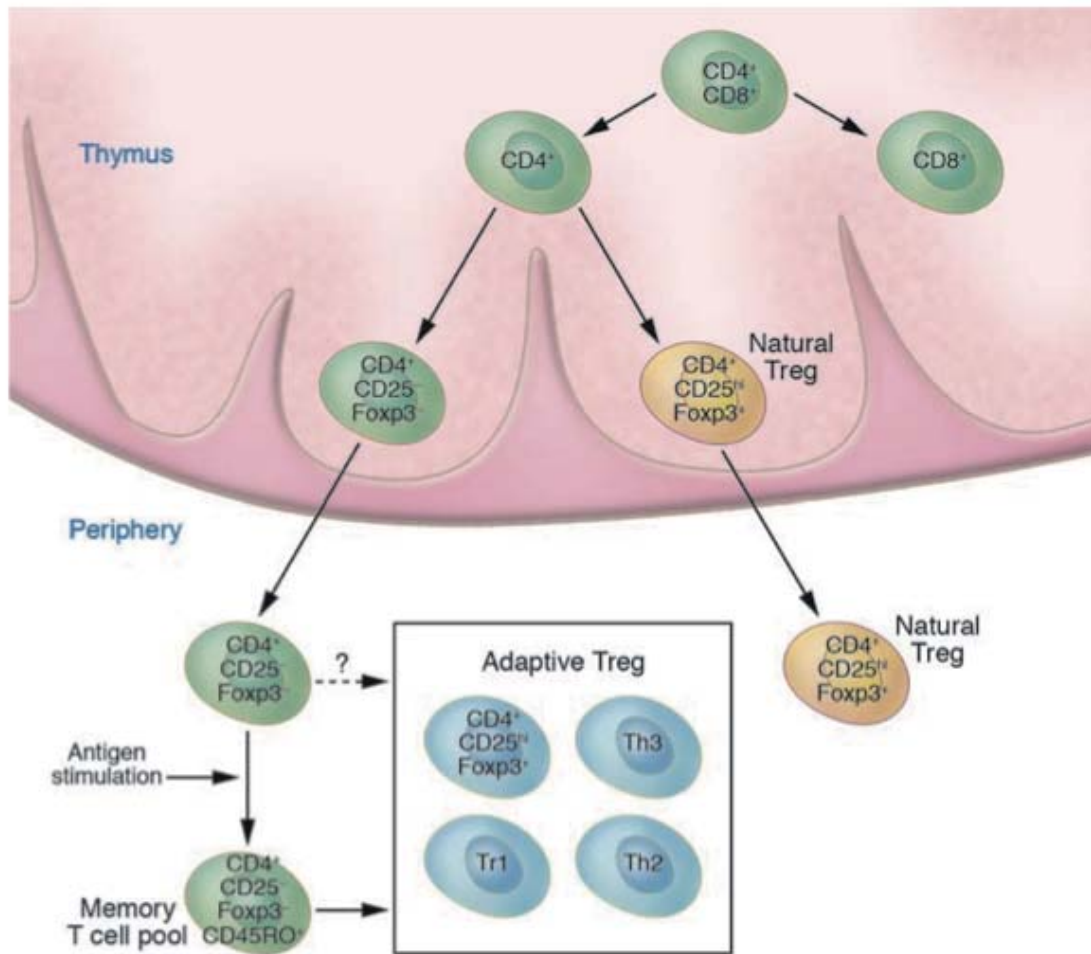


Figura 4. Generació de Tregs naturals i Tregs induïdes. Les cèl·lules Treg naturals, la major funció de les quals és controlar les respostes autoimmunitàries, s'originen com un llinatge propi al timus, són cèl·lules TCD4⁺ que expressen FOXP3 i alts nivells de CD25. Quan migren a la perifèria, aquestes cèl·lules mantenen les seves propietats fenotípiques i funcionals. En paral·lel, altres grups de cèl·lules TCD4⁺ també controlen de manera efectiva les respostes immunitàries, no només contra antigens propis sino també contra antigens microbians, tumorals i de transplant. Aquestes Tregs no estan presents com a tal al timus, sinó que deriven de precursors perifèrics TCD4⁺CD25⁻ i es diferencien a Tregs funcionals seguint l'estimulació adequada (en presència d'antigen adequat o citocines especialitzades). Es coneixen de forma general com a Treg induïdes (iTregs). Un cop diferenciades, també poden expressar CD25 i FOXP3. No obstant, una característica principal que les diferencia de les nTregs és la seva dependència a les citocines. (Extret de Chatenaud L. J Clin Invest 2006).

Abans de la identificació de FOXP3 com a *master gene* de les Tregs, es van generar estudis que van donar evidències de la generació *in vivo* d'iTregs [87]. Aquestes cèl·lules mostraven un fenotip de Treg veritable i expressaven marcadors canònics com són CTLA4, GITR i CD103. Tot i que el paper de l'exposició antigènica no es va adreçar en aquests estudis, el requeriment de la IL-2 es va establir clarament. Més tard, es va demostrar que la inducció òptima d'iTregs s'associa amb mètodes d'entrega d'antígens no immunogènics com ara injecció oral o intravenosa, bombes peptídiques o a través de DC carregades amb anticossos en absència d'adjuvants [80], [88]. Les iTregs convertides *in vivo* són supressores efectives en assajos *in vitro* [80], [81], [88]–[90], mentre que les iTregs induïdes per TGFβ no són totalment supressores i

adquireixen solament part de la signatura transcripcional de les Tregs [9], [79], [91], [92], subratllant encara més les diferències entre les iTregs i les nTregs.

La regulació epigenètica de l'expressió gènica juga un paper important en la diferenciació i estabilització del llinatge de cèl.lula T [93], [94]. En nTregs, la desmetilació de les illes CpG a la regió 2 no codificant conservada (*Treg-specific demethylation region* or TSDR) és una característica principal i es pensa que reflecteix estabilitat: expressió constitutiva de FOXP3 en aquesta població [95]. La inducció *in vitro* de foxp3 mitjançant TGF- β no és suficient per induir la desmetilació del TSDR, mentre que les iTregs generades *in vivo* exhibeixen patrons variables. Alguns dels estudis inicials van mostrar que les iTreg generades *in vivo* tenen TSDR demetilats [96, tot i que això s'ha vist contradit per estudis recents que demostren que les iTregs expressen motius CpG metilats a TSDR [90]. Recentment, el grup de Sakaguchi va refermar que el desenvolupament de les Treg és contingent a través de la desmetilació de les cpG no només al TSDR sinó també en la signatura de gens com Tnfrsf18, CTLA-4, Ikzf4, i Il2ra [74]. La desmetilació en aquests gens a les nTregs estabilitza el patró d'hipometilació CpG tipus nTreg, que es necessita per a un desenvolupament complet de Treg a més de per l'expressió de FOXP3. Així, el desenvolupament de nTreg no només ve dictat per la regulació epigenètica de FOXP3 sinó també per haver aconseguit establir el patró de desmetilació específic de Treg. Futurs estudis epigenètics es necessiten a les iTreg per incloure no només TSDR sinó tb altres signatures gèniques que determinin un estat de Treg totalment compromès.

Els estudis dirigits directament a analitzar les funcions de les iTregs *in vivo* han estat pocs a causa de la manca de models animals apropiats. Molts estudis funcionals han utilitzat iTregs induïdes amb TGF- β *in vitro* i han demostrat que són protectores [90], [97], [98]. En aquest sentit, les iTregs induïdes antígen-específiques amb TGF- β *in vitro* són altament eficients controlant el debut d'autoimmunitat en models murins de gastritis autoimmune a través de la inhibició de les funcions de DC i la modulació del tràfic de cèl.lules T [99], [100]. No obstant, estudis que comparen les capacitats de supressió dels grups de Treg, han trobat que les iTregs són menys eficients que les nTregs [84], [91]. Aquests estudis reflexen una manca de l'adquisició del programa complet de Treg per part de les iTregs induïdes per TGF- β , que en combinació amb altres factors, com ara el número de cèl.lules injectades i el tipus d'animal, poden influir en la seva eficàcia. L'anàlisi funcional de les iTregs ha estat majoritàriament limitat a la tolerància a mucoses, respostes inflamatòries a antígens exranyes i models animals que potser no reflecteixen condicions fisiològiques. Haribhai *et al.* van demostrar

recentment que les nTregs són incapaces de suprimir inflamació crònica i autoimmunitat en absència de iTregs [84]. En el seu model, les nTregs soles no eren suficients per mantenir la tolerància quan es transferien a ratolins deficientes en Foxp3. En canvi, quan les cèl.lules Teff Foxp3⁻ es coinjectaven amb les nTregs, les iTregs generades perifèricament representaven un 15% aproximadament del *pool* de Treg i actuaven conjuntament amb les nTreg per restablir la tolerància. És difícil dibuixar conclusions finals basades en aquests estudis, ja que s'han observat inconsistències en el comportament de les respostes de cèl.lules T en ratolins *scurfy*. Malgrat això, si funcions similars de les iTregs s'observessin en altres models animals, això recolzaria un interessant paradigma, que les iTregs es generen per complementar les nTregs i les contribucions dels dos grups de Tregs serien necessaris per establir tolerància. S'hipotetitzava que les nTregs es necessiten per mantenir l'homeostasi immunitària i el control de respostes autoimmunes d'ampli espectre, mentre que les iTregs es generen per controlar la inflamació localment en teixits i aquesta supressió seria transitòria a causa de la curta vida o estabilitat de les iTregs [101].

3.7. Mecanismes de supressió

Les cèl.lules Treg poden suprimir l'activació, la proliferació i la funció efectora d'un ampli ventall de cèl.lules immunes, que inclouen les cèl.lules TCD4⁺ i CD8⁺, les cèl.lules NK i NKT, cèl.lules B i APCs *in vitro* i *in vivo* [102]. Aquesta habilitat singular per controlar les respostes immunitàries situa en un paper central les cèl.lules Treg per a la prevenció de malalties autoimmunitàries, immunopatologies i al·lèrgia, com també en el manteniment de la tolerància als al·loinjerts i la tolerància materno-fetal durant l'embaràs [103]. No obstant, les cèl.lules Treg també poden suprimir les respostes immunitàries dirigides contra cèl.lules tumorals i afavorir la progressió del tumor. La inducció de la capacitat supressora de les Treg requereix estimulació antigènica (per exemple, senyals d'activació a través del TCR), mentre que la supressió que exerceixen les Treg activades no és específica d'antigen [104].

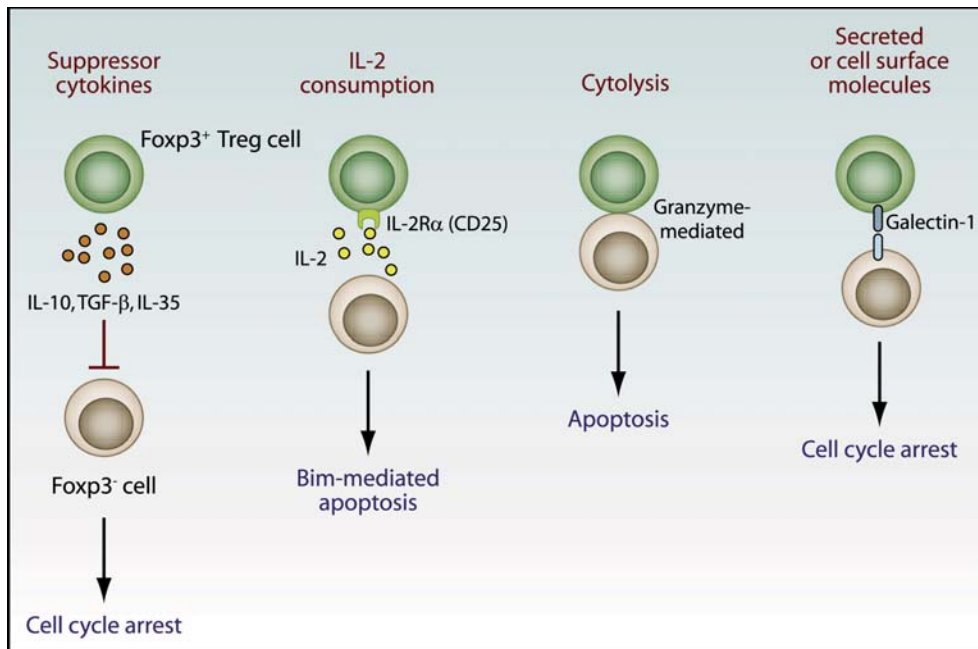


Figura 5. Representació dels diferents mecanismes de supressió que poden exercir les cèl·lules Treg. Diversos events moleculars i cel·lulars s'han descrit per explicar com les Treg poden suprimir les respostes immunitàries. Aquests inclouen: secreció de citocines immunosupressores, privació de IL-2, citotoxicitat, modulació de molècules de superfície, entre altres.

Existeixen diversos mecanismes de supressió descrits per a les cèl·lules Treg, i és probable que diversos funcionin sinèrgicament i de manera complementària, i que cada mecanisme contribueixi a la supressió en una certa extensió i en una certa condició. S'han descrit mecanismes de supressió per contacte cèl·lula-cèl·lula, per modulació funcional mitjançant molècules com CTLA-4, CD39, CD73, LAG3, o induïnt la mort d'APCs o cèl·lules T responedores mitjançant granzimes i perforines. També s'han descrit mecanismes mediat per factors solubles, com la secreció de citocines immunosupressores com són la IL-10, TGFβ, IL-35, galectina 1, o la privació de citocines com ara la IL-2, necessària per a l'expansió i la supervivència de les T responedores [105]–[107]. A continuació s'expliquen de forma detallada els diversos dels mecanismes que s'acaben d'apuntar:

- I. Modulació funcional (CTLA-4, IDO, TIGIT, LAG3):
 - Axis CD28/CTLA-4. L'observació que les Treg són l'única població de limfòcits que constitutivament expressa **CTLA-4** juntament amb el perfil supressor d'aquestes cèl·lules *in vitro* (hipoproliferació, baixa producció de citocines per les Treg), que s'assembla molt al que s'ha observat en presència de reactius que bloquegen la coestimulació, va suggerir la possibilitat que la interacció de CTLA-4 de les Tregs amb CD80 i CD86 en les DC fos una via important a través de la qual les Tregs mediessin la seva supressió *in vitro*. Diversos

estudis demostren clarament que les Treg poden regular a la baixa l'expressió de molècules coestimuladores en DC de ratolí i humanes *in vitro* [108], [109]. La funció de CTLA-4 en les Tregs ha estat clarificada per la recent demostració que animals amb una deleció selectiva de l'expressió de CTLA-4 desenvolupen autoimmunitat sistèmica a les 7 setmanes d'edat [110]. Per tant, la deficiència de CTLA-4 en les Treg per si sola és suficient per causar una malaltia fatal, i el manteniment de la seva expressió en cèl.lules T efectores activades és insuficient per prevenir aquest resultat. Les conclusions que s'obtenen d'aquests estudis és que la inhibició de l'expressió de CD80 i CD86 per les Treg limita la capacitat de les DC per estimular les cèl.lules T *naïve* a través de CD28, cosa que resulta en supressió immunitària.

- S'han proposat altres mecanismes pels quals les Treg o bé suprimeixen l'activitat presentadora d'antigen de les DC o promuen la secreció de factors supressors per la població de DC. Les Treg poden condicionar les DC a través d'un mecanisme dependent d'interaccions entre CTLA-4 i CD80 i CD86 per expressar **IDO** (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), que és una molècula reguladora potent que indueix el catabolisme del triptofan en metabolits proapoptòtics que suprimeixen l'activació de les cèl.lules T efectores. La privació de triptofan al medi és essencial per a l'activació i proliferació de cèl.lules T efectores, però no sembla que les cèl.lules Treg siguin tant sensibles a aquest aminoàcid. La inducció d'IDO es va trobar dependent d'una expressió elevada de CTLA-4 en les Treg [111].
- **Axis CD226/TIGIT.** Al 2009 es va descriure l'axis TIGIT/CD226 com un dels mecanismes supressors semblants a l'axis CD28/CTLA-4. TIGIT és un nou receptor coinhibidor que, juntament amb CD226 (DNAM-1), competeixen amb diferent afinitat pels seus lligands expressats a les cèl.lules dendrítiques CD112 i CD155 [112]. La interacció de CD226 (com ho fa CD28) activa les cèl.lules T, però aquesta és inhibida quan la interacció és mitjançant TIGIT, que expressa motius ITIM a la seva cua intracitoplasmàtica [113]. A més de les cèl.lules Tregs, també s'ha descrit expressat a cèl.lules NK i també a les TCD8+. La resposta de TIGIT va molt dirigida a la inhibició de la resposta Th1, i per tant, a la producció d'IFN γ [114].
- Una altra molècula de superfície que pot jugar un paper en la supressió de la funció de les DC per les Treg és **LAG-3** (CD223), un homòleg del CD4 que uneix molècules d'MHC II amb molta afinitat. La unió de LAG3 a les molècules de classe II expressades per DC immadures indueix un senyal inhibitori mediat

per ITAM [115]. Com que les cèl.lules T humanes activades també poden expressar MHCII, la unió de LAG-3 de les Treg a les efectores activades pot resultar en supressió.

II. Deprivació d'IL-2:

En treballs de Pandinyan *et al.* les Treg inhibien la proliferació de les Teff perquè consumien preferentment la IL-2 del medi gràcies al seu receptor d'alta afinitat per la IL-2, de manera que les Teff morien per apoptosi depenent del factor proapoptòtic Bim [116]. Altres treballs en ratolí indiquen que en les primeres fases de la infecció amb diferents patògens (*Listeria*, *Toxoplasma* o amb el virus de la vacuna), la IL-2 produïda per les cèl.lules T efectores és principalment consumida de forma autocrina, però durant l'evolució de la resposta, les cèl.lules Treg apareixerien i bloquejarien les primeres a causa d'un consum més eficient de la citocina [116]. En canvi, estudis d'addició d'anti-CD25 per bloquejar la IL-2 del medi en assajos de supressió *in vitro* no va tenir cap efecte sobre la capacitat reguladora de les Treg [117]. En resum, els estudis no demostren que el consum d'IL-2 sigui una de les vies majoritàries de supressió *in vitro*.

III. Inducció de mort (granzima, perforina):

Les Treg humanes poden activar-se mitjançant una combinació d'anticossos contra CD3 i CD46 per expressar granzima A i matar cèl.lules TCD4⁺ i CD8⁺ activades i altres tipus cel.lulars de manera depenent de perforina sense la implicació de la senyalització Fas-FasL [118]. Altres evidències indiquen que el mecanisme en ratolins és independent de perforina i mediat per granzima [119]. En microambients tumorals, Cao *et al.* [120] va demostrar que entre un 5-30% de Treg expressaven granzima B, i que aquestes cèl.lules eren lítiques per NK i CTLs de manera depenent de granzima B i perforina. Per tant, en certs contextes les Treg poden diferenciar-se al que s'han anomenat cèl.lules "supressores-citotòxiques".

IV. Mitjançant molècules solubles (IL-10, TGF β , IL-35, galectina 1)

- Nakamura *et al.* (JEM 2001) van per primer cop suggerir la idea que el **TGF β** produït per les Treg estigués unit a la superfície cel.lular i mediés la supressió de manera depent de contacte cel.lular. En els seus estudis, detectaven TGF β en cèl.lules T en estat de repòs i activades, i la supressió podia veure's revertida per elevades quantitats d'anti-TGF β . En contrast amb aquests estudis, Piccirillo *et al* no van ser capaços de demostrar requeriments per la producció

de TGF β o resposta a TGF β en la supressió mediada per Tregs [121]. Després de l'activació a través del TCR, Andersson et al (2008 JEM) van poder tenir amb anti-LAP (*Latency-associated peptide*), una molècula que també és producte del gen del TGF β , (i presumiblement TGF β latent expressat) un elevat percentatge de cèl.lules Treg humanes i de ratolí activades, però cap d'elles va ser reactiva amb anti-TGF β (Tran et al., 2009b JI). Quina és llavors la significació funcional de l'expressió selectiva de TGF β latent en cèl.lules Treg activades? La interpretació més senzilla és la que ja va oferir en un principi Nakamura et al (2001 JEM), amb el seu model que proposava que el TGF β latent de superfície s'activa i juga un paper principal en la supressió de les Treg actuant directament en les Teff o en les DCs.

- La IL-10 de forma indirecta suprimeix les respostes de les Teff inhibint de forma potent les capacitats de presentació d'antigen de les APCs, incloent DC, cèl.lules de Langerhans i macròfags. La IL-10 regula a la baixa l'expressió d'MHC II i de molècules coestimuladores com són CD54, CD80 i CD86 [122]. També inhibeix la secreció de citocines i quimiocines per part de les APCs, que influeixen en la diferenciació, proliferació i migració de les cèl.lules T. A més, la IL-10 regula de forma directa les cèl.lules Teff inhibint la seva abilitat per produir IL2, TNF α , IL-5 i proliferar [123], [124].
- Secretades per les Tregs, el TGF β i la IL-10 també afecten de forma conjunta la funció de les Teff i les DCs de diverses maneres. TGF β 1 redueix la producció de citocines inflamatòries de les TCD4⁺ [125]. A més, també induïx la producció de IL-10 per part de les Th1 i en conseqüència atenua les funcions Th1 [126]. De forma recíproca, la IL-10 incrementa la resposta de les Teff al TGF β 1 ([126]. LA IL-10 també regula a la baixa la producció d'IL12 a les DCs i inhibeix la funció de les Th1 [127], [128].
- La **IL-35** és una citocina heterodimèrica descoberta recentment produïda per les Tregs FOXP3⁺ i contribueix a la seva funció supressora [129]. Està composta de dues cadenes, IL12a (p35) i EBI3, que comparteix amb dues altres citocines heterodimèriques, la IL-12 i IL-27, respectivament, La IL-35 és necessària per a la màxima funció reguladora *in vivo*, ja que les Treg deficientes en alguna de les dues cadenes no són capaces de controlar l'expansió homeostàtica de cèl.lules T i IBD [129]. Queda oberta la pregunta de si la IL-35 podrà mediar la generació d'iTreg, que és una característica de les altres dues citocines inhibidores, la IL-10 i el TGF- β .
- La **galectina 1** és una molècula soluble que pot jugar un paper en les

interaccions entre Treg-DC i Treg-Teff. És un membre de la família altament conservada de les proteïnes d'unió al b-galactòsid [130]. Les conseqüències de la unió de galectina correlacionen amb aquelles induïdes per les Treg en cèl.lules T responedores, incloent l'arrest al cicle cel.lular, apoptosi i inhibició de la producció de citocines proinflamatòries. No està clar si la galectina 1 actua com a citocina soluble o mitja els seus efectes via contacte cèl.lula-celula. La Galectina 1 s'expressa preferentment a les Treg i es regula a l'alça després de l'activació a través del TCR. Bloquejar la galectina 1 redueix de forma significativa els efectes inhibidors de Treg en humans i ratolí, i les Treg de ratolins deficientes en galectina 1 presenten activitat reguladora reduïda [130].

4. Tregs i autoimmunitat: diabetis tipus 1

La Diabetes tipus 1 és una malaltia autoimmunitària considerada clàssicament òrganoespecífica, la resposta immunitària va dirigida principalment contra antígens de les cèl.lules β del pàncrees responsables de la producció d'insulina, hormona que controla els nivells de glucosa en sang [131]. La mateixa insulina sembla que és l'autoantigen contra el que es trenca la tolerància del sistema immunitari, però en el decurs de la malaltia es va ampliant la resposta que condueix a l'activació d'altres cèl.lules T i B addicionals. Es produeix una diversificació dels autoantígens que es coneix amb el nom d'*epitope spreading*. La reacció es cronifica i la pèrdua progressiva de la capacitat de producció d'insulina, fa que els individus acabin fent el debut clínic temps després (anys) d'haver-se iniciat la resposta autoreactiva.

La simptomatologia associada segons l'estudi EURODIAB és hiperglicèmia de base i poliúria (96%), seguit d'una pèrdua de pes (61%) i fatiga (52%) [132]. La diabetes de tipus 1 representa el 5-10% dels casos de diabetes i és freqüent en nens i adolescents, tot i que un 25% dels casos debuten en edat adulta. Tot i que hi ha variabilitat en la incidència i prevalència de la T1D entre països, en general el nombre de casos en el món està augmentant i es calcula que en Estats Units cada any es diagnostiquen 2,3 % de casos més que l'anterior [133], [134]. A Catalunya, el nombre estimat de persones amb diabetis està al voltant dels 560.000 casos. Cada any es registren entre 250 i 270 nous casos de diabetis tipus 1 en menors de 30 anys [135]-

4.1. Etiologia de la T1D

La T1D és una malaltia multifactorial. L'etiologia de la T1D és desconeguda però s'ha demostrat que hi ha un component genètic de susceptibilitat. Els factors de risc associats a aquesta malaltia són la genètica, l'edat (afecta més a nens que a adults), el sexe, ja que la freqüència és més elevada en dones que en homes, la raça i l'àrea geogràfica. A més, hi ha factors ambientals que modulen el procés en individus amb predisposició genètica [136].

La DT1 és una malaltia de susceptibilitat poligènica. En humans i en ratolins s'han descrit loci de susceptibilitat anomenats IDDM i *Idd*, respectivament. Actualment se segueixen identificant noves regions implicades i gens candidats. Aquest component genètic està refermat en humans amb evidències com que la T1D afecta freqüentment diferents membres d'una mateixa família i la probabilitat de desenvolupar la malaltia és major si es té un familiar de primer grau afectat. A més, en els casos de bessons on un d'ells és diabètic, la probabilitat que el germà bessó pateixi la malaltia és de 30-50% si és univitel·lí o de (6-10%) si és bivitellí [137]. Entre els IDDM més importants i que suposen un factor de risc més important es troben les molècules del MHC-II, en particular el 40% dels pacients T1D són heterozigots per HLA-DR3 i DR4, en comparació amb només 3% en la població general. Després, l'expressió de DR3 / DR4 en heterozigositat, segueix el DR4 en homozigositat com el genotip de risc més alt, seguit per DR3 i DR4 / DRX heterocigositat (sent DRX un al·lel diferent a DR3 / DR4). Només el 5% dels pacients T1D no expressen ni HLA-DR3 ni DR4. Per altra part, també hi ha al·lells que protegeixen contra la diabetis tipus 1 (HLA-DR2, HLA-DR5 i HLA-DQB1*0602) [138]. Només 1 de cada 15.000 persones amb HLA-DQB1 * 0602 desenvolupa T1D [136].

Altres gens que contribueixen a la malaltia són relacionats també amb els sistema immunitari com els que codifiquen per molècules com la insulina, CTLA-4, CD28, CD40L, IL-2, entre altres (T1Dbase, www.t1dbase.org). Finalment, el fet que bessons univitel·lins tot i tenir la mateixa base genètica no comparteixin el 100% la malaltia entre ells, indica que altres factors externs contribueixen a la malaltia com infeccions, nutrició i la microbiota intestinal.

4.2. La diabetes tipus 1 és una malaltia autoimmunitària

La resposta autoreactiva està mediada per un component cel·lular (limfòcits T) i un component humoral (autoanticossos), fet que ho corrobora la millora observada després del tractament amb immunosupressors sistèmics, com la ciclosporina, tot i que aquesta no s'utilitza com a teràpia a causa dels seus efectes secundaris nefrotòxics i d'afectació del sistema immunitari [139]. Tant en ratolins com en humans, la transmissió de la T1D a través de limfòcits és una altra evidència d'autoimmunitat. Lampeter et al al 1993 van demostrar la transmissió de la malaltia entre dos germans amb HLA idèntic després d'un transplantament de medul·la òssia [140]. Les malalties autoimmunitàries sovint es manifesten de forma associada en un mateix individu o família. Els pacients amb T1D desenvolupen amb major freqüència tiroiditis autoimmunitària, celiaquia i malaltia d'Addison. Aquestes malalties tenen factors genètics predisposants en comú. A més, de vegades es donen alhora en pacients amb síndromes poliglandulars autoimmunitaris [141].

Pel que fa a les evidències dels mecanismes efectors involucrats podem destacar els següents:

i) Autoanticossos contra els illots (ICA, islet cell autoantibody), insulina (IAA, insulin autoantibodies), descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD), insuloma associat a proteïna 2 (IA-2), Zinc Transporter 8 (ZnT8) [142]–[145]. No se sap amb claredat però, si aquests autoanticossos poden contribuir a causar la malaltia o ser conseqüència de la lesió del teixit causada pels limfòcits T i l'alliberació anòmala d'antígens [144].

ii) Insulitis. S'observen infiltrats leucocitaris dins i al voltant dels illots de Langerhans [144], [146], [147]. La distribució espacial dels leucòcits en la insulitis associada amb la destrucció de les cèl·lules beta és intrigant, ja que els illots de Langerhans tenen dues fronteres que els limfòcits no solen creuar normalment: 1- l'endoteli, que delimita la vasculatura de les glàndules endocrines, 2- el teixit connectiu lax, que forma la barrera entre els components endocrins i exocrins del pàncrees. Alguns leucòcits es localitzen dins l'illot, però la majoria es concentren a la perifèria, estenent-se entre els espais tissulars entre les glàndules exocrines. Aquest continu d'infiltració limfocítica a la T1D dins i al voltant de l'illot i entre els acinis, suggereix que les barreres normals contra la migració leucocitària entre els illots i els teixits exocrins es trenquen durant el procés de patogènesi. Willcox a 2009. Recentment, Campbell-Thompson *et al.* han publicat un treball exhaustiu en el que es descriuen les característiques

histopatològiques de insulitis en la diabetis tipus humà 1 de més de 150 pàncrees [148]. D'aquest treball es va treure el concepte d'insulitis en la diabetis humana, molt diferent de les dades del model experimental del ratolí NOD. Els autors van observar que la fracció d'illots infiltrats és molt baixa (<10%), i els illots infiltrats contenen molt poques cèl·lules immunes (≥ 15 leucòcits / illot es considera com a positiva per infiltració, que és només dues vegades el nombre de leucòcits trobat en el pàncrees de donants control [149]. D'altra banda, els leucòcits que s'infiltra sovint es troben només a la perifèria dels illots (peri-insulitis) i principalment són CD8⁺ [150].

iii) Limfòcits autorreactius. En models animals es pot transferir la malaltia a receptors sans mitjançant la transferència de cèl·lules T autoreactives [147], [151]. L'especificitat dels limfòcits T autorreactius descrita és, principalment, contra epítops de la insulina, GAD i IA2 [152], [153]. En humans, el grup de Kent *et al.* ha descrit cèl·lules T anti-insulina a partir de sang perifèrica d'un pacient diabètic i ha mostrat que la insulina és reconeguda per cèl·lules T presents als nòduls limfàtics propers a l'òrgan diana [146]. A més, va analitzar els TCR i detectà restricció de cadenes α i β , cosa que suggereix expansió oligoclona en els malalts. En el pàncrees es produeixen expansions clonals en resposta a antígens, com van demostrar Codina-Busqueta *et al.* [154]. En aquest treball es van identificar expansions monoclonals de determinades seqüències de CDR3 en els illots de Langerhans purificats d'un donant que va morir deu dies després del debut de la malaltia, demostrant que la infiltració no només es troba als illots sinó que hi ha reconeixement antigènic *in situ*.

4.3. Paper de les cèl·lules T reguladores en la diabetis tipus 1

La major part de les dades experimentals provenen d'estudis en models animals, especialment en el ratolí NOD (*non-obese diabetic*). Les dades obtingudes de models animals de T1D demostren clarament que les Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ són crucials per remetre la T1D. Eliminació de cèl·lules T reguladores en els ratolins NOD accelera el desenvolupament espontani de la malaltia [155], [156]. D'altra banda, la reconstitució o la transferència de cèl·lules T reguladores prevenia el desenvolupament de diabetis autoimmune en models murins [157], [158]. L'activació de les cèl·lules T tant CD4⁺ com CD8⁺ té lloc als limfonodes pancreàtics, i després les cèl·lules efectores T migren als illots per destruir les cèl·lules beta, l'efecte protector de Tregs pot ocórrer tant en els òrgans limfoides secundaris com al pàncrees [159].

En humans la primera evidència del paper de les cèl·lules Tregs en T1D prové dels pacients amb IPEX on mutacions a *FOXP3* provoca una autoimmunitat multiorgànica on també està inclosa la diabetis [31], fet que subratlla la importància de les Treg en el control de l'inici de la malaltia. Altres estudis s'han realitzat usant i / o aïllant cèl·lules Tregs de sang perifèrica i s'ha buscat si existeix una correlació amb la freqüència, fenotip o en funcionament d'aquestes cèl·lules i la malaltia. Diversos treballs s'han publicat amb resultats no concloents sobre la freqüència de cèl·lules Treg. Kukreja va ser el primer en demostrar que el percentatge de cèl·lules T CD25⁺ estava disminuït en pacients diabètics [160], posteriorment treballs en els que estudiaven les cèl·lules CD4⁺CD25^{hi} van indicar que la freqüència de les cèl·lules Tregs Foxp3⁺ no era diferent entre pacients i controls [161]–[163], però sí en canvi en alguns d'aquests treballs demostraven que la capacitat reguladora de les Tregs de diabètics estava alterada sent menys eficients regulant les Teff [161], [164]. Posteriorment, Schneider *et al.* va introduir un nou concepte, indicant que el defecte de regulació no afectava les Tregs sinó a les Teff dels pacients T1D, que eren refractàries a la supressió [165]. Més endavant, Long *et al.* van trobar que les cèl·lules iTreg, específiques d'antigen, de controls i pacients suprimien de manera similar [166].

Un altre aspecte a tenir en compte en la funció de les cèl·lules Tregs de diabètics és la seva gran dependència d'IL-2 exògena respecte a controls, i per tant diversos autors han estudiat la implicació de la via de senyalització de la IL-2 en les cèl·lules Treg en individus amb T1D. Long *et al.* han trobat alteracions en la via IL-2 de senyalització tant en les cèl·lules nTreg i iTreg de pacients T1D [167]. A més, s'ha establert una correlació per als pacients entre el polimorfisme de només un nucleòtid en la regió IL2RA i la baixa producció de CD25 soluble [168], [169]. Per tant, son clares les evidències que les cèl·lules Treg juguen un paper en la diabetes tipus 1 humana, però el mecanisme està encara per definir.

Hipòtesi de treball

Les cèl.lules Treguladores naturals són un element clau en el manteniment de la tolerància i en l'homeostasi del sistema immunitari. L'absència de cèl.lules TCD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ dóna lloc a una autoimmunitat generalitzada. Les cèl.lules reguladores naturals surten de timus a sang perifèrica, i allà es barregen amb altres cèl.lules amb les que parcialment comparteixen fenotip com les cèl.lules T activades. La major dificultat per al seu estudi és la manca d'un marcador exclusiu que les defineixi.

La caracterització de trets únics i exclusius de les Tregs naturals humanes és necessari per poder estudiar-les en salut i malaltia, purificar-les i usar-les com a eina terapèutica.

Objectius

Capítol 1

Cèl.lules Treguladores al timus i la seva evolució amb l'edat en mostres pediàtriques

1. Caracterització de les cèl.lules Treg naturals i altres poblacions de timòcits en mostres de timus humans pediàtrics
2. Anàlisi de l'evolució amb l'edat de les poblacions de timòcits en mostres humanes pediàtriques

Capítol 2

Búsqueda de marcadors de cèl.lules T reguladores en perifèria i en timus

1. Estudis de marcadors de cèl.lules Treg de perifèria i de timus mitjançant de tècniques de proteòmica
2. Comparació de l'expressió gènica de molècules caracteritzades a partir de la proteòmica en Tregs de timus, Tregs de perifèria en repòs i activades

Capítol 3

Cèl.lules T reguladores a perifèria, estudi en individus sans i individus amb diabetis autoimmune

1. Estudi de la freqüència i del fenotip de les cèl.lules Treg de sang perifèrica de pacients amb diabetes tipus 1 i de controls
2. Anàlisi funcional de les cèl.lules Treg de sang perifèrica de pacients amb diabetes tipus 1 i de controls

Materials i mètodes

1. Mostres i el seu processament per a l'obtenció de limfòcits

1.1 Sang total o derivats sanguinis

Les mostres de partida per a l'obtenció dels limfòcits T han estat procedents de teixit humà, i són les següents:

Les bosses de capes leucoplaquetàries procedeixen del Banc de Sang i Teixits de Barcelona (BST). Són concentrats de plaquetes i glòbuls blancs procedents de les donacions de sang d'individus sans, un cop aquesta sang ja ha estat processada per a l'obtenció de plaquetes, sèrum i glòbuls vermells. Aquestes capes leucoplaquetàries (tradicionalment conegudes com a *buffy coat*) acostumen a ser un producte de rebuig al BST.

Les mostres de sang total amb anticoagulant procedeixen de pacients o controls que han estat informats de l'ús que es farà de la seva donació, i que han signat un consentiment informat. El volum de les donacions de sang oscil·la entre 10-50 ml. Les mostres de pacients amb diabetis tipus 1 procedeixen de l'Hospital de Mataró, gràcies a la col·laboració amb la Dra. Eduarda Pizarro, membre de la Unitat d'Endocrinologia de l'hospital. Les mostres de pacients amb malaltia de *Graves-Basedow* procedeixen en part de l'Hospital de Mataró (Dra. Eduarda Pizarro) i en part de l'Hospital de la Vall Hebron, gràcies a la col·laboració amb el Dr. Gabriel Obiols del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'hospital.

Per a cada capítol de l'apartat de resultats s'indica de forma detallada quines mostres s'han fet servir.

1.1.1. Centrifugació en gradient de densitat

Les mostres de partida per a l'obtenció de limfòcits poden ser bosses de capes leucoplaquetàries, mostres de sang anticoagulada o suspensions cel·lulars vàries que continguin limfòcits. En el cas de les capes leucoplaquetàries i la sang, la mostra cal diluir-la a la meitat amb PBS suplementat al 2% amb SBF i tot el procés es fa a temperatura ambient (TA). Per a dur a terme la separació s'usa la solució de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Science) que té una densitat de 1,77 g/L, lleugerament superior a la dels limfòcits. S'aprofita aquesta característica per a què després de la centrifugació pertinent, els limfòcits quedin concentrats just a sobre de la solució de Ficoll i es puguin recuperar amb facilitat.

En un tub adequat al volum que s'hagi de separar, es disposa lentament la mostra sobre del ficoll amb cura de no barrejar les dues solucions. La relació final de mostra

(diluïda) : Ficoll és de 3:1. Se centrifuga tot seguit a 600g 30 minuts a TA (aturada suau de centrífuga) Es recuperen els limfòcits de la interfase. Les cèl.lules es renten exhaustivament per eliminar les restes de Ficoll i altres cèl.lules contaminants que puguin ser-hi presents (p. e. plaquetes). En el cas d'haver partit de *buffy coat*, els rentats són més llargs, ja que és un enriquiment de plaquetes. En aquest cas, es fa un primer rentat de 10 minuts a 1400 rpm (250g), seguit de 2 o 3 rentats a 1000 rpm (200g) 15 min. Els rentats es fan amb PBS. Per a la resta de mostres de partida, es fa un primer rentat de 6 minuts a 1400 rpm (250g), seguit de 2 rentats a 1100 rpm (220g) 10 min. Els rentats es fan amb PBS 2% SFB.

1.2. Timus humans pediàtrics

Es van processar mostres de timus pediàtrics durant el període comprès entre 2006 i 2010, en col.laboració amb el grup del Dr. Pujol-Borrell i emmarcat en el projecte Eurothymaide amb referència LSHB-CT-2003-503410. Les mostres procedien de donants pediàtrics sotmesos a cirurgia cardíaca a l'Hospital Universitari de la Vall Hebron, i es van cedir per al seu ús en recerca previ consentiment informat dels tutors legals dels donants. A la taula 1 es fa un recull de les mostres, s'indica el pes total de teixit que es va rebre i la quantitat de teixit que es va usar per al treball que es presenta en aquesta tesi.

L'estudi de les cèl.lules nTregs que es va a dur a terme amb aquestes mostres perseguia dos objectius a assolir mitjançant la citometria de flux: 1- determinació dels percentatges de les poblacions de timòcits, 2- caracterització fenotípica de les poblacions de timòcits. Per a la posta a punt de la metodologia, inicialment es va treballar només en l'assoliment de l'objectiu 1. Després, es va implantar el disseny experimental per a determinar simultàniament els dos objectius. Així doncs, les primeres mostres de timus que es van procesar es van usar exclusivament per a l'objectiu 1 i es mostren a la taula 1.1. La resta de mostres es van usar per a ambdós objectius i es mostren a la taula 1.2.

Taula 1.1
Mostres de timus usades per a l'objectiu 1

Mostra	Informació del donant			Pes del teixit (g.)	
	Sexe*	Edat [†]	Edat en dies	Rebut [§]	Processat [‡]
1 TMB119i	M	7m	210	9	9
2 TMA-1	F	6d	6	2,9	2,9
3 TMB139i	F	19m	570	22,6	22,6
4 TMB168i	M	8d	8	2	2
5 TMB175i	M	3m	90	8	8
6 TMB188i	M	9d	9	3,9	3,9
7 TMB197i	F	7m 9d	219	23,9	1,3
8 TMB235i	M	6m	180	12,2	12,2
9 TMB263i	F	4a 4m 28d	1608	7,2	< 1
10 TMB267i	F	3a 5m 13d	1258	6,8	6,8
11 TMA-2	M	6a 3m 23d	2303	5	5
12 TMA-3	M	6a 8m 17d	2447	10,2	< 1
13 TMB345i	F	6d	6	4,6	< 1
14 TMB361i	F	11d	11	5,1	1,6

* M, masculí; F, femení.

[†] a, any; m, mes; d, dia.

[§] pes del teixit total rebut al laboratori

[‡] pes del teixit processat per a aquest treball de tesi

Taula 1.2
Mostres de timus usades per als objectius 1 i 2

Mostra	Informació del donant			Pes del teixit (g.)	
	Sexe*	Edat [†]	Edat en dies	Rebut [§]	Processat [‡]
1 TMB348i	F	6d	6	5,7	< 1
2 TMB359i	M	14d	14	2,3	< 1
3 TMA-5	M	1m	30	10,4	< 1
4 TMB374i	F	6m	180	8,4	1,7
5 TMA-6	M	5d	5	7,7	< 1
6 TMA-7	M	10m	300	47,1	< 1
7 TMB390i	M	9d	9	5,3	5,3
8 TMA-8	M	27d	27	2,4	2,4
9 TMB396i	M	7m 9d	219	8,6	< 1
10 TMA-10	F	11m 27d	362	17,6	17,6
11 TMB406i	M	8a 8m 11d	3261	8,3	< 1
12 TMB407i	M	8m 13d	253	4	4
13 TMB409i	F	10a 7m 29d	3889	2,7	2,7
14 TMB411i	M	19m 8d	574	5,1	< 1
15 TMB413i	F	9d	9	4,1	4,1
16 TMB416i	M	19m 7d	577	17	< 1
17 TMA-11	M	4a 6m 22d	1662	20	1,4
18 TMB423i	M	3m 1d	91	10,2	5,8
19 TMB424i	F	11m 2d	332	6,4	< 1
20 TMA-12	F	7d	7	7,4	1,5
21 TMA-13	M	2d	2	7,8	4
22 TMB432i	F	27d	27	1,2	1,2

Taula 1. Llistat de les mostres de timus pediàtrics processats. Les mostres es troben distribuïdes en dues taules segons si es van usar per a la determinació de l'objectiu 1 (taula 1.1) o per a la determinació dels objectius 1 i 2 (taula 1.2). S'indiquen nom de la mostra i sexe i edat del donant, així com pes del teixit rebut al laboratori, i pes del teixit processat per a aquest treball de tesi.

La nomenclatura de les mostres es va assignar al laboratori del Dr. Pujol (TMB, que vol dir **timus** de **B**arcelona), a excepció d'aquelles mostres que vam rebre directament nosaltres, sense que passessin prèviament per la fundació (HuGTiP), i que vam anomenar TMA (en referència a **timus** de la Universitat **A**utònoma de **B**arcelona).

1.2.1. Processament dels timus

Cada timus es va digerir mecànicament en condicions estèrils i a 4°C en medi de cultiu RPMI suplementat amb 10% SBF (Gibco), 2mM L-glutamina, 100 U ml⁻¹ penicil·lina i 100 mg ml⁻¹ estreptomina (Sigma). Primer de tot, amb l'ajuda d'un bisturí es va eliminar la càpsula que envoltava el teixit, les zones hemorràgiques i les zones cauteritzades. Tot seguit, es va procedir a rascar de forma suau però persistent el teixit amb el bisturí, i s'observava com el medi guanyava terbolesa a mesura que els timòcits se separaven del teixit i se suspendien en el medi. La suspensió cel·lular es va rentar dues vegades amb medi de cultiu fresc (idèntic al que es va fer servir per a la digestió) 10 min. 300 g. a TA i se'n va determinar la viabilitat usant el colorant vital blau tripà i la cambra de Neubauer. En tots els casos, la viabilitat va ser superior al 95%.

Aproximadament es van usar entre 2-10 milions de timòcits per fer la tinció per a l'estudi mitjançant citometria de flux, en funció de si es tractava de mostres de la taula 1.1 o de la taula 1.2, respectivament. La resta de timòcits es van usar per als estudis de proteòmica i de PCR quantitativa (Capítol 2 de resultats de la tesi).

2. Immunofenotipatge per citometria de flux

2.1. Immunofenotipatge de sang i derivats sanguinis

2.1.1. Tinció superficial

Per a cada marcador de Treg que es vulgui analitzar, es tenyeixen 200 µl de sang total amb anticoagulant de forma directa amb anticossos monoclonals d'especificitat humana anti-CD4-FITC (BD Bioscience), anti-CD25-PECy5.5 (BD Bioscience) i un tercer anticòs marcat amb PE, que correspondrà al marcador d'estudi (veure llistat de marcadors de T_{reg}). S'incuben 30 minuts a TA i a les fosques. Tot seguit s'afegeixen 2 ml per tub de solució de lisi (*FACS lysing solution*, BD Bioscience) diluïda 1/10 amb aigua destil·lada durant 10 minuts, i es centrifuga 5 min a 300g TA. Aquesta solució lliça els eritròcits i alhora fixa el marcatge superficial. Es renta amb 2 ml per tub de PBS suplementat al 2% amb SFB. Arribats a aquest punt, es pot continuar amb el marcatge citoplasmàtic, o bé, rentar un cop més i ressuspensar les cèl·lules en 300 µl de PBS FACS i fer-ne l'adquisició al citòmetre.

2.1.2. Tinció citoplasmàtica

El marcatge amb anticossos monoclonals anti-FOXP3^{PE} (eBioscience) i anti-CTLA-4^{PE} (BD Bioscience) és intracitoplasmàtic. Després de marcar les cèl·lules superficialment, es renten amb saponina (Sigma-aldrich) al 0,1% (en PBS 2% SFB), i es ressuspensen amb 50 µl de solució de permeabilització (0,3% de saponina en PBS 2% SFB) en presència de l'anticòs. La saponina és un detergent suau que forma porus a la membrana plasmàtica de les cèl·lules permetent l'entrada dels anticossos al citoplasma. Els porus són transitoris, només es mantenen en presència de la saponina. Les cèl·lules s'incuben 45 minuts amb l'anticòs i el detergent, i després es renten dues vegades amb PBS 2% SFB. Si l'adquisició de les cèl·lules no es pot dur a terme en les dues hores següents, cal fixar el marcatge citoplasmàtic. Es pot usar la *FACS lysing solution* o una solució de paraformaldehid (PFA) a l'1%.

2.1.3. Adquisició de la mostra i anàlisi de les dades

L'adquisició de les cèl·lules es realitza en un citòmetre de flux analitzador FACSCalibur

(BD Immunocytometry Systems), i les dades s'analitzen amb el software *CellQuest Pro* (BD Immunocytometry Systems) basant-nos en la metodologia d'anàlisi de l'article de Wing i col.laboradors [170]. L'estratègia d'anàlisi s'indica a l'apartat 3.1.1. del capítol 3 de resultats, figura 3.2.

2.2. Immunofenotipatge de les mostres de timus

Per poder estudiar les poblacions de timòcits és necessari marcar CD4 i CD8 simultàniament. Per a l'estudi dels percentatges de les poblacions de timòcits (objectiu 1, veure apartat 1.2 de Materials i Mètodes), es va realitzar una tinció superficial de tres fluorescències per tub: CD4 i CD8, i es va afegir CD25. Per també poder dur a terme la caracterització fenotípica de les poblacions de timòcits d'estudi (objectiu 2), posteriorment es va implementar el marcatge amb una quarta fluorescència per tub: CD4, CD8, CD25 i un anticòs dirigit contra el marcador d'estudi. Per a cada mostra, es van tenir 16 molècules de superfície i 2 molècules intracitoplasmàtiques (veure panell de tinció a la taula 2.2). El panel de tinció de la taula 2.1 es va fer servir per al marcatge de les mostres de timus processades a l'inici de l'estudi (taula 1.1), mentre que el panel de tinció de la taula 2.2 és l'usat per al marcatge de les mostres processades posteriorment (taula 1.2).

2.2.1. Tinció superficial

Es van tenir 200.000 cèl.lules procedents de digerits totals de mostres de timus amb 3 µl de cada un dels anticossos (directament marcats amb un fluorocrom) pertinents (veure taula 2). Les mostres es van incubar 30 minuts a TA i a les fosques, i es van rentar dues vegades amb PBS suplementat al 2% amb SFB 5 min. a 300g TA. Es van resuspendre en 300 µl de PBS i es van adquirir al citòmetre.

2.2.2. Tinció citoplasmàtica

Per la tinció intracitoplasmàtica, es van marcar 400.000 cèl.lules, primer amb anticossos contra proteïnes de superfície seguint el protocol indicat a l'apartat 2.2.1. Després del marcatge superficial, les cèl.lules es van fixar amb *FACS lysing solution* 1:10 (BD) per a què mantinguin la integritat quan s'incuben amb el tampó de marcatge que conté saponina. Es van rentar dos cops amb PBS suplementat al 2% amb SFB, i després amb PBS suplementat al 2% amb SFB i al 0.1% amb saponina. Es van resuspendre amb solució de permeabilització (PBS 2% SFB saponina 0,3%) i es van

incubar amb l'anticòs durant 45 min. a TA i a les fosques. Es van rentar dues vegades amb PBS suplementat al 2% amb SFB 5 min. a 300g TA., es van ressuspendre en 300 µl de PBS i es van adquirir al citòmetre.

En els casos en què l'adquisició de les mostres tenyides no es va poder dur a terme en les dues hores següents al marcatge, ja fos superficial o citoplasmàtic, es van fixar les cèl.lules amb *FACS lysing solution* 1:10 i es van mantenir a 4°C fins al moment de l'adquisició, que pot allargar-se fins un màxim de 24 hores després del marcatge.

Taula 2.1 - Tinció de tres fluorescències

canals de fluorescència	FL1	FL2	FL3
fluorocroms	FITC	PE	PerCP

TINCIÓ SUPERFICIAL

<u>control negatiu</u>			
tub 1	IgG1 [§]	IgG1	IgG1
<u>controls de compensació</u>			
tub 2	CD4	IgG1	IgG1
tub 3	IgG1	CD4	IgG1
tub 4	IgG1	IgG1	CD4
<u>control de poblacions</u>			
tub 5	CD4	CD8	CD3
<u>controls dels marcadors estudiats (FMO*)</u>			
tub 6	CD4	CD8	IgG1
<u>tubs per immunofenotipatge</u>			
tub 7	CD4	CD8	CD25

200.000 cèl.lules per tub
3 [¶] de cada anticòs per tub

Taula 2.1 - Tinció de quatre fluorescències

canals de fluorescència	FL1	FL2	FL3	FL4
fluorocroms	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7

TINCIÓ SUPERFICIAL

<u>control negatiu</u>				
tub 1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
<u>controls de compensació</u>				
tub 2	CD4	IgG1	IgG1	IgG1
tub 3	IgG1	CD4	IgG1	IgG1
tub 4	IgG1	IgG1	CD4	IgG1
tub 5	IgG1	IgG1	IgG1	CD4
<u>control de poblacions</u>				
tub 6	IgG1	CD8	CD3	CD4
<u>controls dels marcadors estudiats (FMO)</u>				
tub 7	CD8	IgG1	CD25	CD4
tub 8	IgG1	CD8	CD25	CD4
<u>tubs per immunofenotipatge</u>				
tub 9	CD8	CD27	CD25	CD4
tub 10	CD44	CD8	CD25	CD4
tub 11	CD8	CD69	CD25	CD4
tub 12	CD8	CD62L	CD25	CD4
tub 13	CD8	CD122	CD25	CD4
tub 14	CD8	CD127	CD25	CD4
tub 15	CD8	GITR [¶]	CD25	CD4
tub 16	CD8	CD95	CD25	CD4
tub 17	CD8	CD54	CD25	CD4
tub 18	DR	CD8	CD25	CD4
tub 19	CD8	CCR4	CD25	CD4
tub 20	CD8	CCR5	CD25	CD4
tub 21	CD8	CCR6	CD25	CD4
tub 22	CD8	CD278	CD25	CD4
tub 23	CD8	CD279	CD25	CD4

200.000 cèl.lules per tub
3 [¶] de cada anticòs per tub
[¶]10 [¶] de l'anticòs anti-GITR per tub

*FMO, fluorescence minus one
[§]controls d'isotip

canals de fluorescència	FL1	FL2	FL3	FL4
fluorocroms	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7

TINCIÓ CITOPLASMÀTICA

<u>control negatiu</u>				
tub 1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
<u>controls de compensació</u>				
tub 2	CD4	IgG1	IgG1	IgG1
tub 3	IgG1	CD4	IgG1	IgG1
tub 4	IgG1	IgG1	CD4	IgG1
tub 5	IgG1	IgG1	IgG1	CD4
<u>control de poblacions</u>				
tub 6	IgG1	CD8	CD3	CD4
<u>controls dels marcadors estudiats (FMO)</u>				
tub 7	CD8	IgG1	CD25	CD4
tub 8	IgG1	CD8	CD25	CD4
<u>tubs per immunofenotipatge</u>				
tub 9	CD8	CTLA-4	CD25	CD4
tub 10	CD8	FOXP3 [¶]	CD25	CD4

400.000 cèl.lules per tub
5 [¶] de cada anticòs per tub
[¶]15 [¶] de l'anticòs anti-FOXP3 per tub

Taula 2. Panell de tinció per a l'immunofenotipatge de les mostres de timus mitjançant citometria de flux. Com s'explica a l'apartat 3, el panell de tinció de la taula 2.1 es va fer servir per al marcatge de les mostres de timus processades a l'inici de l'estudi (taula 1.1). I el panell de tinció de la taula 2.2, per al marcatge de les mostres processades posteriorment (taula 1.2).

2.2.3. Adquisició de la mostra i anàlisi de les dades

L'adquisició de les cèl.lules es realitza en un citòmetre de flux analitzador FACSCanto (BD Immunocytometry Systems), i les dades s'analitzen amb el software FACSDiVa® (BD Immunocytometry Systems) i el software FlowJo® (FlowJo Enterprise). L'estratègia d'anàlisi s'indica a l'apartat 1.1.1 del capítol 1 de resultats, figura 1.2.

3. Aïllament de cèl.lules T

Per a la separació cel.lular de les poblacions de Treg i Teff procedents de mostres de sang o productes derivats de la sang (sang total heparinitzada procedent de donants i bosses leucoplaquetàries), es va partir de PBMCs obtinguts per gradient de densitat amb Ficoll. En el cas de les mostres de timus humans pediàtrics, es va partir de suspensions cel.lulars de timòcits obtingudes mitjançant digestió mecànica.

3.1. Separació magnètica de cèl.lules T reguladores

Es va fer servir el kit de separació de cèl.lules T reguladores humanes *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, human* (Miltenyi Biotech) i es van seguir les instruccions del fabricant amb petites modificacions. L'estratègia de separació que utilitza el kit consisteix en aïllar en un primer pas les cèl.lules TCD4⁺ mitjançant selecció negativa a partir de l'ús d'una barreja o *cocktail* format per anticossos monoclonals biotinitats dirigits contra CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ, i CD235a (*Glycophorin A*), que seguidament s'incuben amb anticossos anti-biotina units a boles magnètiques. Després les cèl.lules TCD4⁺ es marquen amb un anticòs anti-CD25 per purificar les cèl.lules CD25⁺ a partir de selecció positiva. Per a la separació magnètica de les cèl.lules marcades es va fer servir l'autoMACS (Miltenyi Biotech).

Els volums de reactius que s'indiquen a continuació són necessaris per cada 10 milions de cèl.lules a marcar, a excepció del volum de tampó en què es ressuspenen les cèl.lules marcades per passar-les per l'autoMACS, que són 500µl per cada 100 milions de cèl.lules. El tampó que s'utilitza per al procés és PBS 2mM EDTA 0,75% SBF (s'anomena *running buffer*) a 4°C. Les cèl.lules es van centrifugar 300g 5 min 4°C, es van ressuspendre amb 90µl de tampó i es van afegir 10µl de la barreja d'anticossos biotinitats. Es va incubar 10 min a 4°C i es van afegir 20 µl d'anticòs monoclonal anti-biotina unit a boles magnètiques. Es va incubar 15min a 4°C, i es va rentar l'excès

d'anticòs amb tampó usant 10-20x el volum de marcatge i centrifugant 300g 5min 4°C. Es van ressuspendre les cèl.lules en 500µl de tampó i es va fer la separació amb l'autoMACS usant el programa *Depl05*. Es va determinar la cel.lularitat i la viabilitat (per exclusió amb blau tripà) de la fracció CD4⁺ amb l'ús de la cambra de Neubauer, i es va prosseguir amb el marcatge. Les cèl.lules es van ressuspendre amb 90µl de tampó i es van marcar amb 10µl d'anticòs monoclonal anti-CD25 unit a boles magnètiques. Es va incubar 15min a 4°C i es va rentar amb 1-2ml de tampó 300g 5min 4°C. Es van ressuspendre les cèl.lules en 500µl de tampó i es van separar amb l'autoMACS usant el programa *Posseld2*.

La puresa de cada fracció cel.lular eluïda es va analitzar per citometria de flux mitjançant la tinció específica amb anticossos monoclonals anti-CD4 i anti-CD25. La quantitat màxima de partida en un mateix procés de separació és de 1.000 milions de timòcits.

3.2. Separació de cèl.lules T reguladores mitjançant citometria de flux

Per a l'obtenció de Tregs mitjançant citòmetres separadors, es va fer un primer pas d'enriquiment de la mostra en la fracció d'interès. Això és, es van aïllar les cèl.lules T CD4⁺ mitjançant separació magnètica amb l'autoMACS. El procediment que es va seguir va ser el mateix que el que s'indica a l'apartat 3.1 amb una modificació que afecta al programa de separació, que en aquest cas va ser *Depletes*. Aquest és un programa de separació de l'autoMACS amb el que a la fracció d'interès s'obtenen més cèl.lules en número, tot i que aquestes no són tan pures en quant al marcadors de selecció. Així podíem obtenir el major número possible de cèl.lules TCD4⁺, tot i que hi hagués contaminació d'altres cèl.lules. La presència de cèl.lules CD4⁻ o de cèl.lules CD4⁺ que no fossin limfòcits a la nostra mostra a separar no suposava un problema, ja que la separació mitjançant citometria de flux és molt específica i ens assegura pureses molt altes de les poblacions separades.

Seguidament, la fracció separada de cèl.lules TCD4⁺ es va tenyir amb anticossos monoclonals marcats fluorescentment (aquests varien segons l'objectiu a assolir), que és requisit previ per poder separar mitjançant citometria de flux les poblacions de Treg i Teff. Per a la tinció es va usar 1µl de cada anticòs per cada milió de cèl.lules a separar. Es va incubar 15-20 min a TA i es va rentar l'excès d'anticòs a 300g 5min TA amb PBS. Les cèl.lules es van ressuspendre en PBS, i en cas de formació de xarxes de DNA genòmic visibles, la mostra es va filtrar amb filtres de 30µm (Celltrics®, Partec).

4. Metodologia REM de cultiu de cèl.lules T

El mètode d'expansió ràpida (*Rapid Expansion Method*, REM[171]) es va adaptar com s'indica. A dia 0 es van cultivar en flasks T25 (BD Biosciences) 40.000 cèl.lules de cada població en 25 ml finals de medi IMDM suplementat amb L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml i estreptomicina 100mg/ml (ambdues de Sigma-Aldrich), *pool* de sèrum humà A⁺ descomplementat al 10% (obtingut de donants del BST i processat al laboratori) i anticòs monoclonal anti-CD3 humà (OKT3, generat al laboratori) a 50ng/ml a 37°C i CO₂ al 5%. Es van afegir 25 x 10⁶ PBMCs irradiats a 30-Gy com a *feeders* (cèl.lules que produeixen i alliberen al medi factors de creixement que no es coneixen amb certesa, però que ajuden al creixement de les cèl.lules T). La IL-2 es va afegir a dia 1 del cultiu a 100 i 45 U/ml per a les Treg i Teff, respectivament. Els cultius no es van tocar novament fins a dia 5, moment en què es va canviar la meitat del medi per medi fresc amb IL-2. Les cèl.lules es podien utilitzar a partir del dia 8-9 de cultiu.

4.1. Processament del sèrum humà

Al laboratori es prepara de rutina un *pool* de sèrum humà per al cultiu de cèl.lules T d'origen humà. Es parteix de 6-10 bosses de sèrum humà de donants masculins A⁺. Cada sèrum es processa individualment, però tots al mateix temps. Breument, es descomplementen 30 min. a 56°C, s'ultracentrifuguen a 45.000g per retirar el greix, es filtren a 0,22µm i es testen mitjançant un assaig de proliferació cel.lular de limfòcits T en què s'usa medi de cultiu suplementat amb cada un dels sèrums al 10%. Finalment, es barregen tots aquells sèrums que hagin estat considerats aptes a l'assaig de proliferació, i el *pool* s'aliquota i s'emmagatzema a -20°C.

5. Assajos funcionals

5.1 Assajos d'apoptosi

Per aconseguir mort cel.lular induïda per activació (AICD, *activation-induced cell death*), les cèl.lules Treg i Teff expandides de controls i pacients es van activar *in vitro* amb 1,25µl d'esferes recobertes d'anticossos humans anti-CD3 i anti-CD28 (Dynabeads, Invitrogen) per cada 1x10⁶ cèl.lules (relació de cèl.lula: esfera de 2:1) i IL-

2 a 100 U/ml i es van cultivar 3 dies a 37°C i CO₂ al 5% en medi IMDM suplementat amb glutamina 2mM, penicilina 100 U/ml i estreptomina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich) i sèrum humà al 10% (medi IMDM complet). Les cèl.lules es van plaquejar en plaques de 96 pous de fons rodó en una relació de 10⁵ cèl.lules per pou, i es van cultivar a 37°C i CO₂ al 5% en medi (IMDM complet suplementat amb IL-2 a 100 U/ml) i sense estímuls o amb estímuls proapoptòtics: anticòs monoclonal anti-CD3 humà unit a placa a 30 µg/ml (OKT3) o anticòs monoclonal anti-CD95 humà soluble (clon DX2, BD Bioscience) a 1 µg/ml. Es va analitzar el grau d'apoptosi per citometria de flux a les 24, 48 i 72 hores de cultiu amb el kit de marcatge Annexin-V-FLUOS (Roche Diagnostics GmbH) seguint les instruccions del fabricant. No es van dur a terme passos de rentat per evitar la pèrdua de cèl.lules apoptòtiques.

5.2. Assajos de supressió

Les cèl.lules Treg expandides de controls i pacients T1D es van descongelar i es van cultivar en plaques de 96 pous de fons rodó a diferents ràtios amb 10⁴ cèl.lules Teff (cèl.lules CD4⁺CD25⁻ al·logèniques descongelades i obtingudes per separació magnètica) per pou en medi IMDM complet (veure apartat 3.1 de Materials i Mètodes). Les cèl.lules Teff es van estimular amb esferes recobertes d'anti-CD3 i anti-CD28 (Dynabeads, Invitrogen) en una relació de cèl.lula: esfera de 2:1 en presència de 5 x 10⁴ PBMC autòlegs a les Teff irradiades (a 30 Gy). Com a control de l'assaig, es va calcular la proliferació de cada població cel.lular aïllada usant les mateixes condicions descrites (10⁴ cèl.lules per pou). Les cèl.lules es van incubar durant 5 dies a 37°C i CO₂ al 5%. Es van pulsar amb 1 µCi de metil timidina tritiada (Perkin-Elmer) per pou 16 hores abans de llegir la proliferació. El percentatge de supressió es va calcular com s'indica: 100 - (100 x c.p.m. ratio Treg:Teff / c.p.m. Teff). Totes les condicions de cultiu es van dur a terme per triplicat.

6. Tècniques de biologia molecular

6.1. Extracció d'RNA

Es va fer servir el kit *RNEasy Mini* (Qiagen), i es van seguir les instruccions del fabricant amb alguna lleugera modificació. Es va treballar ràpid i a temperatura ambient, i fent servir material i espai de treball lliure d'RNAses. Les mostres de partida, en cas de trobar-se emmagatzemades a -80°C, es van atemperar a 37°C, i es van

ressuspendre en el tampó RLT Plus (suplementat amb β -mercaptoetanol (β -ME, Sigma) en una relació de 10 μ l β -ME per cada ml de tampó) seguint la relació de 600 μ l de tampó per cada 10 milions de cèl.lules o 10 μ g d'RNA teòrics. Es va homogenitzar el lisat fent-lo passar per una xeringa de 20G almenys 5 cops, es va transferir a una *gDNA Eliminator column* per eliminar el DNA genòmic i es va centrifugar 30s a $\geq 8000g$. Cal repetir aquest pas fins a fer passar tot el volum de lisat per la columna. Es va afegir 1 volum d'etanol al 70% a l'el·luït i es va transferir fins a 700 μ l de la mostra a una *RNeasy spin column*. Es va centrifugar 15s a $\geq 8000g$ per enganxar l'RNA a la membrana de la columna. Es va descartar l'el·luït i es va repetir aquest pas fins a fer passar tot el volum per la columna. Es va rentar la membrana de la columna primer amb 700 μ l de tampó RW1, i després amb 500 μ l de tampó RPE. En ambdós casos, es va descartar l'el·luït després de centrifugar 15s a $\geq 8000g$. Es van afegir novament 500 μ l de tampó RPE i es va centrifugar 2min a $\geq 8000g$ per rentar i assecat la membrana de la columna. Es va col·locar la columna en un nou tub col·lector i es va centrifugar a velocitat màxima 1min. Aquest pas serveix per assegurar-nos d'eliminar completament l'etanol, que podria afectar als usos posteriors de l'RNA. Finalment, es va col·locar la columna en un ependorff i es va afegir directament a sobre de la membrana entre 30-50 μ l d'aigua *RNase-free*. Es va incubar 1 minut per a què la membrana s'impregnés i es va centrifugar 1min a $\geq 8000g$ per eluir l'RNA.

Nota: el buffer RLT Plus (+ β -ME) pot usar-se per arxivar les mostres durant mesos a -80°C, ja que d'aquesta manera els àcids nucleics es mantenen en bon estat. Així es va procedir amb diverses de les nostres mostres. En el moment de l'extracció d'RNA, es van descongelar a 37°C i es va iniciar el protocol en el punt de l'homogeneïtzació.

6.2 Validació i quantificació de les mostres d'RNA

La qualitat de les mostres d'RNA es va analitzar mitjançant l'ús de l'Agilent's 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.). Es tracta d'un sistema d'electroforesi capil·lar on les molècules d'RNA se separen per mida i es detecten per la incorporació d'una molècula intercalant fluorescent. L'mRNA representa una proporció molt baixa del total d'RNA a les mostres (entre 1-3% segons <http://www.lifetechnologies.com/es/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html>).

Així, aquesta tecnologia no detecta l'mRNA sinó l'rRNA ribosomal, que és majoritari, i assumeix que la quantitat i la qualitat de l'rRNA reflecteix la de l'mRNA. En eucariotes,

les bandes majoritàries corresponen als rRNAs 18S i 28S. Aquest sistema genera un valor indicatiu de l'estat del RNA que s'anomena RIN (*RNA Integrity Number*), i que presenta un rang de valors d'1-10. Com més alt és el RIN, millor és l'estat de l'RNA. La relació entre la quantitat de rRNA 28S i 18S també és indicativa de l'estat de l'RNA, i els valors entre 1-2 indiquen que l'RNA és de bona qualitat. El criteri de validació de les mostres d'RNA que s'han usat per aquest treball de tesi ha estat que el RIN fos superior a 7, i la relació 28S/18S d'rRNAs fos superior a 1.

La quantitat d'RNA de les mostres es va determinar mitjançant l'ús del Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), que es tracta d'un espectrofotòmetre que utilitza una metodologia de retenció de la mostra que només fa ús de la tensió superficial, i així no cal usar cubetes. Per a la quantificació d'RNA, es mesura l'absorbància de llum a 260nm (on presenten la màxima absorció els àcids nucleics) i s'aplica la fórmula que indica que 1 unitat d' $A_{260} = 44\mu\text{g/ml}$. Les proteïnes presenten la màxima absorció a 280 nm, així que s'usa la relació d'absorbàncies A_{260}/A_{280} per determinar la presència de proteïnes a la mostra. Per RNA, s'accepta que la mostra està lliure de proteïnes quan aquesta relació oscil·la al voltant de 2. Les mostres que s'han usat per aquest treball de tesi presentaven valors al voltant de 2.

6.3. Retro-transcripció

Es van usar dues retro-transcriptases per passar les mostres d'RNA a cDNA: M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) i SuperScript III (ambdues d'Invitrogen). Es van usar en funció de la seva disponibilitat al laboratori. Els dos enzims retro-transcriuen un màxim de $5\mu\text{g}$ d'RNA total o de $0,5\mu\text{g}$ d'mRNA per cada reacció de $20\mu\text{l}$, i es diferencien en la quantitat mínima d'RNA (ja sigui RNA total o mRNA) que poden processar, que és de 1ng per la M-MLV, i de 10pg per la SuperScript III.

A continuació s'indiquen els protocols que es van fer servir per a cada una d'elles, que són les instruccions de la casa comercial. Cada reacció va tenir un volum final de $20\mu\text{l}$ i es va treballar a 4°C .

M-MLV: Es van barrejar $0,5\mu\text{l}$ d'oligo(dT)₁₅ $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (25pg/ml , Invitrogen)*, $1\mu\text{l}$ dNTPs $10\mu\text{M}$ ($0,5\text{mM}$, Sigma), i l'RNA en un volum màxim de $10,5\mu\text{l}$ (es va ajustar el volum amb aigua DEPC si va caler). La barreja es va desnaturalitzar 5min. a 65°C seguit d'1 min. a 4°C . Seguidament, es van afegir $4\mu\text{l}$ de buffer 5x (1x), $2\mu\text{l}$ DTT $0,1\text{M}$ (10mM)

(ditiotreitòl, agent reductor, Invitrogen) i 1µl *RNase OUT* 40U/ml (0,1U/ml) (mescla d'inhibidors d'RNases, Invitrogen) i es van incubar 2min. a 37°C. Finalment, es va afegir 1µl de M-MLV 200U/ml (0,5U/ml) i es va incubar la barreja 50 min. a 37°C seguit de 15min. a 70°C.

SuperScript III: Es van barrejar 0,5µl d'oligo(dT)₁₅ 1µg/µl (25pg/ml)^{*}, 1µl dNTPs 10mM (0,5mM), i l'RNA en un volum màxim de 11,5µl (es va ajustar el volum amb aigua DEPC si va caler). La barreja es va desnaturalitzar 5min. a 65°C seguit d'1 min. a 4°C. Seguidament, es van afegir 4µl de buffer 5x (1x), 1µl DTT 0,1M (5mM) i 1µl *RNase OUT* 40U/ml (0,1U/ml) i 1µl de SuperScript III 200U/ml (0,5U/ml) i es va incubar la barreja 60 min. a 55°C seguit de 15min. a 70°C.

6.4. PCR convencional de GAPDH

Per comprovar la funcionalitat del cDNA i com a mesura indirecta de la integritat de l'RNA, es va realitzar una amplificació per PCR convencional del gen de la GAPDH humana (gliceraldehid 3-deshidrogenasa) usant primers que abarquen diferents exons del gen. Es tracta d'un gen d'expressió ubiqua (*housekeeping gene*), així ens assegurem que es troba a totes les nostres mostres i que s'expressa en quantitats altes.

Cada reacció de PCR va tenir un volum final de 15µl i es van fer servir per tub 2µl de la mostra de cDNA diluïda 1/10 (20ng), 1,5µl de buffer 10x que acompanya l'enzim (1x, Biotools), 1,5µl dNTPs 2,5µM (0,25mM, Sigma), 1,5µl del primer directe 5µM (0,5M, Sigma), 1,5µl del primer revers 5µM (0,5M, Sigma), 6,4µl d'aigua de grau de PCR (aigua milliQ doblement autoclavada) i 0,6µl de Taq polimerasa 5U/µl (0,2U/µl, Biotools). Les seqüències dels primers són les següents: directe, 5'TCTTCTTTTGCCTCGCCAG3', i revers, 5'AGCCCCAGCCTTCTCCA3'. El muntatge de la PCR es va realitzar a 4°C, i el programa d'amplificació que va usar-se és el següent: 1 cicle de 95°C 3 min., 28 cicles de 95°C 30s., 65°C 30s. i 72°C 30s., i 1 cicle de 72°C 7 min, seguit d'1 cicle a 4°C ∞. Després es va fer córrer el producte de l'amplificació en una electroforesi en gel d'agarosa (Ecogen) al 2% i bromur d'etidi (Sigma) al 0,004%(v/v) a 80V 30-60 min, i es va revelar la presència de bandes amb la llum UV amb l'ajuda del Versadoc.

6.5. PCR quantitativa

La PCR a temps real o PCR quantitativa (qPCR) permet monitoritzar el progrés de l'amplificació de la seqüència problema i quantificar-la, a diferència de la PCR convencional, en què la informació de la reacció es recull al final del procés i només és qualitativa.

La quantificació dels productes de PCR a temps real es basa fonamentalment en la detecció de fluorescència mitjançant l'ús de sondes fluorescents complementàries a la seqüència diana o d'intercalants de DNA fluorescents. Així, les reaccions es caracteritzen pel moment en el temps durant el ciclatge (cicle *threshold* o Ct) en què el senyal fluorescent incrementa de forma significativa respecte el senyal basal. Com més alt sigui el número de còpies de la diana a l'inici, abans es produirà l'increment de la fluorescència i més baix serà el Ct.

6.5.1. Quantificació relativa (mètode del Ct comparatiu o mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Un assaig de quantificació relativa permet analitzar els canvis en l'expressió gènica d'una mostra o un grup de mostres en relació a una mostra de referència (també anomenada calibrador), i és la metodologia d'anàlisi que vam emprar en el nostre estudi.

En qualsevol estudi d'expressió gènica es requereix una normalització per corregir les diferències entre reaccions i entre mostres. Amb aquesta finalitat s'usen controls endògens, que són gens idealment amb una transcripció constant sota diferents condicions experimentals i suficientment abundants en els diferents teixits i tipus cel·lulars. Els gens més usats en aquest estudi han estat: d'RNAs ribosomal (18S), de gens involucrats en funcions cel·lular bàsiques com ara la glucòlisi (GAPDH, PGK1) o la síntesi de nucleòtids (HPRT), o les proteïnes associades als RNAs estructurals (RPLP0).

Per al càlcul de la quantificació relativa vam fer servir el mètode del Ct comparatiu, que requereix que l'eficiència d'amplificació dels gens involucrats en l'assaig (gens d'interès i controls endògens) sigui similar i propera al 100% (es va calcular l'eficiència d'amplificació usant la metodologia del pendent de Ct (veure nota d'aplicació d'

Applied Biosystems: *Amplification Efficiency of Taqman® Gene Expression Assay*,) per als següents gens: FOXP3, CD25, GTR, ..., i els valors oscil·len entre el 85-120%).

La fórmula aritmètica que utilitza aquest mètode és la següent:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

on RQ és la quantificació relativa (*Relative Quantification*), no té unitats i permet comparar entre mostres i/o assajos.

A continuació es dissectionen les fórmules per entendre millor el càlcul seguint un ordre temporal:

(1) Calcular ΔCt per a cada mostra. Es fa normalitzant l'expressió del gen d'interès per aquella mostra amb l'expressió del control endogen per aquella mostra de la següent manera:

$$\Delta Ct_{\text{mostra}} = \Delta Ct_{\text{gen interès}} - \Delta Ct_{\text{control endogen}}$$

(2) Decidir quina mostra usarem com a referència per al càlcul de la RQ. Aquesta mostra serà el calibrador de l'assaig. També cal calcular el seu ΔCt , i es fa com per a qualsevol altra mostra, normalitzant amb el control endogen de la següent manera:

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = \Delta Ct_{\text{gen interès}} - \Delta Ct_{\text{control endogen}}$$

(3) Calcular el $\Delta\Delta Ct$ per a una mostra i un gen d'interès concret x (prèviament normalitzat amb el control endogen). Es fa referenciant l'expressió del gen d'interès x d'una mostra (ΔCt_x mostra) amb l'expressió del gen d'interès x del calibrador (ΔCt_x calibrador) de la següent manera:

$$\Delta\Delta Ct_x = \Delta Ct_x \text{ mostra} - \Delta Ct_x \text{ calibrador}$$

L'obtenció dels valors de Ct i l'establiment de la línia basal per a cada reacció es va aconseguir de forma automàtica gràcies al software SDS (*Sequence Detection System*) versió 2.3 (Applied Biosystems). El càlcul de la RQ es va realitzar amb el software RQ Manager versió 2.1 (Applied Biosystems). Es van aplicar certs criteris per a excloure de forma manual valors de Ct, i són els següents:

- Els valors de $Ct > 35$ no s'inclouen a l'anàlisi dels resultats perquè es troben molt propers als límits de la sensibilitat del sistema de detecció de la PCR a temps real.

- Es realitzen triplicats per a l'amplificació de cada gen. La SD del promig dels valors de Ct no ha de superar 0,25. En cas de replicats la corva d'amplificació dels quals s'allunya de la dels altres replicats, es va testar si treient el seu valor de Ct del promig disminuïa la SD, i en cas afirmatiu, s'excloïa aquest valor. Com a mínim es disposava de dos replicats per dada per tenir-la en compte a l'anàlisi.

7. Assajos proteòmics

Els assajos de proteòmica els van dur a terme al Servei de Proteòmica de la Vall Hebron dirigit pel Dr. Francesc Canals. Se'ls hi van proporcionar les fraccions cel·lulars de Treg i Teff aïllades per FACS en format de pellet sec de 3 mostres de timus i 2 mostres de PBMCs. Ells van dur a terme el processament dels 5 experiments d'ICPL, i ens van lliurar una taula amb el llistat de proteïnes identificades i quantificades per a cada experiment.

Per a cada assaig d'ICPL, es van barrejar els extractes proteïcs de la fracció de cèl·lules T efectores i cèl·lules T reguladores de la mateixa mostra de PBMC o de timus. La reducció, carbamidometilació i marcatge de la proteïna es va realitzar fent servir el kit PL Serva IC, seguint les recomanacions del fabricant, que s'expliquen a continuació. Uns 200µg de proteïna van ser reduïts 30 min a 60°C en presència de 0,5µl de solució fosfina tris (2-carboxietil). Les mostres es van atemperar, es van alquilar amb 0,5µl de iodoacetemida i es van incubar 30 min a 25°C en foscor. Es va aturar la reacció per adició de 0,5µl d'N-acetilcisteïna i es va incubar 15 min a 25°C. Després de la carbamidometilació, 3µl de la solució 12C-Nic-reagent (L) es va afegir a 100 µg de la mostra de Teff i 3µl de la solució 13C-Nic-reagent (H) a la mateixa quantitat de la mostra de Treg. Les mostres es van cobrir amb argó, es van sonicar durant 1 min i es va deixar que procedís la reacció a TA durant 2 hores. Després, 2 µl d'hidroxilamina es van afegir a cada mostra i es van incubar durant 20 min. Les mostres es van barrejar i el pH es va ajustar a 11-12 afegint NaOH 2N. Es va precipitar la proteïna amb el kit Clean up (GE, Healthcare) i es va dissoldre en tampó de càrrega de mostra (Tris-HCL 50mM, pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 0,1% (p/v) blau de bromofenol, 10% v/v glicerol, 5% v/v mercaptoetanol). Es van separar les proteïnes mitjançant electroforesi 1D en gel de poliacrilamida al 2,5%. Cada carril del gel es va tallar en 20 fragments horitzontals i cada fragment es va sotmetre a digestió trípica amb tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI.)

La digestió trípica es va analitzar en un espectròmetre de masses de trampa iònica Esquire HCT (Bruker) acoblat a un sistema de nanoHPLC (Ultimate, LcPackings,

Netherlands). La mostra en primer lloc es va concentrar en una columna de nanotrampa PepMap 300um i.d. 1 mm i després es va carregar en una columna de nanoseparació PepMap 75um i.d. 15 cm. (LC Packings, Netherlands). Els pèptids es van eluir gràcies a un gradient d'acetonitril (Gradient: 0-60% B en 120 min, B) 80% acetonitril (CAN), àcid fòrmic 0,1% en aigua; flow rate ca. 300 nL/min) a través d'una agulla de nanosprai PicoTip (New Objective, Woburn, MA) a la font d'ionització de nanosprai de l'espectròmetre de masses de trampa iònica. El processament de les dades per a la identificació i la quantificació de les proteïnes es va fer amb *Protein Scape 2.1* i *WARP-LC 1.2* (Bruker), una plataforma de *software* que integra el processament de la correguda de dades LC-MS, la indentificació de proteïnes a través de la cerca a la base de dades d'espectres MS/MS i la quantificació proteïca basada en la integració dels pics cromatogràfics de MS obtinguts dels cromatogrames iònics per a cada precursor. Les proteïnes es van identificar fent servir Mascot per buscar a la base de dades Swiss-Prot 57.0. Els espectres MS/MS es van buscar amb un precursor de tolerància de massa de 1,5 Da, fragment de tolerància de 0,5 Da, especificitat de tripsina amb un màxim d'un lloc de trencament perdut, carbamidometilació de cisteïna establerta com a modificació fixa i l'oxidació de metionina i els marcatges de l'ICPL a l'N-terminal i Lys com a modificacions variables. El criteri per a la identificació positiva es va fixar en una puntuació Mascot individual per a cada espectre MS/MS de cada pèptid més alt que el corresponent homòleg amb puntuació de llindar. El ratio de falsos positius per a la identifiicació de proteïna de Mascot es va mesurar buscant a l'atzar en una base de dades decoy i es va estimar que estava per sota del 4%. Per a les proteïnes d'interès escollides, les dades de quantificació obtingudes de l'anàlisi WARP-LC automatitzat es van revisar de forma manual.

8. Anàlisi estadística de les dades

Hem usat el programa GraphPad Prism 5.01 per a l'anàlisi estadística de les dades. Cada llistat de dades corresponent a un paràmetre determinat es va sotmetre a un test de normalitat *Shapiro-Wilk* per conèixer si les dades seguien una distribució normal o distribució Gaussiana. Així, segons aquesta informació, es van realitzar anàlisis estadístiques paramètriques (per dades que seguien una distribució normal) o no paramètriques (per aquelles dades que no seguien una distribució normal) de les dades.

Quan es va donar el cas d'analitzar una variable en dos grups, es va usar un *t-Student* per dades amb distribució normal, i test *Mann-Whitney* per dades sense distribució

normal. En ambdós casos, sempre test “two-tailed” (*one-tailed tests* requereixen més coneixement sobre les dades i els grups d’anàlisi, fins i tot abans d’iniciar la recopilació de dades). Quan es va donar el cas d’analitzar una variable en més de dos grups, es va usar un ANOVA One-way seguit d’un test de Bonferroni per dades amb distribució normal, i un test de Krustal-Wallis seguit d’un test de Dunns per dades sense distribució normal. Quan es va donar el cas d’analitzar dues variables, en tots els casos es va fer servir un ANOVA Two-Way seguit d’un test de Bonferroni.

Les anàlisis estadístiques fetes als grups de dades pertinents s’indiquen en els capítols de resultats on s’expliquen aquestes dades.

Resultats i discussió

Resultats – Capítol 1

Cèl·lules Treguladores al timus i la seva evolució amb l'edat en mostres pediàtriques

En timus, els precursors de les cèl·lules T arriben des de la medul·la òssia i pateixen processos de selecció amb la finalitat d'aconseguir un repertori de cèl·lules T restringit per l'MHC de l'individu i tolerant als antigens propis. Tal i com s'ha explicat a la introducció, no només al timus es generen cèl·lules T CD4⁺ efectores sinó també cèl·lules T amb un fenotip funcional regulador. Tot i que la procedència tímica d'aquestes cèl·lules es va suggerir en el model murí en treballs publicats per Nishizuka 1969 [18], no va ser fins el 2005 en què es va descriure que l'origen de les cèl·lules T_{reg} humanes era [172]. D'aquí que se'ls hi atorgués el sobrenom de T_{reg} naturals (nT_{reg}), tot i que ara hi ha publicacions que les anomenen T_{reg} tímiques (tT_{reg}). En aquest treball les T_{reg} tímiques seran identificades com nT_{reg}. En ratolins es va demostrar que aquestes cèl·lules ja presenten capacitat supressora al timus i el seu fenotip és CD4SPCD25⁺ [173]. En canvi hi ha molt pocs articles en els que es caracteritzin aquestes cèl·lules en el timus de mostres humanes i només un parell en què s'analitzin en relació amb el temps d'evolució de l'infant. L'objectiu d'aquest estudi és analitzar les cèl·lules Treguladores a nivell del seu fenotip al llarg del temps a partir de diferents mostres de timus extrets per cirurgia cardíaca en nens d'edats compreses entre 2 dies i 10 anys.

1.1. Estudi de les cèl·lules Treg naturals i altres poblacions de timòcits en mostres de timus humans pediàtrics

1.1.1. Anàlisi de l'expressió de CD25 als timòcits de les mostres humanes

L'elevada expressió de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25) és un marcador d'aquestes cèl·lules Treg des del timus. Aquestes cèl·lules en el timus representen un 3,6±1,6% del total de timòcits. Quan es va analitzar la seva distribució segons l'expressió dels coreceptors CD4 i CD8, es va observar que els timòcits CD25⁺ es troben principalment entre les fraccions CD4SP (timòcits CD4SPCD25⁺) i DP (timòcits DP25⁺) en uns percentatges de 66,4±15,4% i 18,2±11,5, respectivament.

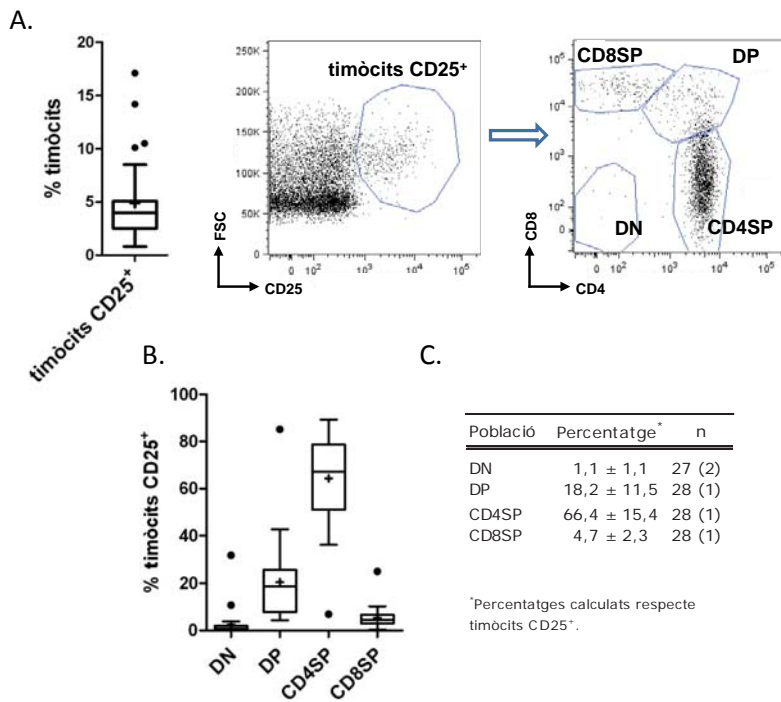


Figura 1.1. Anàlisi de la població de cèl·lules CD25⁺ mitjançant citometria de flux a les mostres de timus humà. A. Es representa en un gràfic la distribució dels percentatges de timòcits CD25⁺ respecte timòcits totals en les mostres testades, seguit de l'estratègia d'anàlisi per determinar a quina població de timòcits en desenvolupament pertanyen els timòcits CD25⁺. B. Representació gràfica de la distribució dels timòcits CD25⁺ en percentatge en les poblacions de timòcits. C. Taula on es mostren els valors promig de percentatge juntament amb la SD i el nombre de mostres analitzades. Entre parèntesi s'indica el número de valors atípics, que no s'han usat per als càlculs de valor promig.

L'estudi es va centrar en les poblacions de timòcits caracteritzades segons els coreceptors CD4 i CD8, que són timòcits DP, DN, CD4SP i CD8SP, i en aquelles que expressen CD25 de forma majoritària, com acabem de descriure, que són CD4SPCD25⁺ i DP25⁺. A la figura 1.2 es mostra l'estratègia d'anàlisi d'aquestes fraccions per citometria de flux.

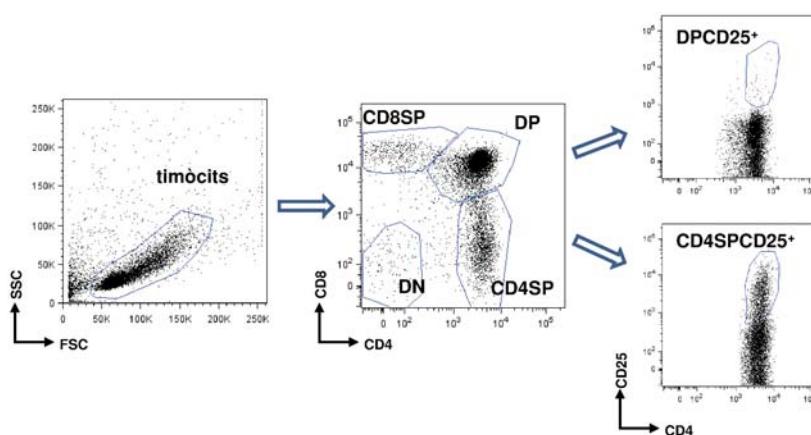


Figura 1.2. Poblacions d'estudi mitjançant citometria de flux a les mostres de timus humà. Els timòcits es van seleccionar per les seves propietats de dispersió de la llum, i després es van seleccionar les poblacions de DN, DP, CD4SP, CD8SP segons la seva expressió dels coreceptors CD4 i CD8. Els timòcits DPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺ se seleccionen a partir dels timòcits DP i els CD4SP, respectivament.

1.1.2. Anàlisi de la freqüència de les poblacions d'estudi

Primer, es va determinar la distribució de les poblacions de timòcits a les nostres mostres per confrontar aquestes dades amb les descrites a la literatura. Tal i com es mostra a la taula, després de l'anàlisi de 33 mostres de timus humans, els percentatges respecte timòcits totals van ser de $67,3 \pm 14,5$ (figura 1.3.A) per les cèl.lules DP, seguit de $17,6 \pm 9,1$ per els timòcits CD4SP. I finalment, menys representats, els timòcits CD8SP i els timòcits DN, amb percentatges de $7,1 \pm 3,2$ i $3,4 \pm 2,2$, respectivament.

El percentatge de les DPCD25⁺ representa al voltant d'un 1% ($0,9 \pm 0,7$) respecte el total de les DP, mentre que les cèl.lules CD4SPCD25⁺ representen un $14,1 \pm 4,2$ del total de timòcits CD4SP (figura 1.3.B).

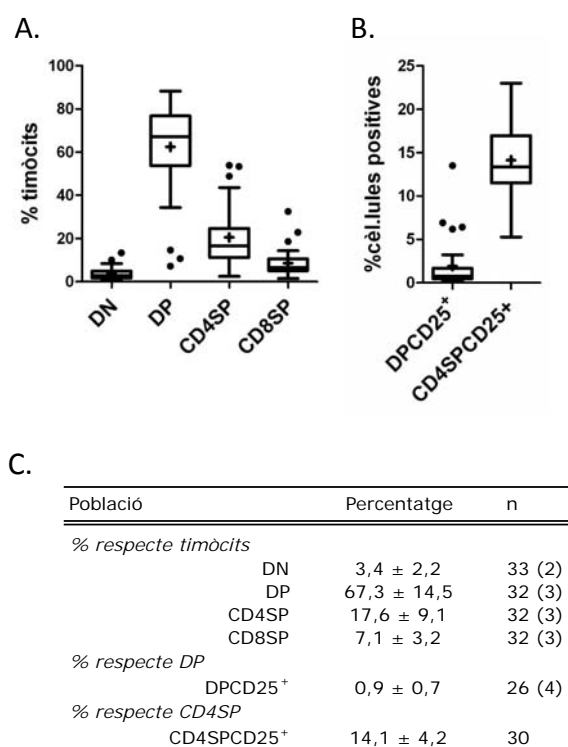


Figura 1.3. Poblacions d'estudi mitjançant citometria de flux a les mostres de timus humà. A. Es representen els percentatges de les poblacions de timòcits DN, DP, CD4SP i CD8SP respecte el total de timòcits. B. Es representen els percentatges de les cèl.lules DPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺ respecte els timòcits DP i CD4SP, respectivament. C. Taula on s'indiquen els valors promig de percentatge per a cada població d'estudi, amb la SD i el nombre de mostres analitzades. Entre parèntesi s'indica el número de valors atípics, que no s'han usat per als càlculs de valor promig.

1.1.3. Verificació de la naturalesa reguladora de les CD4SPCD25⁺ de timus

CD25 a timus és el marcador que hem fet servir per seleccionar les Tregs, així que vam voler assegurar que era una bona estratègia de selecció. I a banda dels assajos de supressió, vam estudiar la correlació de l'expressió de FOXP3 amb la de CD25, que prèviament Miyara havia demostrat en sang perifèrica humana i que posava de relleu que les cèl.lules TCD4⁺CD25^{high} disposaven del major percentatge de FOXP3 i de la major capacitat supressora [174]. Per una banda, es va analitzar l'expressió dels dos marcadors per PCR quantitativa en 12 mostres de teixit tímic total (4 mostres per cada grup d'edat), i la correlació va ser positiva i estadísticament significativa ($p=0,02$).

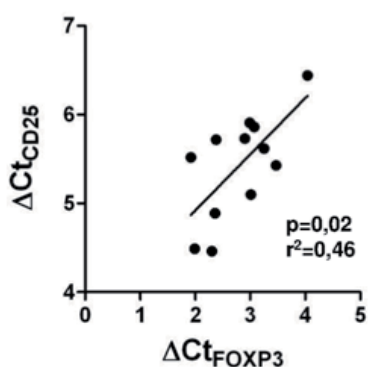


Figura 1.5. Els timòcits CD4SPCD25⁺ són cèl.lules T reguladores. Es van realitzar assajos de supressió amb timòcits CD4SPCD25⁺ aïllats de mostres humanes sobre la proliferació de cèl.lules TCD4⁺CD25⁻ procedents de PBMCs de donants sans, que es van estimular amb esferes recobertes d'anti-CD3 i anti-CD28. Les cèl.lules es van cocultivar durant 5 dies, i a les darreres 16h es va afegir timidina tritiada per a mesurar la radioactivitat incorporada. Es mostren els resultats d'un assaig representatiu dels dos realitzats.

Per tal de confirmar la seva naturalesa reguladora, els timòcits CD4SPCD25⁺ es van aïllar per FACS i es van posar en cultiu amb cèl.lules Tefectores CD4⁺CD25⁻ procedents de PBMCs d'un donant sa per testar la seva capacitat supressora. Com es pot veure al gràfic, les cèl.lules Treg naturals exerceixen una forta regulació en la proliferació de les Teff, inhibint quasi de forma completa la seva divisió al ratio 1:1. L'assaig amb els timòcits DPCD25⁺ es va desestimar per el baix nombre de cèl.lules.

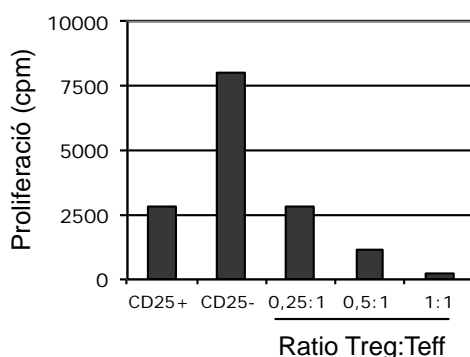


Figura 1.4. A timus existeix una correlació positiva entre CD25 i FOXP3. Es va analitzar l'expressió de FOXP3 i CD25 per PCR quantitativa en 12 mostres de teixit tímic total, 4 de cada grup d'edat. Com a control endogen es va fer servir l'expressió d'HPRT.

1.1.4. Caracterització fenotípica de les poblacions CD4SPCD25⁺ i DPCD25⁺ a les mostres de timus humans pediàtrics

1.1.4.1. Presentació dels marcadors per a l'anàlisi fenotípica

El fenotip de les cèl.lules CD25⁺ en el timus es va estudiar a partir de l'expressió dels marcadors que es descriuen a la taula 1.1. Les cèl.lules Treguladores tenen un fenotip activat i/o madur en sang perifèrica, i els marcadors clàssics més homogenis per estudiar-les són FOXP3, CTLA-4, CD127, GITR, CD122, CD95, CCR6. A més d'aquests, es van incloure una sèrie de molècules representatives de fenotip efector (CCR4, CCR5, CD62L, CD54), activat (CD69, CD95, HLA-DR, CD278 i CD279) i/o de maduresa (CD45RO, CD69, CD44 i CD27).

Nom	Descripció	Altres noms	Referències
CD69	lectina que s'expressa en superfície quan s'activen els limfòcits T i les cèl.lules NK, i que està involucrada en la proliferació cel.lular		Darrasse-Jèze G. et al. Blood 2013
CD44	glicoproteïna de membrana involucrada en funcions varies, entre elles, l'activació i la recirculació limfocitàries		Shimizu Y et al. J Immunol 1989
CD27	membre de la família del TNF específic de limfòcits involucrat en la interacció entre limfòcits T i limfòcits B		Cupedo T. et al. Eur. J. Immunol. 2005
CD45RO	isoforma de la proteïna tirosina fosfatasa, receptor tipus C, regulador de la senyalització a través del TCR i BCR	PTPRC	Darrasse-Jèze G. et al. Blood 2013
CD62L	molècula d'adhesió que permet als limfòcits la circulació als òrgans limfoides secundaris	L-selectina	Himmel ME. et al J Immunol. 2013
FOXP3	factor de transcripció involucrat en el desenvolupament de les cèl.lules T reguladores		Nunes-Cabaço H. et al. Eur. J. Immunol. 2011
CTLA-4	membre de la superfamília de les immunoglobulines, inhibidor de l'activació de les cèl.lules T	CD152	Stephens LA. et al. Eur. J. Immunol. 2001
CD95	membre de la família del TNF, inductor d'apoptosi quan s'uneix al seu lligand (FasL), la seva expressió s'associa a cèl.lules T activades	FasR, TNFRSF6	Cupedo T. et al. Eur. J. Immunol. 2005
CD127	cadena alfa del receptor de la IL-7 (IL-7R), que és necessari per al desenvolupament dels limfòcits; participa en la seva maduració i activació	IL-7R α	Cupedo T. et al. Eur. J. Immunol. 2005
GITR	receptor de la família del TNF induïble per glucocorticoides que actua com a coestimulador de l'activació de les cèl.lules T	TNFRSF18	Darrasse-Jèze G. et al. Blood 2013
CD122	cadena beta del receptor de la IL-2 (IL-2R), que participa en la proliferació i activació de cèl.lules T	IL-2R β	Stephens LA. et al. Eur. J. Immunol. 2001
CCR4	receptor de quimiocines característic de cèl.lules Th2	CD194	D'Ambrosio J Immunol 1998
CCR5	receptor de quimiocines amb funcions en la resposta inflammatòria a infeccions	CD195	Heng et al. Nature 1996
CCR6	receptor de quimiocines que induïx el tràfic de cèl.lules limfoides a l'epiteli		Lim HW, et al. J Immunol 2008
CD278	membre de la família del CD28, co-estimulador induïble de les cèl.lules T	ICOS	Lee HM. et al. Advances in Immunology 2011
CD279	membre de la superfamília de les immunoglobulines, regulador negatiu de la resposta immunitària	PD-1	Lee HM. et al. Advances in Immunology 2011
CD54	molècula d'adhesió que participa en les respostes immunitària i inflammatòria	ICAM-1	Staunton DE et al. Cell 1988
HLA-DR	molècula presentadora de pèptids de classe II, participa en l'activació específica de cèl.lules T; la seva expressió s'associa a cèl.lules T activades	MHC-II	Choi EY. et al. Human Immunol. 1997

Taula 1.1. Marcadors usats per a la caracterització fenotípica de les cèl.lules T reguladores a timus humà. S'indiquen els marcadors, una petita descripció del tipus de molècula i el seu paper en el sistema immunitari, altres noms de la molècula i referències bibliogràfiques que mostren l'associació del marcador amb les cèl.lules Treg en humans.

1.1.4.2. Anàlisi de l'expressió dels marcadors a les poblacions d'estudiEl nostre interès recau en les poblacions CD25⁺ perquè són la font de cèl.lules Treg, i per

això hem agrupat els marcadors segons la seva expressió en els timòcits DPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺ i els seus equivalents CD25⁻. El comportament dels marcadors a les poblacions caracteritzades per CD4 i CD8 es mostra a l'annex 1 d'aquest capítol.

A continuació s'expliquen de forma més detallada les característiques de cada grup i quins marcadors es troben a cada grup:

- Marcadors de maduració: CD69, CD44, CD27, CD62L i CD45RO

Es tracta de marcadors d'elevada expressió principalment a les poblacions de timòcits més madurs, és a dir, CD4SP i CD8SP (veure annex 1). S'observa que entre les poblacions CD25⁺ i els seus equivalents CD25⁻, la seva expressió es restringeix als grups de cèl·lules més madures, com són CD4SPCD25⁺, CD4SPCD25⁻ i DPCD25⁺, però no a les DPCD25⁻.

El comportament de CD45RO difereix lleugerament del de la resta del grup de marcadors, perquè la seva expressió s'observa a partir dels timòcits DP.

- Marcadors preferentment expressats a DPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺ (marcadors de Tregs): FOXP3, CTLA-4, CD122, CD95, GITR i CD127

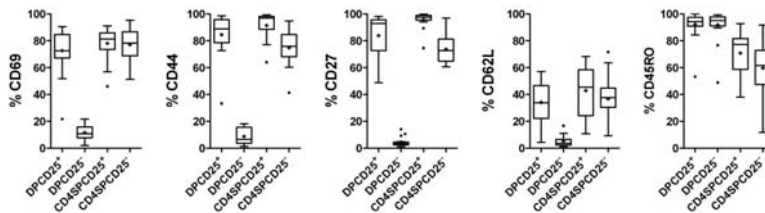
Els marcadors d'aquest grup són característics de cèl·lules T_{reg}, la seva expressió es troba de forma majoritària a les poblacions DPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺ amb freqüències similars i elevades. CTLA-4 i FOXP3 s'expressen únicament als timòcits CD4SP. En canvi, el GITR s'expressa majoritàriament a timòcits DP (veure annex 1). L'expressió del CD127 és inversa a la del CD25, com ho demostra la seva distribució als timòcits CD4SP segons els nivells de CD25. La seva expressió és més elevada a DPCD25⁺, probablement a causa de la funció del CD127 en el desenvolupament d'aquestes cèl·lules.

- Marcadors d'expressió majoritària a DPCD25⁺: CCR4, CCR5, CCR6, CD278, CD279, CD54, HLA-DR

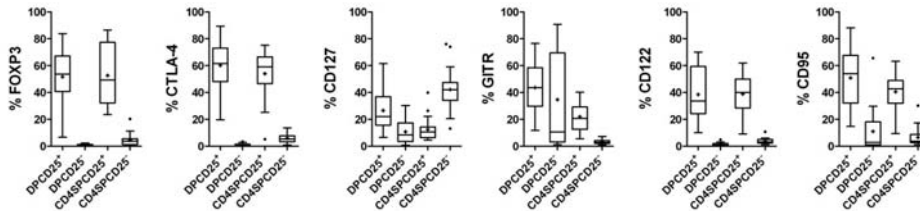
L'expressió d'aquests marcadors és escassa, i assoleix els màxims en les cèl·lules DPCD25⁺ amb percentatges al voltant del 40%. També hi ha expressió a les cèl·lules CD4SPCD25⁺, però en un percentatge inferior, que oscil·la al voltant del 20%.

Per tant, els timòcits DPCD25⁺ són cèl·lules madures amb fenotip característic de cèl·lules Treg (CD4SPCD25⁺) amb un cert grau d'activació. Tot i representar una població molt petita dins dels timòcits DP, no són una població homogènia com ho demostren l'expressió de receptors de quimiocines i molècules coestimuladores, que potser estarien jugant un paper en la selecció tímica.

I. Marcadors de maduració



II. Marcadors preferentment expressats a DPCD25+ i CD4SPCD25+ (marcadors de Tregs)



III. Marcadors d'expressió majoritària a DPCD25+

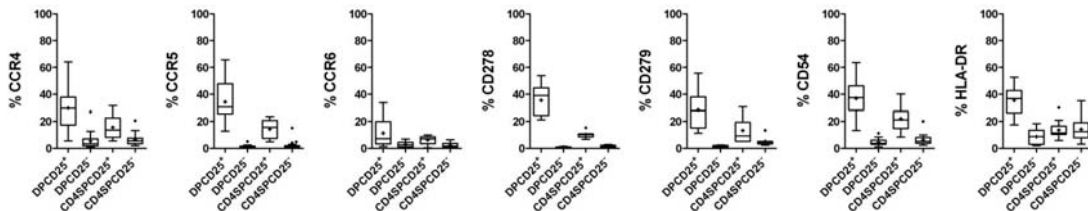


Figura 1.6. Expressió dels marcadors d'estudi a les poblacions de timòcits DPCD25+, CD4SPCD25+ i els seus equivalents CD25- de les mostres de timus humanes. L'agrupació dels marcadors es va fer segons la seva expressió a les poblacions reguladores de timus CD4SPCD25+ i DPCD25+. En el primer grup trobem marcadors de maduració (CD69, CD44, CD27, CD62L i CD45RO), que es troben altament expressats en els timòcits de fenotip madur. En el segon grup hi trobem marcadors característics de Tregs (FOXP3, CTLA-4, CD127, GITR, CD122 i CD95). I al tercer grup, hi ha receptors de quimiocines i marcadors d'activació que s'expressen preferentment als timòcits DPCD25+ (CCR4, CCR5, CCR6, CD278, CD279, CD54 i HLA-DR), suggerint que tenen un paper en la maduració d'aquestes cèl·lules.

1.2. Estudi de l'evolució de les poblacions de timòcits en mostres humanes pediàtriques amb l'edat

Un cop establert quin era el patró d'expressió d'aquests marcadors al timus, vam voler analitzar l'evolució de les cèl·lules T_{reg} amb l'edat. Per portar a terme aquest objectiu, les mostres de timus pediàtrics es van classificar en tres grups segons l'edat dels donants. Es coneix que durant el primer mes de vida post natal hi ha una depleció de timòcits DP [175], per això vam agrupar les mostres seguint el següent criteri:

- **≤1 m** : mostres de donants d'edats inferiors o iguals a un mes (calculat en 30 dies).
- **1m < edat < 1a** : mostres de donants d'edats entre 1 mes i un any (calculat en 365 dies).
- **≥1a** : mostres de donants d'edats igual o superior a l'any.

Com a mesura de control, es va determinar si hi havia diferències en la cel·lularitat de les mostres processades segons l'edat. Es va fer un recompte del nombre de timòcits totals obtinguts per digestió mecànica a partir d'un nombre conegut de grams de teixit, i es va analitzar si aquests valors correlacionaven amb l'edat. Les dades es troben graficades a la figura 1.7 i mostren que no hi ha diferències en la cel·lularitat entre els timus inclosos a l'estudi.

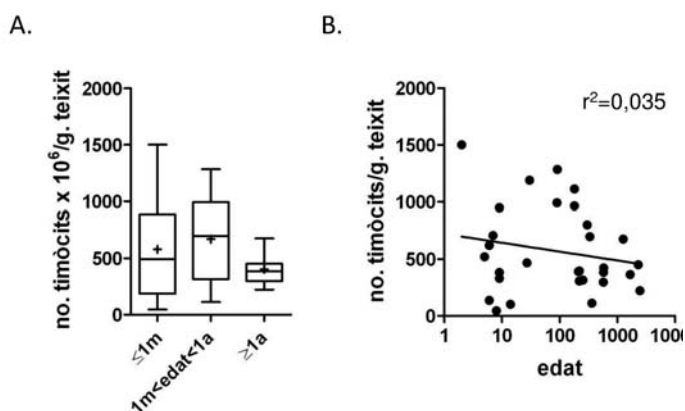


Figura 1.7. Cel·lularitat de les mostres de timus humans. La correlació entre el número de timòcits per gram de teixit amb l'edat del donant no presenta diferències entre edats, segons test d'Spearman.

1.2.1 Evolució de les poblacions de timòcits d'estudi amb l'edat

1.2.1.1 Timòcits DN, DP, CD4SP i CD8SP

L'any 2001 Varas i col·laboradors van fer una anàlisi de les variacions en les poblacions tímiques segons edat, i van observar que les cèl·lules CD4SP disminuïen amb l'edat [175]. En primer lloc, vam voler determinar si aquesta observació es confirmava a les nostres dades. I tal i com es mostra a la figura 1.8.A, existeix una disminució estadísticament significativa quan comparem entre el grup ≤1m i el grup ≥1a ($p < 0,05$). No només s'observa aquesta disminució quan comparem la freqüència de les CD4SP entre grups, sinó també quan s'analitza la correlació entre els dos paràmetres, freqüència i edat. A la figura 1.8.B. es pot veure que hi ha una correlació negativa amb significació estadística ($p = 0,002$). La disminució de timòcits CD4SP amb l'edat va acompanyada d'un augment de DP, no en canvi de CD8SP ni de DN. A més, tenint en compte que hi ha una correlació positiva entre la freqüència de cèl·lules DP i edat ($p = 0,025$, figura 1.7.B), podem dir que les dues poblacions que estan sota un mateix equilibri són les de timòcits CD4SP i DP.

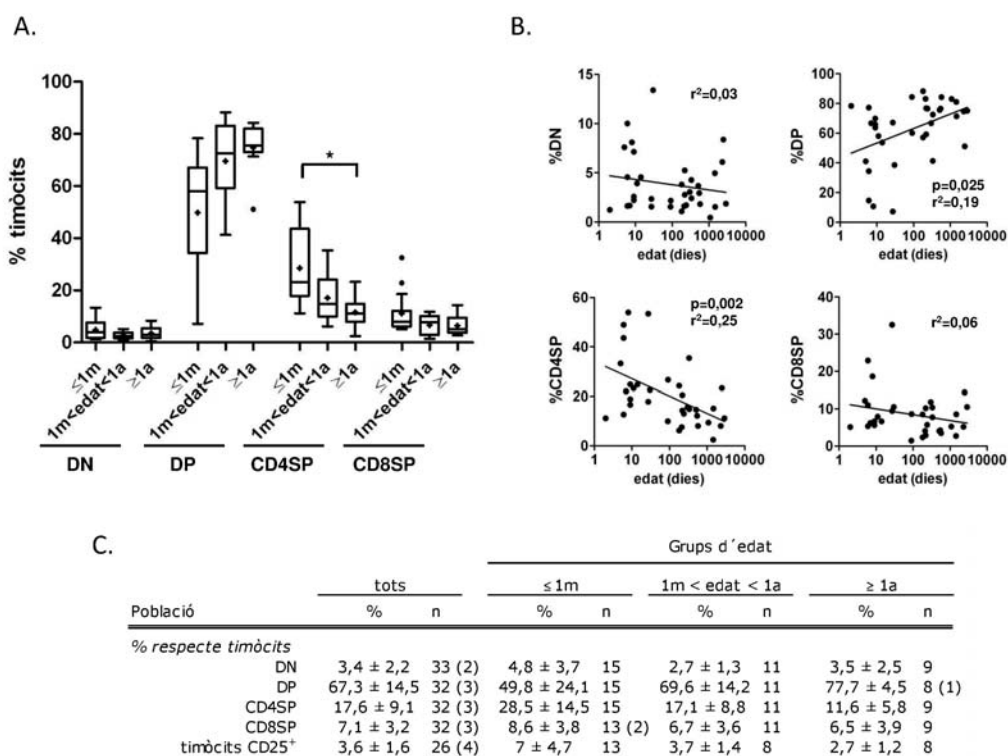


Figura 1.8. Evolució dels percentatges de les poblacions de timòcits DN, DP, CD4SP i CD8SP segons edat a les mostres de timus humanes. A. Distribució de les poblacions clàssiques de timòcits segons la seva expressió de CD4 i CD8 en els grups d'edat. Hi ha una disminució estadísticament significativa del percentatge de CD4SP amb l'edat. B. Els percentatges de timòcits CD4SP i DP correlacionen amb significació estadística amb l'edat de manera inversa, això és, el percentatge de CD4SP disminueix mentre que el de DP incrementa. C. A la taula es recullen els valors promig amb les SD i el nombre de valors de les dades graficades a A. Entre parèntesi s'indiquen el nombre de valors atípics, que no s'han usat per als càlculs.

1.2.1.2. Timòcits CD4SPCD25⁺ i DP25⁺

Finalment, es va realitzar el mateix estudi analitzant de forma directa les poblacions CD4SPCD25⁺ i DP25⁺, tal i com s'observa a la figura 1.2. Les dades indiquen que només la població CD4SPCD25⁺ pateix canvis en la seva freqüència amb l'edat. A la figura 1.9.A es mostra que hi ha una disminució del seu percentatge amb l'edat ($p < 0,01$ pels grups $\leq 1m$ i $1m < \text{edat} < 1a$, i $p < 0,05$ pels grups $\leq 1m$ i $\geq 1a$), i que la correlació dels dos paràmetres és negativa ($p = 0,0015$). No hi ha diferències per la població de timòcits DP25⁺, com s'indica a la figura 1.9.B, i podria ser a causa del baix percentatge que representen.

Tot i no detectar canvis en la freqüència de les DP25⁺, sí s'aprecien diferències en el nivell d'expressió (MFI) de CD25, i de la mateixa manera ocorre amb la població CD4SPCD25⁺. En ambdós casos, la intensitat dels nivells de CD25 (MFI de CD25) incrementen amb l'edat ($p < 0,05$ per grups $\leq 1m$ i $\geq 1a$ a les poblacions DP25⁺ i CD4SPCD25⁺). Aquest augment no deriva d'un problema en el processament de les mostres, ja que la MFI de CD4 no varia estadísticament entre els grups d'edat. En

resum, en el primer mes de vida s'observa una freqüència elevada de cèl·lules CD4SPCD25⁺, però amb nivells baixos per CD25. Aquests valors evolucionen de forma inversa amb l'edat, observant-se una disminució en la freqüència de cèl·lules CD4SPCD25⁺ acompanyada de nivells d'expressió de CD25 de l'ordre de 4 vegades superiors.

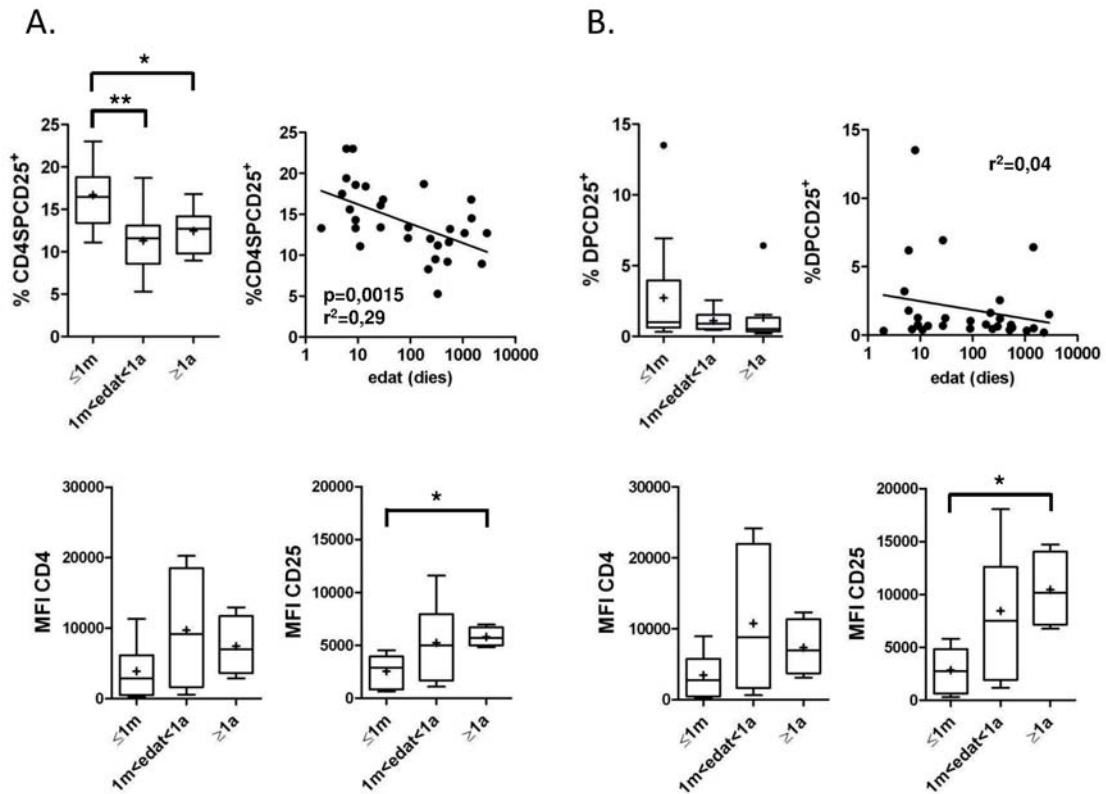


Figura 1.9. Evolució dels percentatges de les poblacions CD4SPCD25⁺ i DPCD25⁺ en les mostres de timus humans segons l'edat. A. Els percentatges de cèl·lules CD4SPCD25⁺ es troben disminuïts en el grup 1m<edat<1a ($p<0,01$) i en el grup $\geq 1a$ ($p<0,05$) respecte el grup $\leq 1m$. La correlació del percentatge d'aquestes cèl·lules respecte timòcits CD4SP amb l'edat és negativa i estadísticament significativa ($p=0,0015$). B. El percentatge de cèl·lules DPCD25⁺ és superior en el grup $\leq 1m$ respecte els altres dos grups, però no hi ha diferències estadísticament significatives. Tampoc és estadísticament significativa la correlació amb l'edat. Tant per les cèl·lules CD4SPCD25⁺ (A) com per les cèl·lules DPCD25⁺ (B) es mostren els valors de MFI de CD25, que es comporten de la mateixa manera i incrementen amb l'edat ($p<0,05$ per grups $\leq 1m$ i $\geq 1a$), així com els de CD4, que no varien.

1.2.2. Evolució de les poblacions de timòcits d'estudi amb l'edat segons anàlisi de marcadors d'activació i de Tregs

Els nostres resultats defineixen clarament una disminució de les cèl·lules CD25⁺ amb l'edat, associat a una major expressió de CD25 per cèl·lula. Per tant, la pregunta que ens vam formular va ser si hi havia canvis fenotípics que estarien relacionats amb

l'evolució del timus a partir del període neonatal fins a edats properes a la primera dècada de vida.

1.2.2.1. Evolució del comportament dels marcadors en les poblacions d'estudi amb l'edat a les mostres de timus humans: percentatge de positivitats i intensitat d'expressió (MFI)

Els marcadors que ja s'havien estudiat a les poblacions d'estudi, es van tornar a analitzar en funció dels grups d'edat. Els resultats es representen a les figures 1.10, 1.11 i 1.12, on s'agrupen els marcadors seguint el criteri que ja havíem establert (veure apartat 1.1.4.2). No es van revelar diferències per cap marcador en les poblacions de timòcits DN, DP, CD4SP i CD8SP, a excepció de FOXP3. A la figura 1.11 s'observa un augment de l'expressió de FOXP3 amb l'edat ($p < 0,001$ per comparacions $\leq 1m$ vs. $\geq 1a$ i $1m < edat < 1a$ vs. $\geq 1a$), tot i haver-hi poques mostres al grup $\geq 1a$ ($n=3$).

Pel que fa a l'expressió dels marcadors en les poblacions CD25⁺ i les seves corresponents CD25⁻, en general la freqüència de les cèl.lules no varia en el rang d'edat que analitzem, és a dir, les cèl.lules que estudiem es mantenen fenotípicament estables. Les nostres dades de caracterització fenotípica indiquen que les cèl.lules DPCD25⁺ són molt similars als timòcits CD4SPCD25⁺, amb expressions elevades de FOXP3, CTLA-4, CD122 i CD95. Les DPCD25⁺ són més dependents de CD127 que CD4SPCD25⁺, ja que la IL-7 és necessària per a la seva [176]). GITR és l'únic marcador de Treg que es comporta diferent a la resta, ja que la seva expressió s'observa a les DP i a les DPCD25⁺, però disminueix a les CD4SPCD25⁺.

Respecte els marcadors de maduració, les DPCD25⁺ presenten nivells de CD44, CD69, CD27, CD62L i CD45RO equiparables als de CD4SPCD25⁺, fet que demostra el seu caràcter de timòcits madurs.

Finalment, alguns marcadors es van trobar expressats preferentment a les DPCD25⁺, entre ells, els receptors de quimiocines, CCR4, CCR5 i CCR6, i marcadors com CD54 i HLADR, que indiquen activació. Es podria especular que aquests marcadors tenen relació amb el pas d'aquestes cèl.lules a selecció tímica.

Quan estudiem la correlació dels marcadors amb l'edat, només varien FOXP3 i CD95. D'una banda, les diferències en la freqüència de cèl.lules FOXP3⁺ afecten als timòcits DPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺, i en els dos casos hi ha un increment significatiu del percentatge als grups de major edat respecte els que es troben entre el mes i l'any ($p < 0,05$ per comparació $1m < edat < 1a$ vs. $\geq 1a$, veure figura 1.11.A). Per a les CD4SPCD25⁺ també trobem significació estadística entre el grup de menys d'un mes i els majors d'un any ($p < 0,001$).

D'altra banda, CD95 augmenta amb l'edat en les DPCD25⁺ ($p < 0,001$ per comparació $\leq 1m$ vs. $\geq 1a$ i $p < 0,05$ per comparació $1m < edat < 1a$ vs. $\geq 1a$, veure figura 1.11.A). Acompanyant aquest increment s'observa un augment en l'expressió de CD95 a la població de DPCD25⁺ ($p < 0,05$, veure figura suplementària 1.3, annex 1). Aquesta dada és encara més robusta estadísticament quan fem la correlació del percentatge de CD95 amb l'edat. El que s'observa és que el CD95 incrementa a totes les fraccions, CD4SPCD25⁺ ($p < 0,05$), DPCD25⁺ ($p < 0,005$) i CD4SPCD25⁻ ($p < 0,05$), a excepció dels timòcits DPCD25⁻ (veure figura 1.11.B).

En resum aquestes dades suggereixen que la disminució de timòcits CD4SPCD25⁺ que observem amb l'edat podria estar vinculada a l'increment del percentatge de cèl.lules CD95⁺, ja que aquesta molècula, a banda de ser característica de cèl.lula activada, és un membre de la família del TNF que participa en el control de la resposta immunitària induïnt apoptosi.

Les cèl.lules T convencionals CD4⁺CD25⁻ també es veurien afectades per aquest control de la resposta, però en menor proporció que les Treg naturals, CD4SPCD25⁺ i també les DPCD25⁺. Tanmateix, tot i disminuir en nombre amb l'edat, aquesta població de reguladores tímiques naturals incrementa el seu percentatge de FOXP3, ja sigui perquè la població és més homogènia amb l'edat, o bé per influència de la recirculació de cèl.lules T perifèriques activades al timus.

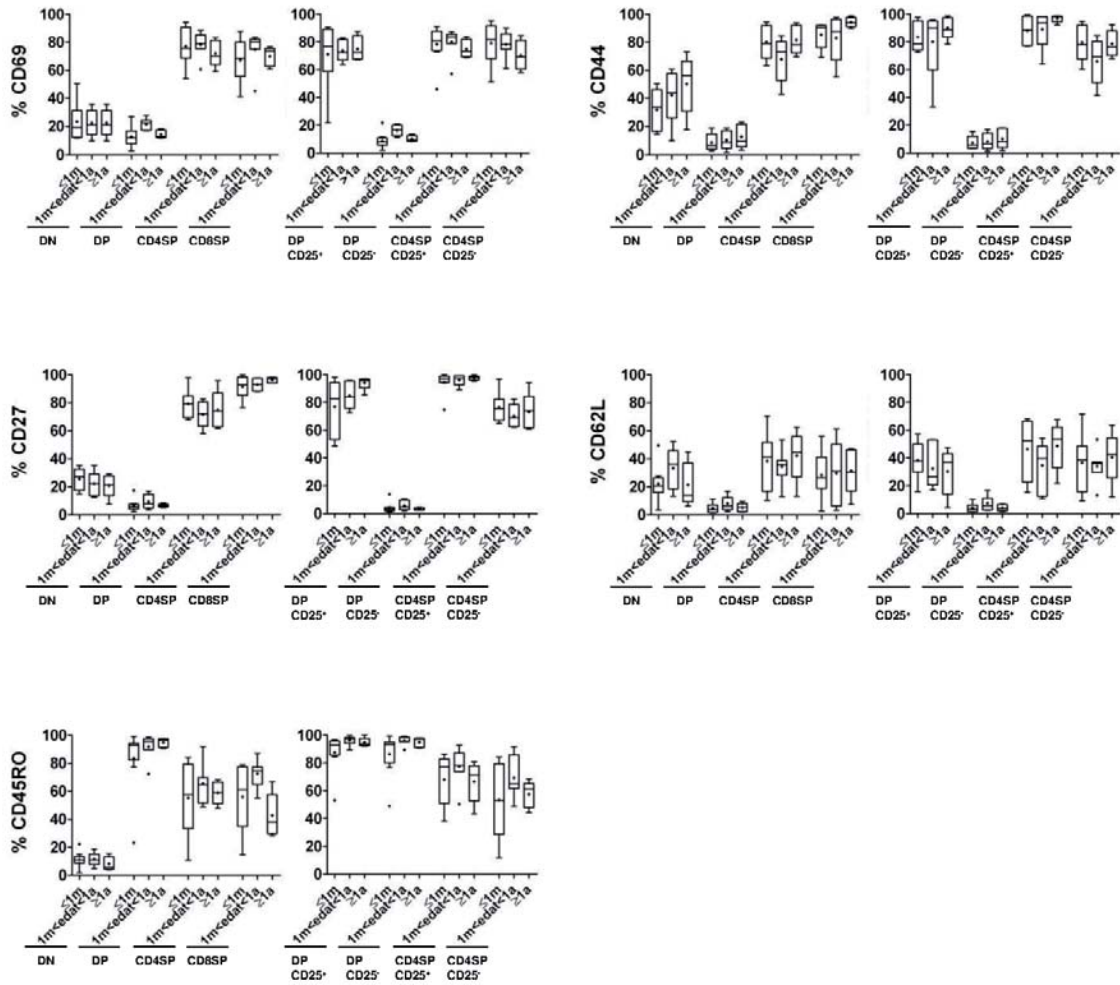
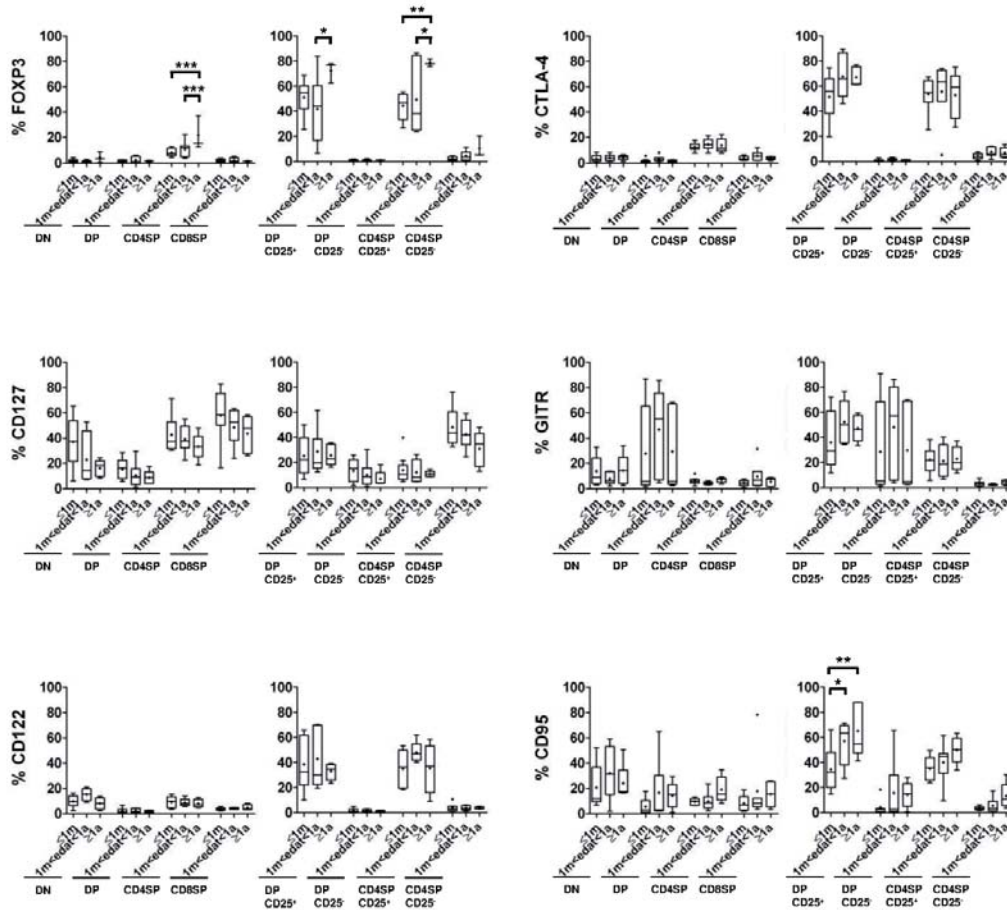


Figura 1.10. Anàlisi de l'expressió en percentatge dels marcadors de maduració a les poblacions d'estudi de les mostres humanes de timus segons edat. S'analitzen CD69, CD44, CD27, CD62L i CD45RO, que s'expressen en percentatges elevats a les poblacions de timòcits madures, això és, CD4SP, CD8SP, DP, CD25⁺ i CD4SPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺. CD45RO és una excepció, ja que s'expressa de forma elevada a tots els grups analitzats menys els timòcits DN. No s'observen diferències estadísticament significatives entre grups d'edat, determinat mitjançant test ANOVA 2-way (les variables analitzades són l'edat i el grup cel·lular) seguit de test de Bonferroni.

A.



B.

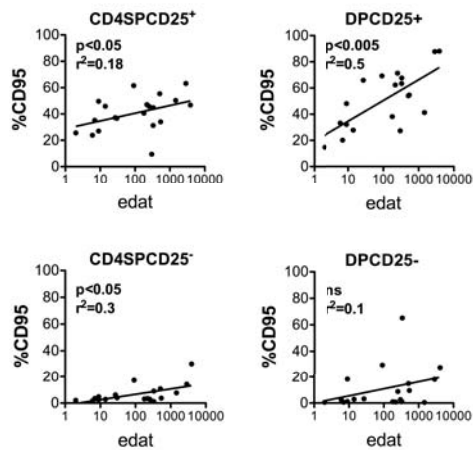


Figura 1.11. Anàlisi de l'expressió en percentatge dels marcadors de Treg a les poblacions d'estudi de les mostres humanes de timus segons edat. A. S'analitzen FOXP3, CTLA-4, CD127, GITR, CD122 i CD95. La seva expressió és baixa als timòcits de forma general, però s'incrementa quan analitzem les poblacions CD25⁺. El comportament de CD127 és invers al de la resta, perquè el tret característic a les Treg és la baixa expressió de CD127. S'observen diferències estadísticament significatives per FOXP3 i CD95 segons edat. Test ANOVA 2-way (les variables analitzades són l'edat i el grup cel·lular) seguit de test de Bonferroni. B. Es va analitzar si existia correlació estadística entre el percentatge de cèl·lules CD95⁺ i l'edat segons test d'Spearman, i es va obtenir significació estadística per CD4SPCD25⁺ (p<0,05), DPCD25⁺ (p<0,005) i CD4SPCD25⁻ (p<0,05). No es va trobar significació per DPCD25⁻ (ns).

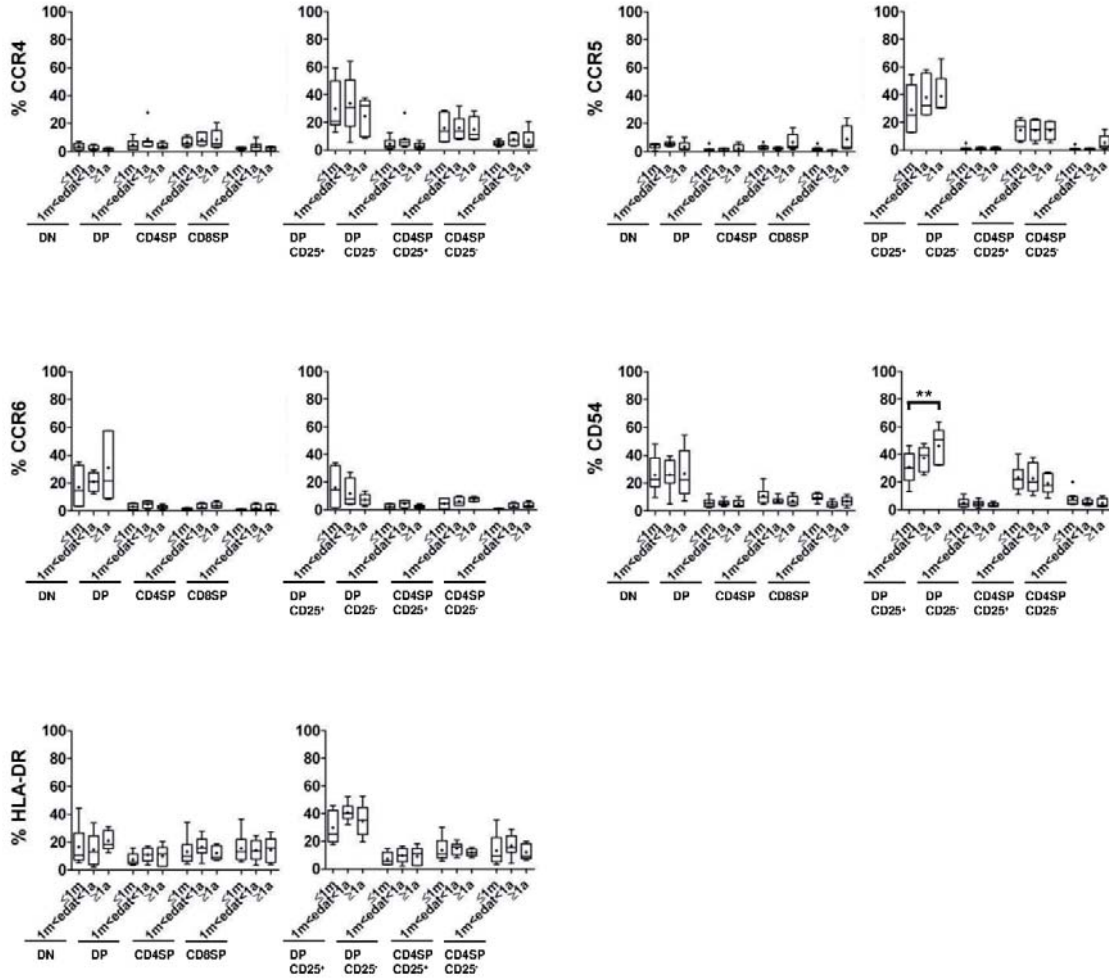
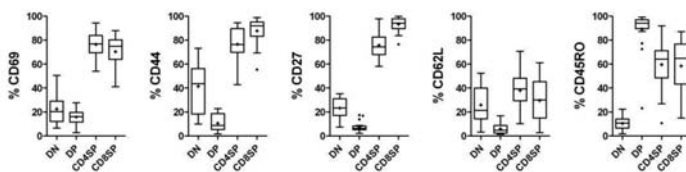


Figura 1.12. Anàlisi de l'expressió en percentatge de receptors de quimiocines i marcadors d'activació a les poblacions d'estudi de les mostres humanes de timus segons edat. L'expressió de CCR4, CCR5, CCR6, CD54 i HLA-DR és baixa als timòcits de forma general, però s'incrementa quan analitzem les poblacions CD25+. De fet, l'expressió dels marcadors és majoritària als timòcits DP CD25+. S'observa un increment de l'expressió de CD54 a les cèl·lules DP CD25+ amb l'edat ($p < 0,01$). Test ANOVA 2-way (les variables analitzades són l'edat i el grup cel·lular) seguit de test de Bonferroni.

ANNEX 1:

I. Marcadors d'alta expressió



II. Marcadors de baixa expressió

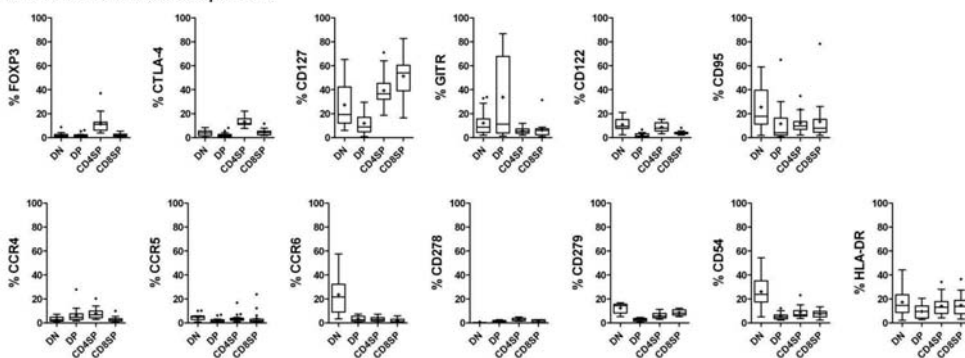


Figura Suplementària 1.1. Expressió dels marcadors d'estudi a les poblacions de timòcits DN, DP, CD4SP i CD8SP de les mostres de timus humanes. Els marcadors es troben distribuïts en dos grups segons el seu nivell d'expressió a les poblacions de timòcits. En el grup de marcadors d'elevada expressió trobem CD69, CD44, CD25, CD62L, CD127 i CD45RO. En el grup de marcadors de baixa expressió trobem FOXP3, CTLA-4, GITR, CD122, CD95, CCR4, CCR5, CCR6, CD278, CD279, CD54 i HLA-DR.

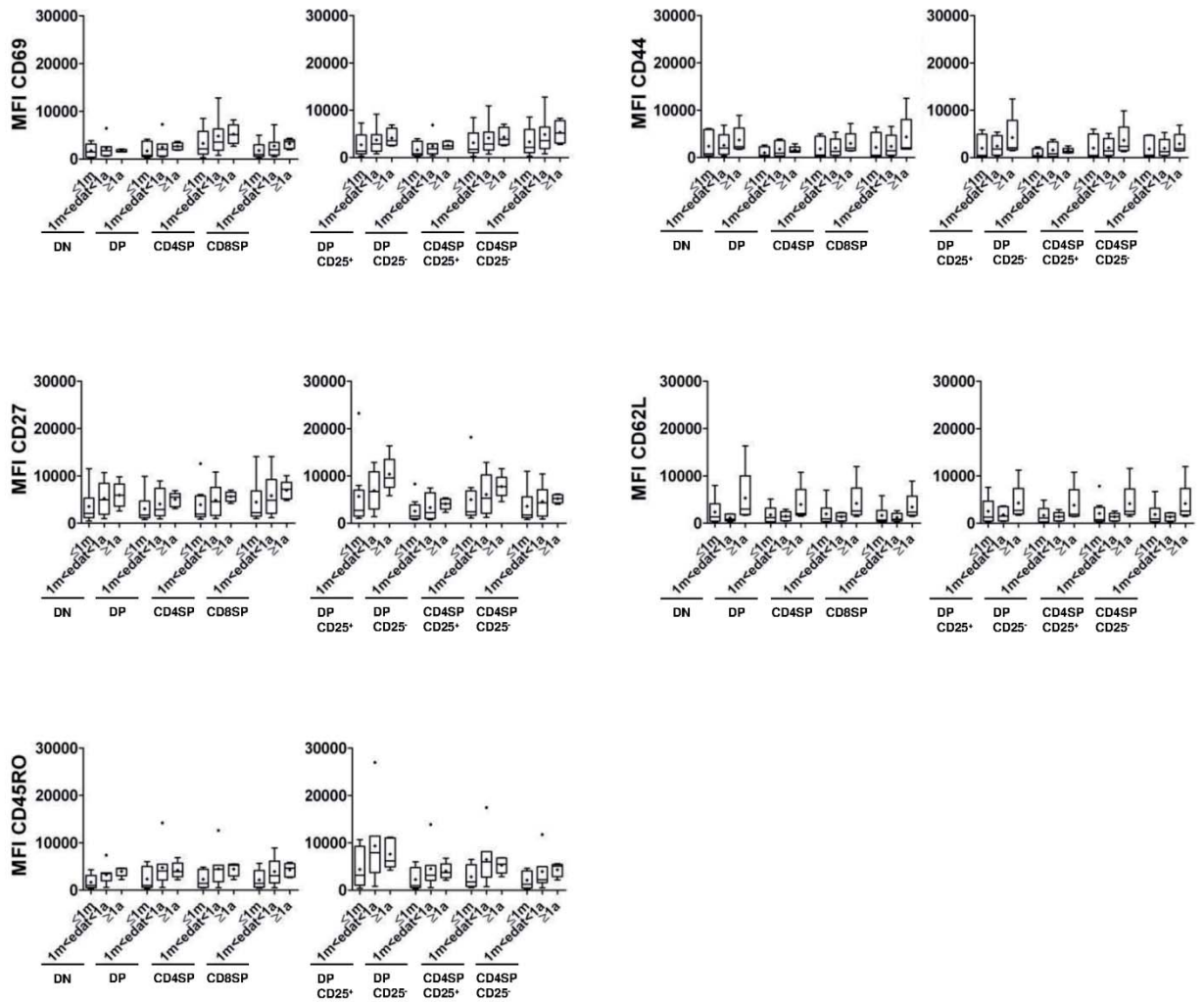


Figura Suplementària 1.2. Anàlisi de l'expressió en MFI dels marcadors de maduració a les poblacions d'estudi de les mostres humanes de timus segons edat. S'analitzen CD69, CD44, CD27, CD62L i CD45RO, que estan vinculats a maduració. No s'observen diferències estadísticament significatives entre grups d'edat, a excepció de CD95, que determinat mitjançant test ANOVA 2-way (les variables analitzades són l'edat i el grup cel·lular) seguit de test de Bonferroni.

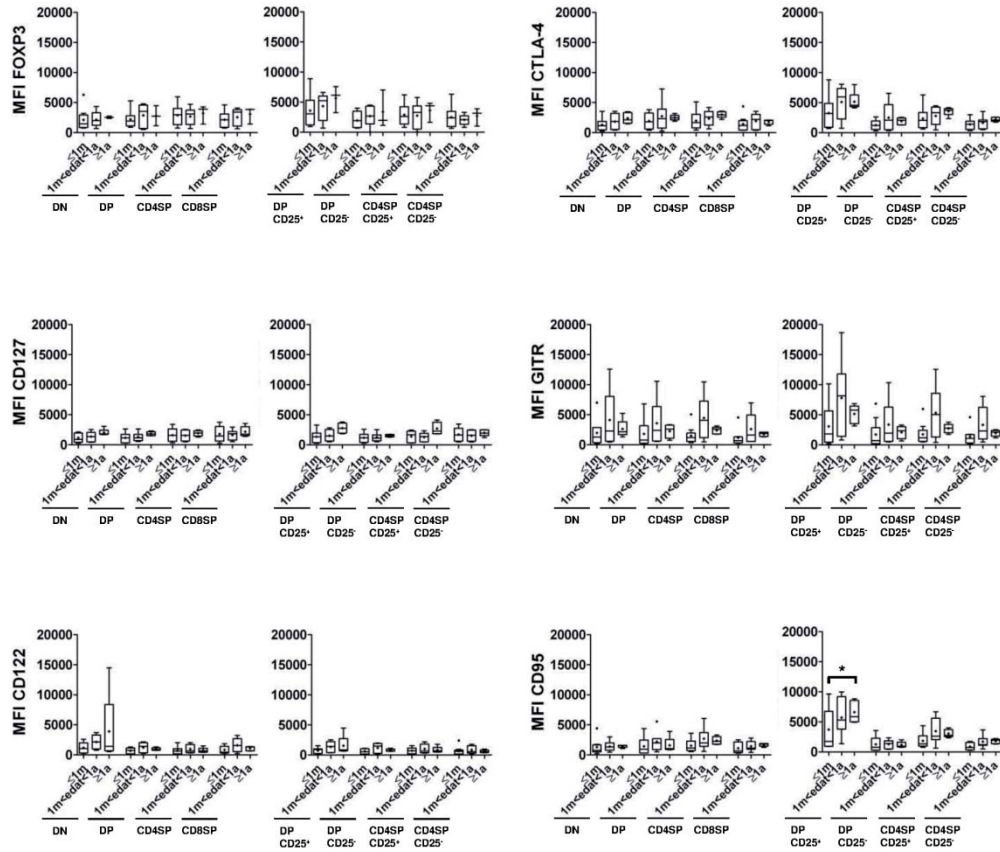
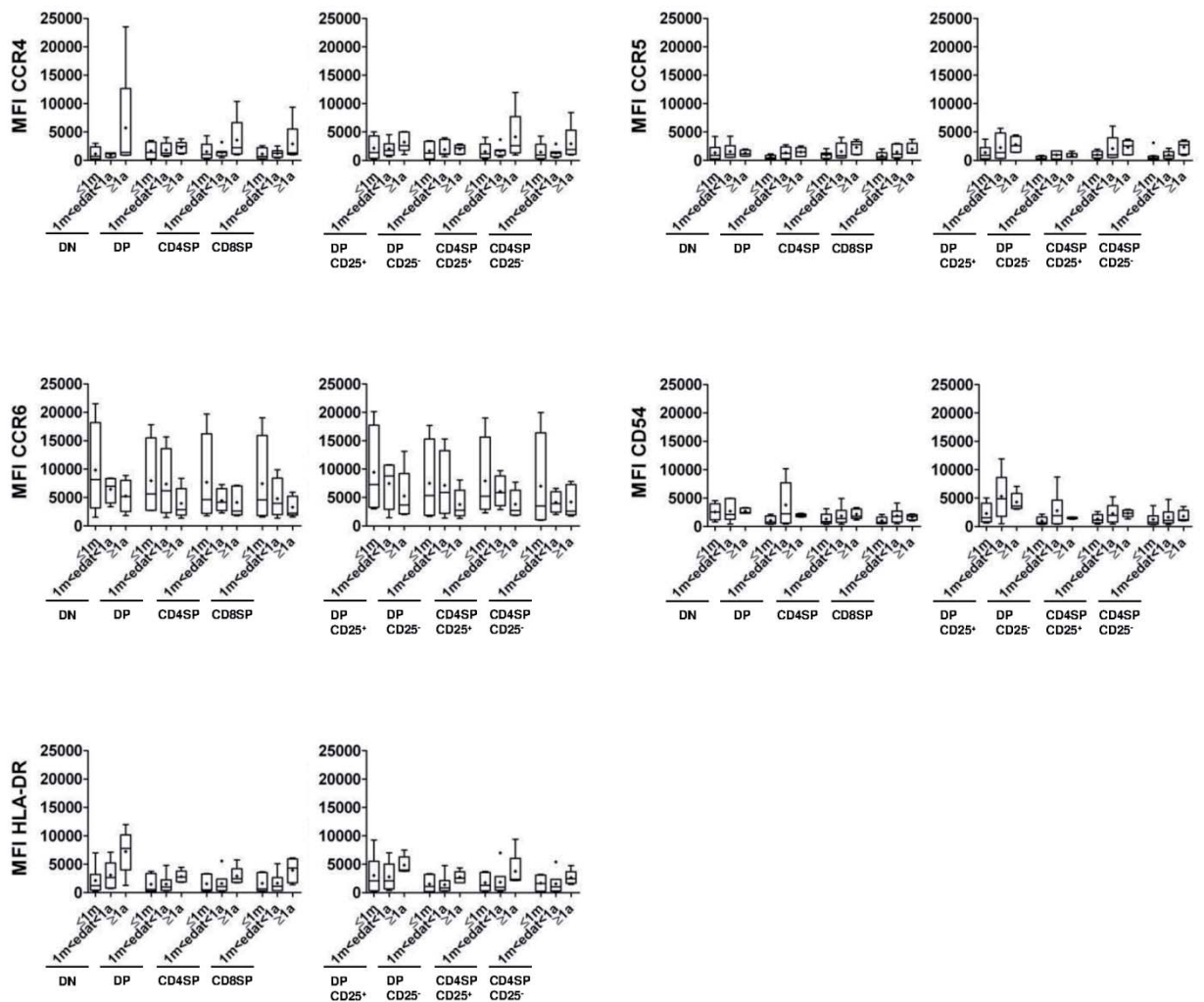


Figura Suplementària 1.3. Anàlisi de l'expressió en MFI dels marcadors de Tregs a les poblacions d'estudi de les mostres humanes de timus segons edat. S'analitzen FOXP3, CTLA-4, CD127, GITR, CD122 i CD95, i s'observen diferències estadísticament significatives per CD95, que es troba incrementat al grup de majors d'un any respecte el grup de menors d'un mes. Test ANOVA 2-way (les variables analitzades són l'edat i el grup cel·lular) seguit de test de Bonferroni.

A.



B.

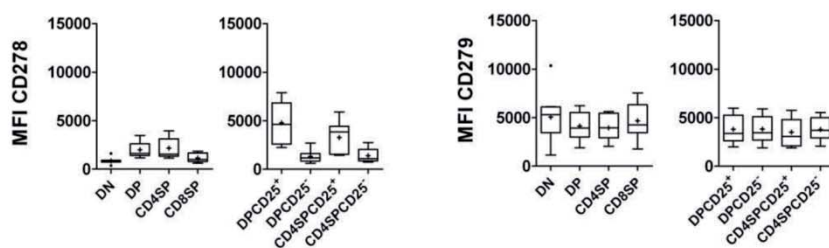


Figura Suplementària 1.4. Anàlisi de l'expressió en MFI de receptors de quimiocines i marcadors d'activació a les poblacions d'estudi de les mostres humanes de timus segons edat. A. S'analitzen CCR4, CCR5, CCR6, CD54 i HLA-DR segons els grups d'edat, i no es determinen diferències estadístiques segons Test ANOVA 2-way (les variables analitzades són l'edat i el grup cel·lular) seguit de test de Bonferroni. B. Es grafiquen les dades de MFI dels marcadors d'activació CD278 i CD279, dels que no hi havia suficients dades per separar-los en grups d'edat.

Discussió - Capítol 1

El timus és un òrgan clau per l'establiment de la tolerància central. Per una banda s'encarrega d'educar les cèl.lules T per evitar fenòmens d'autorreactivitat, i per altra, genera les cèl.lules Treg, que s'encarreguen de mantenir la tolerància perifèrica. En aquest treball hem tingut accés a un gran número de timus humans de donants pediàtrics (n=35), i l'objectiu que ens vam proposar va ser caracteritzar la població de cèl.lules Treg naturals en humans i com evolucionen amb l'edat.

La composició cel.lular dels timus sans pediàtrics és un tema poc estudiat tot i que és crucial el seu coneixement per l'estudi del desenvolupament dels limfòcits T. Un dels principals obstacles per assolir aquest objectiu és l'accés a l'òrgan, tanmateix, existeixen alguns treballs a la literatura que han analitzat de forma exhaustiva grans col·leccions de timus humans. Varas *et al* estudien un total de 20 timus distribuïts en un grup de menys d'1 mes i un altre que parteix del mes fins als deu anys ([175]. Observen una depleció de timòcits DP durant el primer mes de vida, que s'estabilitza en el temps amb valors al voltant del 70%. Determinen que la població DP pateix un alt índex d'apoptosi, fet que justifica la baixa proporció d'aquests timòcits en el primer mes de vida neonatal. Els autors donen evidències que una involució profunda afecta el timus humà neonatal, i apunten que aquest és un altre event a incorporar a la llista creixent d'alteracions immunològiques que tenen lloc al període perinatal.

Un altre estudi a tenir en compte és el de Weerkamp i col.lab[177]), en què analitzen un total de 58 timus sans amb rangs d'edats compresos entre els 8 dies i els 8 anys. Agrupen els timus en sis grups d'edat, en el primer tenen cabuda els òrgans procedents de nens de menys d'1 mes, i a l'últim, a partir de l'any i mig i fins als 8 anys. El percentatge més baix de timòcits DP es troba en el grup de nens de menys d'1 mes, amb un valor promig de 57,4% que augmenta fins el 76,3% en el grup de més edat. Els percentatges de les poblacions de timòcits més madures, CD4SP i CD8SP, també oscil·len en percentatge entre els grups d'edats extrems, amb valors que van del 20% i 8%, respectivament, en els nens de menys d'un mes fins a 6% i 4% en el grup de nens de més edat. En aquest estudi els autors analitzen els nivells de cortisol dels donants, i no troben associació amb l'edat, per la qual cosa conclouen que la depleció de timòcits DP en el primer mes de vida és un procés fisiològic.

Els nostres resultats concorden amb aquestes dades. En el nostre estudi disposàvem de 35 timus de donants pediàtrics amb edats entre 2 dies i 10 anys, que vam agrupar en menors d'un mes, entre 1 mes i 1 any, i més grans d'un any. Trobem els valors més baixos de timòcits DP en el grup de menors d'un mes, amb un percentatge del 49,8%. Com en els estudis descrits prèviament, aquests valors s'incrementen fins a establir-se en un 77,7%. En conjunt, les dades del nostre treball confrontades amb estudis previs descrits a la bibliografia demostren que la distribució de les poblacions de timòcits varien amb l'edat, amb alteracions principalment durant el primer mes de vida neonatal, que evolucionen cap a l'estabilitat durant el primer any de vida. A més, aquests resultats posen de manifest que el desenvolupament del timus, des de la infantesa com a òrgan productor de cèl.lules T fins a la seva involució, no és només un procés continu, sinó que està sotmès a la demanda del sistema immunològic perifèric, que està en un procés de maduració i expansió.

Amb l'edat, el timus pateix una degeneració progressiva que s'inicia a la pubertat i dona lloc a una quasi pèrdua de la seva capacitat de generar i exportar noves cèl.lules T [178]. Uns anys després de la pubertat, l'espai tímic epitelial i la unitat funcional de timopoiesi, i per tant, la producció de cèl.lules T, declina en un 3% aproximadament per any fins a l'edat de 45 anys aproximadament, moment en què només roman un reduït teixit tímic funcional. El número total de cèl.lules T a la perifèria es manté inalterat no obstant, ja que els mecanismes perifèrics de renovació de cèl.lules T compensen la davallada progressiva del timus [179], [180]. De forma paral·lela a aquesta reducció de la sortida de cèl.lules T, la producció de Treg tímiques també s'ha demostrat que decau amb l'edat en ratolins [181], [182]. En concordància amb això i fins on tenim coneixement, les nostres dades són les primeres en descriure una disminució de la producció tímica de Tregs humanes amb l'edat.

Des que es va determinar que CD25 era un marcador de Treg [29], aquesta molècula ha estat usada per la selecció i caracterització d'aquesta població. Vam escollir estudiar la seva expressió a timus humà per definir la seva distribució entre les poblacions de timòcits, ja que separant les cèl.lules CD25⁺ dels timòcits CD4SP aquestes mostraven capacitat de supressió, i demostrem que existeix una correlació positiva i significativa a nivell transcripcional entre FOXP3 i CD25. La distribució de CD25 en les poblacions de timòcits caracteritzades segons nivells dels coreceptors CD4 i CD8 es va observar de forma majoritària en timòcits CD4SP i DP, amb un valor de 66,4% i 18,2%, respectivament. Només en dos treballs publicats a la literatura han demostrat que les cèl.lules DP-CD25⁺ tenen capacitat supressora [176], [183] i

expressen FOXP3, a més d'altres marcadors associats a Tregs, com són CTLA-4, GITR, CD127, entre altres [184], [185]. Les nostres dades de caracterització fenotípica indiquen que les cèl.lules DPCD25⁺ són molt similars als timòcits CD4SPCD25⁺, amb expressions elevades de FOXP3, CTLA.4, CD122 i CD95. Són, però, més dependents de CD127 que CD4SPCD25⁺, ja que són timòcits en [176]. GITR és l'únic marcador de Treg que es comporta diferent a la resta, ja que la seva expressió s'observa a les DPCD25⁺ i DPCD25⁺ i baixa a les CD4SPCD25⁺. Respecte els marcadors de maduració, presenten nivells de CD44, CD69, CD27, CD62L i CD45RO equiparables als de CD4SPCD25⁺, fet que demostra el seu caràcter de timòcits madurs. Finalment, alguns marcadors es van distribuir preferentment a les DPCD25⁺, entre ells, els receptors de quimiocines, CCR4, CCR5, CCR6, i marcadors co[186] i HL[187]. La funció d'aquests marcadors podria estar relacionada amb el pas al procés de selecció tímica.

Com hem vist, les poblacions tímiques evolucionen amb l'edat, i les nostres dades, a més d'indicar variacions quantitatives aporten variacions qualitatives que sorgeixen de la comparativa dels marcadors analitzats entre grups d'edat. Ambdós marcadors, CD95 i FOXP3 incrementen la seva freqüència amb l'edat. En el cas de FOXP3 aquest increment s'aprecia ja en la fracció de timòcits CD4SP, que és on es concentra l'expressió d'aquest marcador quan mirem les poblacions clàssiques de timòcits. Tanmateix, els percentatges de FOXP3 són elevats i de nivells similars per DPCD25⁺ i CD4SPCD25⁺. Per als timòcits DPCD25⁺ el percentatge de FOXP3⁺ es troba en un 60% de promig en el grup de menors d'1 mes, i incrementa fins a un 80% en els majors d'un any. En canvi, la significació estadística és major per als timòcits CD4SPCD25⁺, perquè les diferències són més grans partint d'un 50% en els menors d'un mes fins al 80% en els grans.

El 2003 es va descobrir el paper de Foxp3 com a "master control gene" per al funcionament i desenvolupament de les Treg en ratolí [63], [188], [189]. Seguidament, es va detectar la presència de FOXP3 en cèl.lules T humanes CD4CD25^{hi} [174], [190], [191], però contràriament al model murí, les cèl.lules humanes FOXP3⁺ no són funcionalment homogènies a perifèria, i l'expressió de FOXP3 s'incrementa en cèl.lules T CD4CD25^{lo} després de la [192]. Al treball publicat per Miyara i col.laboradors en cèl.lules PBMCs, determinen que hi ha una correlació positiva entre CD25 i FOXP3, de manera que les cèl.lules TCD4⁺CD25^{high} són les que expressen els majors nivells de FOXP3, i més de supressió *in vitro* de cèl.lu[174]. Les nostres dades indiquen que la freqüència de cèl.lules FOXP3⁺ a les nTregs incrementa amb l'edat, suggerint un

increment en la seva capacitat reguladora amb el temps. No obstant, com ja hem comentat, l'expressió de FOXP3 en humans es troba vinculada també a l'estat d'activació. Les nostres dades, a més d'una major freqüència de FOXP3, mostren un increment amb l'edat del nivel d'expressió de CD25, factors que podrien suggerir un estat d'activació més alt de les cèl.lules CD4SPCD25⁺.

L'altre marcador que ha mostrat diferències amb l'edat és el CD95, també conegut com a Fas o APO1. El 1989 dos grups de forma independent van identificar la funció citolítica d'anticossos dirigits contra FAS [193], [194]. Més endavant, es van descriure soques de ratolins mutants anomenades Fas^{lpr/lpr} o Fas^{lprcg/lprcg}, que presentaven un defecte en els gens que codi[195] o FASL (FASL^{gld/gld}). Aquests ratolins desenvolupaven limfadenopatia i una anomalia autoimmunitària semblant al Lupus Sistèmic Er[196]. En humans, es va identificar una mutació al gen FAS [197], [198], que donava lloc a una síndrome anomenada ALPS (*autoimmune lympho-proliferative syndrome*), que es caracteritzava per una limfadenopatia i esplenomegàlia cròniques, i fenòmens d'autoimmunitat. L'activació de FAS pel seu lligand fisiològic FASL es va demostrar que induï[199]), de fet FAS-FASL és una de les vies efectores usades per les cèl.lules T citotòxiques per eliminar cèl.lules diana. En humans, CD95 s'ha proposat com un mecanisme de depleció de cèl.lules T autoreactiv[200]). Tot i que en ratolins el paper de CD95 en la selecció negativa està en discussió [201], en humans, sembla ser més evident, ja que en pacients amb ALPS es detecten timòcits DN[202]. A banda del seu paper principal proapoptòtic, CD95 és un receptor de funció dual que estaria molt relacionat amb el microambient cel.lular. De fet, s'ha relacionat CD95 amb la proliferació, diferenciació, migració i producció de citocines tant de cèl.lules hematopoièti[201]. En referència a la cèl.lula T en humans, s'ha comprovat que CD95 està relacionat amb la proliferació de les cèl.lules T en activacions subòptimes a t[203] [204].

El nostre estudi és el primer que descriu de forma exhaustiva la relació de CD95 amb l'edat en timus humà. La publicació de Balandina en Miastè[205] mostra que les Tregs tímiques d'adults tenen una major freqüència de cèl.lules CD95⁺ que les de neonats, per al grup de timus controls, però no observen variacions en les CD4CD25^{hi}. [205]. En el nostre estudi hem inclòs un major nombre de mostres de timus humans que ens ha permès classificar-los en tres grups d'edats. Les nostres dades no només confirmen que la freqüència de cèl.lules CD95⁺ incrementa amb l'edat en els timòcits CD4SPCD25⁺, sinó que demostrem que aquest efecte es dona sobretot en els timòcits DPCD25⁺. Aquestes dades suggereixen que amb l'edat, els timòcits CD25⁺ serien més

susceptibles a l'apoptosi mediada per CD95, fet que explicaria la disminució del nombre de nTregs amb l'edat, en concordància amb les dades de la recent publicació de Thiault i [182]. Aquests autors proposen que el desenvolupament de noves cèl.lules Treg al timus està sota control de la progènie madura de reguladores, que retornen a l'òrgan i inhibeixen el desenvolupament de nous precursors de Tregs.

L'exportació de cèl.lules T disminueix amb l'edat a causa de la involució del timus, i les nostres dades suggeririen que l'exportació de les nTregs estaria substancialment disminuïda respecte la de les cèl.lules T convencionals CD4SPCD25⁻, que també incrementen el percentatge de cèl.lules CD95⁺ amb l'edat però en menor proporció. En resum, podriem dir que els nostres resultats apunten a què la vida del timus com a generador de cèl.lules Treg es veuria reduïda abans que la seva vida com a exportador de cèl.lules T *naïve* convencionals.

Resultats - Capítol 2

Búsqueda de marcadors de les cèl.lules T reguladores a perifèria i a timus

Un dels problemes amb els que ens hem enfrontat en el desenvolupament dels anteriors capítols és l'absència de marcadors exclusius que s'expressin a les cèl.lules T reguladores, i que permetin caracteritzar-les com una població o fracció lliure de contaminació. Aquest obstacle ha portat a la publicació de forma recurrent a la literatura treballs amb l'objectiu de descriure molècules noves que puguin esdevenir possibles marcadors de la població de Treg. Fins al moment, cap de les molècules obtingudes ha estat determinant per definir una població pura. La cerca de molècules de superfície característiques de Tregs representa un pas fonamental per al seu aïllament i és requisit inexcusable per a una eventual aplicació d'aquestes cèl.lules en el camp clínic del tractament de malalties humanes.

Context de l'estudi

Per aprofundir en la caracterització de les cèl.lules Treg a nivell molecular, el nostre grup va iniciar un estudi proteòmic comparatiu de les Tregs, com a part del projecte europeu Eurothymaide amb referència LSHB-CT-2003-503410. Mitjançant la tècnica proteòmica quantitativa ICPL (*Isotope Coded Protein Labelling*), es va comparar el proteoma de les poblacions Treg i Teff per determinar diferències quantitatives, i es va fer a partir de mostres humanes de PBMCs d'individus adults (n=2) i de timus pediàtrics (n=3).

Breument, les mostres de Treg (CD4⁺CD25⁺⁺) i Teff (CD4⁺CD25⁻) separades per FACS es van procesar segons el protocol descrit a l'apartat de material i mètodes, per realitzar la comparació proteòmica usant la tècnica ICPL, que permet distingir i quantificar les diferències entre les dues mostres gràcies al marcatge amb diferents isòtops del carboni. Un exemple representatiu de les cèl.lules purificades a partir de les quals es van realitzar els experiments de proteòmica es mostren a la figura 2.1. A la mateixa figura podem observar per cada mostra el nombre total de proteïnes identificades, que van ser més nombroses a les mostres de perifèria que a timus.

Tanmateix, el percentatge de les proteïnes quantificades va oscil·lar de forma general al voltant del 60% en les cinc mostres analitzades. Malauradament, no vam trobar proteïnes que es repetissin com augmentades o disminuïdes entre les mostres de timus ni entre les de perifèria. La necessitat d'un nombre elevat de cèl·lules purificades de partida (>1,5 milions) feia limitant analitzar un elevat número de mostres de cada teixit. Potser l'abordatge considerant aquesta limitació hagués hagut de ser diferent, i partir d'una barreja de mostres per a cada teixit.

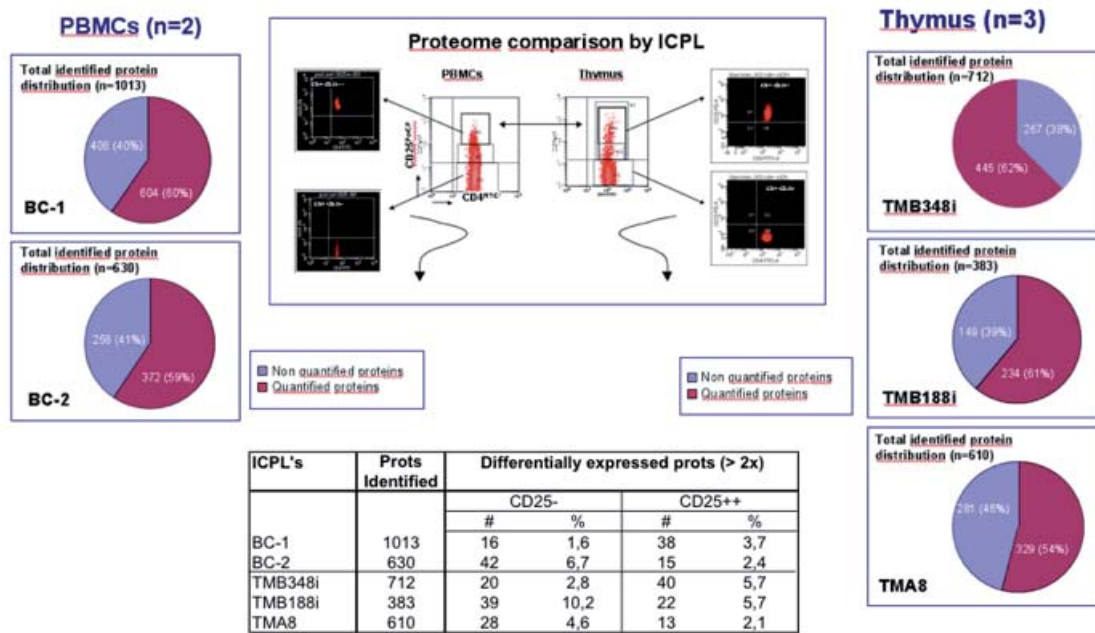


Figura 2.1. Resultats globals dels assajos de proteòmica realitzats en mostres de timus i PBMCs humans. Es van comparar els proteomes de cèl·lules Treg i Teff de mostres de PBMCs d'individus adults (n=2) i de timus pediàtric (n=3) mitjançant la tècnica ICPL. Als diagrames s'indiquen els percentatges de les proteïnes quantificades (formatge morat) i les no quantificades (formatge lila). A la taula es mostren en números absoluts les proteïnes identificades, i les quantificades, que es van trobar diferencialment expressades entre fraccions.

El nombre de proteïnes obtingudes amb una diferència quantitativa entre Treg i Teff superior a 2 va ser relativament petit, representant un 5% del total de les proteïnes quantificades en les mostres estudiades. Aquestes poques diferències entre fraccions Treg i Teff suggeririen que en estat de repòs, els proteomes d'aquestes poblacions estudiades són molt similars. El baix número també podria estar relacionat amb el fet que vam estudiar cèl·lules T en estat de repòs en les dues mostres analitzades, és a dir, després de ser obtingudes de la separació per FACS van ser directament processades, sense pas intermig d'activació. L'absència d'activació de les mostres de timus i perifèria que procedien de donants sans, li dona valor als resultats per representar una situació no alterada de les cèl·lules en un context d'homeostasi.

D'acord amb aquestes argumentacions, es van considerar els cinc experiments d'ICPL com a sumatori de resultats enlloc de com a promig. Les proteïnes incrementades o disminuïdes de forma diferencial entre Treg i Teff procedents dels 5 assajos proteòmics es troben recollides a l'annex 1.

Tot i que els assajos de proteòmica no van revelar cap tendència en el patró de proteïnes diferencialment expressades segons funció, algunes d'elles ens van interessar per la seva citació a la bibliografia relacionada amb les cèl.lules T i el sistema immunitari, com s'indica a la taula 2.1. Els gens d'aquestes proteïnes es van seleccionar per analitzar-los per una tècnica alternativa de PCR quantitativa, tal i com s'explica més endavant a l'apartat 2.1.1.

2.1. Validació mitjançant estudis d'expressió gènica de les proteïnes diferencialment expressades en les poblacions de cèl.lules T estudiades

Per poder confirmar els resultats es va escollir la metodologia Taqman® de PCR a temps real. La base teòrica del funcionament de les sondes Taqman® i la seva quantificació es troben descrits en detall a l'apartat de materials i mètodes (apartat 6.5 de Materials i Mètodes).

Les plaques Taqman® consisteixen en targetes de microfluídica de 384 pous cada una que permeten dur a terme de forma simultània 384 reaccions de PCR. Les sondes i els encebadors necessaris per a les reaccions de PCR estan pre-carregats a cada un dels pous. La resta de reactius necessaris per a què es dugui a terme la reacció de PCR es troben en una *master mix* ja preparada per el fabricant.

El sistema, en aquest cas, és totalment fet a mida del consumidor, que s'encarrega de decidir quins gens mostra vol testar. A la figura 2.2. hi ha una representació gràfica del disseny de la placa que va ser escollida per a la nostra experimentació.

Replicates		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A		
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	C	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	D	
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	E	
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	F	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	G	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	H	
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	J	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	K	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	L	
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	M	
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	N	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	O	
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P	

Figura 2.2. Format de la placa Taqman® usada per a l'experimental en el nostre estudi. Es tracta d'una targeta de microfluídica on es poden testar de forma simultània per PCR quantitativa 96 gens per duplicat, dels quals un és control endògen obligatori 18S i serveix per la normalització de les dades. A cada targeta es carreguen dues mostres.

Es tracta del format de 96 pous, que permet estudiar de forma simultània 96 gens, dels quals 95 són a elecció del consumidor, i un és el control endogen necessari per a la normalització de les dades, que ve donat pel fabricant i que, en el nostre cas, va ser el 18SRNA. Els gens es testen per duplicat per a cada mostra que s'estudia, i en aquest format concret, es poden carregar dues mostres per placa.

Els ports són els punts de càrrega de la placa, per on es fa arribar la mostra als pous. Cada port alimenta un total de 48 pous, i que en nombre de gens en suposa 24, ja que es testen per duplicat. Per tant, cal carregar els 4 ports per poder testar els 96 gens per duplicat d'una mateixa mostra.

2.1.1. Selecció dels gens a estudiar per qPCR

Part dels gens analitzats es van seleccionar en base a les diferències quantitatives en la seva expressió entre la població de Tregs i Teff. Es van escollir aquelles molècules l'expressió de les quals era almenys el doble en increment o disminució a les cèl.lules Treg respecte les Teff. I es va fer un segon cribatge basant-se en: (i) una cerca bibliogràfica per conèixer estudis que relacionessin l'expressió d'aquestes molècules amb funcions a les cèl.lules T, i (ii) una eina informàtica anomenada STRING, que permetia determinar altres molècules d'interès gràcies a l'aplicació de bases de dades que el.laboren xarxes d'associació proteïca funcional (es van escollir aquelles molècules amb una puntuació de confiança del resultat igual o superior a 0,9 en una escala de 0-1). A banda d'aquests gens basats en els dades de proteòmica, es van incloure altres a la targeta de microfluídica fins a completar un total de 96 gens, que s'expliquen a continuació de forma detallada en grups:

- Gens de molècules identificades amb els experiments de proteòmica i altres relacionats obtinguts usant l'eina STRING, agrupats segons funció en enzims,

xaperones, senyalització, funció a nucli, citoesquelet i apoptosi.

- Gens característics de Tregs: marcadors de cèl.lules Treg com a controls del contigut en cèl.lules nTregs a la fracció aïllada per FACS de cèl.lules TCD4⁺CD25⁺⁺.
- Gens objecte d'estudi al projecte amb acrònim Eurothymaide dins del *VI Framework Programme CE* (ref. FP6-503410): molècules de cèl.lules Treg naturals i Treg adaptatives que eren objecte d'estudi d'altres grups del nostre equip de treball en aquest projecte europeu.
- Gens que codifiquen per a receptors de quimiocines relacionats amb la localització i moviment de les cèl.lules T així com marcadors de cèl.lules T.
- Gen que servirà com a control endogen: RNA18S.

El llistat dels 96 gens es troba indicat a la Taula 2.1, on es mostren agrupats segons les categories funcionals que s'acaben d'esmentar, i on també s'hi detalla altra informació rellevant com són la referència de la sonda Taqman, la procedència del gen (si es tracta d'una proteïna trobada a l'assaig de proteòmica o relacionada segons STRING) i referència bibliogràfica de la seva relació amb cèl.lules T.

Categoria funcional	Nom gen	Nom proteïna	Funció	Referència sonda	Procedeix de proteòmica?	Interaccions descrites	Referències
enzims	ADA	Adenosine deaminase	metabolisme de les purines	Hs00163553_m1	si		J Leukoc Biol. 2011 Jan;89(1):127-36.
	DPP4	CD26	Exopeptidasa amb paper en l'activació de cèl·lules T	Hs00175210_m1	si	ADA	Cytometry A. 2012 Oct;81(10):843-55.
	ERO1L	ERO1-like protein alpha precursor	oxidoreductasa involucrada en formació d'enllaços disulfur	Hs00205880_m1	si		J Immunol. 2015 May 15;194(10):4988-96.
	GZMB	Granzyme B precursor		Hs00188051_m1	STRING	SERPIN9	J Immunol. 2009; 182, 89-90
	P4HB	Protein disulfide-isomerase precursor	membre de la família de les disulfido-isomerases	Hs00168586_m1	si	ERO1L	Cell Immunol. 2009;255(1-2):82-92.
	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	modifica proteïnes nuclears	Hs00242302_m1	si		Immunology. 2013 Aug;139(4):428-37.
	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4 precursor	formació d'enllaços disulfur	Hs00191754_m1	si	HSP90B1	Biochim Biophys Acta. 2010 Apr;1804(4):918-28
	PTPN7	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 7	paper en la regulació del desenvolupament de limfòcits T i B	Hs00160732_m1	si		Blood 2010 115: 3580-3588
	SERPIN9	Serpín B9	remodelació de la matriu; apoptosi	Hs00394497_m1	si		Am J Kidney Dis. 2012 Oct;60(4):629-40.
	UBA2	ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	Ubiquitin ligasa	Hs00271420_m1	no		J Immunol Methods. 2012 Oct 31;384(1-2):128-34
xaperones	BAG1	BAG-family molecular chaperone regulator-1	S'unix a Bcl-2	Hs00185390_m1	STRING		Nature Cell Biology Vol 3 March 2001
	HSP90B1	HSP90B1 heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	Precursor de l'endoplasmata	Hs00427665_g1	si		Blood. 2008 Aug 15;112(4):1223-30.
	HSPA1A;HSPA11	Heat shock 70 kDa protein 1	Xaperona	Hs00217229_s1	si		PLoS One. 2012;7(12):e51747.
senyalització	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK (Fragment)	involucrada en senyalització a través de Ca	Hs00225285_m1	si		Immunity. 2006 Jan;28(1):64-74.
	ANXA1	Annexin A1		Hs00167549_m1	si		J Immunol. 2013 Feb 1;190(3):997-1007
	ANXA2	Annexin A2 isoform 1	regulació del creixement cel·lular	Hs00733393_m1	si		Biochem J. 1995 August 15; 310(Pt 1): 243-248.
	ANXA5	Annexin A5		Hs00154054_m1	si		J Bone Miner Res. 2012 Nov;27(11):2399-412
	CACNA1D	Calcium channel a1.3v subunit	relacionada amb AHNAK	Hs00167753_m1	STRING	AHNAK	
	CACNA1F	Calcium channel a1.4v subunit	relacionada amb AHNAK	Hs00193172_m1	STRING	AHNAK	
	CD38	Isoform 2 of ADP-ribosyl cyclase 1	modula les respostes mediades per interacció cèl·lula T - antigen	Hs00233552_m1	si		PLoS One. 2011 Mar 1;6(3):e17359.
	CD44	Isoform 12 of CD44 antigen precursor	interaccions cèl·lula-cèl·lula	Hs00174139_m1	si		Front Immunol. 2012; 3: 23
	DGKA	Diacylglycerol kinase alpha	complesix amb PKC per el segon missatger	Hs00176278_m1	si		Nat Immunol. 7, 1174 (2006)
	EFHD2	EF-hand domain-containing protein 2 (Swip51)	involucrada en senyalització de Ca	Hs00386606_m1	si		Proteomics. 2004 Aug;4(8):2216-20.
	ETHE1	ethylmalonic encephalopathy protein	antiapoptòtic	Hs00204752_m1	si		J Child Neurol. 2013 May;28(5):668-71
	GRB2	Isoform 1 of Growth factor receptor-bound protein 2	proliferació cel·lular	Hs00157817_m1	si		J Exp Med. 1999 May 3;189(9):1383-90.
	LCK	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase	senyalització a través del TCR	Hs00178427_m1	STRING	CD38	
	LGALS3	Galectin-3	creixement cel·lular, apoptosi	Hs00173587_m1	si		Genome Biol. 2006; 7(7): R54.
	NCAM-1, CD56	Neural cell adhesion molecule 1	adhesió cel·lular	Hs00169851_m1	si		Trends in Molecular Medicine 13:108-2007
	NFATC2	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2	participa en transcripció en cèl·lules T activades	Hs00234855_m1	si	DGKA	JEM vol. 201 no. 2 181-187 2005
	ORA1	calcium release-activated calcium modulator 1 (ORA1)	related with AHNAK	Hs00385627_m1	STRING	AHNAK	J Physiol 590.17 (2012) pp 4157-4167
	PRKRA	protein kinase R, interferon-inducible class A, cytosolic	funció pro-apoptòtica	Hs00289379_m1	si		PLoS One. 2011 Mar 25;6(3):e18225.
	STIM1	stromal interaction molecule 1	related with AHNAK	Hs00162394_m1	STRING	AHNAK	
	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia	senyalització de cèl·lula T	Hs00268434_m1	si		Cancer Cell. 2012 Aug 14;22(2):209-21
	TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein	transducció de senyal	Hs00364644_m1	STRING	PRKRA	
	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	media transducció de senyal	Hs00356749_g1	si	YWHAH	J Biol Chem. 2012 Nov 9;287(46):38665-79
	YWHAH	14-3-3 protein gamma	media transducció de senyal	Hs00705917_s1	si	YWHAE	PNAS. 2014 Jun 10;111(23):E2394-403
	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1)	media transducció de senyal	Hs00237047_m1	STRING	YWHAH	
nuclear	APEX1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	paper central en la resposta a l'estrès oxidatiu	Hs00172396_m1	si	HMGB2, GZMA	Mol Cell Biol. 2013 Apr; 33(7): 1468-73
	GZMA	Granzyme A precursor	lisi cel·lular	Hs00196206_m1	STRING	HMGB2, APEX1	Immunity. 2004 Oct;21(4):589-601.
	HMGB1	High mobility group protein B1	proteïna nuclear relacionada amb recombinació	Hs01923466_g1	si		Int Immunol. 2012 Aug;24(8):485-94.
	HMGB2	High mobility group protein B2	involucrada en recombinació V(D)J	Hs00357789_g1	si	RAG-1, GZMA, APEX-1	Eur J Immunol. 2004 Aug;34(8):2179-90.
	RAG-1	V(D)J recombination activating protein 1	V(D)J recombination	Hs01920694_s1	STRING	HMGB2	
	TLR-2	Toll-like receptor 2	reconeixement de patògens, immunitat innata	Hs00152932_m1	STRING	HMGB1, TLR-4, TNF	PLoS One. 2013 Jul 3;8(7):e69722.
	TLR-4	Toll-like receptor 4	reconeixement de patògens, immunitat innata	Hs00152939_m1	STRING	HMGB1, TLR-2, TNF	
	TSN	Transferrin	involucrada en reordenament de TCR	Hs00172824_m1	si		Nat Genet. 1995 Jun;10(2):167-74.

Taula 2.1. Llistat de proteïnes testades per qPCR a la placa Taqman®. Una gran part dels gens inclosos en aquesta taula procedeixen dels resultats de proteòmica que donen peu a aquesta capítol de resultats. La resta de gens procedeixen d'estudis realitzats amb programes informàtics que indicaven interaccions amb les proteïnes aïllades experimentalment, i finalment, altres gens d'interès (com s'indica a l'apartat 2.1.1.). Per a cada gen, a la taula s'indica la proteïna que codifica, la seva funció, la sonda Taqman® que es va usar per a la seva detecció per qPCR, la seva procedència en relació als nostres experiments de proteòmica, i referències bibliogràfiques que vinculen aquelles proteïnes amb el sistema immunitari. La taula continua a la pàgina següent.

Categoria funcional	Nom gen	Nom proteïna	Funció	Referència sonda	Procedeix de proteòmica?	Interaccions descrites	Referències	
citoesquelet	ACTN1	Alpha-actinin-1	proteïna d'unió a l'actina	Hs00241650_m1	si	TES	Mol Cell Proteomics. 2013 Feb; 12(2):277-82	
	ACTN4	Alpha-actinin-4	proteïna d'unió a l'actina	Hs00245168_m1	si		Cancer Res. 2001 May 15;61(10):4078-83.	
	ANK2	Alpha-1D adrenergic receptor	regula proliferació i creixement cel.lular	Hs00153998_m1	STRING	SPTBN1		
	APC2	adenomatosis polyposis coli 2 (APC2)	papir en el desenvolupament de les cèl.lules T immadures	Hs00183420_m1	si	MAPRE1	Nat Immunol. 2005 Aug;6(8):800-9.	
	ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	proteïna que controla la polimerització de l'actina	Hs01031740_m1	STRING	WASP		
	CAPG	Macrophage capping protein	proteïna reguladora de l'actina	Hs00156249_m1	si	WASP, VASP	Sci Signal. 2009 Aug 18;2(8):ra46.	
	CDC42	Cell division control protein 42 homolog	involucrada en cicle cel.lular, morfologia cel.lular, migració i endocitosi	Hs00854939_g1	STRING	WASP		
	DNM2	Isoform 1 of Dynamin-2	associada a microtúbuls	Hs00191900_m1	si		Nature. 2012 Jan 11;481(7380):157-63	
	EZR	Ezrin	intermediari entre la membrana plasmàtica i el citoesquelet d'actina	Hs00931646_m1	si	MSN, RDX, ICAM-1, CD44	J Immunol. 2009 Jan 15;182(2):1021-32.	
	FLNA	filamin A, alpha	migració i polarització cel.lulars	Hs00155065_m1	si		Nat Cell Biol. 2008 Nov;8(11):1270-6.	
	ICAM-1	ICAM-1	molècula d'adhesió intercel.lular	Hs99999152_m1	STRING	EZR		
	LMNA	Lamin A/C	ensamblatge nuclear, organització de la cromatina i de la membrana nuclear	Hs00153462_m1	si		Leuk Res. 1990;14(9):815-21.	
	MAP7	Isoform 1 of Enscosin	relacionada amb microtúbuls, essencial per polarització i diferenciació cel.lulars	Hs00187725_m1	si		Cell Mol Biol (Nosy-le-grand). 2004 Feb;52(1):29-33.	
	MAPRE1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	regulació de microtúbuls i estabilitat cromosòmica	Hs00608526_mH	si	APC2	Int J Cancer. 2005 Dec 20;117(6):896-904.	
	MSN	Moesin	uneixen membrana plasmàtica i el citoesquelet d'actina	Hs00792607_mH	STRING	EZR		
	RDX	Radixin	uneixen membrana plasmàtica i el citoesquelet d'actina	Hs00988414_g1	STRING	EZR, ARHGDI		
	SPTBN1	Isoform Short of Spectrin beta chain, brain 1 (SPTBN1)	uneixen membrana plasmàtica i el citoesquelet d'actina	Hs00162271_m1	si	TES	Immunity. 2002 Sep;17(3):303-15.	
	TES	Isoform 1 of Testin	regulador negatiu del creixement cel.lular	Hs00210319_m1	si	VASP, ACTN1, SPTBN1	Eur J Immunol. 2003 Nov;33(11):2964-73.	
	VASP	Vasodilator stimulated phosphoprotein	Involucrada en remodelació del citoesquelet i polarització cel.lular	Hs00163444_m1	STRING	MCP, WASP, TES		
	VCL	Isoform 2 of Vinculin	Involucrada en les unions cèl.lula-cèl.lula i cèl.lula-matriu extracel.lular	Hs00243320_m1	si		Mol Cell Biol. 2007 Sep;27(17):5986-6000	
	VIM	Vimentin	Ancora la posició dels òrgans al citosol	Hs00185584_m1	si		Mol Cells. 2014 May;37(5):426-34.	
	WAS	Wiskott-Aldrich syndrome protein	transducció de senyals de receptors de membrana al citoesquelet d'actina	Hs00166001_m1	si		J Biol Chem. 2014 Dec 12;289(50):34503-19.	
	apoptosi	BAD	Bcl2-antagonist of cell death (BAD) (Bcl-2 binding component 6)	Promou l'apoptosi	Hs00188930_m1	no		J Exp Med. 2006 Dec 25;203(13):2939-51.
		CHP	Calcium-binding protein p22	Participa en el tràfic de membrana constituïda	Hs00819122_m1	si		J Biol Chem. 1999 Dec 17;274(51):36125-31.
		FAIM3	Anti-Fas-induced apoptosis (FAIM3, Tesso)	Inhibició de l'apoptosi	Hs00193770_m1	si		Blood. 2013 Mar 21;121(12):2368-70.
		SET	Isoform 1 of Protein SET	Activació de la transcripció i reparació del DNA	Hs00853870_g1	si		Mol Cell Biol. 2002 Apr; 22(8):2810-2820.
	marcadors Tregs	CD4	CD4	coreceptor del TCR	Hs00181217_m1	no		J Immunol. 2011 Apr 1;186(7):3808-21.
CTLA-4		CTLA-4	transmet senyals inhibidores a cèl.lules T activades	Hs00175480_m1	no		Immunology. 2002 Jun;106(2):190-9.	
FOXP3		FOXP3	factor de transcripció involucrat en el desenvolupament de les Tregs	Hs00203958_m1	no		J Exp Med. 2005 Oct 3;202(7):801-6.	
GITR		GITR	membre de la família del TNF, involucrat en apoptosi	Hs00188346_m1	no		J Immunol Res. 2015;2015:171520.	
IL2RA		CD25	cadena alfa del receptor de la IL-2	Hs00166229_m1	no		J Immunol. 2011 Apr 1;186(7):3808-21.	
ILR7A		CD127	desenvolupament dels timòcits	Hs00233682_m1	no		J Exp Med. 2006 Jul 10;203(7):1693-700.	
EUROTHYMAIDE	NOTCH3	NOTCH3	Screpanti's group	Hs00166432_m1	no		J Immunol. 2011 Jun 1;186(11):6199-206.	
	PTCRA	pre-T alpha receptor	Screpanti's group	Hs00300125_m1	no		Int Immunol. 2009 Jun;21(6):727-43.	
	PHLPP1	PHLPP1	Powrie's group	Hs01597866_m1	no		J Immunol. 2011 May 15;186(10):5533-7.	
	GPR83	GPR83	Powrie's group	Hs00173906_m1	no		J Exp Med. 2015 Jun 29;212(7):1011-20.	
	TLR9	Toll-like receptor 9	Hewlyovitz's group	Hs00370913_s1	no		J Clin Invest. 2009 Feb;119(2):387-98.	
	RARA	Retinoic Acid Receptor	Powrie's group	Hs00940448_g1	no	CD38	J Exp Med. 2007 Aug 6;204(8):1757-54.	
	CBLB	CBLb1	Hewlyovitz's group	Hs00909784_m1	no		J Immunol. 2013 Jul 15;191(2):632-9.	
	R. Quimiocines	CCR1	CCR1		Hs00174298_m1	no		J Appl Oral Sci. 2015 Oct;23(5):536-46.
CCR2		CCR2		Hs00174150_m1	no		J Appl Oral Sci. 2015 Oct;23(5):536-46.	
CCR3		CCR3		Hs00266213_s1	no		Allergy. 2009 Aug;64(8):1121-9.	
CCR5		CCR5		Hs00152917_m1	no		Allergy. 2009 Aug;64(8):1121-9.	
CCR6		CCR6		Hs00171121_m1	no		Allergy. 2009 Aug;64(8):1121-9.	
CCR7		CCR7		Hs99999080_m1	no		Allergy. 2009 Aug;64(8):1121-9.	
CCR10		CCR10		Hs00706455_s1	no		J Appl Oral Sci. 2015 Oct;23(5):536-46.	
CXCR3		CXCR3		Hs00171041_m1	no		J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):2942-51.	
CXCR4		CXCR4		Hs00237052_m1	no		J Immunol. 2011 Jan 1;186(1):132-42.	
CXCR6		CXCR6		Hs01890898_s1	no		J Immunol. 2011 Jan 1;186(1):132-42.	
CXCR7		CXCR7		Hs00664172_s1	no		Transp Immunol. 2014 Mar;30(2-3):107-13.	
control endogen		18S	18S RNA control	ús obligatori	Hs99999901_s1	no		

Taula 2.1. Llistat de proteïnes testades per qPCR a la placa Taqman®. Continuació de la pàgina anterior.

2.1.2. Interpretació de les dades generades per la PCR quantitativa Taqman®

La metodologia Taqman és un sistema de PCR quantitativa que permet fer una quantificació relativa de l'expressió dels gens testats. Això és, en qualsevol interpretació de dades que resultin de fer servir aquesta tecnologia necessitem una mostra que serveixi de calibrador, respecte la qual indicarem si a la mostra problema hi ha més o menys quantitat d'expressió gènica (que s'indica com a valor de RQ). Per

tant, a cada comparació disposarem de dues mostres que seran comparades sempre en relació a la mostra calibradora, i els resultats es donaran segons la relació d'expressions entre aquestes dues mostres. El signe que acompanya al valor de RQ indica si l'increment de l'expressió gènica es dona a la fracció mostra (RQ>0) o a la fracció calibradora (RQ<0).

Tanmateix, cal indicar que l'increment en l'expressió d'un gen concret a una de les fraccions implica que, de forma proporcional, l'expressió d'aquest mateix gen es troba disminuïda a l'altra fracció amb la que es compara. I el mateix ocorre si parlem d'un disminució, es tradueix en un increment a la fracció amb què comparem.

Als gràfics que il·lustren els resultats de la comparativa de qPCR es troben representades les dades d'amplificacions de tots aquells gens que presenten valors de RQ superiors a 2 o inferiors a -2, i la desviació estàndard de les quals no supera els 0,25 punts. Es representen les dades promig de les mostres testades, que per a perifèria són 3 i per a timus són 2, com s'indica a la taula 2.2.

2.1.3. Mostres usades en els assajos de PCR quantitativa Taqman®

Es van obtenir cèl.lules T reguladores (CD4⁺CD25^{hi}) i cèl.lules T efectores (CD4⁺CD25^{lo}) per selecció per FACS, que es van processar directament per a l'extracció del RNA missatger i el seu anàlisi per qPCR. El fenotip de les fraccions separades s'indica a la taula 3.2. Les fraccions aïllades es van obtenir de 3 mostres PBMCs de donants adults i 2 mostres de timus pediàtrics.

	<i>fracció Treg</i>	<i>fracció Teff</i>	<i>n</i>	<i>edat donants</i>
PBMCs	CD4+CD25 ^{hi}	CD4+CD25 ⁻	3	> 18 anys [¥]
timus	CD4+CD25 ⁺	na	2	< 1 mes

Taula 2.2. Mostres analitzades per qPCR. S'indica, per a cada teixit, les fraccions que es van aïllar per FACS d'un total de 3 o 2 mostres, de PBMCs i timus, respectivament. També s'indica l'edat dels donants. Na, no aplica; ¥ els PBMCs procedeixen de donants sans del Banc de Sang i Teixits

2.2. Determinació de la naturalesa reguladora de les mostres de Tregs aïllades de perifèria

En absència d'un marcador molecular exclusiu per aquestes cèl.lules T amb fenotip regulador, és obligatori determinar que amb el mètode usat per separar i enriquir la fracció CD4⁺CD25⁺⁺ s'obtenen cèl.lules amb aquesta característica funcional. Per demostrar que la fracció usada per els assajos de Taqman® i proteòmica era predominantment formada per cèl.lules amb fenotip regulador, es van realitzar assajos de supressió sobre cèl.lules T efectores per les cèl.lules separades a partir de FACS sorting tant de les mostres de sang perifèrica (a continuació) com de les de timus (veure figura 1.5 del capítol 1).

A la figura 2.4.A es pot observar que per aquesta població de cèl.lules T reguladores de perifèria en estat de repòs, ja que no es van activar prèviament per als assajos *in vitro*, la màxima regulació oscil.la al voltant del 50% per als ràtios equivalents en número cel.lular amb les TCD4⁺CD25⁻ convencionals, que actuen com a efectores. Aquest assaig és representatiu d'un total de 3 experiments fets a partir de cèl.lules aïllades de 3 donants sans. Les cèl.lules Tregs, d'acord amb el seu estat anèrgic [206], no van proliferar en resposta a l'estímul específic de TCR (esferes recobertes amb anticossos monoclonals dirigits contra CD3 i CD28) (figura 2. 4.B).

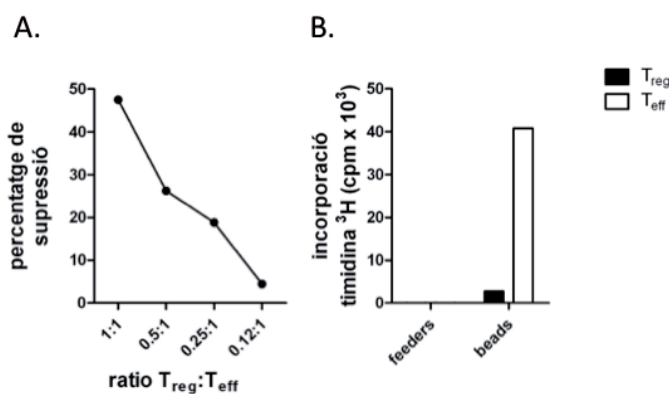


Figura 2.4. Capacitat reguladora de les cèl.lules Treg de perifèria. A. Es va assajar la capacitat supressora de cèl.lules Treg CD4⁺CD25⁺⁺ aïllades de PBMCs de donants sans sobre la proliferació de TCD4⁺CD25⁻ del mateix donant, estimulades amb esferes recobertes amb anti-CD3 i anti-CD28. B. Es mostra la proliferació de les cèl.lules Treg i les Teff en presència de "feeders" i en resposta a l'estímul de proliferació (esferes recobertes d'anticossos anti-CD3 i anti-CD28).

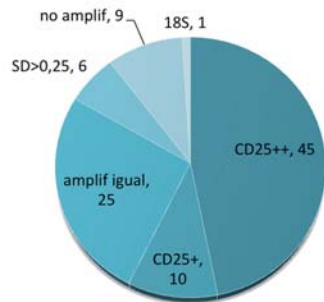
2.3. Comparativa de l'expressió gènica de les Tregs de perifèria amb Tregs de timus

Per veure la diferent expressió transcripcional entre les Tregs naturals i les de perifèria dels gens seleccionats per a la Taqman®, es va realitzar la comparativa de les fraccions CD4⁺CD25⁺⁺ de les mostres de timus i de sang perifèrica d'adults. La fracció reguladora de timus es va usar per calibrar la comparativa, de manera que els valors de RQ positius són increments d'expressió gènica en la fracció de Tregs de perifèria, i els valors de RQ negatius són increments a les Treg de timus.

El nombre de gens que van amplificar al mateix nivell entre fraccions representen un 26,3% (25/95), i entre ells, hi trobem els marcadors característics de nTreg, FOXP3 (RQ=1,20) i CTLA-4 (RQ=-1,20), a més de CD4 (RQ=-1,89). Els gens diferencialment expressats es representen a la figura 2.5, i són majoritaris amb un 57,9% (55/95). Si analitzem com és la seva expressió en les Tregs, veiem que només el 18,2% (10/55) es troba incrementat a timus, respecte el 81,8% que estan més expressats a perifèria (45/55). Entre els gens més expressats a timus, hi trobem: i) PTCRA (RQ=-33,33) i RAG1 (RQ=-14,28) com a indicatius de l'origen tímic de la fracció; ii) CD38 (RQ=-14,28), CCR1 (RQ=-8,33) i CAPG (RQ=-4,76), que podrien tenir una funció en les Treg tímiques, i iii) GITR (RQ=-2,38), que és l'únic marcador de Tregs més expressat a timus.

Per part dels gens més expressats a la fracció de les TCD4⁺CD25⁺⁺ de perifèria trobem dos gens, CCR6 (RQ=29,77) i LGALS3 (RQ=18,14) referits a la bibliografia com a marcadors de [207]. Tant CCR6 com LGALS3 són gens que amplifiquen a les mostres de Treg de timus testades, però en la seva comparativa amb les amplificacions de les mostres de TReg de perifèria, s'observa que l'expressió es superior a perifèria, i això suggeriria que la seva expressió s'incrementa un cop les cèl.lules TCD4⁺CD25⁺⁺ són exportades des del timus. Per altra part, també trobem el gen de la cadena alfa de IL7R (CD127), tot i que com demostren les nostres dades de fenotipatge (veure Capítols 1 i 3 d'aquesta tesi) aquest és un marcador de Treg (CD127^{low}) i la seva expressió es troba disminuïda en aquestes cèl.lules a timus i perifèria. No obstant, en la comparativa per qPCR entre les dues fraccions, es troba més incrementat a perifèria (RQ=7,14). L'augment a perifèria indicaria que la fracció CD25⁺⁺ pot estar contaminada per un percentatge de cèl.lules T efectores activades, que expressen CD127 ja que aquestes són dependents d'IL7 a la perifèria.

A.



B.

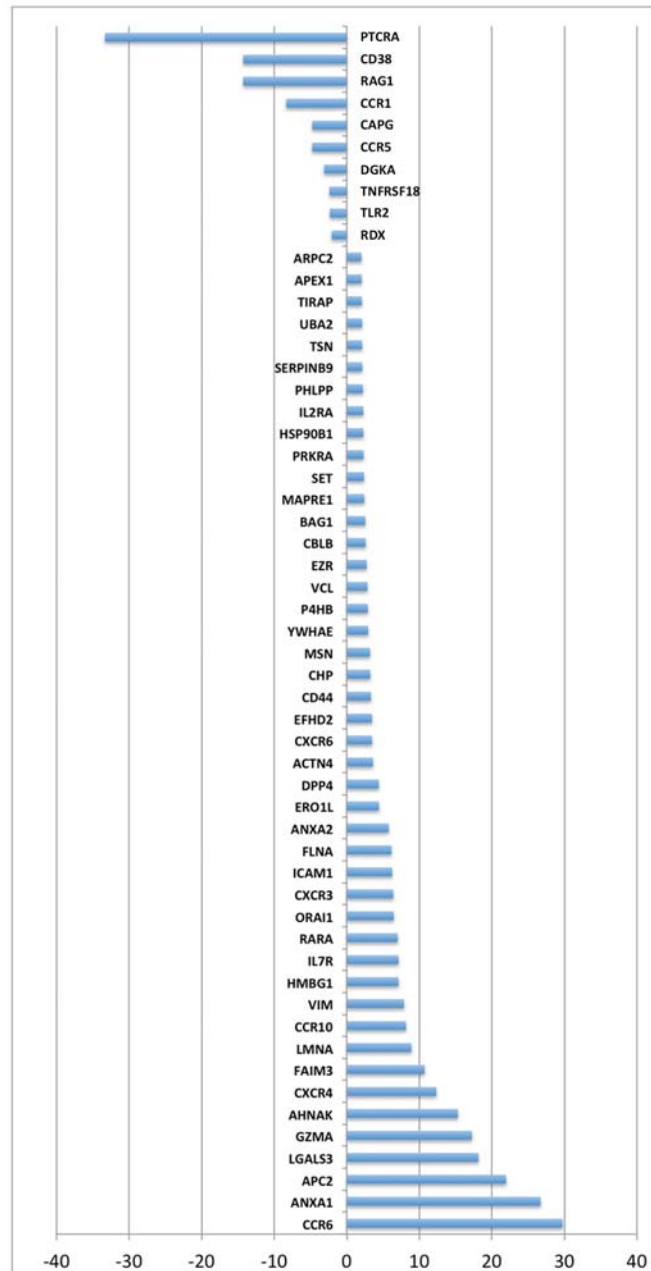


Figura 2.5. Comparativa d'expressió gènica entre Treg de perifèria i Treg de timus en mostres no activades. A. Distribució en números absoluts dels 96 gens testats per qPCR segons les característiques d'amplificació: no amplif, gens que no amplifiquen; SD>0,25, gens que amplifiquen però SD superior a 0,25; 18S, control endògen, gen RNA18S; CD25+, gens diferencialment més expressats a la fracció de cèl.lules CD4CD25+; CD25-, gens diferencialment més expressats a la fracció de cèl.lules CD4CD25-; amplif igual, gens que no presenten diferències d'expressió entre fraccions. B. Representació gràfica dels gens diferencialment expressats entre fraccions. Amb valors de RQ<0 es representen els gens més expressats a les Treg de timus, mentre que la RQ>0 per a les Treg de perifèria. Gens que no van amplificar: ANK2, CACNA1D, CACNA1F, CCR2, GRP83, NCAM1, NOCTH3, TAL1, TLR4; Gens amb SD>0,25: BAD, DNM2, GZMB, MAP7, NFATC2, TLR9.

Pel que fa a la resta de gens i per poder obtenir un patró funcional partint d'aquest perfil transcripcional de les Tregs de perifèria, es va usar l'eina bioinformàtica PANTHER GO (**PANTHER, Protein ANALYSIS THrough Evolutionary Relationships**), que forma part del projecte "Gene Ontology Reference Genome Project" i que té per objectiu classificar proteïnes i els seus gens per anàlisi a gran escala. Més concretament, el sistema de classificació PANTHER GO és una àmplia base de dades biològiques de

gens i proteïnes que pot usar-se per classificar i identificar la funció dels productes gènics. Per tant, el llistat de gens que es van trobar incrementats a les Treg de perifèria respecte les Tregs de timus es va introduir a l'aplicació PANTER GO, i en base a les funcionalitats descrites a la base de dades d'aquest programa, els gens es van agrupar en categories funcionals com es mostra a la figura 2.6. Aquest programa pot assignar una o diverses funcionalitats a una mateixa proteïna. Les assignacions funcionals majoritàries foren “*catalytic activity*” (activitat catalítica) i “*binding*” (unió), seguides per “*structure molecular activity*” (activitat de molècules estructurals) i “*receptor activity*” (activitat de receptors). Finalment trobem “*enzyme regulator activity*” (regulació enzimàtica) i “*nucleic acid binding transcription factor activity*” (unió a DNA de factors de transcripció).

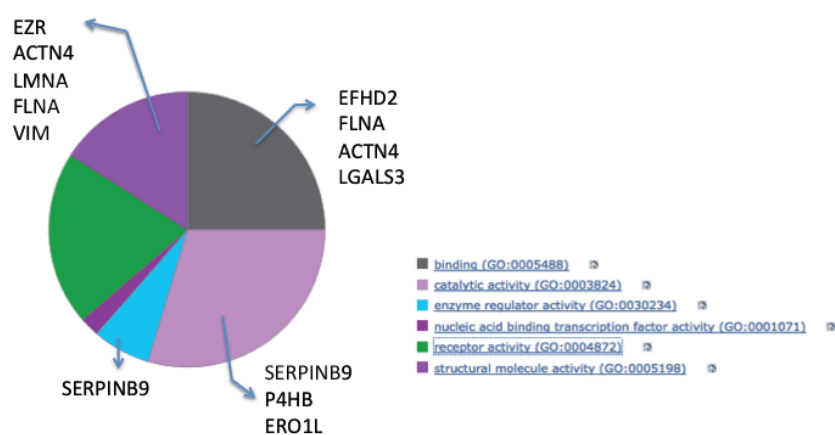


Figura 2.6. Anàlisi funcional dels gens incrementats a la fracció de Treg de perifèria respecte timus. Es va usar l'eina bioinformàtica PANTER GO per estudiar la funcionalitat de la fracció de cèl.lules Treg en base als gens que vam trobar més incrementats quan es va comparar amb les Treg de timus. L'aplicació PANTER GO va distribuir els gens en 6 categories funcionals, de les quals les majoritàries van ser: unió, activitat catalítica i molècules amb activitat estructural. S'indica amb fletxes aquelles proteïnes que van ser trobades a la proteòmica i que també han estat corroborades per la Taqman.

A la figura 2.6 s'indiquen amb fletxes les proteïnes que es van trobar incrementades en els experiments de proteòmica a la fracció Treg de perifèria, i que s'han trobat diferencialment incrementats a les Tregs de perifèria en la comparativa a nivell transcripcional. Com hem comentat, el programa assigna una o diverses funcionalitats a cada proteïna, segons la informació disponible a la base de dades, per això veiem en alguns casos el mateix gen repetit en diferents categories funcionals.

La Galectina 3 és la proteïna codificada pel gen LGALS3, i les nostres dades de proteòmica i les d'expressió gènica ambdues determinen que es troba incrementada a

les Tregs aïllades de PBMCs, suggerint que la seva expressió pot estar relacionada amb el fenotip de cèl.lula Treg com a biomarcador o amb la seva funció.

2.4. Comparativa de l'expressió gènica de les Tregs en repòs i post-activació

La comparació a nivell transcripcional entre les Tregs de perifèria i les Tregs timus demostra que, de la selecció dels gens de la placa Taqman®, la majoria es troben més expressats a la fracció de perifèria. Per determinar si aquesta dada pot atribuir-se a un major estat d'activació de la fracció de Treg de perifèria, vam repetir els assajos Taqman® sobre cèl.lules Tregs i Teff aïllades de PBMCs de donants sans, i les vam comparar amb les dades obtingudes fraccions equivalents de Treg i Teff, que van ser activades en cultiu usant la tecnologia REM (veure capítol 3).

2.4.1. Anàlisi transcripcional de la fracció reguladora en repòs

En un primer pas, es van comparar els perfils d'expressió gènica de la placa de Taqman® dissenyada de les fraccions CD4CD25⁺ (Treg) i CD4CD25⁻ (Teff) aïllades per FACS de mostres de PBMCs no activades d'individus sans.

La comparativa entre aquestes fraccions va demostrar poques diferències a nivell transcripcional, ja que sols un 21,05% dels gens analitzats (20/95) es van trobar diferencialment expressats més de 2 vegades, segons es mostra a la figura 2.7. Com es pot observar, el 75% d'aquests gens estaven incrementats a la fracció de Tregs (20/25), i corresponen a marcadors usats per definir les cèl.lules Treg: FOXP3 (RQ=64,87), CD25 (RQ=61,50), CCR6 (RQ=13,24), GITR (RQ=10,58), LGALS3 (RQ=6,90) i CTLA-4 (RQ=4,11). Aquestes dades confirmaven que les mostres tenien alt nivell de peresa en Tregs. Cal comentar que el CD127, tot i no arribar al criteri de tall aplicat per a l'anàlisi de les dades, presenta una RQ de -1,47, que indicaria que es troba més expressat a les Teff que a les Treg i reforça que la contaminació de cèl.lules CD25⁻ a la fracció CD25⁺ és petita.

A la fracció de Teff els gens més expressats van ser TLR2 amb un valor de RQ de -50, i després, amb nivells de diferència d'expressió de 10 vegades menys, APC2 (RQ=-5,26), ACTN1 (RQ=-4,17), CCR5 (RQ=-3,85) i GZMA (RQ=-2,17).

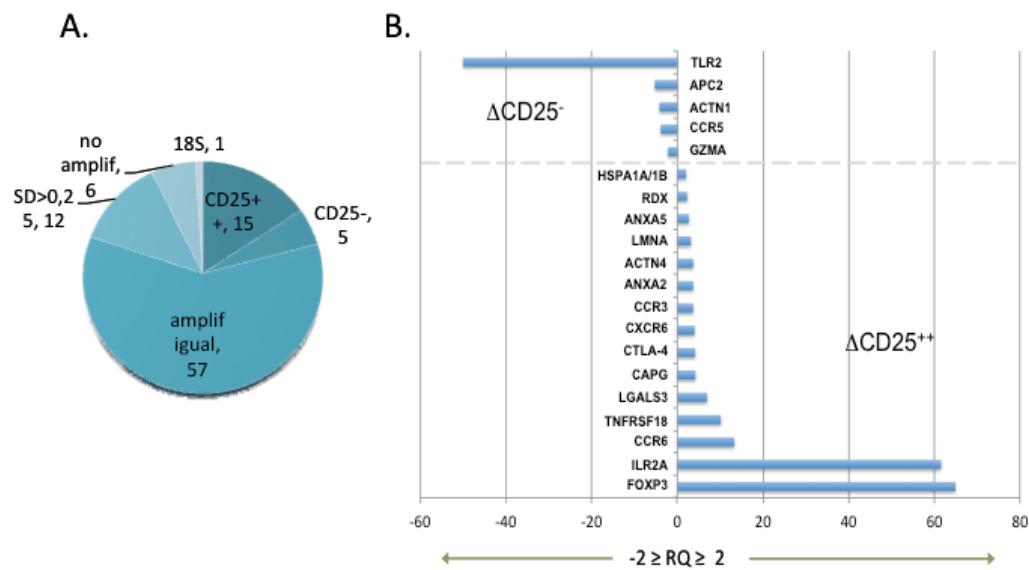


Figura 2.7. Comparativa de cèl.lules Tregs vs. Teff aïllades de PBMCs de donants sans. A. Distribució en números absoluts dels 96 gens testats per qPCR segons les característiques d'amplificació. no amplif, gens que no amplifiquen; SD>0,25, gens que amplifiquen i presenten SD superior a 0,25; 18S, control endògen, gen RNA18S; CD25⁺, gens diferencialment més expressats a la fracció de cèl.lules CD4CD25⁺⁺; CD25⁻, gens diferencialment més expressats a la fracció de cèl.lules CD4CD25⁻; amplif igual, gens que no presenten diferències d'expressió entre fraccions. B. Representació gràfica dels gens diferencialment expressats entre fraccions. Amb valors de RQ<0 es representen els gens més expressats a les Teff, mentre que la RQ>0 per a les Treg. Gens que no van amplificar: ANK2, CACNA1D, CACNA1F, CCR2, CCR10, FLNA, GRP83, NCAM1, NOCTH3, TAL1, TLR4, VASP; Gens amb SD>0,25: BAD, DNMT2, GZMB, MAP7, NFATC2, TLR9.

2.4.2. Anàlisi transcripcional de cèl.lules reguladores activades

Les cèl.lules Treg i Teff aïllades per FACS a partir de sang perifèrica de tres donants es van expandir en cultiu en presència d'IL-2 i anti-CD3, seguint el mètode REM (apartat 4 de Materials i Mètodes). A aquests cultius se'ls va denominar REM2, REM3 i REM4, acompanyat d'un signe positiu si s'havia generat a partir de cèl.lules T CD4⁺CD25⁺⁺CD127⁻, o d'un signe negatiu si provenien de cèl.lules T CD4⁺CD25⁻CD127⁺. Les cèl.lules reguladores i efectores dels tres cultius van ser analitzades per estudiar la seva funció reguladora i la seva expressió gènica als deu dies de cultiu, moment en què estaven més activades.

Primer es va analitzar si els cultius expandits conservaven la seva capacitat reguladora i per això es va dissenyar un assaig de supressió de la fracció positiva (REM⁺) i de la negativa (REM⁻). Tal i com es mostra a la figura 2.8, els cultius REM⁺ dels tres donants van ser capaços d'inhibir la proliferació de les T responedores de manera dosi-

depenent. En canvi, aquest efecte no es va observar per als cultius REM⁺, a excepció de la mostra REM4⁺ en què s'aprecia una certa regulació, però que en cap cas està al nivell de l'exercida per les REM4⁺.

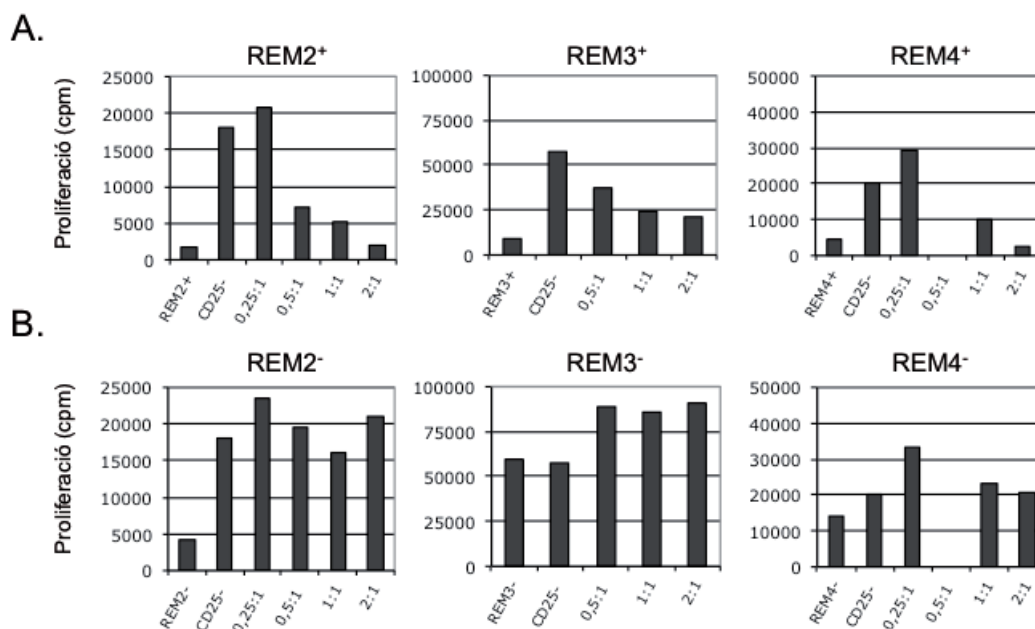


Figura 2.8. Capacitat de regulació de les cèl·lules Treg activades. A. Les cèl·lules TCD4⁺CD25⁺⁺ i TCD4⁺CD25⁻ aïllades per FACS de 3 donants sans es van expandir i activar en cultiu seguint la metodologia REM, i es van anomenar REM2, REM3 i REM4. Es va testar la capacitat supressora d'ambdues fraccions respecte la proliferació de cèl·lules TCD4⁺CD25⁻ autòlogues estimulades amb esferes recobertes amb anti-CD3 i anti-CD28, i es va mesurar la proliferació mitjançant incorporació de timidina tritiada després de 5 dies de cocultiu. Es mostren els resultats per a les 3 mostres de les cèl·lules expandides TCD4⁺CD25⁺⁺ (A) i TCD4⁺CD25⁻ (B), i s'observa que només la fracció CD25⁺⁺ disposa de capacitat supressora.

Un cop es va demostrar que els cultius activats conservaven les seves propietats funcionals de partida, es va analitzar l'expressió dels gens seleccionats a la placa Taqman® dissenyada segons les dades de proteòmica en les mateixes mostres REM2, 3 i 4 (veure apartat 3.1).

En la comparativa entre les fraccions de Treg i Teff activades, les diferències que es van trobar representen un 21,05% (20/95), el mateix percentatge que es va obtenir per la comparativa entre les fraccions en repòs. No obstant, per a les cèl·lules activades, la majoria de gens que es troben diferencialment expressats corresponen a la fracció Teff (13/20, 65% dels gens diferencialment expressats) respecte la de cèl·lules Treg (7/20, 35% dels gens diferencialment expressats), tal i com es representa a la figura 2.9.

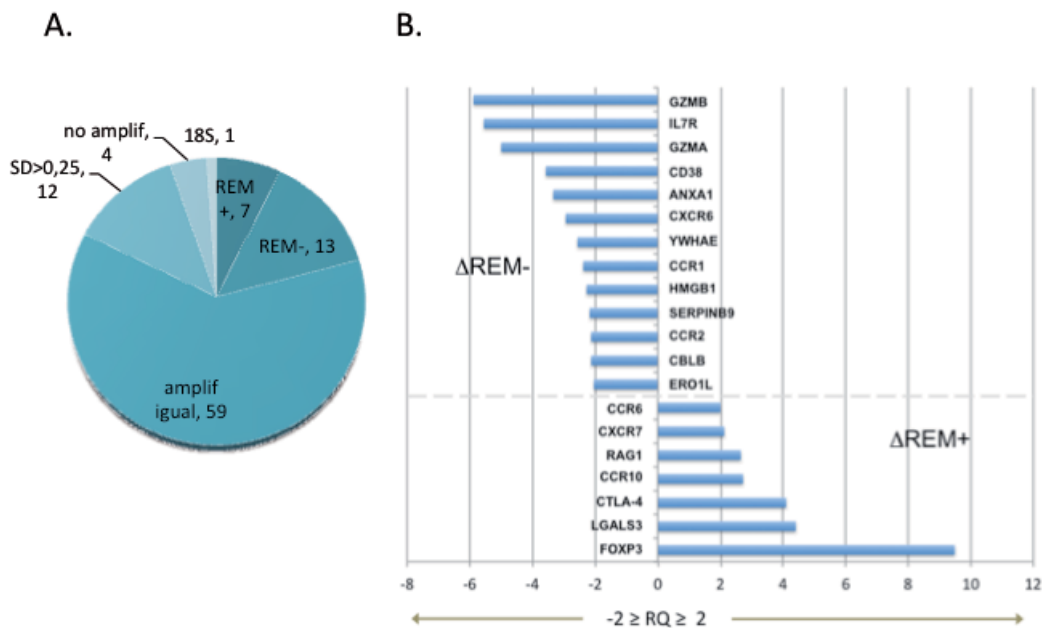


Figura 2.9. Comparativa de cèl.lules Treguladores activades A. Distribució en números absoluts dels 96 gens testats per qPCR segons les característiques d'amplificació. no amplif, gens que no amplifiquen; SD>0,25, gens que amplifiquen i presenten SD superior a 0,25; 18S, control endògen, gen RNA18S; CD25⁺⁺, gens diferencialment més expressats a la fracció de cèl.lules CD4CD25⁺⁺ activades; REM⁻, gens diferencialment més expressats a la fracció de cèl.lules CD4CD25⁻ activades; amplif igual, gens que no presenten diferències d'expressió entre fraccions. B. Representació gràfica dels gens diferencialment expressats entre fraccions. Amb valors de RQ<0 es representen els gens més expressats a les REM⁻, mentre que la RQ>0 per a les REM⁺.

Gens que no van amplificar: GRP83, NOTCH3, TAL1, PTCRA; Gens amb SD>0,25: TLR4, BAD, NFATC2, MAP7, DNM2, CACNA1D, HSPA1A1B, CACNA1F, ANK2, NCAM1, TLR2, APC2.

A la fracció de Tregs, els gens més expressats van ser marcadors característics de Treg, com ara FOXP3 (RQ=9,48) i CTLA4 (RQ=4,09) i de nou entre aquests es va trobar la LGALS3 (RQ=4,40). I a més es van trobar diversos receptors de quimiocines augmentats, CCR10 (RQ=2,71), CXCR7 (RQ=2,11) i CCR6 (RQ=2) i també l'expressió de RAG1 (RQ=2,64), que sorprèn en aquest context, i que es podria atribuir a una desregulació gènica a causa de l'activació o podria estar relacionat amb el procés de revisió del TCR [208].

Els gens IL2RA (RQ=1,33) i TNFRSF18 (RQ=1,17) es van trobar igualment expressats a Treg i Teff, fet que confirma que la seva expressió està vinculada a l'estat d'activació cel.lular, i que ambdós tipus cel.lulars depenen de la IL-2 per a la seva activació.

A la fracció de cèl.lules Teff es van trobar altament expressats els gens de GZMA (RQ=-5) i GZMB (RQ=-5,88), que codifiquen molècules amb funcions efectores. Una

d'elles, la GZMA, també estava incrementada en les cèl.lules Teff en repòs. També està vinculat a cèl.lules T efectores l'expressió de IL7R, que es va trobar expressat a nivells alts similars al de les granzimes, amb una RQ=-5,55. Finalment, es van trobar diversos receptors de quimiocines, CXCR6 (RQ=-2,94), CCR1 (RQ=-2,38) i CCR2 (RQ=-2,13), fet que indica que l'expressió d'aquests receptors va lligada a estats d'activació diferent, com és el cas de CCR6 per les Tregs. Aquest és l'únic receptor de quimiocina que sempre s'ha detectat associat a les cèl.lules T CD4⁺CD25⁺ tant en repòs com activades.

La resta són un conjunt de gens que majoritàriament codifiquen molècules amb funció senyalitzadora i enzims i que es trobaven a la fracció CD25⁺ quan la comparàvem amb la del timus, indicant que són gens que s'incrementen amb l'activació (ANXA, RQ=-3,33; YWHAE, RQ=-2,56; HMGB1, RQ=-2,27; CBLB, RQ=-2,13; ERO1L, RQ=-2,04). Aquests resultats suggereixen que l'expressió d'aquests gens no estaria lligada amb el fenotip regulador, ja que es troben incrementats a la fracció CD25⁺ de perifèria quan les comparem amb les Treg de timus, i passen a ser expressades a les cèl.lules CD25⁻ expandides de perifèria sense capacitat reguladora segons els assajos realitzats (fig 2.9). Pel que fa al gen CD38 (RQ=-3,57), s'ha observat més expressat a la fracció de cèl.lules nTreg que a la de Tregs de perifèria, però la major expressió en les CD25⁻ activades suggereix que no és un marcador associat a les cèl.lules T reguladores. El CD38 es tracta d'un marcador d'activació comú a moltes cèl.lules del sistema immunitari, com les cèl.lules B i T en general, i les cèl.lules NK ([209]).

Tot i que són dades preliminars, l'anàlisi dels resultats de la comparativa entre les Tregs de perifèria i les Tregs de timus indiquen que:

- la majoria de les molècules augmentades en els experiments de proteòmica en les cèl.lules Treg de perifèria i de timus són codificades per gens induïts com a conseqüència d'un major estat d'activació. La majoria dels gens diferencialment expressats a la Taqman entre CD25⁺ de perifèria i timus desapareixen quan comparem les fraccions CD25⁺ i CD25⁻ directament aïllades de perifèria i sense activar.
- L'activació a través d'un mètode com el REM, en què les cèl.lules T són sotmeses a una activació completa, va permetre diferenciar quin d'aquests gens es mantenen a la fracció de Tregs. Marcadors associats a les Tregs però clarament relacionats amb els nivells d'activació, com són GITR i CD25, no figuraven com a gens augmentats o disminuïts. En canvi, marcadors com Foxp3

i CTLA-4 seguien mantenint-se en les CD25⁺⁺ activades.

- Una altra molècula interessant que demostra que la comparativa és vàlida és l'IL7R (CD127), que tot i que les cèl.lules estan activades pel mateix procediment, s'expressa més a les CD25⁻ activades que a les Treg activades.
- Altres gens que s'expressen més a les Treg de perifèria que a les de timus i que es mantenen augmentades després de l'activació a Treg i no Teff, són LGALS3 i CCR6. Particularment, l'expressió de la galectina es troba a nivells similars als de FOXP3.
- Tot i incloure 10 receptors de quimiocines a la placa Taqman per poder identificar si algun d'aquests s'expressava diferencialment a les cèl.lules nTregs, només CCR1 es va trobar incrementat a nTregs. Però en perifèria, aquest receptor es va trobar incrementat a les Teff activades. Respecte el CCR6, les nostres dades corroboren la seva associació al fenotip de les Tregs de perifèria tant en condicions de repòs com activades.
- Les granzimes s'han descrit com un possible mecanisme de supressió utilitzat per les Tregs. En el nostre assaig les hem trobat augmentades a les Treg de perifèria respecte a les del timus, però en perifèria, es trobaven incrementades a les cèl.lules Teff tant en repòs com activades.

En resum, les cèl.lules Tregs de perifèria presenten un fenotip activat respecte les de timus, entre altres motius, perquè un cop a la perifèria, les cèl.lules T efectores emmascaren aquesta fracció. No obstant, en el nostre estudi hem trobat galectina-3, incrementada a nivell de proteïna a l'estudi proteòmic i que les dades de qPCR corroboren que es manté expressada a la fracció reguladora en perifèria tant en repòs com activades. Aquesta molècula s'havia descrit prèviament com a marcador de Treg en cèl.lules procedents de perifèria, i les nostres dades determinen que es tracta d'un caràcter adquirit a perifèria, ja que en la comparativa de Tregs de timus i perifèria la trobem incrementada a perifèria.

ANNEX 2:

LLISTAT DE PROTEÏNES DIFERENCIALMENT EXPRESSADES ENTRE FRACCIONS Treg i Teff PROCEDENTS DELS ASSAJOS ICPL

Taula 1. Llistat de proteïnes diferencialment expressades (2x) procedents de l'ICPL del BC1.

Fracció	Codi gen	Proteïna	Número accés proteïna	PM (kDa)	CV	Mitjana (H/L)	Pèptids totals	Pèptids marcats
CD25+	LMNA	Lamin-A/C	IP00021405	74,38	< 30	-6,93	27	18
CD25+	CAPG	Macrophage capping protein (capping protein (actin filament), gelsolin-like)	IP00027341	38,78	< 30	-6,81	5	2
CD25+	ANXA2	annexin A2	IP00455315	40,67	< 30	-5,42	13	10
CD25+	MAP7	microtubule-associated protein 7	IP00022628	84,12	< 30	-3,83	1	1
CD25+	ANXA4	annexin IV	IP00793199	36,29	56,91	-3,45	3	3
CD25+	ANXA5	Annexin A5	IP00329801	35,97	< 30	-3,74	5	2
CD25+	AP1G1	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit isoform a	IP00293396	92,52	< 30	-1,82	1	1
CD25+	ETHE1	ETHE1 (ethylmalonic encephalopathy) protein, mitochondrial precursor	IP00003766	28,37	< 30	-3,32	4	1
CD25+	ARHGAP25	Rho GTPase-activating protein 25	IP00383530	52,43	< 30	-2,56	2	1
CD25+	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK (Fragment)	IP00021812	312,58	< 30	-3,00	2	1
CD25+	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	IP00449049	113,81	< 30	-2,95	2	1
CD25+	CRYZ	Quinone oxidoreductase (crystallin, zeta)	IP00000792	35,36	< 30	-2,43	1	1
CD25+	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	IP00017617	69,62	< 30	-3,38	4	1
CD25+	HSP90B1	Endoplasmic reticulum stress protein 90kDa beta (Grp94), member 1	IP00027230	26,65	< 30	-2,94	1	1
CD25+	VCL	Vinculin	IP00307162	124,29	< 30	-2,78	3	1
CD25+	ECHDC1	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	IP00302688	31,40	< 30	-3,37	2	1
CD25+	SERPINB9	Serpin B9	IP00032139	43,00	< 30	-2,36	3	2
CD25+	ERO1L	ERO1-like protein alpha precursor	IP00386755	55,21	< 30	-2,26	2	1
CD25+	EFHD2	EF-hand domain-containing protein 2	IP00060181	26,79	< 30	-2,13	4	4
CD25+	EXOSC7	Exosome complex component RRP42	IP00014198	5,83	< 30	1,91	1	1
CD25+	P4HB	Protein disulfide-isomerase precursor	IP00010796	57,48	< 30	-2,12	3	3
CD25+	EZR	Ezrin	IP000843975	69,82	< 30	-2,09	24	18
CD25+	FAM129A	Niban protein	IP00328350	104,04	< 30	-8,00	2	1
CD25+	CD44	CD44 antigen precursor	IP00297160	39,90	< 30	-2,01	2	1
CD25+	HIST1H1B	Histone cluster 1, H1b	IP000217468	22,57	< 30	-5,30	4	4
CD25+	HIST1H1E	histone cluster 1, H1e	IP000217467	21,85	< 30	-2,08	13	13
CD25+	DGKA	Diacylglycerol kinase alpha	IP00333143	83,99	< 30	-1,99	2	2
CD25+	HNRNPUL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	IP00736859	85,31	< 30	-3,84	1	1
CD25+	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	IP00000816	29,33	< 30	-1,91	4	3
CD25+	ANXA1	Annexin A1	IP000218918	38,92	< 30	-1,89	17	16
CD25+	IARS2	Isoleucyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor	IP00017283	114,69	< 30	-1,89	2	1
CD25+	ACTN4	Alpha-actinin-4	IP00013808	105,24	57,07	-1,88	9	6
CD25+	FLNA	filamin A, alpha	IP00302592	282,58	< 30	-1,86	26	16
CD25+	VIM	Vimentin	IP000418471	53,68	< 30	-1,86	83	66
CD25+	MYO1F	Myosin-1f	IP000218638	125,47	< 30	-8,39	1	1
CD25+	NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4	IP00017763	43,16	< 30	-1,82	2	2
CD25+	OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	IP00098902	117,06	< 30	-2,83	3	2
CD25+	PDIA4	protein disulfide isomerase family A, member 4	IP00009904	73,23	< 30	-1,85	3	3
CD25+	HSP901A/1B	Heat shock 70 kDa protein 1B/1B	IP00304925	70,28	< 30	-1,81	11	9
CD25+	PFKP	Phosphofructokinase, platelet	IP00643196	86,52	53,89	-3,69	2	2
CD25+	PSMB2	Proteasome subunit beta type 2	IP00028006	22,99	< 30	-2,56	2	1
CD25+	RBM12	RNA-binding protein 12	IP00550308	97,56	< 30	-1,92	1	1
CD25+	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	IP00008530	34,42	< 30	-6,67	1	1
CD25+	SART3	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	IP00006025	110,72	< 30	-2,05	3	2
CD25+	SF3A3	Splicing factor 3A subunit 3	IP00029764	59,15	< 30	-1,84	1	1
CD25+	SLC25A24	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCA24	IP00337494	53,55	30,94	-2,69	2	2
CD25+	SQRDL	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	IP00009634	25,69	< 30	-1,95	1	1
CD25+	STX4	Syntaxin-4	IP00029730	33,99	< 30	-2,38	1	1
CD25+	TBA1A	Tubulin alpha-1A chain	IP00179709	50,61	< 30	-1,91	3	2
CD25+	THUMP1	THUMP domain-containing protein 1	IP00550243	49,03	< 30	-5,00	2	1
CD25+	TUBA1C	Tubulin alpha-ubiquitous chain	IP00387144	50,80	< 30	-1,81	10	5
CD25+	PPP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	IP00033600	41,65	< 30	3,72	2	1
CD25+	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	IP00021428	42,37	< 30	2,08	2	2
CD25+	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	IP000465439	23,12	< 30	12,50	1	1
CD25+	APC2	adenomatous polyposis coli 2	IP00025190	245,97	< 30	12,50	1	1
CD25+	ATP6V1D	ATPase, H+ transporting, lysosomal 34kDa, V1 subunit D	IP00001568	15,04	< 30	2,06	1	1
CD25+	BIN2	Bridging integrator 2	IP00550792	38,49	< 30	2,10	1	1
CD25+	COMT	Catechol O-methyltransferase	IP00011284	30,47	< 30	1,88	1	1
CD25+	EPHX2	Epoxide hydrolase 2	IP00104341	63,32	< 30	3,78	2	1
CD25+	HIST3H2A	Histone cluster 3, H2a	IP00031562	14,11	< 30	1,97	3	1
CD25+	PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	IP00016610	37,99	< 30	1,87	6	2
CD25+	RBAK	RB-associated KRAB repressor	IP00302755	85,39	< 30	12,50	1	1
CD25+	RGS10	regulator of G-protein signaling 10	IP00013454	21,25	< 30	2,36	2	2
CD25+	RPIA	ribose 5-phosphate isomerase A	IP00026513	33,53	< 30	1,84	3	1
CD25+	RSL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	IP00008708	55,17	< 30	1,95	2	2
CD25+	UBA2	ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	IP00023234	71,75	< 30	1,80	5	3
CD25+	SF1	Splicing factor 1	IP00386119	80,80	< 30	2,99	1	1
CD25+	SP100	SP100 nuclear antigen	IP00011675	101,49	< 30	12,50	1	1
CD25+	APEX1	DNA (apurinic or apyrimidinic site) lyase	IP000215911	35,93	< 30	1,86	3	1
CD25+	SUPT16H	FACT complex subunit SPT16	IP00026970	120,41	< 30	2,14	2	1
CD25+	HMG1	High mobility group protein 1	IP000419258	25,05	< 30	2,22	2	2
CD25+	SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	IP00328230	253,62	< 30	2,35	3	2
CD25+	ACTN1	Alpha-actinin-1	IP00013508	103,56	< 30	3,22	4	1
CD25+	FAIM3	Anti-Fas-induced apoptosis (Fas apoptotic inhibitory molecule 3)	IP00023119	43,46	< 30	12,50	1	1

Taula 2. Llistat de proteïnes diferencialment expressades (2x) procedents de l'ICPL del BC2.

Fracció	Codi gen	Proteïna	Número accés			Mitjana (H/L)	Pèptids totals	Pèptids marcats
			proteïna	PM (kDa)	CV			
CD25+	ARHGEF1	Rho guanine nucleotide exchange factor 1	IP00339379	99	< 30	1,89	7	1
CD25+	BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	IP00218200	35	< 30	2,11	1	1
CD25+	CEP192	centrosomal protein 192kDa	IP00456708	215	< 30	6,74	1	1
CD25+	ESYT1	extended synaptotagmin-like protein 1	IP00022143	123	< 30	2,01	3	1
CD25+	HINT1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	IP00239077	14	< 30	1,84	1	1
CD25+	HSPA5	HSPA5 protein (GRP78/BIP)	IP00003362	72,49	< 30	1,80	4	3
CD25+	PDAP1	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein (PDGFA associated protein)	IP00013297	21	< 30	2,80	1	1
CD25+	PPP1CB	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	IP00218236	37,96	< 30	1,81	1	1
CD25+	RPL21	60S ribosomal protein L21	IP00247583	19	< 30	2,89	2	1
CD25+	RSL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	IP00008708	55	< 30	2,14	1	1
CD25+	S100A4	Protein S100-A4 (S100 calcium binding protein A4)	IP00032313	12	< 30	4,78	1	1
CD25+	SAFB	Scaffold attachment factor B	IP00300631	103	< 30	3,12	1	1
CD25+	SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	IP00220360	25	< 30	3,04	1	1
CD25+	SPCS3	Signal peptidase complex subunit 3	IP00300299	21	< 30	2,74	1	1
CD25+	TPM3	tropomyosin 3 isoform 5	IP00477649	29	< 30	2,69	2	2
CD25+	YWHAQ	14-3-3 protein gamma	IP00220642	28	< 30	2,34	1	1
CD25-	ACTA2	Actin, aortic smooth muscle	IP00008603	42	< 30	0,25	1	1
CD25-	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	IP00022431	40	< 30	0,46	3	1
CD25-	AKR1B1	Aldose reductase	IP00413641	36	< 30	0,50	1	1
CD25-	ARPC3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	IP00005162	21	< 30	0,50	1	1
CD25-	ARPC5	actin related protein 2/3 complex subunit 5	IP00007280	17	< 30	0,37	1	1
CD25-	ARPC5L	Actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like	IP00414554	17	< 30	0,45	1	1
CD25-	ATP5D	ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor	IP00024920	17	< 30	0,37	1	1
CD25-	BT3G	basic transcription factor 3	IP00221035	22	< 30	0,40	1	1
CD25-	CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	IP00641881	23	< 30	0,41	3	2
CD25-	CCT6A	T-complex protein 1 subunit zeta	IP00027626	58	< 30	0,30	1	1
CD25-	CFL1	Cofilin-1	IP00012011	18,72	< 30	0,52	6	5
CD25-	DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 1)	IP00293655	83	< 30	0,34	1	1
CD25-	ECHS1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	IP00024993	32	< 30	0,42	1	1
CD25-	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	IP00219018	18	< 30	0,39	1	1
CD25-	GIMAP1	GTPase, IMAP family member 1	IP00103387	35,48	< 30	0,52	1	1
CD25-	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	IP00027497	63	< 30	0,50	2	1
CD25-	HIST1H1C	histone cluster 1, H1c	IP000217465	21	< 30	0,42	3	3
CD25-	HIST1H1D	histone cluster 1, H1d	IP000217466	22	< 30	0,29	23	22
CD25-	HIST1H2BA	Histone H2B type 1-A	IP00465364	14	< 30	0,25	12	10
CD25-	HIST1H2BK	Histone cluster 1, H2bk	IP00419833	13,88	< 30	0,53	2	2
CD25-	HIST2H2AA3	Histone cluster 2, H2aa3	IP000216457	14	< 30	0,39	4	3
CD25-	HIST2H2BE	Histone cluster 2, H2be	IP00003935	14	< 30	0,39	1	1
CD25-	HIST2H2BF	Histone cluster 2, H2bf	IP000329665	14	36	0,25	14	12
CD25-	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	IP00414696	36	< 30	0,50	7	3
CD25-	IQSEC1	IQ motif and Sec7 domain-containing protein 1	IP00457114	109	< 30	0,48	1	1
CD25-	ITF	lactotransferrin	IP00298860	80	< 30	0,35	3	3
CD25-	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	IP00293276	12,64	< 30	0,56	2	1
CD25-	NSFL1C	p47 protein isoform c (NSFL1 [p97] cofactor (p47))	IP00376904	29	< 30	0,41	1	1
CD25-	DGKA	Diacylglycerol kinase alpha	IP00333143	44,83	< 30	0,52	1	1
CD25-	PNN	Pinin	IP00002649	67,08	< 30	0,51	1	1
CD25-	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	IP00419585	18	42	0,32	15	12
CD25-	RBML1	RNA binding motif protein, X-linked-like 1	IP00061178	42	< 30	0,28	2	1
CD25-	RPL17	60S ribosomal protein L17	IP00413324	21	< 30	0,31	1	1
CD25-	RPL3	ribosomal protein L3	IP00550021	29	< 30	0,28	1	1
CD25-	RPS20	ribosomal protein S20	IP00791265	7	< 30	0,41	1	1
CD25-	RPS24	40S ribosomal protein S24	IP00029750	17	< 30	0,49	1	1
CD25-	RTCD1	RNA terminal phosphate cyclase domain 1	IP00011726	40	< 30	0,41	1	1
CD25-	SEPT9	Septin-9	IP00790326	24	< 30	0,46	1	1
CD25-	SNRPB	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	IP00027285	25	< 30	0,12	1	1
CD25-	SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	IP00017963	14	< 30	0,46	1	1
CD25-	TMPO	Gamma of Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma; thymopoietin	IP00181409	39	< 30	0,45	1	1
CD25-	TPI1	Triosephosphate isomerase	IP00451401	23	< 30	0,49	1	1
CD25-	TRA2B	Arginine/serine-rich-splicing factor 10	IP00301503	33,76	< 30	0,55	1	1
CD25-	TTR	Transthyretin precursor	IP00022432	16	< 30	0,35	1	1
CD25-	UBC	Ubiquitin C splice variant	IP00969566	17	< 30	0,32	1	1
CD25-	UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	IP00021347	18	< 30	0,43	1	1
CD25-	UBE2NL	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	IP00376844	11	< 30	0,41	1	1
CD25-	YWHAQ	14-3-3 protein beta/alpha	IP000216318	23	< 30	0,39	3	2
CD25-	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	IP00021263	28	< 30	0,47	14	11
CD25-	ZMYND15	Zinc finger MYND domain-containing protein 15	IP00031056	78	< 30	0,23	1	1

Taula 3. Llistat de proteïnes diferencialment expressades (2x) procedents de l'ICPL del TMA-8.

Fracció	Codi gen	Proteïna	Número accés			Mitjana (H/L)	Pèptids totals	Pèptids marcats
			proteïna	PM (kDa)	CV			
CD25+	ACTN4	Alpha-actinin-4	IPI00013808	105	< 30	-2,36	4	2
CD25+	ARPC5L	Actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like	IPI00014554	17	< 30	-6,17	2	1
CD25+	BAP18	Chromatin complexes subunit BAP18 (C17orf49)	IPI00790228	20	< 30	-3,01	1	1
CD25+	CHMP1B	Charged multivesicular body protein 1b	IPI00156984	22	< 30	-1,86	2	1
CD25+	CYCS	cytochrome C	IPI00465315	12	< 30	-1,82	1	1
CD25+	EZR	Ezrin	IPI00843975	70	< 30	-2,03	1	1
CD25+	FLNA	filamin A, alpha	IPI00302592	283	< 30	-3,98	4	1
CD25+	FTL	Ferritin light polypeptide variant	IPI00375676	21	< 30	-1,95	1	1
CD25+	GSTK1	Glutathione S-transferase kappa 1	IPI00219673	26	< 30	-1,92	2	2
CD25+	H2AFY	H2A histone family, member Y	IPI00304171	40	< 30	-2,14	1	1
CD25+	HEATR8	HEAT repeat-containing protein 8	IPI00845320	147	< 30	-2,30	1	1
CD25+	LMNB1	Lamin-B1	IPI00217975	67	< 30	-4,12	2	1
CD25+	OPN5	Opsin-5	IPI00395810	40	< 30	-8,26	1	1
CD25+	PHB	Prohibitin	IPI00017334	30	< 30	-2,08	4	2
CD25+	RAB11B	Ras-related protein Rab-11B	IPI00020436	25	< 30	-2,27	1	1
CD25+	TF	serotransferrin	IPI00022463	11	< 30	-1,87	2	2
CD25+	TSN	Translin	IPI00018768	26	< 30	-2,06	3	2
CD25+	UQCRCB	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein	IPI00220416	14	< 30	-4,75	1	1
CD25-	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	IPI00465439	23	< 30	4,75	1	1
CD25-	ANXA1	Annexin A1	IPI00218918	23	< 30	2,15	1	1
CD25-	APEX1	DNA (apurinic or apyrimidinic site) lyase	IPI00215911	36	< 30	2,32	2	1
CD25-	ARID5A	AT rich interactive domain 5A isoform 1	IPI00012918	65	< 30	>10	1	1
CD25-	C4orf49	Ovary-specific acidic protein	IPI00013252	28	< 30	2,87	1	1
CD25-	C9orf103	Probable gluconokinase	IPI00418496	21	< 30	>10	1	1
CD25-	CLTB	Clathrin light chain B	IPI00014589	25	< 30	2,37	1	1
CD25-	DFNA5	Long of Non-syndromic hearing impairment protein 5	IPI00029656	55	< 30	2,35	1	1
CD25-	DNAJC8	Dnaj homolog subfamily C member 8	IPI00003438	30	< 30	1,87	1	1
CD25-	EIF1AY	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal	IPI00023004	17	< 30	2,62	2	2
CD25-	ELAVL1	ELAV-like protein 1	IPI00301936	36	< 30	1,80	3	1
CD25-	HDHD2	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	IPI00644472	30	< 30	1,85	1	1
CD25-	HIST1H1B	Histone cluster 1, H1b	IPI00217468	6	< 30	2,51	1	1
CD25-	HIST1H2AA	Histone cluster 1, H2aa	IPI00045109	14	< 30	4,12	1	1
CD25-	HIST1H2BH	Histone cluster 1, H2bh	IPI00303133	14	35	2,32	5	4
CD25-	HIST2H2BE	Histone cluster 2, H2be	IPI00003935	14	< 30	1,84	3	3
CD25-	HMGB1	High mobility group protein B1	IPI00419258	22	< 30	2,01	2	2
CD25-	HMGB2	High mobility group protein B2	IPI00219097	24	< 30	2,32	2	2
CD25-	LAMC1	Laminin subunit gamma-1 precursor	IPI00298281	183	< 30	8,43	1	1
CD25-	MED12	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	IPI00004068	229	< 30	4,98	1	1
CD25-	MZB1	hypothetical protein MGC29506/ no genera nada en uniprot	IPI00102821	21	< 30	3,75	1	1
CD25-	NDUFS8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial precursor	IPI00010845	24	< 30	2,24	1	1
CD25-	OClAD2	OClA domain containing 2 isoform 1	IPI00555902	17	< 30	1,97	2	1
CD25-	PATL1	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)	IPI00760958	71	< 30	>10	1	1
CD25-	PEX6	Peroxisome assembly factor 2	IPI00299182	105	< 30	2,57	1	1
CD25-	POLR2E	DNA-directed RNA polymerase II 23 kDa polypeptide	IPI00291093	25	< 30	1,82	1	1
CD25-	PSMB4	Proteasome subunit beta type 4 precursor	IPI00555956	29	< 30	1,95	1	1
CD25-	RPL19	60S ribosomal protein L19	IPI00025329	23	< 30	1,90	2	2
CD25-	RPL3	ribosomal protein L3	IPI00550021	40	< 30	2,32	1	1
CD25-	RPL35	60S ribosomal protein L35	IPI00412607	15	< 30	1,88	1	1
CD25-	RPS8	40S ribosomal protein S8	IPI00216587	24	< 30	1,84	3	1
CD25-	SNRNP25	Similar to DNA directed RNA polymerase III polypeptide K	IPI00550775	30	< 30	>10	1	1
CD25-	STMN1	Stathmin	IPI00479997	17	< 30	4,19	5	4
CD25-	TUBA1C	Tubulin alpha-ubiquitous chain	IPI00387144	51	< 30	3,17	7	3
CD25-	TUBB	Tubulin, beta polypeptide	IPI00645452	48	< 30	2,72	4	2
CD25-	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	IPI00003949	17	< 30	4,68	1	1
CD25-	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	IPI00000816	16	< 30	2,12	2	2

Taula 4. Llistat de proteïnes diferencialment expressades (2x) procedents de l'ICPL del TMB188i.

Fracció	Codi gen	Proteïna	Número accés			Mitjana (H/L)	Pèptids totals	Pèptids marcats
			proteïna	PM (kDa)	CV			
CD25+	ANXA6	annexin A6	IPI00221226	75,57	< 30	-4,35	3	1
CD25+	ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	IPI00440493	59,83	< 30	-3,24	6	2
CD25+	CSK2	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2	IPI00015105	9,68	< 30	-2,26	1	1
CD25+	EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B	IPI00012079	69,24	< 30	-2,14	1	1
CD25+	FUBP1	Far upstream element-binding protein 1	IPI00375441	67,69	< 30	-2,51	3	2
CD25+	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	IPI00021327	25,30	< 30	-2,67	1	1
CD25+	LASP1	LIM and SH3 domain protein 1	IPI00000861	30,10	< 30	-2,30	3	2
CD25+	LMNA	Lamin-A/C	IPI00021405	74,38	< 30	-8,60	3	1
CD25+	MYL1	Myosin Light Chain 1, Skeletal Muscle Isoform	IPI00216070	0,00	< 30	-3,65	1	1
CD25+	PARK7	Protein DJ-1 (parkinson protein 7)	IPI00298547	20,05	< 30	-3,69	1	1
CD25+	PDHA1	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, somatic form, mitochondrial precursor	IPI00306301	43,95	< 30	-1,82	1	1
CD25+	PSMD9	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	IPI00010860	24,81	< 30	-2,62	1	1
CD25+	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	IPI000643041	18,66	< 30	-6,53	1	1
CD25+	RPL10A	60S ribosomal protein L10a	IPI000412579	24,99	< 30	-2,24	1	1
CD25+	RPL15	Ribosomal protein L15 pseudogene 3	IPI000470528	24,27	< 30	-2,92	1	1
CD25+	RPL31	60S ribosomal protein L31	IPI00026302	14,45	< 30	-3,30	1	1
CD25+	RPL8	60S ribosomal protein L8	IPI00012772	28,24	< 30	-1,93	3	3
CD25+	RPS6	40S ribosomal protein S6	IPI00021840	28,83	< 30	-3,19	1	1
CD25+	RSF1	remodeling and spacing factor 1	IPI00290652	165,26	< 30	-3,03	1	1
CD25+	TP11	Triosephosphate isomerase	IPI00451401	27,21	< 30	-2,58	1	1
CD25+	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	IPI00010779	28,62	< 30	-2,09	1	1
CD25+	WDR75	WD repeat protein 75	IPI00217240	95,92	33,43	-7,03	2	2
CD25+	ZNF22	Zinc finger protein 22	IPI00215890	26,58	< 30	-3,33	3	2
CD25-	ACTR2	Actin-like protein 2	IPI00005159	45,02	< 30	1,88	2	1
CD25-	ADA	Adenosine deaminase	IPI00296441	41,02	< 30	2,08	1	1
CD25-	AKR1B1	Aldose reductase	IPI000413641	36,23	< 30	3,12	1	1
CD25-	ARHGDI1A	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	IPI00003815	23,25	58,79	3,01	2	2
CD25-	C14orf166	UPF0568 protein C14orf166	IPI00006980	28,16	< 30	2,93	1	1
CD25-	CACYBP	Calcyclin-binding protein	IPI00395627	26,31	< 30	2,37	1	1
CD25-	CD38	ADP-ribosyl cyclase 1	IPI00395006	22,13	< 30	2,46	1	1
CD25-	CDV3	Protein CDV3 homolog	IPI00014197	28,72	< 30	2,32	1	1
CD25-	CHP	Calcium-binding protein p22	IPI00218924	22,44	< 30	14,30	1	1
CD25-	CLTA	Brain of Clathrin light chain A	IPI00014587	27,17	< 30	1,96	1	1
CD25-	CNGB3	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta 3	IPI00409767	92,70	< 30	8,30	1	1
CD25-	CORO1A	Coronin-1A	IPI00010133	40,02	< 30	1,83	4	3
CD25-	DDIT4L	DNA-damage-inducible transcript 4-like	IPI00060544	22,24	< 30	5,69	1	1
CD25-	EEF1D	EEF1D protein	IPI00064086	28,65	< 30	2,41	4	1
CD25-	EIF4A3	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	IPI00009328	47,13	< 30	2,02	3	2
CD25-	FBL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	IPI00025039	33,88	< 30	2,06	3	2
CD25-	G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	IPI00012442	52,19	< 30	1,86	2	1
CD25-	GD12	Rab GDP dissociation inhibitor beta	IPI00031461	51,09	< 30	1,95	2	2
CD25-	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	IPI00027497	63,34	< 30	2,32	1	1
CD25-	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	IPI000215965	38,94	97,80	2,01	6	5
CD25-	HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	IPI00003881	45,98	76,91	2,85	4	3
CD25-	HP1BP3	Heterochromatin protein 1-binding protein 3(HP1-BP74)	IPI00296291	61,45	49,20	3,07	2	2
CD25-	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha 2	IPI00382470	98,67	< 30	2,58	4	2
CD25-	HSP90AB1	Heat shock protein 90kDa alpha (Cytosolic), class B member 1	IPI00514659	20,11	< 30	1,87	2	1
CD25-	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	IPI00003865	23,24	< 30	1,96	1	1
CD25-	MAPRE1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	IPI00017596	30,15	< 30	1,98	1	1
CD25-	NACAD	NAC-alpha domain-containing protein 1	IPI00004538	184,29	< 30	2,96	1	1
CD25-	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1, 120 kDa isoform precursor	IPI00220737	84,35	< 30	2,44	1	1
CD25-	NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	IPI00925023	12,04	< 30	2,30	1	1
CD25-	NUCKS1	Nuclear ubiquitously casein and cyclin-dependent kinases substrate	IPI00022145	27,28	< 30	2,77	2	2
CD25-	NUDC	Nuclear migration protein nudC	IPI00550746	24,40	< 30	2,75	1	1
CD25-	PHB2	Prohibitin-2	IPI00027252	33,28	94,54	3,05	5	3
CD25-	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	IPI00179964	57,36	< 30	2,36	1	1
CD25-	PUS7	Pseudouridylate synthase 7 homolog	IPI00044761	75,33	< 30	4,01	1	1
CD25-	RAB11B	Ras-related protein Rab-11B	IPI00020436	24,59	< 30	2,67	1	1
CD25-	RALY	RNA binding protein, autoantigenic	IPI00514496	25,38	< 30	3,16	1	1
CD25-	RPL38	60S ribosomal protein L38	IPI00215790	8,27	< 30	3,16	1	1
CD25-	RPL5	Ribosomal protein L5	IPI00000494	28,25	< 30	2,86	1	1
CD25-	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	IPI00008530	29,83	< 30	5,12	1	1
CD25-	RPS27A	ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor	IPI00179330	18,30	108,49	1,92	9	9
CD25-	RPS3A	40S ribosomal protein S3a	IPI00419880	29,93	< 30	2,96	1	1
CD25-	SET	Protein SET	IPI00072377	33,47	94,80	2,78	3	3
CD25-	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	IPI00007188	33,10	60,23	2,50	4	4
CD25-	SLC25A6	Solute carrier family 25 (Mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member	IPI00645646	17,41	< 30	2,58	1	1
CD25-	SRSF2	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	IPI00005978	25,46	< 30	1,95	3	1
CD25-	SRSF9	Splicing factor, arginine/serine-rich 9	IPI00012340	25,64	< 30	2,78	3	1
CD25-	TKT	Transketolase	IPI00942979	37,05	< 30	1,94	1	1
CD25-	TMPO	Gamma of Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	IPI00181409	38,77	< 30	1,85	2	1
CD25-	TPH2	Tryptophan 5-hydroxylase 2	IPI00217398	56,76	< 30	4,69	1	1
CD25-	TRDN	Triadin	IPI00220272	18,44	< 30	2,34	1	1
CD25-	TTN	Titin	IPI00759613	3680,12	< 30	2,36	1	1
CD25-	TUBB1	Tubulin beta-1 chain	IPI00006510	48,92	< 30	1,97	1	1
CD25-	UBC	Polyubiquitin-C	IPI00969566	0,00	< 30	2,09	2	2
CD25-	WASF2	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	IPI00472164	68,60	< 30	1,94	1	1
CD25-	YWHAQ	14-3-3 protein gamma	IPI00220642	28,46	< 30	2,10	2	2
CD25-	YWHAQ	14-3-3 protein theta	IPI00018146	28,03	< 30	2,09	2	1
CD25-	ZNF610	Zinc finger protein 610	IPI00167850	54,67	< 30	11,96	1	1

Taula 5. Llistat de proteïnes diferencialment expressades (2x) procedents de l'ICPL del TMB348i.

Fracció	Codi gen	Proteïna	Número accés proteïna	PM (kDa)	CV	Mitjana (H/L)	Pèptids totals	Pèptids marcats
CD25+	ADH5	Alcohol dehydrogenase class-3	IPI00746777	42	< 30	-8,95	1	1
CD25+	ADRA1D	Alpha-1D adrenergic receptor	IPI00012725	34	< 30	-100,00	1	1
CD25+	ATAD3A/ATAD3B	TOB3_ATPase family, AAA domain containing 3A	IPI00045921	65	< 30	-1,90	2	1
CD25+	ATP2A3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	IPI00004092	115	< 30	-3,37	3	2
CD25+	ATP5C1	ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor	IPI00478410	33	< 30	-1,92	1	1
CD25+	CAPG	Macrophage capping protein (capping protein (actin filament), gelsolin-like)	IPI00027341	39	< 30	-4,49	3	1
CD25+	CARS	CysteinyI-tRNA synthetase, cytoplasmic	IPI00027443	84	< 30	-7,08	1	1
CD25+	CLTA	Clathrin light chain A	IPI00014587	27	< 30	-4,75	1	1
CD25+	CNN2	Calponin-2	IPI00015262	34	< 30	-1,97	1	1
CD25+	DES	Desmin	IPI00465084	54	< 30	-1,92	1	1
CD25+	DNAJC9	DnaJ homolog subfamily C member 9	IPI00154975	30	< 30	-2,61	1	1
CD25+	DNM2	Dynamín-2	IPI00033022	98	< 30	-2,32	3	1
CD25+	GNA13	Guanine nucleotide-binding protein alpha-13 subunit	IPI00290928	44	< 30	-3,13	1	1
CD25+	GTF2F2	Transcription initiation factor IIF subunit beta	IPI00477686	29	< 30	-2,43	1	1
CD25+	H1F0	H1 histone family, member 0	IPI00550239	21	< 30	-2,28	2	2
CD25+	H1FX	H1 histone family, member x	IPI00021924	22	< 30	-4,91	1	1
CD25+	H3F3A	Histone H3.3	IPI00219038	15	60	-2,23	4	3
CD25+	HIST1H1E	histone cluster 1, H1e	IPI00217467	22	< 30	-6,92	1	1
CD25+	HIST1H2AC	histone cluster 1, H2ac	IPI00216456	14	< 30	-1,82	5	3
CD25+	HIST1H4A	Histone cluster 1, H4I	IPI00453473	11	53	-1,96	7	7
CD25+	HIST2H3A	Histone H3j	IPI00171611	15	42	-2,22	8	7
CD25+	HMG82	High mobility group protein B2	IPI00219097	24	< 30	-2,62	4	4
CD25+	HNRNP2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	IPI00414696	36	< 30	-2,99	4	1
CD25+	LMNB2	Lamin B2	IPI00009771	70	42	-5,75	8	2
CD25+	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	IPI00291006	36	< 30	-8,06	1	1
CD25+	NDUFS3	NADH dehydrogenase buiquinone Fe-S protein	IPI00025796	25	42	-2,80	2	2
CD25+	NSUN2	NOL1/NOP2/Sun domain family 2 protein	IPI00306369	87	< 30	-1,95	1	1
CD25+	NUCKS1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate	IPI00022145	27	48	-4,03	2	2
CD25+	PABPN1	poly(A) binding protein, nuclear 1	IPI00005792	33	< 30	-2,12	2	1
CD25+	PCBP2	poly(C)-binding protein 2 isoform b	IPI00012066	39	< 30	-1,87	3	1
CD25+	PSMD4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	IPI00022694	41	< 30	-1,89	2	2
CD25+	RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein	IPI00414127	23	< 30	-1,93	1	1
CD25+	REXO1L2P	Putative exonuclease GOR-like protein	IPI00937866	65	< 30	-2,35	1	1
CD25+	SFXN1	Sideroflexin-1	IPI00009368	36	< 30	-3,11	2	1
CD25+	SMAP	Small acidic protein (chromosome 11 open reading frame 58)	IPI00003419	20	34	-2,15	3	3
CD25+	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	IPI00216046	123	< 30	-2,29	1	1
CD25+	SND1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	IPI00140420	103	< 30	-2,59	4	1
CD25+	TCERG1	Transcription elongation regulator 1	IPI00247871	124	< 30	-7,66	2	1
CD25+	TCOF1	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1 Isoform a	IPI00165041	148	49	-1,97	4	2
CD25+	TES	Testin	IPI00024097	50	< 30	-3,58	1	1
CD25+	UBA52	Ubiquitin and Ribosomal Protein L40 Precursor	IPI00456429	0	< 30	-2,38	1	1
CD25+	UBE4A	Hypothetical protein (Fragment) (ubiquitination factor E4A)	IPI00807340	46	< 30	-100,00	1	1
CD25+	WAS	Wiskott-Aldrich syndrome protein (eczema-thrombocytopenia)	IPI00001545	53	< 30	-2,01	3	1
CD25-	CHCHD3	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3	IPI00015833	26	< 30	2,73	1	1
CD25-	DDB1	DNA damage-binding protein 1	IPI00293464	128	< 30	3,00	2	1
CD25-	DEF6	IRF4-binding protein (differentially expressed in FDCEP 6 homolog)	IPI00004924	74	< 30	1,96	5	1
CD25-	EID1	EP300 interacting inhibitor of differentiation 1	IPI00295287	14	< 30	2,04	1	1
CD25-	EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-1	IPI00025491	46	< 30	3,11	2	1
CD25-	FKBP4	FK506-binding protein 4	IPI00219005	52	< 30	3,05	1	1
CD25-	FLII	Protein flightless-1 homolog	IPI00031023	146	< 30	2,59	2	1
CD25-	GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase	IPI00642048	13	< 30	2,32	1	1
CD25-	GSPT1	G1 to S phase transition protein 1 homolog	IPI00218829	69	< 30	2,53	1	1
CD25-	HMHA1	minor histocompatibility antigen HA-1	IPI00022471	126	< 30	1,90	6	2
CD25-	HSP90B1	Endoplasmín precursor (heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1)	IPI00027230	93	< 30	2,14	2	1
CD25-	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein	IPI00009960	84	< 30	2,04	3	1
CD25-	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	IPI00009342	190	34	1,92	6	3
CD25-	KHSRP	KH-type splicing regulatory protein	IPI00479786	73	< 30	2,48	5	1
CD25-	MOGAT1	monoacylglycerol O-acyltransferase 1	IPI00289695	39	< 30	2,03	1	1
CD25-	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	IPI00006196	237	37	1,92	21	9
CD25-	PRKRA	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	IPI00021167	35	< 30	2,25	1	1
CD25-	PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	IPI00299608	107	< 30	1,80	3	1
CD25-	PTPN7	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 7	IPI00081833	41	< 30	2,95	1	1
CD25-	RAB10	Ras-related protein Rab-10 (member RAS oncogene family)	IPI00016513	23	< 30	2,31	1	1
CD25-	SMARCC1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1	IPI00234252	123	< 30	1,92	2	1
CD25-	SUL1B1	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	IPI00102581	35	< 30	1,98	1	1
CD25-	TUBB4	Tubulin, beta, 4 (=tubulin beta 3)	IPI00013683	90	< 30	5,43	2	1
CD25-	TUBB8	Beta-tubulin 4Q	IPI00292496	50	< 30	2,25	2	1
CD25-	WDR82	WD40 protein (WD repeat domain 82)	IPI00152695	35	< 30	1,93	1	1

Discussió - Capítol 2

L'objectiu principal d'aquest capítol fou trobar un marcador característic de cèl·lules Treg comparant les proteïnes diferencialment expressades en fraccions purificades de cèl·lules Treg a perifèria de donants sans, comparant-les amb les Treg de timus i les Teff de perifèria. Les dades de proteòmica van generar més de 250 proteïnes diferencialment expressades en el total dels 5 experiments ICPL realitzats. Es tracta de proteïnes abundants i d'expressió generalitzada, però entre elles vam poder identificar un marcador de Tregs, la galectina3, que després vam provar que és un marcador de Tregs que s'adquireix a perifèria, i que vam validar a nivell d'expressió gènica.

Els assajos de proteòmica es van realitzar en dues mostres de sang perifèrica de donants adults i tres mostres de timus pediàtrics. El percentatge de proteïnes quantificades va ser del 60% respecte el total de proteïnes identificades, però tan sols un 5% d'aquestes proteïnes es van trobar diferencialment expressades. Els resultats no van ser reproduïbles, és a dir, no es va trobar cap molècula repetida entre mostres suggerint que la gran variabilitat en humans hagués requerit assajar un número de mostres més elevat. Com a estratègia, per tant, no sembla la millor aproximació perquè no vam aconseguir trobar molècules definitòries de llinatge de Tregs. Això podria ser a causa de problemes tècnics de solubilització de proteïnes associades a membrana, com CD25 o GITR, i/o nuclis, FOXP3, d'acord amb els comentaris de treb[210]. Aquests factors van fer que enlloc de continuar la línia de l'anàlisi proteòmica amb més mostres i més abundants, es va escollir una aproximació alternativa per validar la possible rellevància d'algunes d'aquestes proteïnes diferencialment expressades entre fraccions obtingudes en l'ICPL. Analitzant les dades de cada proteïna en relació amb la biologia de les cèl·lules T, es van escollir algunes per estudiar la seva expressió a nivell transcripcional.

En l'assaig de PCR quantitativa, es van analitzar 95 gens en tres mostres de sang perifèrica de donants adults i dues mostres de timus d'infants de 7 i 9 dies. L'estudi exhaustiu de les dades sobre les diferents proteïnes identificades com a potencialment relacionades amb el fenotip regulador, vam escollir 48 proteïnes dels resultats de proteòmica i vam afegir altres molècules relacionades amb les funcions de les Tregs (taula 2.1). Aquestes molècules estaven involucrades en diferents funcions com senyalització, apoptosi, processos enzimàtics o citoesquelet.

En la comparació entre les cèl.lules Treg de perifèria i les Teff no s'observen diferències substancials dels gens escollits per la Taqman®. No obstant, entre els que gens més augmentats, trobem FOXP3, CD25, CCR6, GITR i CTLA-4 a la fracció TCD4⁺CD25⁺⁺, fet que confirma la seva naturalesa reguladora, com prèviament havíem demostrat als assajos funcionals, que s'havien realitzat amb poblacions Tregs aïllades amb el mateix procediment. La galectina 3 es troba amb valors semblants als dels gens característics de Tregs que acabem d'esmentar.

En la comparació entre cèl.lules Treg de perifèria i les de timus ens trobem que els marcadors de Tregs FOXP3, CTLA-4 i CD25 s'expressen als mateixos nivells, i demostren la puresa elevada d'ambdues fraccions reguladores. Una gran part dels gens inclosos a la Taqman® es troben més expressats a les cèl.lules Treg de perifèria indicant que són cèl.lules més activades i preparades per exercir la funció reguladora. En aquest context, altres marcadors de Tregs, com CCR6 i LGALS3, també es troben més expressats a la fracció reguladora de perifèria, suggerint que són molècules que les Treg adquireixen un cop emigren del timus.

El CCR6 és el gen més diferencialment expressat entre perifèria i timus. CCR6 és un receptor de quimiocines que inicialment es va trobar expressat en cèl.lules T i B de memòria i cèl.lules dendrítiques [211]). Estudis recents revelen també l'expressió de CCR6 en una subpoblació de cèl.lules Treguladores CD4⁺Foxp3⁺. Aquestes cèl.lules Treg CCR6⁺ tenen un fenotip efector-memòria, expressen elevades quantitats d'IL-10 si es comparen amb les Treg CCR6⁻ i es troben preferentment a teix[212]. CCL20, lligand de CCR6, és una quimiocina involucrada amb la quimiotaxi a localitzacions determinades on s'expressa i per tant participa en el reclutament de cèl.lules Treg a l'infiltrat de teixits, incloent teixits tumorals, afavorint l'evasió de la resposta immunitària contra el tumor.

En el quart lloc dels gens augmentats en perifèria vs. timus, es troba la Galectina3. Les galectines pertanyen a una categoria de proteïnes immunomoduladores solubles que poden actuar intracel.lularment, modulant vies de senyalització, o extracel.lularment, com a mediadors reguladors bioactius ([213]. S'uneixen a un disacàrid comú en diferents receptors cel.lulars i proteïnes de la matriu extracel.lular. Mitjançant la seva habilitat reconeixent estructures específiques de glúcids, les galectines són potents mediadors solubles involucrats en la comunicació de les cèl.lules del sistema

immunitari, senyalització, interaccions entre hoste i microbi, homeostasi de cèl.lules T, preservació de la tolerància fetomaterna i supressió de patologia autoimmune. A més, les galectines poden contribuir a la creació de microambients immunosupressors en llocs de creixement tumoral i metàstasi ([214]. Estudis recents han demostrat diferents fenotips immunològics en ratolins deficients en diferents membres de la família. Per exemple, ratolins que no disposen del gen per la galectina1 o per la galectina9 presenten respostes Th1 i Th17 incrementades i també respostes inflamatòries augmentades ([215], mentre que ratolins deficients en galectina 3 exhibeixen una inflamació reduïda en models de ratolí d'esclerosi múltiple i artritis ([216]). Per tant, tot i la similitud en seqüència, i la distribució solapada, els membres individuals de la família de les galectines poden jugar diferents papers en el control de l'homeostasi immunitària. Els únics membres que han estat vinculats a les cèl.lules T reguladores han estat la galectina 1 i la galectina 10, com a possibles mecanismes efectors de la regulació, i la galectina 3, que està relacionada amb el control [217]. Mentre que la seva secreció inicia cascades de senyalització d'apoptosi en cèl.lules [218], la galectina3 intracel.lular funciona com a molècula antiapop[219]. En assajos d'inhibició de la galectina 3 en cèl.lules Treg, Ocklenburg i col. demostren que aquestes cèl.lules mantenen la seva capacitat supressora, i desvinculen el paper d'aquesta molècula amb la regulació [207].

Per comprovar com d'estable és aquest fenotip de cèl.lules Treg, es van separar i expandir fraccions de perifèria CD4⁺CD25⁺ i CD4⁺CD25⁻. Es van testar tres cultius expandits per la seva capacitat reguladora i per l'expressió dels gens inclosos a la Taqman®. Els resultats demostren que després de l'expansió, les cèl.lules Treg mantenen el seu fenotip regulador, amb expressió elevada de FOXP3 i CTLA-4, i capacitat reguladora sobre la proliferació de cèl.lules Teff. Les cèl.lules Teff no adquireixen un fenotip regulador després de l'activació, i no presenten capacitat reguladora en els assajos de supressió. I quant a l'expressió de gens, presenten una expressió alta d'algunes molècules que els otorguen funció efectora, com GZMA i GZMB. Després de l'activació, l'expressió de CCR6 i LGALS3 segueix vinculada al fenotip regulador. Aquests resultats coincideixen amb les dades presentades per Ocklenburg i col.[207]. Els autors van comparar els perfils d'expressió gènica d'aquestes cèl.lules Treg amb cèl.lules Teff, ambdues poblacions prèviament activades *in vitro*. I per primer cop, descriu el caràcter de marcador de Treg de la LGALS3. A més, determinen que la GALS3 es troba vinculada a la presència de FOXP3, ja que també troben alts nivells en cèl.lules Teff que havien estat transduïdes retroviralment amb FOXP3 (ThFOXP3) i expandides en cultiu. Pfoertner *et al.* també assajen els

perfils gènics de les Treg vs Teff, en aquest cas sense activar, i entre els gens incrementats a les TReg que no havien estat descrits prèviament troben la LGALS3[220]. Tre[221] confirmen que la galectina3, com altres marcadors de Tregs CTLA4, FOXP3, ICOS, es troba incrementada en les Tregs de fenotip estable (mantenen l'expressió de FOXP3 en cultiu).

En resum, les dades de la proteòmica van ser el punt de partida de l'anàlisi de l'expressió gènica entre les fraccions reguladores i efectores que va permetre evidenciar l'expressió de la galectina 3 en les Tregs de perifèria. Prèviament Solstad i col havien abordat la cerca de marcadors comparant els proteomes de Treg i Teff, i havien trobat, entre altres molècules, la galectina 3 com a marcador de Treg, també en cèl.lules en repòs[222]. Tanmateix, a diferència del nostre abordatge, aquests autors van fraccionar les cèl.lules segons estructures subcel.lulars abans d'iniciar les anàlisis per espectrometria de masses, i això els va permetre identificar altres marcadors de Tregs, juntament amb la galectina3. Kubach i col fent servir proteòmica quantitativa, troben altres membres de la família de les galectines, com són la galectina 10 i la galectina 1[210]. Les nostres dades, juntament amb els treballs de Solstad i Kubach, posen de relleu que tot i ser cèl.lules T en estat de repòs, els perfils proteòmics de les cèl.lules TCD25⁺ i CD25⁻ són diferents. Les nostres dades corroboren que la galectina 3, no només a nivell de proteòmica sino també transcripcional, és un marcador de cèl.lules Treg que aquestes cèl.lules adquireixen a perifèria, ja que la seva expressió és major en Treg vs Treg timus. La seva expressió està vinculada a un fenotip regulador estable ja que l'expressió de la galectina 3 està entre els mateixos nivells que els marcadors de cèl.lula Treg com són FOXP3 i CTLA-4 en les fraccions activades

Capítol 3 de resultats

Cèl·lules T reguladores a perifèria, estudi en individus sans i individus amb diabetis autoimmune

Les cèl·lules Treg tenen un paper fonamental en el manteniment de la tolerància i s'han descrit alteracions en la seva freqüència i funció en diverses malalties autoimmunitàries [223]–[225]. Una d'elles és la diabetis [160]), malaltia en què el nostre laboratori té una llarga tradició de treball. Així, ens vam proposar revisar les característiques d'aquesta població en pacients diabètics en comparació amb individus sans.

Informació de context

A perifèria les cèl·lules T es troben amb una gran diversitat d'antígens, molt d'ells procedents de l'ambient extern, fet que genera diferents estats d'activació en els limfòcits T. L'activació d'aquestes cèl·lules indueix l'expressió de CD25 en diferents graus, i es genera un ampli ventall de cèl·lules T CD25⁺. Al timus, la majoria de timòcits CD25⁺ es corresponen a cèl·lules T reguladores, ja siguin CD4SPCD25⁺ o DPCD25⁺. En canvi, a perifèria les cèl·lules T_{reg} naturals CD25^{hi} es dilueixen amb altres cèl·lules TCD4⁺ que no presenten capacitat supressora però sí que expressen CD25. És per això que CD25 perd especificitat com a marcador de Treg a perifèria. A la sang de cordó es pot observar un pas entremig entre aquestes dues situacions extremes (figura 3.1). En aquest teixit, els limfòcits T tan sols han entrat en contacte amb antígens de la mare, a banda dels seus propis com a individu, aquells que els han dirigit en el seu procés selectiu de maduració al timus. I a banda de les cèl·lules amb alts nivells d'expressió de CD25, que es correspondrien amb les cèl·lules Treg, ja n'hi ha d'altres amb baixa expressió de CD25 que es corresponen a cèl·lules T activades.

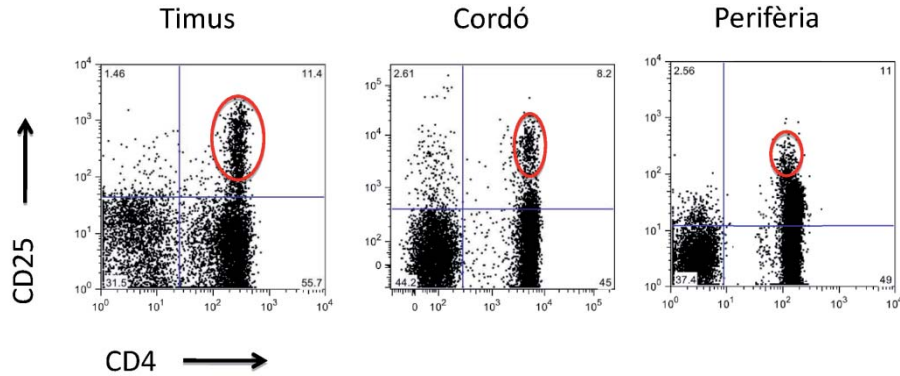


Figura 3.1. Evolució de la població de T_{reg} naturals en el seu procés de maduració en diferents etapes de la vida immunològica d'un individu. Les cèl·lules T_{reg} pertanyen a la població de limfòcits $TCD4^+$ amb elevada expressió de CD25, i a mesura que avancen en el seu procés maduratiu, que implica una sortida del timus a perifèria, es dilueixen. A cordó s'observa una situació entremig, on encara la freqüència de Treg és alta però comença a baixar a causa de la barreja amb altres cèl·lules $TCD4^+$ activades.

3.1. Anàlisi de la freqüència de les fraccions cel·lulars $TCD4^+$ segons l'expressió de CD25 a les mostres de sang perifèrica de controls i pacients

3.1.1. Estratègia d'anàlisi de les fraccions cel·lulars $TCD4^+$ segons CD25 i grups d'estudi

Les cèl·lules Treg naturals es defineixen per l'elevada expressió de CD25. Per analitzar aquesta població en sang de pacients amb DT1, es va elaborar un detallat estudi citomètric per permetre la comparació entre individus (figura 3.2).

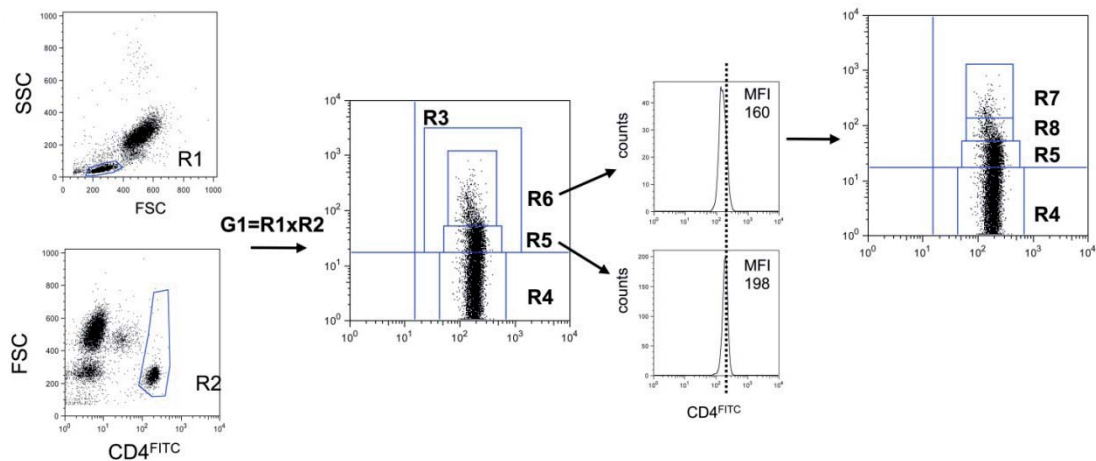


Figura 3.2. Estratègia d'anàlisi de les fraccions cel·lulars $TCD4^+$ segons l'expressió de CD25 en mostres de sang d'individus adults. Les cèl·lules $T CD4^+$ ($G1$) es van seleccionar segons les seves propietats de complexitat i tamany i l'elevada expressió de CD4. La regió $R4$ per les cèl·lules $CD25^-$ es va definir mitjançant la tinció amb anticossos anti- $CD4-FITC$ i un control d'isotip marcat amb $PE-Cy5$. El total de cèl·lules $CD25^+$ ($CD25^+T$, $R3$) es van definir tenyint amb anticossos anti- $CD4-FITC$, control d'isotip marcat amb PE i anti- $CD25-PE-Cy5$. El lleuger decrement en la MFI de $CD4$ es va usar per definir les fraccions cel·lulars $CD25^{lo}$ ($R5$) i les $CD25^{bright}$ ($R6$). $R6$ es va subdividir en $CD25^{high}$ ($R7$, events que queden fora de la població principal) i $CD25^{med}$ ($R8$).

L'expressió de CD25 en les cèl·lules T CD4⁺ no és bimodal, per això, a l'hora de discriminar entre les cèl·lules Treg (amb alts nivells de CD25 o CD25^{bright}, R6) de la resta de cèl·lules T CD25⁺ vam fer ús de la disminució del nivell d'intensitat d'expressió (MFI) de CD4 característic de la població Treg. Després d'haver analitzat més de 100 mostres de controls i pacients, vam poder determinar de forma experimental que la relació promig entre la MFI de CD4 a CD25⁺ i CD25^{bright} era d'1,2. Les cèl·lules contingudes en R6 es van separar en funció de l'expressió de CD25 en R7 i R8. Així, les cèl·lules T CD4⁺ es van separar en cèl·lules TCD4⁺CD25⁺ totals (CD25T, R3), CD25^{lo} (R5), CD25^{med} (R8) i CD25^{hi} (R7). Les mostres de pacients amb malaltia de Graves (GD) es van analitzar en paral·lel per establir una comparació amb una altra malaltia autoimmunitària òrgan-específica. Les dades sobre els individus inclosos a l'estudi es mostren a la taula 3.1.

Grup	n	Edat ^a	Sexe		Presència d'autoanticossos						
			M	F	GAD			TPO			
					Neg	Pos	ND	Neg	Pos	ND	
Controls	46	32,7±9,9	24	22	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GD	31	36,5±11	8	23	NA	NA	NA	4	10	17	
T1D	40	29,2±8,0	25	15	2	22	16	NA	NA	NA	

GAD, descarboxilasa de l'àcid glutàmic; NA, no aplicable; ND, no disponible; neg, negatiu, pos, positiu; TPO, peroxidasa tiroidea.

^aS'indica l'edat en anys com a promig amb la SD

Taula 3.1. Informació dels individus per grup d'estudi. S'indica per cada grup d'estudi el número d'individus, l'edat promig, el sexe i la presència d'autoanticossos.

3.1.2. El percentatge de CD25T però no el de cèl·lules CD25^{bright} està disminuït en pacients respecte controls

El percentatge de CD25T de les mostres de T1D i GD (25,6±8.9 i 27±8,5, respectivament) va ser significativament més baix que a controls (32±9, p<0,002). No obstant, aquest efecte és resultat de la disminució de la fracció cel·lular CD4⁺CD25^{lo} (26,8±8,5 en controls, 20,6±7,6 en T1D i 22,2±8 en GD, p<0,002) (figura 3.3). No es van trobar diferències en les cèl·lules Treg, probablement a causa del seu baix percentatge a perifèria.

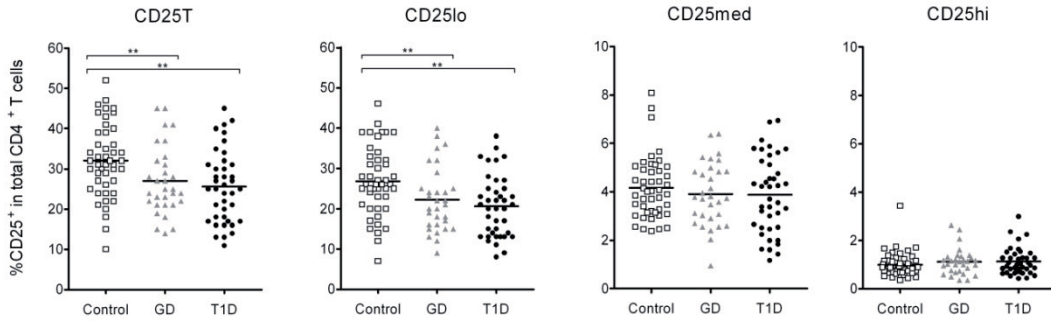


Figura 3.3. Estratègia d'anàlisi de les fraccions cel·lulars TCD4⁺ segons l'expressió de CD25 en mostres de sang d'individus adults. La freqüència de les fraccions cel·lulars segons expressió de CD25 es va analitzar en controls i pacients, i es va determinar una disminució estadísticament significativa de les cèl·lules CD25^T ($p < 0,002$) i de les CD25^{lo} ($p < 0,002$) en pacients T1D i GD respecte controls, però no en les cèl·lules CD25^{hi}. Es va aplicar un test de variances ANOVA *one-way* seguit d'anàlisi *post-hoc* Tukey-Kramer.

Tot i així, quan es va comparar el rendiment de separació cel·lular de Treg a partir del mateix volum de sang de pacients T1D i controls, aquest va ser significativament més baix en pacients (figura 3.4)(cèl·lules T CD4⁺CD25^{hi}: 1,12±0,4 per controls, 0,45±0,27 per T1D, $p < 0,01$; PBMCs: 50,67±17,36 per controls, 38,36±11,56 per T1D; cal multiplicar els valors $\times 10^6$ per tenir número absolut de cèl·lules).

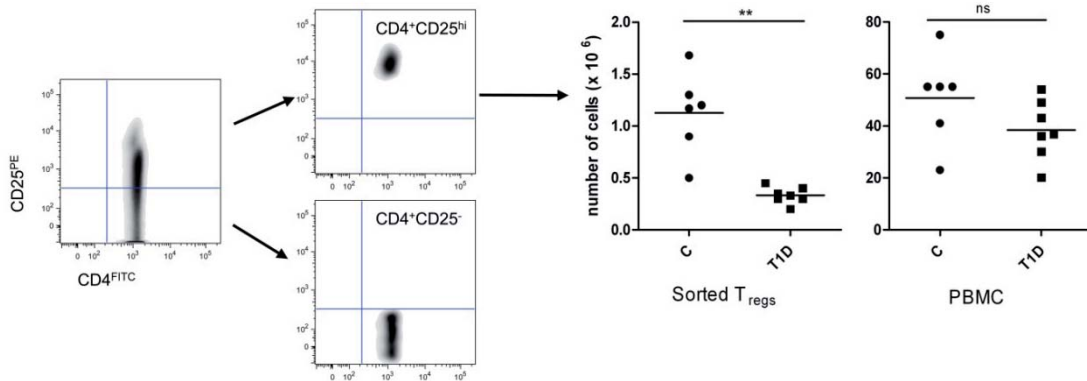


Figura 3.4. Estratègia d'anàlisi de les fraccions cel·lulars TCD4⁺ segons l'expressió de CD25 en mostres de sang d'individus adults. Es van separar les cèl·lules TCD4⁺ CD25^{bright} i CD25⁻ de mostres de PBMCs de controls i de pacients. El rendiment de la separació de cèl·lules Treg (CD4⁺CD25^{hi}) va ser significativament més baix en T1D que en controls ($p < 0,01$), mentre que no va haver-hi diferències en el recompte de PBMCs. Es va aplicar un test t-Student per l'anàlisi estadística.

3.2. Disminució de les cèl·lules TCD4⁺CD25⁺GITR⁺ circulants en els pacients T1D

Per definir millor les cèl·lules Treg, es van estudiar altres marcadors de superfície, com són CD122, CD95, CD45RO, CD62L, CCR4, CCR5, GITR, CD54 i CD127, i marcadors citoplasmàtics, com són CTLA-4 i FOXP3 (figura 3.5).

El fenotip FOXP3⁺CD152⁺CD127^{low}, propi de Treg, es va confirmar per les fraccions CD25^{bright} a pacients i controls, i només es van trobar diferències significatives entre pacients i controls en l'expressió de GITR (figura 3.6). El percentatge de cèl·lules GITR⁺ estava reduït en la població CD25^{hi} de T1D (32,6±11 en T1D respecte 45,2±15,7 en controls, p<0,0009), i també, tot i que en menor proporció, en les cèl·lules CD25^{med} (p<0,01) i CD25^{lo} (p<0,02). L'anàlisi de l'expressió de GITR en les fraccions cel·lulars de CD25 de donants representatius dels controls i dels pacients amb T1D es mostren a la figura 2.7. L'expressió de GITR en els pacients amb GD no va diferir de la dels donants sans, fet que suggereix que aquest fenotip era específic de les cèl·lules T dels pacients T1D.

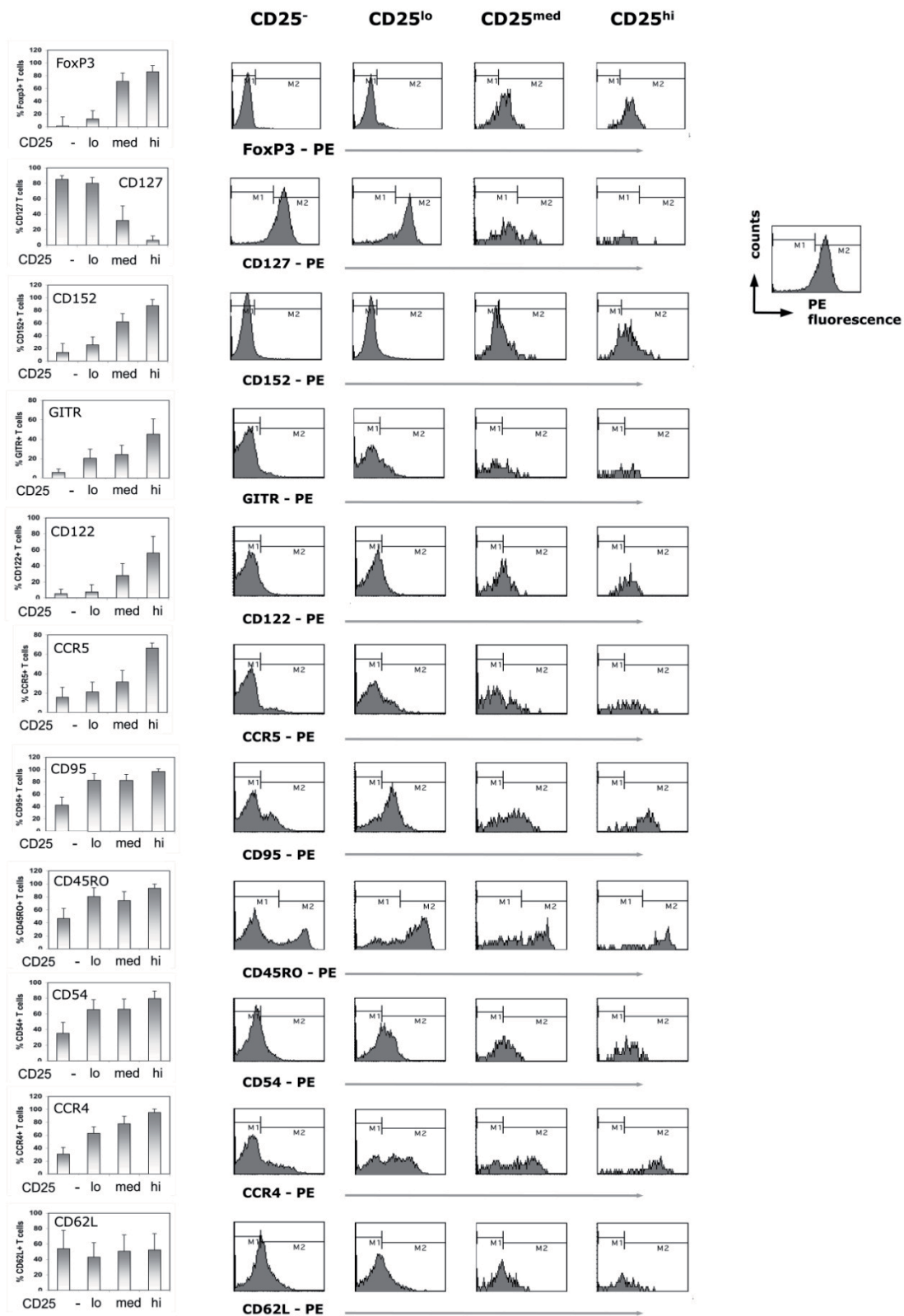


Figura 3.5. Anàlisi per citometria de flux de les fraccions cel·lulars TCD4⁺ de les mostres de controls. FOXP3, CD152 i CD127 són els millors marcadors per definir la població de cèl·lules Treg, el fenotip de les quals és FOXP3⁺CD152⁺CD127^{lo}. El baix percentatge de GITR es va observar per totes les fraccions CD25⁺, però va resultar ser l'únic marcador que es comportava diferent entre les fraccions CD25^{med} i CD25^{hi}. Altres molècules de superfície associades al fenotip de Treg també es van analitzar, com són CD122, CCR5, CD95, CD45Ro, CD54, CCR4 i CD62L.

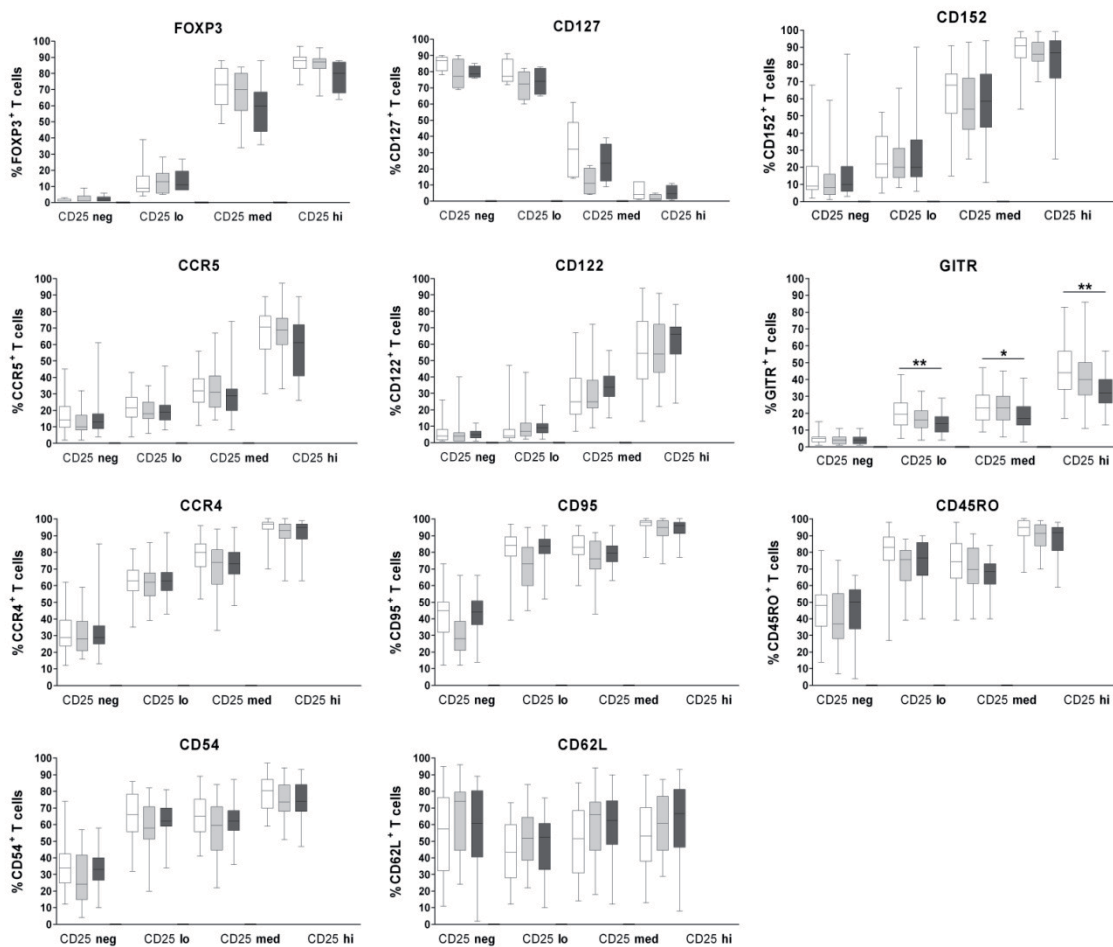


Figura 3.6. La freqüència de cèl·lules GITR⁺ es va trobar significativament reduïda en les fraccions cel·lulars TCD4⁺CD25⁺ de pacients diabètics respecte controls. Quan es va comparar l'expressió dels marcadors de Treg entre mostres, l'única diferència significativa es va trobar en el GITR en T1D respecte controls. La freqüència de cèl·lules GITR⁺ dels pacients diabètics es troba reduïda en totes les fraccions CD25⁺, sent la més significativa la reducció en la fracció CD25^{hi} ($p < 0,0009$). L'estadística es va realitzar usant un test de varianza ANOVA one-way seguit d'una anàlisi *post-hoc* Tukey-Kramer. Controls, caixes blanques; GD, caixes gris clar; T1D, caixes gris fosc.

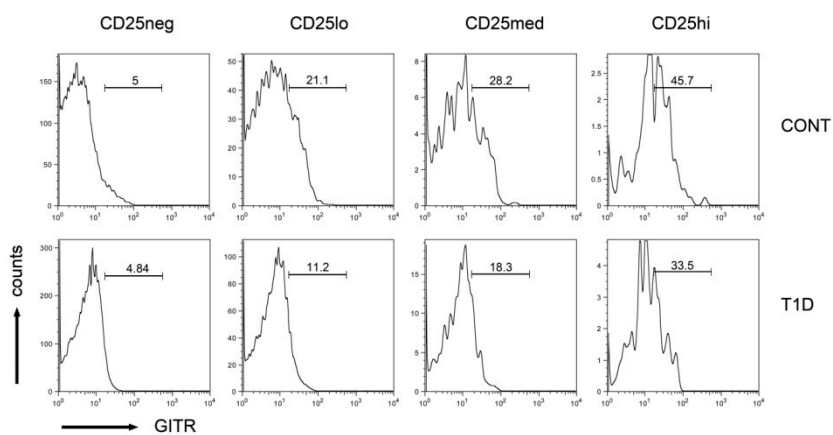


Figura 3.7. Anàlisi de l'expressió de GITR en les fraccions de CD25 de mostres representatives dels donants controls i diabètics. Els histogrames mostren el percentatge de GITR⁺ per cada fracció cel·lular segons la seva expressió de CD25. Es mostren individus representatius de cada grup d'estudi, control i T1D, per evidenciar que el percentatge de GITR està reduït en cada fracció cel·lular per el pacient diabètic en comparació amb el control.

Per analitzar si aquesta freqüència reduïda anava acompanyada d'una disminució en el nivell d'expressió del GITR, es va mesurar la MFI de GITR en controls i T1D (figura 2.8). La MFI de GITR estava significativament disminuïda en el total de cèl·lules CD4⁺CD25⁺ de pacients T1D respecte controls (figura 3.8.A), i aquesta disminució s'observava també en totes les fraccions cel·lulars CD25⁺ (figura 3.8.B). De nou, la major significació estadística es va trobar en les cèl·lules TCD25^{hi} entre pacients T1D i controls (32,5±6 en T1D respecte 39,4±6 en controls, p<0,001).

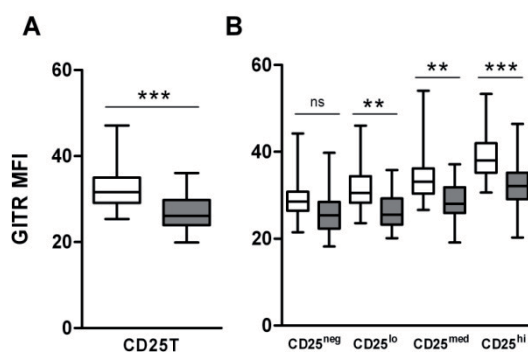


Figura 3.8. El nivell d'expressió de GITR es va trobar significativament reduït a les fraccions de cèl·lules TCD4⁺CD25⁺ de pacients T1D respecte controls. El nivell d'expressió de GITR es va mesurar per mitjà de la MFI en el total de cèl·lules T CD4⁺CD25⁺ (CD25T) (A) i en les fraccions de CD25 (B) de les mostres de controls (caixes blanques) i de T1D (caixes grises). La MFI de GITR es va trobar significativament reduïda a les CD25T (p<0,001), i a la resta de fraccions, això és, CD25^{lo} (p<0,01), CD25^{med} (p<0,01) i CD25^{hi} (p<0,001) de pacients respecte controls. Per l'estadística, es va fer un test de varianza ANOVA one-way seguit d'una anàlisi *post-hoc* de Tukey-Kramer.

Per analitzar aquestes diferències a nivell de mRNA, es va realitzar PCR quantitativa de l'expressió de GITR usant mostres de cèl·lules T CD4⁺CD25^{hi} aïllades a partir de PBMCs de pacients diabètics i controls. Els resultats van mostrar un menor nivell d'expressió de GITR en 5 dels 7 pacients diabètics en comparació amb el promig dels controls (n=4). En canvi, l'expressió de FOXP3 a les mostres va ser equivalent en pacients i controls (figura 3.9). L'estadística aplicada als valors d'expressió de FOPX3 i GITR va determinar que el seu comportament va ser significativament diferent (p<0,01).

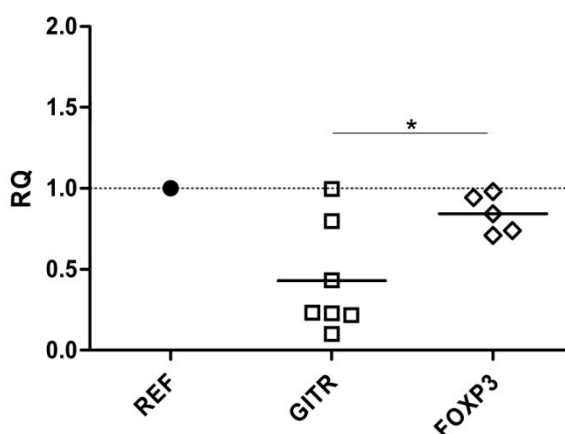


Figura 3.9. L'expressió de GITR es va trobar reduïda en cèl·lules TCD4⁺CD25^{hi} de pacients T1D respecte controls. Es va analitzar per PCR quantitativa l'expressió de GITR en cèl·lules CD4⁺CD25^{hi} de PBMCs de pacients (n=7) T1D i controls (n=4). Es va testar en paral·lel l'expressió de FOXP3 com a control experimental (T1D, n=5; C, n=4). Es va usar el mètode -2^{DDCt} per determinar els valors de quantificació relativa. La normalització es va fer amb l'expressió de RPL0 com a gen d'expressió ubíqua. L'expressió relativa de GITR i FOXP3 en pacients respecte controls es va calcular usant un valor de referència. Aquesta referència es correspon al valor Ct promig per cada gen diana (GITR i FOXP3) en mostres control i al que se li dona un valor arbitrari d'1 (cercle negre). L'expressió relativa de GITR es va trobar reduïda 2 vegades en promig de 5 de 7 mostres de Treg de T1D. No es van trobar diferències per FOXP3. Es va aplicar un test *t-Student* als valors de GITR i FOXP3 que va determinar que el seu comportament era significativament diferent ($p<0,01$).

3.3. El baix percentatge de cèl·lules T GITR⁺ es manté després de l'expansió *in vitro* de T_{reg} de pacients T1D

L'expressió de GITR es regula a l'alça en cèl·lules T després de l'activació. Per analitzar si es mantenia el fenotip després de l'expansió *in vitro*, les cèl·lules Treg (CD4⁺CD25^{bright}) i les cèl·lules Teff (CD4⁺CD25⁻) aïllades de PBMCs de pacients T1D (n=4) i controls (n=4) es van expandir usant la metodologia REM descrita per el cultiu de cèl·lules T en presència d'anticòs anti-CD3 soluble, IL-2 i cèl·lules accessòries autòlogues irradiades (veure l'apartat 4 de Materials i Mètodes). Amb aquest mètode les cèl·lules Treg podien ser expandides de $3-4 \times 10^4$ fins a 500 vegades en 9 dies. Es va analitzar l'expressió de GITR en les poblacions de cèl·lules T expandides per citometria de flux a dies 9 i 15 de cultiu. Com a control del fenotip de les cèl·lules durant l'expansió *in vitro*, es va determinar també l'expressió de CTLA-4 i FOXP3 (figura 3.10). Les nostres dades demostren que l'expressió de GITR s'incrementa després de l'activació tant a Treg com a Teff. No obstant, el percentatge de cèl·lules GITR⁺ va ser més baix per les cèl·lules Treg de T1D que les de controls ($58,2 \pm 12,1$ en T1D respecte $82,3 \pm 7,7$ per controls, $p<0,05$). Aquesta tendència es va mantenir a dia 15 de cultiu, tot i que no va aconseguir significació estadística. No es van trobar diferències per la MFI de GITR (no es mostren les dades). Aquests resultats es van confirmar per PCR quantitativa (figura suplementària, veure [226]. Els nivells de FOXP3 es van mantenir molt baixos a les fraccions Teff als dos temps analitzats, mentre que CTLA-4 es va mantenir alt per Teff i Treg després de 9 dies de cultiu, i només va continuar alt a Treg i no a Teff després de 15 dies de cultiu. Els percentatges de FOXP3⁺ i CTLA-4⁺ van ser estadísticament diferents entre les cèl·lules Treg i Teff als dos temps, fet que indica que la metodologia d'expansió emprada manté el fenotip de les cèl·lules inicials.

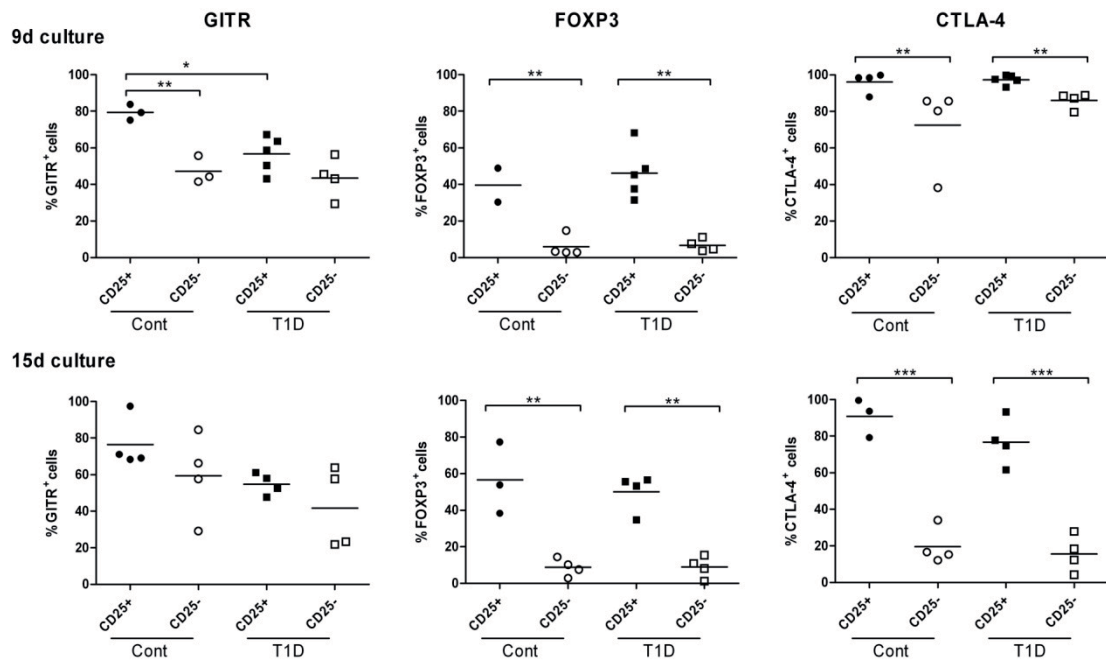


Figura 3.10. La freqüència de cèl·lules GITR⁺ està disminuïda en les cèl·lules T_{reg} expandides de pacients T1D en comparació amb donants sans. Les cèl·lules T CD4⁺CD25^{bright} (CD25⁺) i CD4⁺CD25⁻ (CD25⁻) separades per citometria de flux de controls (n=4) i pacients T1D (n=5) es van expandir en cultiu amb anticòs anti-CD3 i IL-2 en presència de cèl·lules accessorïes irradiades autòlogues. Es van testar els nivells d'expressió de GITR, FOXP3 i CTLA-4 mitjançant citometria de flux de les cèl·lules CD25⁺ i CD25⁻ de controls i pacients a dies 9 (panells superiors) i 15 (panells inferiors) de cultiu. La freqüència de cèl·lules GITR⁺ en la fracció CD25⁺ de T1D es va trobar significativament reduïda respecte controls ($p < 0,05$) després de 9 dies de cultiu. Diferències significatives també es van trobar pels marcadors intracitoplasmàtics FOXP3 i CTLA-4 entre les fraccions de cèl·lules expandides CD25⁺ i CD25⁻ als dos punts de temps analitzats. Es va realitzar un test de varianza ANOVA *one-way* seguit d'una anàlisi *post-hoc* de Tukey-Kramer. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.4. El baix percentatge de cèl·lules T GITR⁺ no afecta a la capacitat de supressió de les cèl·lules Treg expandides de pacients T1D

Per testar si la reducció del percentatge de cèl·lules GITR⁺ en les cèl·lules T_{reg} expandides de pacients T1D afectava a la seva capacitat reguladora, es van realitzar assajos de supressió. Com a cèl·lules T responedores (Teff), es van usar cèl·lules T CD4⁺CD25⁻ aïllades magnèticament de PBMCs al·logènics de donants control. Les cèl·lules Treg dels cultius de 9 i 15 dies de pacients T1D (n=2) i controls (n=2) es van barrejar amb les cèl·lules responedores en presència d'esferes recobertes amb anticòs anti-CD3 i anti-CD28 en un assaig de supressió a diferents relacions de cèl·lules Treg:Teff com es mostra a la figura 3.11. Es van aconseguir els mateixos nivells de supressió de les cèl·lules Treg expandides de controls i pacients als dos temps. Per tant, hem adaptat un mètode molt eficient per expandir cèl·lules Treg i hem demostrat que les cèl·lules Treg de T1D expandides amb la metodologia REM suprimeixen als mateixos nivells que les control, malgrat que en aquestes condicions d'activació, les Treg de pacients expressen menys GITR que les de controls (figura 3.10).

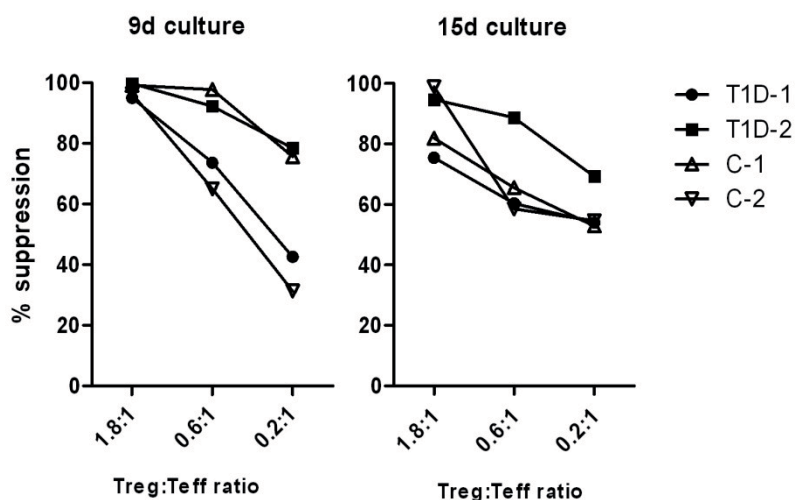


Figura 2.11. Les cèl·lules T_{reg} expandides de controls i pacients T1D van demostrar la mateixa capacitat de supressió. Les cèl·lules T_{reg} expandides en cultiu de controls (n=2, símbols blancs) i pacients T1D (n=2, símbols negres) es van assajar per determinar la seva capacitat de suprimir la proliferació de cèl·lules $T CD4^+CD25^-$ (Teff) al·logèniques estimulades amb boles recobertes amb anti-CD3 i anti-CD28. El percentatge de supressió es va calcular com s'indica: $100 - (100 \times c.p.m. Treg:Teff \text{ a diferents ratios} / c.p.m. Teff)$. Es van assolir elevats nivells de supressió per ambdós grups de mostres als dos punts de temps analitzats.

3.5. El baix percentatge de GITR en les cèl·lules $T CD25^{**}FOXP3^+$ de pacients T1D es manté en cultiu a curt termini sota condicions subòptimes d'estimulació

Vam voler estudiar l'expressió de GITR i la supervivència de les cèl·lules Treg en cultiu a curt termini sota condicions d'estimulació òptima i subòptima. Amb aquesta finalitat es van descongelar PBMCs de pacients T1D i controls i es van mantenir en cultiu durant 96 i 120h amb boles recobertes d'anti-CD3 i anti-CD28 o sense estimulació externa, només amb medi de cultiu (figura 3.12). En medi, només les cèl·lules $CD25^{bright}$ expressaven GITR, en contrast amb les cèl·lules activades amb boles que van assolir nivells d'expressió de GITR màxims (figura 3.12.A). Després de 7 dies de cultiu en condicions subòptimes, les cèl·lules $CD25^{bright}$ eren totes $FOXP3^+$ i expressaven alts nivells de GITR (figura 3.12.B). Quan comparem controls i pacients, l'increment en l'expressió de GITR després d'una activació òptima en cultiu a curt termini va ser el mateix en els dos grups. En canvi, sota condicions subòptimes d'estimulació, aquest increment en l'expressió de GITR va ser més baix en T1D que en controls (tot i que no va assolir significació estadística) (figura 3.12.C), repetint la tendència observada a PBMCs (figures 3.6 i 3.7) i a cèl·lules T expandides a llarg termini (figura 3.10). Aquestes condicions d'estimulació subòptima van resultar en una

disminució de les cèl·lules CD25^{lo} i un increment de les cèl·lules CD25^{bright} a pacients i controls. L'expressió de GITR en aquestes cèl·lules va mostrar els mateixos resultats descrits per les cèl·lules analitzades *ex vivo*: només la fracció CD25^{bright} era GITR⁺ en els dos grups però amb nivells significativament més baixos a pacients respecte controls (valors, $p < 0,05$) (fig 3.12.D). Aquests resultats suggereixen que enfront d'una estimulació subòptima, les cèl·lules amb un fenotip regulador FOXP3⁺GITR⁺ es mantenen en cultiu, però en números més baixos a pacients T1D.

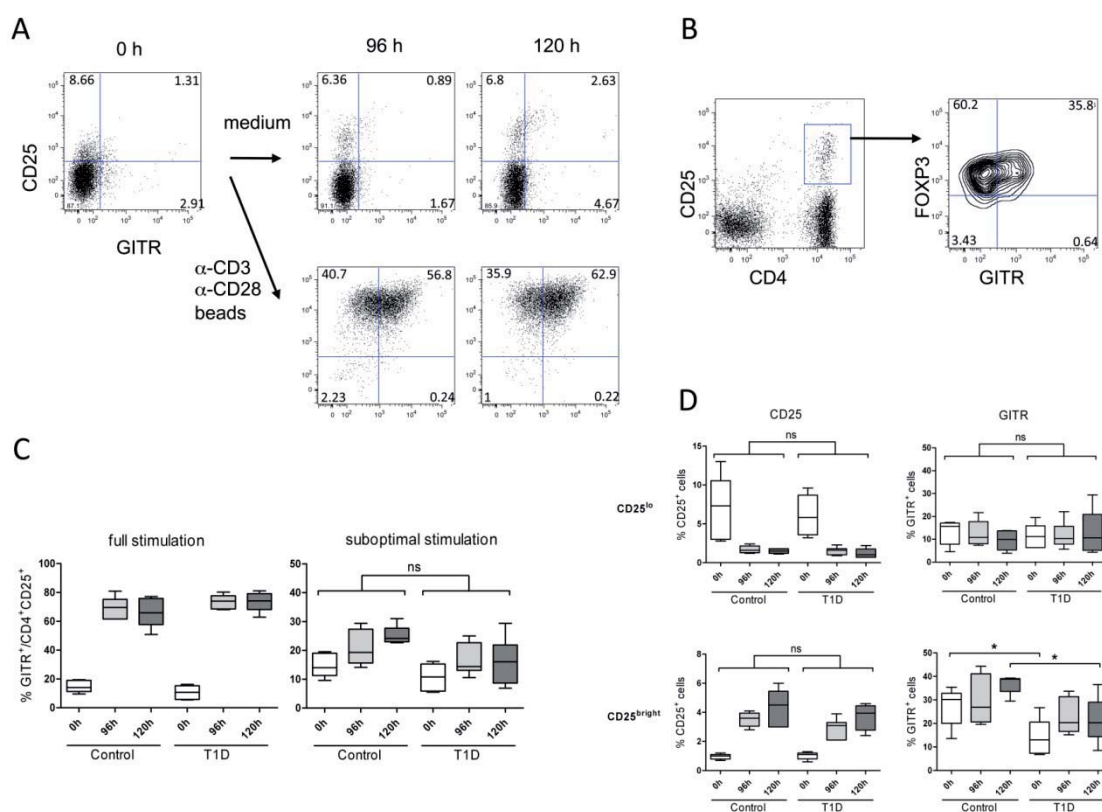


Figura 3.12. Disminució del percentatge de cèl·lules GITR⁺ en les cèl·lules T_{reg} CD25^{bright}FOXP3⁺ de pacients T1D en cultiu a curt termini amb condicions subòptimes d'estimulació. A. Els PBMCs es van mantenir en cultiu durant 96 i 120h amb boles recobertes d'anti-CD3 i anti-CD28 o sense estímul extern, només en medi. En les condicions subòptimes d'estimulació, només les cèl·lules CD25^{bright} expressaven GITR, en contrast amb les cèl·lules altament activades (per condicions òptimes d'estimulació), que van regular GITR a l'alça fins un màxim. B. Després de 7 dies de cultiu sense estimulació, les cèl·lules CD25^{bright} eren totes FOXP3⁺ i expressaven alts nivells de GITR. C. L'augment de l'expressió de GITR després de l'activació òptima a través del TCR a curt termini va ser idèntic en les mostres controls (n=7) i T1D (n=5). Sota condicions subòptimes d'estimulació, aquest increment del GITR va ser més baix en T1D que en controls, malgrat que no es va arribar a la significació estadística. D. En condicions subòptimes d'estimulació, només la fracció CD25^{bright} va créixer en percentatge. La majoria de cèl·lules GITR⁺ a controls i pacients es van trobar entre les cèl·lules CD25^{bright}. La freqüència de cèl·lules GITR⁺ en aquesta fracció va ser significativament més baixa a T1D que a controls abans ($p < 0,02$) i després de 120h de cultiu ($p < 0,05$). Es va realitzar un test de variances ANOVA *one-way* seguit d'una anàlisi *post-hoc* de Tukey-Kramer. * $P < 0,05$; ns, no significatiu estadísticament. En A i B es mostra un donant sa representatiu.

3.6. Les cèl·lules T CD25⁺FOPX3⁺ de pacients T1D són més susceptibles a l'apoptosi que les seves equivalents de controls

Per estudiar si la reducció de GTR estava relacionada a la seva funció anti-apoptòtica, vam estimular les cèl·lules Treg expandides de T1D i controls durant 3 dies amb boles recobertes amb anti-CD3 i anti-CD28 i després les cèl·lules es van incubar amb estímuls apoptòtics: anticòs anti-CD3 unit a placa, anticòs anti-CD95 o medi. Els resultats es mostren a la figura 3.13. Com a norma, les cèl·lules Treg dels pacients van ser més susceptibles a la inducció de l'apoptosi mediada per CD95 que les T_{reg} de controls. La diferència promig va ser propera a 2x a temps més primerencs (24h) i amb tendència a convergir després de 48 (1,3x) i 72h (valors iguals). El comportament de les corbes va ser estadísticament significatiu diferent entre controls i pacients ($p < 0,03$), i va seguir la mateixa tendència en tots els experiments realitzats ($n=3$). Aquestes diferències entre controls i pacients van ser independents dels nivells d'expressió de CD95, que eren equivalents en els dos grups (no es mostren les dades), tal i com passava en PBMCs (figura 3.6). Cal destacar que l'increment en l'apoptosi en les cèl·lules Treg de pacients respecte controls també va ser significatiu quan les cèl·lules es van cultivar en medi durant 72h (increment de 2,7x, $p < 0,05$), sense cap estímulo apoptòtic específic. Això suggereix que aquest comportament observat per l'estimulació amb anti-CD95, també podria aplicar-se a la supervivència homeostàtica de les cèl·lules Treg de pacients T1D. Ambdues poblacions de Treg van ser resistents a l'apoptosi mediada per la senyalització a través del TCR (quan es va usar anti-CD3 unit a placa), tal i com estava descrit [227]. En canvi, les cèl·lules T_{eff} van ser molt susceptibles a la inducció d'apoptosi a través del TCR i de CD95, sense diferències significatives entre pacients i controls (no es mostren les dades).

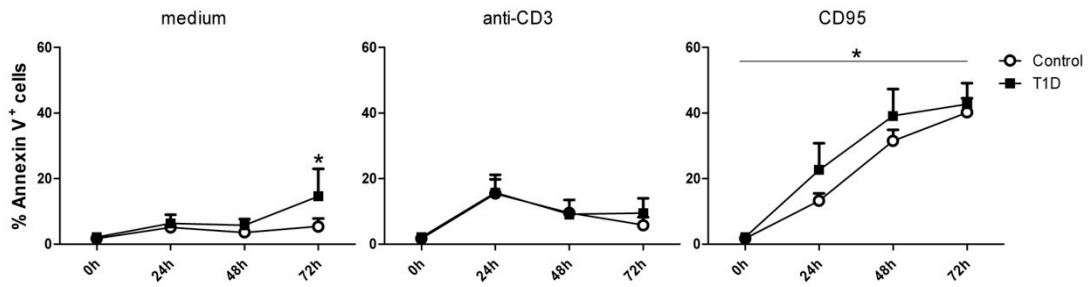


Figura 3.13. Les cèl·lules Treg de pacients T1D són més susceptibles a l'apoptosi que les seves equivalents de controls. Les cèl·lules T expandides de pacients i controls es van estimular durant 3 dies amb boles recobertes d'anti-CD3 i anti-CD28 i després incubades en presència o absència d'estímuls apoptòtics (anti-CD3 o anti-CD95) a diferents temps (0-72h). Els resultats es mostren com a promig dels valors de les mostres control (n=3) i T1D (n=4), i indiquen que: en absència d'estímul, les cèl·lules T_{reg} de pacients patien nivells més elevats d'apoptosi després de 72h de cultiu (panell esquerre; $p < 0,05$); les cèl·lules T_{reg} de controls i pacients no eren susceptibles a l'apoptosi mediada pel TCR (panell central); i que les cèl·lules T_{reg} de pacients eren significativament més susceptibles a l'apoptosi mediada per CD95 que les T_{reg} de controls (panell dret; $p < 0,03$, l'estadística s'aplica al comportament de la corba). Es va realitzar un test de variances ANOVA *two-way* seguit d'una anàlisi *post-hoc* de Bonferroni. * $P < 0.05$.

Discussió - Capítol 3

En aquest capítol describim un decrement consistent de la freqüència de cèl.lules Treg (CD4⁺CD25^{bright}) de pacients T1D en comparació amb mostres controls, així com en mostres de cèl.lules Treg expandides *in vitro* en presència d'anti-CD3 soluble o sota un estímul fluix. A més, les cèl.lules Treg de pacients mostren una susceptibilitat més alta a l'apoptosi mitjançada per CD95 que els controls. Aquest fet suggereix que les Treg de pacients es comporten de manera diferent a les de controls, tot i que la baixa presència de GITR sembla afectar més a la capacitat de supervivència cel.lular que a la funció supressora. També indicar que hem adaptat la metodologia REM per a cèl.lules Treg amb un alt índex de recuperació i un bon manteniment de la capacitat supressió. Així, el cultiu REM podria ser un mètode útil per expandir cèl.lules Treg per immunoteràpia. L'objectiu d'aquest estudi era caracteritzar les cèl.lules Treg CD4⁺CD25^{bright} de sang perifèrica de pacients T1D. Diversos grups han analitzat la freqüència de les cèl.lules T CD4⁺CD25⁺ totals en pacients T1D [160]–[162], [228], [229] va demostrar per primer cop que el número de cèl.lules T CD4⁺CD25⁺ circulants era significativament més baix en pacients de debut de la malaltia en relació amb controls, i la mateixa tendència va ser descrita per Michalek *et al.* [228]. En el mateix context, Jin *et al.* van mostrar una menor freqüència de cèl.lules T CD25⁺ en pacients T1D de més de 14 anys respecte controls, però no en pacients més joves[230].

Els nostres resultats confirmen que per adults T1D i també malalts GD, el nombre total de cèl.lules CD25⁺ van ser més baixos que a controls. L'expressió de CD25 és constitutiva en cèl.lules nTreg i s'indueix gradualment en cèl.lules T activades, tant cèl.lules T efectores com cèl.lules T reguladores induïdes. La seva expressió en cèl.lules T CD4⁺ perifèriques dificulta la separació cel.lular basada en el nivell d'expressió de CD25, i encara més destacable, impedeix l'aplicació del mateix criteri per analitzar diferents mostres. Nosaltres presentem una anàlisi citomètrica precisa que ens ha permès comparar entre els diferents grups de mostres les cèl.lules TCD4⁺CD25^{lo}, com a cèl.lules prèviament activades amb fenotip memòria-efector, les cèl.lules CD4⁺CD25^{med} com a fracció de transició, i les cèl.lules CD4⁺CD25^{hi}, una fracció enriquida en cèl.lules Treguladores. Les diferències observades entre pacients i controls no es van correspondre a un menor nombre de cèl.lules Treg sinó a una baixa freqüència de cèl.lules TCD25^{lo}. Els nostres resultats estan en acord amb dades presentades per McClymont *et al.*[231], que no troben diferències en la freqüència de

nTreg mitjançant l'estudi de la regió no metilada del promotor de FOXP3 entre T1D i controls. Ferraro *et al.* ([232] van descriure una freqüència reduïda de les cèl.lules Treg CD4⁺CD25^{bright} als nòduls limfàtics de pancreas de T1D comparats amb controls, però no van trobar diferències per al compartiment de Treg perifèriques.

Una possible explicació per el baix número de cèl.lules TCD4⁺CD25⁺ circulants a pacients T1D és la pobra activació de cèl.lules T descrita per als pacients ([231], i que està fortament correlacionada amb els genotips de susceptibilitat a la regió ILR2A i amb els baixos nivells de [168]. En el mateix context, un defecte constitutiu en la transducció de senyals del complex CD3/TCR que fa incrementar la sensibilitat a l'apoptosi o l'anèrgia ha estat descrita a pacients T1D ([233]. Hem analitzat diversos marcadors d'activació i de cèl.lules Treg a les fraccions de cèl.lules TCD4⁺. L'anàlisi comparativa de l'expressió de marcadors no va demostrar diferències entre les cèl.lules Treg de pacients i controls a excepció de GITR, un membre de la família de TNFR descrit el 1997 ([234]. GITR s'expressa de forma preferent a les cèl.lules Treg dels limfòcits CD4 en estat de repòs, i ha estat considerat un marcador de cèl.lules Treg. Per altra banda, l'expressió de GITR es regula a l'alça en els limfòcits T un cop s'active[234]. La freqüència de les cèl.lules GITR⁺ en totes les fraccions CD25⁺ va ser significativament més baixa en pacients respecte controls, amb la major significació estadística per la fracció de cèl.lules Treg CD25^{hi}. Resultats similars es van obtenir per la MFI de GITR. Aquesta reducció a nivell de proteïna de GITR en pacients T1D es va validar a nivell de mRNA en cèl.lules Treg CD4⁺CD25^{bright} aïllades per FACS, i els resultats estan en acord amb un treball recent en què cèl.lules T CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} també separades mitjançant FACS de nens acabats de diagnosticar de T1D presentaven una reducció en els nivells d'RNAm de GITR, ICOS i CTLA4 ([235]. Per tant, les nostres dades demostren que en cèl.lules Treg de T1D hi ha un menor nivell d'expressió de GITR i un menor percentatge de cèl.lules GITR⁺.

Per analitzar si la reducció en les cèl.lules GITR⁺ es mantenia en cèl.lules T de pacients T1D expandides *in vitro*, vam adaptar la metodologia REM per a les cèl.lules Treg[171]. Aquest mètode és molt útil per amplificar un petit número altament purificat de cèl.lules T fins a 500-1000 vegades en 15 dies, i fa servir un alt nombre de cèl.lules autòlogues, que actuen com a "feeders", i una concentració subòptima d'anticòs anti-CD3 soluble. De nou, la freqüència de cèl.lules T GITR⁺ es va trobar reduïda en cèl.lules Treg de pacients T1D expandides mitjançant REM en relació als controls. S'ha demostrat que GITR juga un paper en la funció de cèl.lules Treg a rat[236], però la seva funció en la supressió de cèl.lules Treg en humans està encara en discussió. Fent

servir clons de cèl.lules Treg CD4⁺CD25⁺ humanes, Levings *et al.*[237] van demostrar que els anticossos neutralitzadors de GITR no afectaven les seves capacitats de regulació. Tuyaerts *et al.* [238] van demostrar que cèl.lules dendrítiques que expressaven el lligand de GITR (GITRL) donaven senyals coestimuladors a les cèl.lules Treg circulants sense inhibir les seves habilitats de supressió. En canvi, Bianchini *et al.* [239] van descriure que la capacitat de supressió de cèl.lules TCD4⁺CD25^{bright} convencionals així com la de la recentment descrita nova població de Treg GITR⁺CD25^{lo} eren inhibides per un anticòs dirigit contra GITR. Malgrat el baix número de cèl.lules Treg GITR⁺ a T1D, en les nostres mans les cèl.lules Treg de pacients expandides amb REM van ser capaces de suprimir la proliferació de cèl.lules T efectores al·logèniques a nivells similar als dels controls en presència d'esferes recobertes d'anticossos contra CD3 i CD28. Dades semblants van ser descrites per Putnam *et al.*[240], en què feien servir cèl.lules Treg de pacients T1D expandides.

Altres funcions per la senyalització de GITR han estat estudiades a ratolí. D'una banda, GITR és una molècula coestimuladora que indueix la proliferació de les cèl.lules T. van Olffen *et al.*[[241] van descriure una proliferació equilibrada *in vivo* de cèl.lules T convencionals i cèl.lules Treg en ratolins transgènics que expressaven GITRL a les cèl.lules B. Alguns elements que han estat involucrats en la senyalització de GITR són les molècules MS4A4B i MS4A6B, que són membres de la família de receptors dels 4 passos de membrana ([242]. La seva sobreexpressió en una línia cel.lular de limfoma de ratolí va resultar en una senyalització incrementada i producció d'IL-2 en resposta a l'estimulació a través de GITR. Carrier *et al.* ([243] van analitzar també la coestimulació de GITR *in vivo*, en aquest cas van usar un model de ratolí en el què GITRL s'expressava de forma constitutiva en cèl.lules MHC-II⁺. En contrast amb els resultats previs, ells van observar una activació excessiva de les cèl.lules T i infiltració multiorgànica. Aquests resultats apunten de forma conjunta a un clar paper coestimulador del GITR, però l'efecte d'aquesta senyalització depèn del balanç entre activació i regulació que es doni en el context immunològic concret. De fet, s'ha descrit en models animals que la senyalització GITR-GITRL està involucrada en autoimmunitat i inflamació. Ray *et al.*[244] van treballar amb un model de ratolí deficient en cèl.lules B amb tendència a l'autoimmunitat, i van demostrar que una depleció completa de cèl.lules B conduïa a una autoimmunitat clara i una reducció en el número de cèl.lules Treg, ja que les cèl.lules B mantenen l'homeostasi induïnt la proliferació de les cèl.lules Treg a través de la via GITR-GITRL. A més, el bloqueig de la senyalització de GITR amb GITR-Fc correlaciona amb una reducció en la severitat de la malaltia en ratolí amb dany infligit a l'espina dorsal com a model d'inflamació [245]. D'altra banda,

Nocentini *et al.* [246] van demostrar que cèl.lules transfectades amb GITR eren més resistents a la inducció de l'apoptosi que les cèl.lules no transfectades. Més evidències van trobar Spinicelli *et al.*, ja que van descriure la interacció de GITR amb la proteïna citoplasmàtica Siva, que juga un paper antiapoptòtic en resposta a virus i a estrès [247].

Els nostres resultats amb PBMC humans demostren una baixa freqüència de cèl.lules T CD25^{bright}GITR⁺ en la població de cèl.lules Treg en pacients T1D respecte controls. Després de ser completament estimulades, ambdues les cèl.lules Teff i Treg regulen a l'alça l'expressió de GITR. Tanmateix, quan es van mantenir aquestes cèl.lules en cultiu en condicions subòptimes d'activació, en presència de medi de cultiu suplementat amb FCS, només les cèl.lules Treg FOXP3⁺CD25^{bright} van mantenir-se i novament es va trobar una menor freqüència de cèl.lules GITR⁺ a les mostres de T1D en comparació amb els controls. Aquests resultats suggereixen que la menor freqüència de cèl.lules GITR⁺ en la població de Treg de pacients estaria involucrada en la prevenció del seu manteniment complet. A més, el rendiment de la separació mitjançant FACS de cèl.lules Treg a partir de mostres similar de pacients i controls va ser significativament més baix en individus T1D. De forma interessant, l'expansió de cèl.lules Treg de pacients i controls amb un mètode altament eficient (metodologia REM) en presència d'una elevada concentració d'IL-2 i estimulació subòptima, va mantenir la seva capacitat supressora i el seu fenotip, en el que s'inclou la baixa freqüència de GITR a les mostres de pacients. La supervivència de les cèl.lules Treg després de la seva estimulació en pacients i controls es va demostrar a través de la seva resistència a l'apoptosi per la senyalització a través del TCR fent servir pous recoberts amb anticossos contra CD3, com s'havia descrit prèviament per a donants [227]. En contrast, les cèl.lules Treg de pacients van ser més susceptibles a l'apoptosi mediada per CD95 que les mostres de controls. Hi ha evidència de treballs previs que associen un ratio d'apoptosi major al compartiment de cèl.lules Treg de pacients T1D respecte controls ([248]. Així, la baixa freqüència de GITR⁺ que descrivim per als pacients T1D podria estar relacionada amb un impediment de la supervivència de les cèl.lules Treg de pacients, i per tant, amb una reducció del nivell total de regulació de les cèl.lules T.

Discussió final

En aquest treball s'ha estudiat: (i) les cèl.lules T reguladores naturals (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺) al timus, òrgan on es generen i, en particular, la seva evolució amb l'edat; (ii) la caracterització de marcadors de les cèl.lules Treg a perifèria d'individus adults per comparació amb les cèl.lules T reguladores de timus i cèl.lules T efectores de perifèria, i estudiar com es mantenen aquests marcadors després de l'activació *in vitro*; (iii) i finalment, s'ha comparat les cèl.lules T reguladores d'individus amb diabetes tipus 1 i controls per trobar diferències en aquestes cèl.lules a partir d'una mostra no invasiva com és la sang perifèrica.

Les cèl.lules T reguladores són la subpoblació de cèl.lules T que més publicacions ha generat des del 1990, pocs anys abans que S. Sakaguchi publicàs l'associació de la molècula CD25 amb les cèl.lules Treg ([29]. Com es pot veure a la gràfica 1 (dades extretes de Pubmed), en el període d'anys entre el 2010 fins als nostres dies, aquestes cèl.lules dupliquen en número les publicacions de les altres subpoblacions de cèl.lules T com són Th1, Th2 o Th17. La importància d'aquestes cèl.lules és la seva capacitat funcional supressora capaç de controlar la resposta immunitària tant en infeccions agudes com cròniques, malalties autoimmunitàries i, per tant, el potencial que tenen per a la seva aplicació en clínica en la manipulació del sistema immunitari.

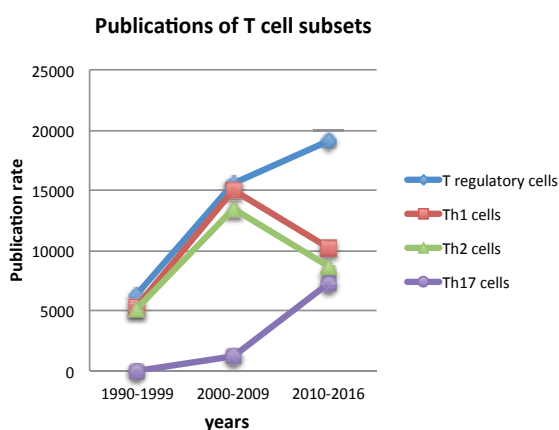


Figura 1. Representació gràfica de l'evolució de les publicacions dels grups destacats de cèl.lules T. S'aprecia que el número de publicacions que més ha incrementat en els darrers anys ha estat el del camp de Tregs, i que darrerament prenen força les Th17.

Fins al dia d'avui, existeixen varis motius que dificulten l'ús d'aquestes cèl.lules en immunoteràpia. En aquest treball de tesi s'ha contribuït a profunditzar en la caracterització d'aquesta població:

1. Quina és la contribució del timus en l'aportació de Treg durant la infantesa?

El timus és l'òrgan generador de les cèl.lules nTreg, però quina és la seva contribució després del naixement del nadó? Les dades que es recullen al capítol 1 d'aquesta tesi descriuen per primer cop a la literatura, fins on sabem, que el timus segueix una inèrcia a la baixa en la producció de cèl.lules T reguladores, que s'inicia a partir del mes de vida i s'estèn fins almenys la primera dècada de vida. Aquesta disminució correlaciona clarament amb un augment de l'expressió de

CD95 en aquestes cèl·lules CD4⁺SPCD25⁺, i també les DPCD25⁺. Aquests resultats suggereixen que de forma lenta però permanent, l'aportació de cèl·lules T reguladores naturals a la perifèria va disminuint. Per altra part, el timus no és aliè a la interacció de l'individu amb el medi extern, fet que provoca l'augment del contingut de les cèl·lules T activades a la perifèria, que poden accedir més fàcilment al timus. Això explicaria aquesta augment de cèl·lules FOXP3⁺ que observem en funció de l'edat. Per tant, no exclouem que part d'aquestes cèl·lules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ puguin procedir de sang perifèrica tal i com suggereixen en el treball recent de Thiault [182].

2. Quins trets mantenen les Tregs de perifèria en adults quan es comparen amb les nTregs d'infants?

El marcador exclusiu de les diferents subpoblacions de cèl·lules T és una dada que de fet no s'ha obtingut per cap dels grups inclosos al gràfic 1, Th1, Th2 i Th17. S'han associat a factors de transcripció, a receptors de quimiocines, però en tots els casos és només a l'experiment on es demostra la funcionalitat el que certifica la classificació d'aquestes cèl·lules T efectores. Això és també el que passa amb les cèl·lules T reguladores. La diferència més important és que les Tregs naturals s'han definit al timus probablement perquè la seva maduració es basa amb una selecció agonista, per afinitat del TCR, a diferència de la resta de cèl·lules T efectores i reguladores induïdes que són producte de la diferenciació a partir de cèl·lules T *naïve* durant la resposta immunitària.

L'objectiu del segon capítol d'aquesta tesi era comparar seguint un abordatge proteòmic les cèl·lules T reguladores CD4⁺CD25^{hi} de perifèria i de timus. La tècnica de l'ICPL va generar un elevat número de proteïnes diferencialment expressades tot i partir de cèl·lules T no activades, però els experiments no van ser reproduïbles entre ells. Per això es va usar una aproximació transcriptòmica i limitada segons els resultats obtinguts a la proteòmica. Per aquest mètode es va poder demostrar que els marcadors més usats i definitoris entre les Tregs tímiques i naturals es mantenen (CD25, CTLA-4, FOXP3), però que hi ha diferències moleculars probablement lligades a l'estat d'activació, que es preveu més alt a perifèria que a timus. En aquest treball, s'ha identificat que les Tregs de perifèria incrementen la seva expressió de Galectina 3, un marcador de Tregs ja establert a la literatura. Notablement, la Galectina-3 es manté expressada a les cèl·lules Tregs activades en comparació amb les T efectores també activades i, el més important, que ho fa a nivells comparables als de FOXP3 o CTLA-4.

En resum, els marcadors essencials de cèl.lules Tregs descrits a les cèl.lules Tregs naturals es mantenen a perifèria i després de l'activació, però aquestes dades suggereixen que s'hauria de fer una distinció entre marcadors estructurals de llinatge i marcadors funcionals, ja que aquests podrien definir-se a la perifèria depenent de com la cèl.lula T reguladora, natural o induïda, s'ha activat a la perifèria.

3. Existeixen diferències entre les cèl.lules Treguladores a pacients amb autoimmunitat, com és el cas de la diabetis tipus 1, en comparació amb individus sans?

L'estudi del fenotip de les cèl.lules Tregs de sang perifèria ens va permetre definir que les cèl.lules T GITR⁺ es troben exclusivament a la fracció de cèl.lules CD25⁺⁺. Aquest estudi es va fer en paral·lel amb l'anàlisi de pacients amb diabetes tipus 1. Tot i ser individus adults, i per tant les cèl.lules Tregs estan barrejades amb les cèl.lules T activades, es van treure conclusions molt interessants com ara que la freqüència de cèl.lules T CD25⁺ està disminuïda a pacients, i especialment la de les cèl.lules T CD4⁺CD25^{lo}. També vam observar que la freqüència de cèl.lules T GITR⁺ estava disminuïda al *pool* de cèl.lules Tregs de diabètics, i que vam trobar vinculat a una major sensibilitat d'aquestes cèl.lules a l'apoptosi, per la qual cosa vam poder concloure que de foma general hi hauria menys capacitat de regulació sobre les cèl.lules T efectores als individus amb T1D.

Les dades d'aquesta tesi han resolt part de les preguntes plantejades actualment, però també obren el pas de noves: i) quin és el grau de cèl.lules T recirculants que accedeixen al timus?; ii) El mecanisme de supressió pot dependre de les condicions en les que les Tregs naturals s'activen a la perifèria?; iii) És la interrelació de les cèl.lules Tregs naturals o induïdes amb les cèl.lules T efectores les causants dels desequilibris de les immunopatologies?

La manca de resposta avui dia a aquestes preguntes fa que les cèl.lules Tregs siguin objecte d'estudi molt important, i aquesta tesi ha contribuït a donar resposta a una petita part d'aquestes preguntes.

Conclusions

CAPÍTOL 1

1. La proporció de les poblacions de timòcits (DN, DP, SPCD4 i SPCD8) varia amb l'edat i principalment s'observa una depleció de les cèl·lules DP en el primer més de vida. Aquest procés fisiològic s'havia descrit previament tant sols en dos treballs anteriors.
2. Amb l'edat els timòcits SPCD4+CD25+ disminueixen de forma significativa.
3. Les cèl·lules DPCD25+ representen un percentatge molt baix (0.9% de les DP), tot i així són una població heterogènia definida per l'expressió dels diferents marcadors usats per fer el fenotip.
4. El fenotip dels timòcits no varia amb l'edat amb excepció de Foxp3+ i CD95+:
 - a. La freqüència de timòcits Foxp3+ incrementa amb l'edat en les SPCD25+. Aquest fet no exclou que la procedència d'aquestes cèl·lules Foxp3+ sigui de la perifèria (major recirculació de les cèl·lules T activades).
 - b. La freqüència de timòcits CD95+ incrementa amb l'edat i sobre tot en les cèl·lules T reguladores. Per tant, amb l'edat es veuria minimitzada l'exportació d'aquesta fracció respecte als timòcits SPCD4CD25-

CAPÍTOL 2

5. La comparació del proteoma entre cèl·lules T reguladores de perifèria i de timus ha permès identificar la Galectina 3 com a marcador de Treg que s'adquireix a la perifèria
6. La Galectina 3 es manté expressada als mateixos nivells que marcadors clàssics de reguladores com Foxp3 o CTLA-4 quan ho comparem amb la fracció de cèl·lules T efectores activades.

CAPÍTOL 3

7. La freqüència de les cèl·lules CD4⁺CD25^{lo} està disminuïda en pacients amb T1D fet que suggeriria un menor estat d'activació en el *pool* de cèl·lules T d'aquests individus.
8. L'estudi del fenotip de cèl·lules Treg de sang perifèrica va permetre definir que les cèl·lules T GITR⁺ estan exclusivament a la fracció de cèl·lules CD4⁺CD25⁺⁺
9. Les cèl·lules Tregs GITR⁺ estan disminuïdes de forma significativa en la fracció de Tregs dels pacients amb T1D, aquest augment està associat a un increment en la sensibilitat a l'apoptosi mediada per CD95, suggerint que hi hauria menys capacitat de supressió de les cèl·lules T efectores en pacients amb diabetes tipus 1.

Apèndix

Publicacions científiques vinculades al període de tesi:

Cristina Xufré, Manuela Costa, Carme Roura-Mir, Eva Codina-Busqueta, Lorena Usero, Eduarda Pizarro, Gabriel Obiols, Dolores Jaraquemada and Mercè Martí. **Low frequency of GITR+ T cells in *ex vivo* and *in vitro* expanded Treg cells from type 1 diabetic patients.** *International Immunology* (2013) Vol 25, No 10, pp 563-574

Eva Codina-Busqueta, Erika Scholz, Pau Marc Muñoz-Torres, Carme Roura-Mir, Manuela Costa, Cristina Xufré, Raquel Planas, Marta Vives-Pi, Dolores Jaraquemada, Mercè Martí. **TCR bias of *in vivo* expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes.** *Journal of Immunology* (2011) Mar 15;186(6):3787-97.

Soledad Carinelli, Cristina Xufré Ballesteros, Mercè Martí, Salvador Alegret, María Isabel Pividori. **Electrochemical magneto-actuated biosensor for CD4 count in AIDS diagnosis and monitoring.** *Biosensors and Bioelectronics* (2015) Dec 15; 74:974-80.

Lorena Usero, Ana Sánchez, Eduarda Pizarro, Cristina Xufré, Mercè Martí, Dolores Jaraquemada, Carme Roura-Mir. **IL-13 pathway alterations impair iNKT cell-mediated regulation of T effector cells in Type 1 Diabetes** (aquest article es troba en segona revisió de la revista *Diabetes*, referència de manuscrit DB15-1350).

Bibliografia

- [1] T. K. Starr, S. C. Jameson, y K. A. Hogquist, «Positive and negative selection of T cells», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, pp. 139-176, 2003.
- [2] R. P. Gale, «Development of the immune system in human fetal liver», *Thymus*, vol. 10, n.º 1-2, pp. 45-56, 1987.
- [3] G. Eberl y D. R. Littman, «Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells», *Science*, vol. 305, n.º 5681, pp. 248-251, jul. 2004.
- [4] S. C. Jameson, «Maintaining the norm: T-cell homeostasis», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, n.º 8, pp. 547-556, ago. 2002.
- [5] V. Appay, D. Sauce, y M. Prelog, «The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals», *Aging*, vol. 2, n.º 2, pp. 78-81, 2010.
- [6] A. L. Gruver, L. L. Hudson, y G. D. Sempowski, «Immunosenescence of ageing», *J. Pathol.*, vol. 211, n.º 2, pp. 144-156, ene. 2007.
- [7] D. Mathis y C. Benoist, «Levees of immunological tolerance», *Nat. Immunol.*, vol. 11, n.º 1, pp. 3-6, ene. 2010.
- [8] D. L. Mueller, «Mechanisms maintaining peripheral tolerance», *Nat. Immunol.*, vol. 11, n.º 1, pp. 21-27, ene. 2010.
- [9] W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K.-J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, y S. M. Wahl, «Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3», *J. Exp. Med.*, vol. 198, n.º 12, pp. 1875-1886, dic. 2003.
- [10] S. P. Cobbold, R. Castejon, E. Adams, D. Zelenika, L. Graca, S. Humm, y H. Waldmann, «Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 172, n.º 10, pp. 6003-6010, may 2004.
- [11] M. Vukmanovic-Stejic, Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. A. Rustin, L. S. Taams, P. C. L. Beverley, D. C. Macallan, y A. N. Akbar, «Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo», *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n.º 9, pp. 2423-2433, sep. 2006.
- [12] H. Groux, A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, y M. G. Roncarolo, «A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis», *Nature*, vol. 389, n.º 6652, pp. 737-742, oct. 1997.
- [13] H. Fukaura, S. C. Kent, M. J. Pietrusewicz, S. J. Khoury, H. L. Weiner, y D. A. Hafler, «Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients», *J. Clin. Invest.*, vol. 98, n.º 1, pp. 70-77, jul. 1996.
- [14] S. Strober, S. Dejbachsh-Jones, P. Van Vlasselaer, G. Duwe, S. Salimi, y J. P. Allison, «Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8-surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 143, n.º 4, pp. 1118-1122, ago. 1989.
- [15] Y. Liu, P. Zhang, J. Li, A. B. Kulkarni, S. Perruche, y W. Chen, «A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells», *Nat. Immunol.*, vol. 9, n.º 6, pp. 632-640, jun. 2008.

- [16] H. Sigmundsdottir y E. C. Butcher, «Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking», *Nat. Immunol.*, vol. 9, n.º 9, pp. 981-987, sep. 2008.
- [17] J. S. Hale y P. J. Fink, «Back to the thymus: peripheral T cells come home», *Immunol. Cell Biol.*, vol. 87, n.º 1, pp. 58-64, ene. 2009.
- [18] Y. Nishizuka y T. Sakakura, «Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice», *Science*, vol. 166, n.º 3906, pp. 753-755, nov. 1969.
- [19] A. Kojima, O. Taguchi, y Y. Nishizuka, «Experimental production of possible autoimmune castritis followed by macrocytic anemia in athymic nude mice», *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 42, n.º 4, pp. 387-395, abr. 1980.
- [20] O. Taguchi y Y. Nishizuka, «Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: T cell requirement in adoptive cell transfer», *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 42, n.º 2, pp. 324-331, nov. 1980.
- [21] S. Sakaguchi, T. Takahashi, y Y. Nishizuka, «Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis», *J. Exp. Med.*, vol. 156, n.º 6, pp. 1577-1586, dic. 1982.
- [22] S. Sakaguchi, K. Fukuma, K. Kuribayashi, y T. Masuda, «Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease», *J. Exp. Med.*, vol. 161, n.º 1, pp. 72-87, ene. 1985.
- [23] H. Smith, Y. Sakamoto, K. Kasai, y K. S. Tung, «Effector and regulatory cells in autoimmune oophoritis elicited by neonatal thymectomy», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 147, n.º 9, pp. 2928-2933, nov. 1991.
- [24] H. Smith, Y. H. Lou, P. Lacy, y K. S. Tung, «Tolerance mechanism in experimental ovarian and gastric autoimmune diseases», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 149, n.º 6, pp. 2212-2218, sep. 1992.
- [25] S. Sugihara, Y. Izumi, T. Yoshioka, H. Yagi, T. Tsujimura, O. Tarutani, Y. Kohno, S. Murakami, T. Hamaoka, y H. Fujiwara, «Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 141, n.º 1, pp. 105-113, jul. 1988.
- [26] F. Powrie y D. Mason, «OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset», *J. Exp. Med.*, vol. 172, n.º 6, pp. 1701-1708, dic. 1990.
- [27] J. A. Ledbetter y L. A. Herzenberg, «Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens», *Immunol. Rev.*, vol. 47, pp. 63-90, 1979.
- [28] M. Asano, M. Toda, N. Sakaguchi, y S. Sakaguchi, «Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation», *J. Exp. Med.*, vol. 184, n.º 2, pp. 387-396, ago. 1996.
- [29] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, y M. Toda, «Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.», *J. Immunol.*, vol. 155, n.º 3, pp. 1151-1164, ene. 1995.
- [30] E. Suri-Payer, A. Z. Amar, A. M. Thornton, y E. M. Shevach, «CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and

- represent a unique lineage of immunoregulatory cells», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 160, n.º 3, pp. 1212-1218, feb. 1998.
- [31] R. S. Wildin y A. Freitas, «IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives», *J. Autoimmun.*, vol. 25 Suppl, pp. 56-62, 2005.
- [32] B. R. Powell, N. R. Buist, y P. Stenzel, «An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy», *J. Pediatr.*, vol. 100, n.º 5, pp. 731-737, may 1982.
- [33] W. L. Russell, L. B. Russell, y J. S. Gower, «EXCEPTIONAL INHERITANCE OF A SEX-LINKED GENE IN THE MOUSE EXPLAINED ON THE BASIS THAT THE X/O SEX-CHROMOSOME CONSTITUTION IS FEMALE», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 45, n.º 4, pp. 554-560, abr. 1959.
- [34] C. L. Bennett, J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, y H. D. Ochs, «The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3», *Nat. Genet.*, vol. 27, n.º 1, pp. 20-21, ene. 2001.
- [35] M. E. Brunkow, E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, y F. Ramsdell, «Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse», *Nat. Genet.*, vol. 27, n.º 1, pp. 68-73, ene. 2001.
- [36] R. S. Wildin, F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, y M. E. Brunkow, «X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy», *Nat. Genet.*, vol. 27, n.º 1, pp. 18-20, ene. 2001.
- [37] M. Itoh, T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, y S. Sakaguchi, «Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 162, n.º 9, pp. 5317-5326, may 1999.
- [38] J. D. Fontenot, J. L. Dooley, A. G. Farr, y A. Y. Rudensky, «Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny», *J. Exp. Med.*, vol. 202, n.º 7, pp. 901-906, oct. 2005.
- [39] L. Klein y K. Jovanovic, «Regulatory T cell lineage commitment in the thymus», *Semin. Immunol.*, vol. 23, n.º 6, pp. 401-409, dic. 2011.
- [40] L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, y K. A. Hogquist, «Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, n.º 6, pp. 377-391, jun. 2014.
- [41] N. Ohkura, Y. Kitagawa, y S. Sakaguchi, «Development and maintenance of regulatory T cells», *Immunity*, vol. 38, n.º 3, pp. 414-423, mar. 2013.
- [42] A. L. Bayer, A. Yu, y T. R. Malek, «Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 178, n.º 7, pp. 4062-4071, abr. 2007.
- [43] C.-W. J. Lio y C.-S. Hsieh, «A two-step process for thymic regulatory T cell development», *Immunity*, vol. 28, n.º 1, pp. 100-111, ene. 2008.
- [44] T. R. Malek, A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, y L. Kong, «CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2», *Immunity*, vol. 17, n.º 2, pp. 167-178, ago. 2002.

- [45] X. Tai, M. Cowan, L. Feigenbaum, y A. Singer, «CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2», *Nat. Immunol.*, vol. 6, n.º 2, pp. 152-162, feb. 2005.
- [46] C.-S. Hsieh, Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot, y A. Y. Rudensky, «An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires», *Nat. Immunol.*, vol. 7, n.º 4, pp. 401-410, abr. 2006.
- [47] C.-S. Hsieh, H.-M. Lee, y C.-W. J. Lio, «Selection of regulatory T cells in the thymus», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, n.º 3, pp. 157-167, mar. 2012.
- [48] Y. Kitagawa, N. Ohkura, y S. Sakaguchi, «Epigenetic control of thymic Treg-cell development», *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, n.º 1, pp. 11-16, ene. 2015.
- [49] G. L. Stritesky, S. C. Jameson, y K. A. Hogquist, «Selection of self-reactive T cells in the thymus», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 95-114, 2012.
- [50] A. J. Caton, E. Kropf, D. M. Simons, M. Aitken, K. A. Weissler, y M. S. Jordan, «Strength of TCR signal from self-peptide modulates autoreactive thymocyte deletion and Foxp3(+) Treg-cell formation», *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, n.º 3, pp. 785-793, mar. 2014.
- [51] M. S. Jordan, A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Hohenbeck, M. A. Lerman, A. Naji, y A. J. Caton, «Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide», *Nat. Immunol.*, vol. 2, n.º 4, pp. 301-306, abr. 2001.
- [52] I. Apostolou, A. Sarukhan, L. Klein, y H. von Boehmer, «Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen», *Nat. Immunol.*, vol. 3, n.º 8, pp. 756-763, ago. 2002.
- [53] A. E. Moran, K. L. Holzappel, Y. Xing, N. R. Cunningham, J. S. Maltzman, J. Punt, y K. A. Hogquist, «T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse», *J. Exp. Med.*, vol. 208, n.º 6, pp. 1279-1289, jun. 2011.
- [54] M. A. Burchill, J. Yang, K. B. Vang, J. J. Moon, H. H. Chu, C.-W. J. Lio, A. L. Vegoe, C.-S. Hsieh, M. K. Jenkins, y M. A. Farrar, «Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire», *Immunity*, vol. 28, n.º 1, pp. 112-121, ene. 2008.
- [55] X. Tai, B. Erman, A. Alag, J. Mu, M. Kimura, G. Katz, T. Guintert, T. McCaughy, R. Etzensperger, L. Feigenbaum, D. S. Singer, y A. Singer, «Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals», *Immunity*, vol. 38, n.º 6, pp. 1116-1128, jun. 2013.
- [56] H. Schorle, T. Holschke, T. Hünig, A. Schimpl, y I. Horak, «Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting», *Nature*, vol. 352, n.º 6336, pp. 621-624, ago. 1991.
- [57] A. R. M. Almeida, N. Legrand, M. Papiernik, y A. A. Freitas, «Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 169, n.º 9, pp. 4850-4860, nov. 2002.
- [58] D. M. Willerford, J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, y F. W. Alt, «Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment», *Immunity*, vol. 3, n.º 4, pp. 521-530, oct. 1995.

- [59] H. Suzuki, Y. W. Zhou, M. Kato, T. W. Mak, y I. Nakashima, «Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo», *J. Exp. Med.*, vol. 190, n.º 11, pp. 1561-1572, dic. 1999.
- [60] T. R. Malek, A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, y L. Kong, «CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2», *Immunity*, vol. 17, n.º 2, pp. 167-178, ago. 2002.
- [61] R. Setoguchi, S. Hori, T. Takahashi, y S. Sakaguchi, «Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization», *J. Exp. Med.*, vol. 201, n.º 5, pp. 723-735, mar. 2005.
- [62] C. Baecher-Allan, J. A. Brown, G. J. Freeman, y D. A. Hafler, «CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 167, n.º 3, pp. 1245-1253, ago. 2001.
- [63] J. D. Fontenot, M. A. Gavin, y A. Y. Rudensky, «Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells», *Nat. Immunol.*, vol. 4, n.º 4, pp. 330-336, abr. 2003.
- [64] B. Fritzsching, N. Oberle, E. Pauly, R. Geffers, J. Buer, J. Poschl, P. Krammer, O. Linderkamp, y E. Suri-Payer, «Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death», *Blood*, vol. 108, n.º 10, pp. 3371-3378, nov. 2006.
- [65] W. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, y J. A. Bluestone, «CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells», *J. Exp. Med.*, vol. 203, n.º 7, pp. 1701-1711, jul. 2006.
- [66] N. Seddiki, B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, y B. Fazekas de St Groth, «Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells», *J. Exp. Med.*, vol. 203, n.º 7, pp. 1693-1700, jul. 2006.
- [67] N. Komatsu, M. E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, y S. Hori, «Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n.º 6, pp. 1903-1908, feb. 2009.
- [68] X. Zhou, S. L. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, C. Penaranda, M. Martínez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, y J. A. Bluestone, «Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo», *Nat. Immunol.*, vol. 10, n.º 9, pp. 1000-1007, sep. 2009.
- [69] S. E. Allan, S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo, y M. K. Levings, «Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production», *Int. Immunol.*, vol. 19, n.º 4, pp. 345-354, abr. 2007.
- [70] J. Wang, A. Ioan-Facsinay, E. I. H. van der Voort, T. W. J. Huizinga, y R. E. M. Toes, «Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells», *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, n.º 1, pp. 129-138, ene. 2007.
- [71] T. Miyao, S. Floess, R. Setoguchi, H. Luche, H. J. Fehling, H. Waldmann, J. Huehn, y S. Hori, «Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3

- expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells», *Immunity*, vol. 36, n.º 2, pp. 262-275, feb. 2012.
- [72] S. Floess, J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.-D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, y J. Huehn, «Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells», *PLoS Biol.*, vol. 5, n.º 2, p. e38, feb. 2007.
- [73] H.-P. Kim y W. J. Leonard, «CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation», *J. Exp. Med.*, vol. 204, n.º 7, pp. 1543-1551, jul. 2007.
- [74] N. Ohkura, M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H. J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai, y S. Sakaguchi, «T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development», *Immunity*, vol. 37, n.º 5, pp. 785-799, nov. 2012.
- [75] J. K. Polansky, K. Kretschmer, J. Freyer, S. Floess, A. Garbe, U. Baron, S. Olek, A. Hamann, H. von Boehmer, y J. Huehn, «DNA methylation controls Foxp3 gene expression», *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, n.º 6, pp. 1654-1663, jun. 2008.
- [76] M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochoy, y S. Sakaguchi, «Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor», *Immunity*, vol. 30, n.º 6, pp. 899-911, jun. 2009.
- [77] J. A. Bluestone y A. K. Abbas, «Natural versus adaptive regulatory T cells», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, n.º 3, pp. 253-257, mar. 2003.
- [78] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, y V. K. Kuchroo, «Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells», *Nature*, vol. 441, n.º 7090, pp. 235-238, may 2006.
- [79] M. C. Fantini, C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, y M. F. Neurath, «Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 172, n.º 9, pp. 5149-5153, may 2004.
- [80] K. Kretschmer, I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, y H. von Boehmer, «Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen», *Nat. Immunol.*, vol. 6, n.º 12, pp. 1219-1227, dic. 2005.
- [81] B. Knoechel, J. Lohr, E. Kahn, J. A. Bluestone, y A. K. Abbas, «Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen», *J. Exp. Med.*, vol. 202, n.º 10, pp. 1375-1386, nov. 2005.
- [82] A. M. Bilate y J. J. Lafaille, «Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 733-758, 2012.
- [83] A. Bono, P. J. Kehn, y E. M. Shevach, «Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis», *Immunol. Today*, vol. 16, n.º 2, pp. 61-67, feb. 1995.
- [84] D. Haribhai, J. B. Williams, S. Jia, D. Nickerson, E. G. Schmitt, B. Edwards, J. Ziegelbauer, M. Yassai, S.-H. Li, L. M. Relland, P. M. Wise, A. Chen, Y.-Q. Zheng, P. M. Simpson, J. Gorski, N. H. Salzman, M. J. Hessner, T. A. Chatila, y C. B. Williams,

- «A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity», *Immunity*, vol. 35, n.º 1, pp. 109-122, jul. 2011.
- [85] S. Z. Josefowicz, R. E. Niec, H. Y. Kim, P. Treuting, T. Chinen, Y. Zheng, D. T. Umetsu, y A. Y. Rudensky, «Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation», *Nature*, vol. 482, n.º 7385, pp. 395-399, feb. 2012.
- [86] R. M. Samstein, S. Z. Josefowicz, A. Arvey, P. M. Treuting, y A. Y. Rudensky, «Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict», *Cell*, vol. 150, n.º 1, pp. 29-38, jul. 2012.
- [87] M. A. Curotto de Lafaille, A. C. Lino, N. Kutchukhidze, y J. J. Lafaille, «CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 173, n.º 12, pp. 7259-7268, dic. 2004.
- [88] I. Apostolou y H. von Boehmer, «In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells», *J. Exp. Med.*, vol. 199, n.º 10, pp. 1401-1408, may 2004.
- [89] M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee, y J. J. Lafaille, «Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation», *Immunity*, vol. 29, n.º 1, pp. 114-126, jul. 2008.
- [90] D. Haribhai, W. Lin, B. Edwards, J. Ziegelbauer, N. H. Salzman, M. R. Carlson, S.-H. Li, P. M. Simpson, T. A. Chatila, y C. B. Williams, «A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, n.º 6, pp. 3461-3468, mar. 2009.
- [91] J. A. Hill, M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis, y C. Benoist, «Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature», *Immunity*, vol. 27, n.º 5, pp. 786-800, nov. 2007.
- [92] Y. Y. Wan y R. A. Flavell, «Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n.º 14, pp. 5126-5131, abr. 2005.
- [93] J. K. Kim, M. Samaranyake, y S. Pradhan, «Epigenetic mechanisms in mammals», *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 66, n.º 4, pp. 596-612, feb. 2009.
- [94] M. M. Musri y M. Párrizas, «Epigenetic regulation of adipogenesis», *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 15, n.º 4, pp. 342-349, jul. 2012.
- [95] J. Huehn, J. K. Polansky, y A. Hamann, «Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, n.º 2, pp. 83-89, feb. 2009.
- [96] J. K. Polansky, K. Kretschmer, J. Freyer, S. Floess, A. Garbe, U. Baron, S. Olek, A. Hamann, H. von Boehmer, y J. Huehn, «DNA methylation controls Foxp3 gene expression», *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, n.º 6, pp. 1654-1663, jun. 2008.
- [97] C. Mottet, H. H. Uhlig, y F. Powrie, «Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 170, n.º 8, pp. 3939-3943, abr. 2003.
- [98] E. N. Huter, G. H. Stummvoll, R. J. DiPaolo, D. D. Glass, y E. M. Shevach, «Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 181, n.º 12, pp. 8209-8213, dic. 2008.
- [99] R. J. DiPaolo, C. Brinster, T. S. Davidson, J. Andersson, D. Glass, y E. M. Shevach, «Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 179, n.º 7, pp. 4685-4693, oct. 2007.

- [100] T.-L. M. Nguyen, N. L. Sullivan, M. Ebel, R. M. Teague, y R. J. DiPaolo, «Antigen-specific TGF- β -induced regulatory T cells secrete chemokines, regulate T cell trafficking, and suppress ongoing autoimmunity», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 187, n.º 4, pp. 1745-1753, ago. 2011.
- [101] M. Yadav, S. Stephan, y J. A. Bluestone, «Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity», *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 232, 2013.
- [102] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, y M. Ono, «Regulatory T cells and immune tolerance», *Cell*, vol. 133, n.º 5, pp. 775-787, may 2008.
- [103] C. Baecher-Allan y D. A. Hafler, «Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease», *Immunol. Rev.*, vol. 212, pp. 203-216, ago. 2006.
- [104] A. M. Thornton y E. M. Shevach, «Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 164, n.º 1, pp. 183-190, ene. 2000.
- [105] E. M. Shevach, «Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression», *Immunity*, vol. 30, n.º 5, pp. 636-645, may 2009.
- [106] D. A. A. Vignali, L. W. Collison, y C. J. Workman, «How regulatory T cells work», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n.º 7, pp. 523-532, jul. 2008.
- [107] Q. Tang y J. A. Bluestone, «The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation», *Nat. Immunol.*, vol. 9, n.º 3, pp. 239-244, mar. 2008.
- [108] N. Misra, J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, y S. V. Kaveri, «Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 172, n.º 8, pp. 4676-4680, abr. 2004.
- [109] P. Serra, A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer, y P. Santamaria, «CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells», *Immunity*, vol. 19, n.º 6, pp. 877-889, dic. 2003.
- [110] K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, y S. Sakaguchi, «CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function», *Science*, vol. 322, n.º 5899, pp. 271-275, oct. 2008.
- [111] U. Grohmann, C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, y P. Puccetti, «CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo», *Nat. Immunol.*, vol. 3, n.º 11, pp. 1097-1101, nov. 2002.
- [112] X. Yu, K. Harden, L. C. Gonzalez, M. Francesco, E. Chiang, B. Irving, I. Tom, S. Ivelja, C. J. Refino, H. Clark, D. Eaton, y J. L. Grogan, «The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells», *Nat. Immunol.*, vol. 10, n.º 1, pp. 48-57, ene. 2009.
- [113] E. Lozano, M. Dominguez-Villar, V. Kuchroo, y D. A. Hafler, «The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 188, n.º 8, pp. 3869-3875, abr. 2012.
- [114] C. A. Fuhrman, W.-I. Yeh, H. R. Seay, P. Saikumar Lakshmi, G. Chopra, L. Zhang, D. J. Perry, S. A. McClymont, M. Yadav, M.-C. Lopez, H. V. Baker, Y. Zhang, Y. Li, M. Whitley, D. von Schack, M. A. Atkinson, J. A. Bluestone, y T. M. Brusko, «Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 195, n.º 1, pp. 145-155, jul. 2015.

- [115] B. Liang, C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, y R. Clynes, «Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 180, n.º 9, pp. 5916-5926, may 2008.
- [116] A. Benson, S. Murray, P. Divakar, N. Burnaevskiy, R. Pifer, J. Forman, y F. Yarovinsky, «Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 188, n.º 2, pp. 800-810, ene. 2012.
- [117] D. Q. Tran, J. Andersson, D. Hardwick, L. Bebris, G. G. Illei, y E. M. Shevach, «Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures», *Blood*, vol. 113, n.º 21, pp. 5125-5133, may 2009.
- [118] W. J. Grossman, J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, y T. J. Ley, «Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death», *Immunity*, vol. 21, n.º 4, pp. 589-601, oct. 2004.
- [119] D. C. Gondek, L.-F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, y R. J. Noelle, «Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 174, n.º 4, pp. 1783-1786, feb. 2005.
- [120] X. Cao, S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, y T. J. Ley, «Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance», *Immunity*, vol. 27, n.º 4, pp. 635-646, oct. 2007.
- [121] C. A. Piccirillo, J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, y E. M. Shevach, «CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness», *J. Exp. Med.*, vol. 196, n.º 2, pp. 237-246, jul. 2002.
- [122] L. W. Collison, M. R. Pillai, V. Chaturvedi, y D. A. A. Vignali, «Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, n.º 10, pp. 6121-6128, may 2009.
- [123] Z. Chen, A. E. Herman, M. Matos, D. Mathis, y C. Benoist, «Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes», *J. Exp. Med.*, vol. 202, n.º 10, pp. 1387-1397, nov. 2005.
- [124] M. J. McGeachy, L. A. Stephens, y S. M. Anderton, «Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 175, n.º 5, pp. 3025-3032, sep. 2005.
- [125] S. G. Zheng, J. H. Wang, J. D. Gray, H. Soucier, y D. A. Horwitz, «Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 172, n.º 9, pp. 5213-5221, may 2004.
- [126] F. Cottrez y H. Groux, «Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 167, n.º 2, pp. 773-778, jul. 2001.

- [127] K. W. Moore, R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, y A. O'Garra, «Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 19, pp. 683-765, 2001.
- [128] J. Zhang, Z. Huang, R. Sun, Z. Tian, y H. Wei, «IFN- γ induced by IL-12 administration prevents diabetes by inhibiting pathogenic IL-17 production in NOD mice», *J. Autoimmun.*, vol. 38, n.º 1, pp. 20-28, feb. 2012.
- [129] L. W. Collison, C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, y D. A. A. Vignali, «The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function», *Nature*, vol. 450, n.º 7169, pp. 566-569, nov. 2007.
- [130] M. I. Garín, C.-C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollón, R. Wait, y R. I. Lechler, «Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells», *Blood*, vol. 109, n.º 5, pp. 2058-2065, mar. 2007.
- [131] G. S. Eisenbarth, «Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease», *N. Engl. J. Med.*, vol. 314, n.º 21, pp. 1360-1368, may 1986.
- [132] C. Lévy-Marchal, C. C. Patterson, A. Green, y EURODIAB ACE Study Group. Europe and Diabetes, «Geographical variation of presentation at diagnosis of type I diabetes in children: the EURODIAB study. European and Diabetes», *Diabetologia*, vol. 44 Suppl 3, pp. B75-80, oct. 2001.
- [133] Writing Group for the SEARCH for Diabetes in Youth Study Group, D. Dabelea, R. A. Bell, R. B. D'Agostino, G. Imperatore, J. M. Johansen, B. Linder, L. L. Liu, B. Loots, S. Marcovina, E. J. Mayer-Davis, D. J. Pettitt, y B. Waitzfelder, «Incidence of diabetes in youth in the United States», *JAMA*, vol. 297, n.º 24, pp. 2716-2724, jun. 2007.
- [134] C. C. Patterson, G. G. Dahlquist, E. Gyürüs, A. Green, G. Soltész, y EURODIAB Study Group, «Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 373, n.º 9680, pp. 2027-2033, jun. 2009.
- [135] «Canal Salut», *Canal Salut*. [En línea]. Disponible en: <http://canalsalut.gencat.cat/ca/>. [Accedido: 03-dic-2015].
- [136] M. J. Gan, A. Albanese-O'Neill, y M. J. Haller, «Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research», *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, vol. 42, n.º 10, pp. 269-291, dic. 2012.
- [137] K. Vehik, R. F. Hamman, D. Lezotte, J. M. Norris, G. Klingensmith, C. Bloch, M. Rewers, y D. Dabelea, «Increasing incidence of type 1 diabetes in 0- to 17-year-old Colorado youth», *Diabetes Care*, vol. 30, n.º 3, pp. 503-509, mar. 2007.
- [138] N. Maclaren, W. Riley, N. Skordis, M. Atkinson, R. Spillar, J. Silverstein, R. Klein, C. Vadheim, y J. Rotter, «Inherited susceptibility to insulin-dependent diabetes is associated with HLA-DR1, while DR5 is protective», *Autoimmunity*, vol. 1, n.º 3, pp. 197-205, 1988.
- [139] C. G. Fathman y B. D. Myers, «Cyclosporine therapy for autoimmune disease», *N. Engl. J. Med.*, vol. 326, n.º 25, pp. 1693-1695, jun. 1992.
- [140] E. F. Lampeter, M. Homberg, K. Quabeck, U. W. Schaefer, P. Wernet, J. Bertrams, H. Grosse-Wilde, F. A. Gries, y H. Kolb, «Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 341, n.º 8855, pp. 1243-1244, may 1993.

- [141] J. M. Barker, «Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 91, n.º 4, pp. 1210-1217, abr. 2006.
- [142] G. F. Bottazzo, A. Florin-Christensen, y D. Doniach, «Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 2, n.º 7892, pp. 1279-1283, nov. 1974.
- [143] R. Lendrum, P. G. Nelson, D. A. Pyke, G. Walker, y D. R. Gamble, «Islet-cell, thyroid, and gastric autoantibodies in diabetic identical twins», *Br. Med. J.*, vol. 1, n.º 6009, pp. 553-555, mar. 1976.
- [144] N. Somoza, F. Vargas, C. Roura-Mir, M. Vives-Pi, M. T. Fernández-Figueras, A. Ariza, R. Gomis, R. Bragado, M. Martí, D. Jaraquemada, y R. Pujol-Borrell, «Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 153, n.º 3, pp. 1360-1377, ago. 1994.
- [145] M. Knip y H. Siljander, «Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes», *Autoimmun. Rev.*, vol. 7, n.º 7, pp. 550-557, jul. 2008.
- [146] S. C. Kent, Y. Chen, L. Bregoli, S. M. Clemmings, N. S. Kenyon, C. Ricordi, B. J. Hering, y D. A. Hafler, «Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope», *Nature*, vol. 435, n.º 7039, pp. 224-228, may 2005.
- [147] L. A. O'Reilly, P. R. Hutchings, P. R. Crocker, E. Simpson, T. Lund, D. Kioussis, F. Takei, J. Baird, y A. Cooke, «Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression», *Eur. J. Immunol.*, vol. 21, n.º 5, pp. 1171-1180, may 1991.
- [148] M. L. Campbell-Thompson, M. A. Atkinson, A. E. Butler, N. M. Chapman, G. Frisk, R. Gianani, B. N. Giepmans, M. G. von Herrath, H. Hyöty, T. W. Kay, O. Korsgren, N. G. Morgan, A. C. Powers, A. Pugliese, S. J. Richardson, P. A. Rowe, S. Tracy, y P. A. In't Veld, «The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes», *Diabetologia*, vol. 56, n.º 11, pp. 2541-2543, nov. 2013.
- [149] P. In't Veld, D. Lievens, J. De Grijse, Z. Ling, B. Van der Auwera, M. Pipeleers-Marichal, F. Gorus, y D. Pipeleers, «Screening for insulinitis in adult autoantibody-positive organ donors», *Diabetes*, vol. 56, n.º 9, pp. 2400-2404, sep. 2007.
- [150] K. T. Coppieters, F. Dotta, N. Amirian, P. D. Campbell, T. W. H. Kay, M. A. Atkinson, B. O. Roep, y M. G. von Herrath, «Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients», *J. Exp. Med.*, vol. 209, n.º 1, pp. 51-60, ene. 2012.
- [151] P. Santamaria, T. Utsugi, B. J. Park, N. Averill, S. Kawazu, y J. W. Yoon, «Beta-cell-cytotoxic CD8+ T cells from nonobese diabetic mice use highly homologous T cell receptor alpha-chain CDR3 sequences», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 154, n.º 5, pp. 2494-2503, mar. 1995.
- [152] K. M. Gillespie, «Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention», *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.*, vol. 175, n.º 2, pp. 165-170, jul. 2006.
- [153] A. L. Notkins y A. Lernmark, «Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues», *J. Clin. Invest.*, vol. 108, n.º 9, pp. 1247-1252, nov. 2001.
- [154] E. Codina-Busqueta, E. Scholz, P. M. Muñoz-Torres, C. Roura-Mir, M. Costa, C. Xufre, R. Planas, M. Vives-Pi, D. Jaraquemada, y M. Martí, «TCR bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1

- diabetes», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 186, n.º 6, pp. 3787-3797, mar. 2011.
- [155] C. A. Piccirillo, M. Tritt, E. Sgouroudis, A. Albanese, M. Pyzik, y V. Hay, «Control of type 1 autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1051, pp. 72-87, jun. 2005.
- [156] Q. Tang, J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, y J. A. Bluestone, «Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice», *Nat. Immunol.*, vol. 7, n.º 1, pp. 83-92, ene. 2006.
- [157] Q. Tang, K. J. Henriksen, M. Bi, E. B. Finger, G. Szot, J. Ye, E. L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, y J. A. Bluestone, «In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes», *J. Exp. Med.*, vol. 199, n.º 11, pp. 1455-1465, jun. 2004.
- [158] E. Jaekel, H. von Boehmer, y M. P. Manns, «Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes», *Diabetes*, vol. 54, n.º 2, pp. 306-310, feb. 2005.
- [159] M.-C. Gagnerault, J. J. Luan, C. Lotton, y F. Lepault, «Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice», *J. Exp. Med.*, vol. 196, n.º 3, pp. 369-377, ago. 2002.
- [160] A. Kukreja, G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli, y N. Maclaren, «Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes», *J. Clin. Invest.*, vol. 109, n.º 1, pp. 131-140, ene. 2002.
- [161] S. Lindley, C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman, y T. I. M. Tree, «Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes», *Diabetes*, vol. 54, n.º 1, pp. 92-99, ene. 2005.
- [162] A. L. Putnam, F. Vendrame, F. Dotta, y P. A. Gottlieb, «CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes», *J. Autoimmun.*, vol. 24, n.º 1, pp. 55-62, feb. 2005.
- [163] T. Brusko, C. Wasserfall, K. McGrail, R. Schatz, H. L. Viener, D. Schatz, M. Haller, J. Rockell, P. Gottlieb, M. Clare-Salzler, y M. Atkinson, «No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes», *Diabetes*, vol. 56, n.º 3, pp. 604-612, mar. 2007.
- [164] T. M. Brusko, C. H. Wasserfall, M. J. Clare-Salzler, D. A. Schatz, y M. A. Atkinson, «Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+CD25+ T-cells in type 1 diabetes», *Diabetes*, vol. 54, n.º 5, pp. 1407-1414, may 2005.
- [165] A. Schneider, M. Rieck, S. Sanda, C. Pihoker, C. Greenbaum, y J. H. Buckner, «The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+FOXP3+ regulatory T cells», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 181, n.º 10, pp. 7350-7355, nov. 2008.
- [166] S. A. Long, M. R. Walker, M. Rieck, E. James, W. W. Kwok, S. Sanda, C. Pihoker, C. Greenbaum, G. T. Nepom, y J. H. Buckner, «Functional islet-specific Treg can be generated from CD4+CD25- T cells of healthy and type 1 diabetic subjects», *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, n.º 2, pp. 612-620, feb. 2009.
- [167] S. A. Long, K. Cerosaletti, P. L. Bollyky, M. Tatum, H. Shilling, S. Zhang, Z.-Y. Zhang, C. Pihoker, S. Sanda, C. Greenbaum, y J. H. Buckner, «Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in

- CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects», *Diabetes*, vol. 59, n.º 2, pp. 407-415, feb. 2010.
- [168] C. E. Lowe, J. D. Cooper, T. Brusko, N. M. Walker, D. J. Smyth, R. Bailey, K. Bourget, V. Plagnol, S. Field, M. Atkinson, D. G. Clayton, L. S. Wicker, y J. A. Todd, «Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes», *Nat. Genet.*, vol. 39, n.º 9, pp. 1074-1082, sep. 2007.
- [169] S. Krause, A. Beyerlein, C. Winkler, A. Gavrisan, C. Kayser, R. Puff, E. Bonifacio, A.-G. Ziegler, y P. Achenbach, «Soluble interleukin-2 receptor alpha in preclinical type 1 diabetes», *Acta Diabetol.*, vol. 51, n.º 3, pp. 517-518, 2014.
- [170] K. Wing, A. Ekmark, H. Karlsson, A. Rudin, y E. Suri-Payer, «Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood», *Immunology*, vol. 106, n.º 2, pp. 190-199, jun. 2002.
- [171] S. R. Riddell y P. D. Greenberg, «The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells», *J. Immunol. Methods*, vol. 128, n.º 2, pp. 189-201, abr. 1990.
- [172] T. Cupedo, M. Nagasawa, K. Weijer, B. Blom, y H. Spits, «Development and activation of regulatory T cells in the human fetus», *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, n.º 2, pp. 383-390, feb. 2005.
- [173] L. A. Stephens, C. Mottet, D. Mason, y F. Powrie, «Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro», *Eur. J. Immunol.*, vol. 31, n.º 4, pp. 1247-1254, abr. 2001.
- [174] M. Miyara, Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, M. Kambouchner, D. Valeyre, C. Chapelon-Abric, P. Debré, J.-C. Piette, y G. Gorochov, «The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells», *J. Exp. Med.*, vol. 203, n.º 2, pp. 359-370, feb. 2006.
- [175] A. Varas, E. Jiménez, R. Sacedón, M. Rodríguez-Mahou, E. Maroto, A. G. Zapata, y A. Vicente, «Analysis of the Human Neonatal Thymus: Evidence for a Transient Thymic Involution», *J. Immunol.*, vol. 164, n.º 12, pp. 6260-6267, jun. 2000.
- [176] H. Nunes-Cabaço, Í. Caramalho, N. Sepúlveda, y A. E. Sousa, «Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage», *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, n.º 12, pp. 3604-3614, dic. 2011.
- [177] F. Weerkamp, E. F. E. de Haas, B. A. E. Naber, W. M. Comans-Bitter, A. J. J. C. Bogers, J. J. M. van Dongen, y F. J. T. Staal, «Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children», *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 115, n.º 4, pp. 834-840, abr. 2005.
- [178] S. P. Berzins, A. P. Uldrich, J. S. Sutherland, J. Gill, J. F. A. P. Miller, D. I. Godfrey, y R. L. Boyd, «Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks», *Trends Mol. Med.*, vol. 8, n.º 10, pp. 469-476, oct. 2002.
- [179] J. J. Goronzy y C. M. Weyand, «Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis», *Trends Immunol.*, vol. 22, n.º 5, pp. 251-255, may 2001.
- [180] C. L. Mackall, C. V. Bare, L. A. Granger, S. O. Sharrow, J. A. Titus, y R. E. Gress, «Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 156, n.º 12, pp. 4609-4616, jun. 1996.

- [181] B.-C. Chiu, V. R. Stolberg, H. Zhang, y S. W. Chensue, «Increased Foxp3+ Treg cell activity reduces dendritic cell co-stimulatory molecule expression in aged mice», *Mech. Ageing Dev.*, vol. 128, n.º 11-12, pp. 618-627, nov. 2007.
- [182] N. Thiault, J. Darrigues, V. Adoue, M. Gros, B. Binet, C. Peral, B. Leobon, N. Fazilleau, O. P. Joffre, E. A. Robey, J. P. M. van Meerwijk, y P. Romagnoli, «Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors», *Nat. Immunol.*, vol. 16, n.º 6, pp. 628-634, jun. 2015.
- [183] F. Liotta, L. Cosmi, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani, y F. Annunziato, «Functional features of human CD25+ regulatory thymocytes», *Microbes Infect.*, vol. 7, n.º 7-8, pp. 1017-1022, jun. 2005.
- [184] G. Darrasse-Jèze, G. Marodon, B. L. Salomon, M. Catala, y D. Klatzmann, «Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses», *Blood*, vol. 105, n.º 12, pp. 4715-4721, jun. 2005.
- [185] E. Maggi, L. Cosmi, F. Liotta, P. Romagnani, S. Romagnani, y F. Annunziato, «Thymic regulatory T cells», *Autoimmun. Rev.*, vol. 4, n.º 8, pp. 579-586, nov. 2005.
- [186] G. Gottrand, T. Courau, V. Thomas-Vaslin, N. Prevel, T. Vazquez, M. G. Ruocco, B. Lambrecht, B. Bellier, B. M. Colombo, y D. Klatzmann, «Regulatory T-cell development and function are impaired in mice lacking membrane expression of full length intercellular adhesion molecule-1», *Immunology*, vol. 146, n.º 4, pp. 657-670, dic. 2015.
- [187] E. Y. Choi, W. S. Park, K. C. Jung, D. H. Chung, Y. M. Bae, T. J. Kim, H. G. Song, S. H. Kim, D. I. Ham, J. H. Hahn, J. Kim, K. Kim, T. S. Hwang, y S. H. Park, «Thymocytes Positively Select Thymocytes in Human System», *Hum. Immunol.*, vol. 54, n.º 1, pp. 15-20, abr. 1997.
- [188] S. Hori, T. Nomura, y S. Sakaguchi, «Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3», *Science*, vol. 299, n.º 5609, pp. 1057-1061, feb. 2003.
- [189] R. Khattry, T. Cox, S.-A. Yasayko, y F. Ramsdell, «An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells», *Nat. Immunol.*, vol. 4, n.º 4, pp. 337-342, abr. 2003.
- [190] G. Roncador, P. J. Brown, L. Maestre, S. Hue, J. L. Martínez-Torrecedrada, K.-L. Ling, S. Pratap, C. Toms, B. C. Fox, V. Cerundolo, F. Powrie, y A. H. Banham, «Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level», *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, n.º 6, pp. 1681-1691, jun. 2005.
- [191] H. Yagi, T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii, y S. Sakaguchi, «Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells», *Int. Immunol.*, vol. 16, n.º 11, pp. 1643-1656, ene. 2004.
- [192] M. A. Gavin, T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs, y A. Y. Rudensky, «Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, n.º 17, pp. 6659-6664, abr. 2006.
- [193] B. C. Trauth, C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Möller, W. Falk, K. M. Debatin, y P. H. Krammer, «Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis», *Science*, vol. 245, n.º 4915, pp. 301-305, jul. 1989.

- [194] S. Yonehara, A. Ishii, y M. Yonehara, «A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor», *J. Exp. Med.*, vol. 169, n.º 5, pp. 1747-1756, may 1989.
- [195] R. Watanabe-Fukunaga, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, y S. Nagata, «Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis», *Nature*, vol. 356, n.º 6367, pp. 314-317, mar. 1992.
- [196] A. Strasser, P. J. Jost, y S. Nagata, «The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System», *Immunity*, vol. 30, n.º 2, pp. 180-192, feb. 2009.
- [197] G. H. Fisher, F. J. Rosenberg, S. E. Straus, J. K. Dale, L. A. Middleton, A. Y. Lin, W. Strober, M. J. Lenardo, y J. M. Puck, «Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome», *Cell*, vol. 81, n.º 6, pp. 935-946, jun. 1995.
- [198] F. Rieux-Laucat, F. Le Deist, C. Hivroz, I. A. Roberts, K. M. Debatin, A. Fischer, y J. P. de Villartay, «Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity», *Science*, vol. 268, n.º 5215, pp. 1347-1349, jun. 1995.
- [199] S. Nagata, «Apoptosis by Death Factor», *Cell*, vol. 88, n.º 3, pp. 355-365, feb. 1997.
- [200] S. Yonehara, Y. Nishimura, S. Kishil, M. Yonehara, K. Takazawa, T. Tamatani, y A. Ishii, «Involvement of apoptosis antigen Fas in clonal deletion of human thymocytes», *Int. Immunol.*, vol. 6, n.º 12, pp. 1849-1856, dic. 1994.
- [201] M. Paulsen y O. Janssen, «Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells», *Cell Commun. Signal.*, vol. 9, n.º 1, p. 7, abr. 2011.
- [202] J. C. Rathmell y C. B. Thompson, «Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease», *Cell*, vol. 109, n.º 2, Supplement 1, pp. S97-S107, abr. 2002.
- [203] M. R. Alderson, R. J. Armitage, E. Maraskovsky, T. W. Tough, E. Roux, K. Schooley, F. Ramsdell, y D. H. Lynch, «Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes.», *J. Exp. Med.*, vol. 178, n.º 6, pp. 2231-2235, ene. 1993.
- [204] M. Paulsen, S. Valentin, B. Mathew, S. Adam-Klages, U. Bertsch, I. Lavrik, P. H. Krammer, D. Kabelitz, y O. Janssen, «Modulation of CD4+ T-cell activation by CD95 co-stimulation», *Cell Death Differ.*, vol. 18, n.º 4, pp. 619-631, abr. 2011.
- [205] A. Balandina, S. Lécart, P. Dartevelle, A. Saoudi, y S. Berrih-Aknin, «Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis», *Blood*, vol. 105, n.º 2, pp. 735-741, ene. 2005.
- [206] C. Baecher-Allan, E. Wolf, y D. A. Hafler, «Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells», *Clin. Immunol.*, vol. 115, n.º 1, pp. 10-18, abr. 2005.
- [207] F. Ocklenburg, D. Moharreggh-Khiabani, R. Geffers, V. Janke, S. Pfoertner, H. Garritsen, L. Groebe, J. Klempnauer, K. E. J. Dittmar, S. Weiss, J. Buer, y M. Probst-Kepper, «UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells», *Lab. Invest.*, vol. 86, n.º 7, pp. 724-737, may 2006.
- [208] G. M. Vaitaitis y D. H. Wagner, «CD40 interacts directly with RAG1 and RAG2 in autoaggressive T cells and Fas prevents CD40-induced RAG expression», *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 10, n.º 6, pp. 483-489, nov. 2013.

- [209] V. Quarona, G. Zaccarello, A. Chillemi, E. Brunetti, V. K. Singh, E. Ferrero, A. Funaro, A. L. Horenstein, y F. Malavasi, «CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules», *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 84, n.º 4, pp. 207-217, ago. 2013.
- [210] J. Kubach, P. Lutter, T. Bopp, S. Stoll, C. Becker, E. Huter, C. Richter, P. Weingarten, T. Warger, J. Knop, S. Müllner, J. Wijdenes, H. Schild, E. Schmitt, y H. Jonuleit, «Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function», *Blood*, vol. 110, n.º 5, pp. 1550-1558, sep. 2007.
- [211] M.-C. Dieu, B. Vanbervliet, A. Vicari, J.-M. Bridon, E. Oldham, S. Aït-Yahia, F. Brière, A. Zlotnik, S. Lebecque, y C. Caux, «Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites», *J. Exp. Med.*, vol. 188, n.º 2, pp. 373-386, jul. 1998.
- [212] M. Kleinewietfeld, F. Puentes, G. Borsellino, L. Battistini, O. Rötzschke, y K. Falk, «CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset», *Blood*, vol. 105, n.º 7, pp. 2877-2886, abr. 2005.
- [213] G. A. Rabinovich y M. A. Toscano, «Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, n.º 5, pp. 338-352, may 2009.
- [214] F.-T. Liu y G. A. Rabinovich, «Galectins: regulators of acute and chronic inflammation», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1183, n.º 1, pp. 158-182, ene. 2010.
- [215] M. A. Toscano, G. A. Bianco, J. M. Ilarregui, D. O. Croci, J. Correale, J. D. Hernandez, N. W. Zwirner, F. Poirier, E. M. Riley, L. G. Baum, y G. A. Rabinovich, «Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death», *Nat. Immunol.*, vol. 8, n.º 8, pp. 825-834, ago. 2007.
- [216] H. Forsman, U. Islander, E. Andréasson, A. Andersson, K. Onnheim, A. Karlström, K. Sävman, M. Magnusson, K. L. Brown, y A. Karlsson, «Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis», *Arthritis Rheum.*, vol. 63, n.º 2, pp. 445-454, feb. 2011.
- [217] S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino, y D. A. Hafler, «FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, n.º 7, pp. 490-500, jul. 2010.
- [218] M. Demetriou, M. Granovsky, S. Quaggin, y J. W. Dennis, «Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation», *Nature*, vol. 409, n.º 6821, pp. 733-739, feb. 2001.
- [219] H.-R. C. Kim, H.-M. Lin, H. Biliran, y A. Raz, «Cell Cycle Arrest and Inhibition of Anoikis by Galectin-3 in Human Breast Epithelial Cells», *Cancer Res.*, vol. 59, n.º 16, pp. 4148-4154, ago. 1999.
- [220] S. Pfoertner, A. Jeron, M. Probst-Kepper, C. A. Guzman, W. Hansen, A. M. Westendorf, T. Toepfer, A. J. Schrader, A. Franzke, J. Buer, y R. Geffers, «Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players», *Genome Biol.*, vol. 7, n.º 7, p. R54, 2006.
- [221] H. He, B. Ni, Y. Tian, Z. Tian, Y. Chen, Z. Liu, X. Yang, Y. Lv, y Y. Zhang, «Histone methylation mediates plasticity of human FOXP3+ regulatory T cells by modulating signature gene expressions», *Immunology*, vol. 141, n.º 3, pp. 362-376, mar. 2014.

- [222] T. Solstad, S. J. Bains, J. Landskron, E. M. Aandahl, B. Thiede, K. Taskén, y K. M. Torgersen, «CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3+CD45RO+CTLA4+-activated human regulatory T cells», *Blood*, vol. 118, n.º 19, pp. 5141-5151, nov. 2011.
- [223] M. A. Kriegel, T. Lohmann, C. Gabler, N. Blank, J. R. Kalden, y H.-M. Lorenz, «Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II», *J. Exp. Med.*, vol. 199, n.º 9, pp. 1285-1291, may 2004.
- [224] V. Viglietta, C. Baecher-Allan, H. L. Weiner, y D. A. Hafler, «Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis», *J. Exp. Med.*, vol. 199, n.º 7, pp. 971-979, may 2004.
- [225] M. Marazuela, M. A. García-López, N. Figueroa-Vega, H. de la Fuente, B. Alvarado-Sánchez, A. Monsiváis-Urenda, F. Sánchez-Madrid, y R. González-Amaro, «Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 91, n.º 9, pp. 3639-3646, sep. 2006.
- [226] C. Xufré, M. Costa, C. Roura-Mir, E. Codina-Busqueta, L. Usero, E. Pizarro, G. Obiols, D. Jaraquemada, y M. Martí, «Low frequency of GITR+ T cells in ex vivo and in vitro expanded Treg cells from type 1 diabetic patients», *Int. Immunol.*, vol. 25, n.º 10, pp. 563-574, oct. 2013.
- [227] B. Fritzsching, N. Oberle, N. Eberhardt, S. Quick, J. Haas, B. Wildemann, P. H. Krammer, y E. Suri-Payer, «Cutting Edge: In Contrast to Effector T Cells, CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells Are Highly Susceptible to CD95 Ligand-but Not to TCR-Mediated Cell Death», *J. Immunol.*, vol. 175, n.º 1, pp. 32-36, ene. 2005.
- [228] J. Michalek, Z. Vrabelova, Z. Hrotekova, M. Kyr, M. Pejchlova, S. Kolouskova, M. Faresjö, y K. Stechova, «Immune Regulatory T Cells in Siblings of Children Suffering from Type 1 Diabetes Mellitus», *Scand. J. Immunol.*, vol. 64, n.º 5, pp. 531-535, nov. 2006.
- [229] T. I. m. Tree, B. O. Roep, y M. Peakman, «A Mini Meta-Analysis of Studies on CD4+CD25+ T cells in Human Type 1 Diabetes», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1079, n.º 1, pp. 9-18, oct. 2006.
- [230] Y. Jin, X. Chen, R. Podolsky, D. Hopkins, L. H. C. Makala, A. Muir, y J.-X. She, «APC dysfunction is correlated with defective suppression of T cell proliferation in human type 1 diabetes», *Clin. Immunol. Orlando Fla*, vol. 130, n.º 3, pp. 272-279, mar. 2009.
- [231] S. A. McClymont, A. L. Putnam, M. R. Lee, J. H. Eesensten, W. Liu, M. A. Hulme, U. Hoffmüller, U. Baron, S. Olek, J. A. Bluestone, y T. M. Brusko, «Plasticity of Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes», *J. Immunol.*, vol. 186, n.º 7, pp. 3918-3926, ene. 2011.
- [232] A. Ferraro, C. Socci, A. Stabilini, A. Valle, P. Monti, L. Piemonti, R. Nano, S. Olek, P. Maffi, M. Scavini, A. Secchi, C. Staudacher, E. Bonifacio, y M. Battaglia, «Expansion of Th17 Cells and Functional Defects in T Regulatory Cells Are Key Features of the Pancreatic Lymph Nodes in Patients With Type 1 Diabetes», *Diabetes*, vol. 60, n.º 11, pp. 2903-2913, ene. 2011.
- [233] S. Nervi, C. Atlan-Gepner, C. Fossat, y B. Vialettes, «Constitutive impaired TCR/CD3-mediated activation of T cells in IDDM patients co-exist with normal co-stimulation pathways», *J. Autoimmun.*, vol. 13, n.º 2, pp. 247-255, sep. 1999.

- [234] G. Nocentini, S. Ronchetti, M. G. Petrillo, y C. Riccardi, «Pharmacological modulation of GITRL/GITR system: therapeutic perspectives», *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, n.º 7, pp. 2089-2099, abr. 2012.
- [235] W. Łuczyński, N. Wawrusiewicz-Kurylonek, A. Stasiak-Barmuta, R. Urban, E. Hendo, M. Urban, M. Hryszko, A. Kretowski, y M. Górka, «Diminished expression of ICOS, GITR and CTLA-4 at the mRNA level in T regulatory cells of children with newly diagnosed type 1 diabetes», *Acta Biochim. Pol.*, vol. 56, n.º 2, pp. 361-370, 2009.
- [236] T. Placke, H.-G. Kopp, y H. R. Salih, «Glucocorticoid-induced TNFR-related (GITR) protein and its ligand in antitumor immunity: functional role and therapeutic modulation», *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2010, p. 239083, 2010.
- [237] M. K. Levings, R. Sangregorio, C. Sartirana, A. L. Moschin, M. Battaglia, P. C. Orban, y M.-G. Roncarolo, «Human CD25+CD4+ T Suppressor Cell Clones Produce Transforming Growth Factor β , but not Interleukin 10, and Are Distinct from Type 1 T Regulatory Cells», *J. Exp. Med.*, vol. 196, n.º 10, pp. 1335-1346, nov. 2002.
- [238] S. Tuyaerts, S. V. Meirvenne, A. Bonehill, C. Heirman, J. Corthals, H. Waldmann, K. Breckpot, K. Thielemans, y J. L. Aerts, «Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells», *J. Leukoc. Biol.*, vol. 82, n.º 1, pp. 93-105, ene. 2007.
- [239] R. Bianchini, O. Bistoni, A. Alunno, M. G. Petrillo, S. Ronchetti, P. Sportoletti, E. B. Bocci, G. Nocentini, R. Gerli, y C. Riccardi, «CD4+CD25^{low}GITR⁺ cells: A novel human CD4+ T-cell population with regulatory activity», *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, n.º 8, pp. 2269-2278, ago. 2011.
- [240] A. L. Putnam, T. M. Brusko, M. R. Lee, W. Liu, G. L. Szot, T. Ghosh, M. A. Atkinson, y J. A. Bluestone, «Expansion of Human Regulatory T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes», *Diabetes*, vol. 58, n.º 3, pp. 652-662, ene. 2009.
- [241] R. W. van Olfen, N. Koning, K. P. J. M. van Gisbergen, F. M. Wensveen, R. M. Hoek, L. Boon, J. Hamann, R. A. W. van Lier, y M. A. Nolte, «GITR Triggering Induces Expansion of Both Effector and Regulatory CD4+ T Cells In Vivo», *J. Immunol.*, vol. 182, n.º 12, pp. 7490-7500, jun. 2009.
- [242] D. Howie, K. F. Nolan, S. Daley, E. Butterfield, E. Adams, H. Garcia-Rueda, C. Thompson, N. J. Saunders, S. P. Cobbold, Y. Tone, M. Tone, y H. Waldmann, «MS4A4B Is a GITR-Associated Membrane Adapter, Expressed by Regulatory T Cells, Which Modulates T Cell Activation», *J. Immunol.*, vol. 183, n.º 7, pp. 4197-4204, ene. 2009.
- [243] Y. Carrier, M. J. Whitters, J. S. Miyashiro, T. P. LaBranche, H. E. Ramon, S. E. Benoit, M. S. Ryan, S. P. Keegan, H. Guay, J. Douhan, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos, y Q. G. Medley, «Enhanced GITR/GITRL interactions augment IL-27 expression and induce IL-10-producing Tr-1 like cells», *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, n.º 6, pp. 1393-1404, jun. 2012.
- [244] A. Ray, S. Basu, C. B. Williams, N. H. Salzman, y B. N. Dittel, «A Novel IL-10-Independent Regulatory Role for B Cells in Suppressing Autoimmunity by Maintenance of Regulatory T Cells via GITR Ligand», *J. Immunol.*, vol. 188, n.º 7, pp. 3188-3198, ene. 2012.
- [245] G. Nocentini, S. Cuzzocrea, T. Genovese, R. Bianchini, E. Mazzon, S. Ronchetti, E. Esposito, D. P. Rosanna, P. Bramanti, y C. Riccardi, «Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor-Related (GITR)-Fc Fusion Protein Inhibits

- GITR Triggering and Protects from the Inflammatory Response after Spinal Cord Injury», *Mol. Pharmacol.*, vol. 73, n.º 6, pp. 1610-1621, ene. 2008.
- [246] G. Nocentini, L. Giunchi, S. Ronchetti, L. T. Krausz, A. Bartoli, R. Moraca, G. Migliorati, y C. Riccardi, «A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, n.º 12, pp. 6216-6221, jun. 1997.
- [247] S. Spinicelli, G. Nocentini, S. Ronchetti, L. T. Krausz, R. Bianchini, y C. Riccardi, «GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis», *Cell Death Differ.*, vol. 9, n.º 12, pp. 1382-1384, dic. 2002.
- [248] P. Jailwala, J. Waukau, S. Glisic, S. Jana, S. Ehlenbach, M. Hessner, R. Alemzadeh, S. Matsuyama, P. Laud, X. Wang, y S. Ghosh, «Apoptosis of CD4+ CD25(high) T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation», *PloS One*, vol. 4, n.º 8, p. e6527, 2009.