THAÍS BOCCIA DA COSTA

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS T REGULADORAS
GERADAS *IN VITRO* NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.**

Área de concentração: Imunologia

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente
Rizzo**

SÃO PAULO

2010

RESUMO

Boccia, T. Avaliação funcional de células T reguladoras geradas *in vitro* na modulação da resposta imune. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígeno do sistema imune, e há evidências recentes de seu envolvimento na manutenção da tolerância imunológica pela interação com células apoptóticas e a população de células T reguladoras. Neste estudo avaliamos as alterações ocorridas na população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ após co-cultura de células de linfonodo com DCs derivadas de células da medula óssea de camundongos BALB/c, ativadas ou não com LPS, na presença de timócitos alogênicos ou singênicos em apoptose. Após cultura na presença de células alogênicas a população de Tregs mostra-se aumentada quando comparada com a cultura com timócitos singênicos, e essa expansão é dependente de contato entre a DC e o linfócito T, uma vez que o isolamento das células por membrana transwell diminuiu drasticamente a expressão destes marcadores. A internalização de células em apoptose em ambos os contextos pelas DCs foi capaz de induzir caráter tolerogênico nestas com baixa expressão de moléculas co-estimuladoras e resistência à maturação por LPS. A produção de IL-2 e TGF- β mostrou-se aumentada nas culturas com células alogênicas em apoptose, podendo ser o motivo da maior expansão de Tregs neste contexto juntamente com o fenótipo tolerogênico induzido nas DCs. As células CD4⁺CD25⁺ geradas *in vitro* por DCs pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose foram capazes de conter a proliferação *in vitro* de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados por esplenócitos de C57BL/6 irradiados até uma diluição de 1:50 (reguladora:respondedora). As células CD4⁺CD25⁺ também foram capazes de regular a proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com anti-CD3 e esplenócitos de BALB/c DO11.10 estimulados com OVA, mas nestes casos a supressão foi observada quando as Tregs estavam em maior concentração. No ensaio *in vivo*, as Tregs geradas *in vitro* também foram capazes de suprimir a proliferação de células respondedoras quando transferidas para animais Nude, impedindo também o infiltrado inflamatório no estômago, cólons, fígado e rins, sendo assim capazes de suprimir a resposta imune tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Palavras chave: Células dendríticas. Apoptose. Linfócito T regulador. Foxp3. Imunossupressão

ABSTRACT

Boccia, T. Analysis of the suppressor function of regulatory T cells generated *in vitro*. 2010. [Thesis (Immunology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The dendritic cell (DC) plays a very important role in antigen presentation in the immune system and recent articles have shown the involvement of the DCs in maintaining peripheral tolerance, probably because of their interactions with apoptotic cells and regulatory T cells (Tregs). Here we evaluated the changes in the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ after co culture of tolerogenic DCs with lymph node cells. Dendritic cells were generated *in vitro* from bone-marrow cells removed from the femurs of BALB/c mice and cultured in the presence of GM-CSF and in the presence or not of LPS. Apoptosis was induced in thymocytes from BALB/c and C57BL/6 and co-cultured with the DCs before co-culture with lymph-node cells. Our results show an increase of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells after co-culture and this increase occurs in the presence of allogeneic and syngeneic apoptotic cells, however it is greater when DCs are pulsed with the alloantigen. Furthermore, the dendritic cells did not change the pattern of co-stimulatory molecules expression due to phagocytosis of syngeneic or allogeneic apoptotic cells and further stimulation with LPS. The amount of IL-2 and TGF- β found in the supernatant of the co-culture with allogeneic and syngeneic apoptotic cells was greater when the DCs are pulsed with the alloantigen rather than in the presence of syngeneic apoptotic cells, thus making the tolerogenic DCs able to expand Tregs. The CD4⁺CD25⁺ cells sorted from the *in vitro* culture of DCs pulsed with alloantigen, and lymph-node cells were able to suppress the proliferation of splenocytes *in vitro* in a specific (spleen cells from BALB/c mice and irradiated spleen cells from C57BL/6 mice) and non-specific manner (spleen cells from BALB/c mice stimulated with α CD3 and spleen cells from BALB/c DO11.10 mice stimulated with OVA). As expected, in the *in vivo* model, the transfer of CD4⁺CD25⁺ cells to Nude mice induced autoimmunity with cell infiltrate in the stomach, colon, liver and kidneys. The co-transfer of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺, both sorted from the *in vitro* culture, was able to control the cell infiltrates in the target organs and the total cell count in the lymph-nodes. Thus, the Tregs expanded *in vitro* are able to suppress the immune response in *in vitro* and *in vivo* assays.

Keywords: Dendritic cells. Apoptosis. Regulatory T cells. Foxp3. Immunosuppression

INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um sistema de reconhecimento molecular que tem como função a manutenção da homeostasia, em situações infecciosas ou fisiológicas. O sistema é composto pela imunidade inata, que em última instância é responsável pelo controle inicial de uma infecção, além de gerar condições propícias para que a imunidade adquirida entre em ação. A imunidade adquirida, por sua vez tem o papel ativo de eliminar a infecção de modo específico envolvendo células e anticorpos produzidos em resposta específica ao microrganismo em questão.

Fazem parte da imunidade inata, vários tipos celulares, dentre eles as células dendríticas que são indispensáveis para o desenvolvimento da resposta imunológica. As DCs são responsáveis pela captura, processamento e apresentação de antígenos para células da imunidade adquirida, os linfócitos T. Sendo assim, as DCs são chamadas de APCs profissionais (do inglês “antigen presenting cells”) e são especializadas nos processos que envolvem a apresentação de antígenos para os linfócitos T (Banchereau e Steinman, 1998; Sallusto e Lanzavecchia, 1999). Sua descoberta foi feita por Steinman e Cohn no início dos anos 70 (Steinman e Cohn, 1973), no entanto, sua completa caracterização e identificação só foram publicadas na segunda metade dos anos 70 (Steinman e Witmer 1978; Steinman e Nussenzweig, 1980). A partir do momento em que foi comprovada a importância das DCs nas reações leucocitárias mistas (do inglês MLR – mixed leukocyte reaction), como potente estimuladora de leucócitos e participação na rejeição de transplantes, os trabalhos sobre estas células tornaram-se mais freqüentes (Steinman e Inaba, 1985). Sabe-se que hoje as DCs estão presentes em praticamente todos os tecidos do organismo desde o sangue até os órgãos linfóides para que possam funcionar como sentinelas do sistema imune, fagocitando e processando antígenos provenientes de todas as estruturas do organismo (Banchereau et al., 2000; Mellman, 2005; Ueno et al., 2007).

Em camundongos, as DCs podem ser divididas em subpopulações que são diferenciadas pela expressão de marcadores de superfície. Uma dessas

subpopulações é a de DCs convencionais (cDC antigamente chamadas de DCs mielóides e linfóides) que, por sua vez, pode ser dividida em duas categorias: 1) cDCs migratórias cuja função principal envolve a migração do tecido periférico para os linfonodos e apresentação de antígenos para células T, como as células de Langerhans. E 2) cDCs residentes no tecido linfóide como as DCs tímicas e esplênicas. Em camundongos, as DCs são fenotipicamente caracterizadas pela expressão da molécula CD11c e em alguns casos a molécula CD8, CD4, CD11b, PDCA (do inglês, plasmacytoid dendritic cell antigen) entre outros marcadores. Ainda há a subpopulação de DCs plasmacitóides (pDCs) que pode ser considerada como uma população precursora de cDC, caracterizada fenotipicamente pela expressão de marcadores como B220, PDCA e em resposta a antígenos virais, as pDCs secretam altas concentrações de IFN do tipo I (Shortman e Liu, 2002; Shortman e Naik, 2007).

Durante processos infecciosos, ou na lesão tecidual, as DCs fagocitam os microrganismos invasores, processam os antígenos provenientes deste microrganismo e migram para os linfonodos onde os antígenos processados serão apresentados aos linfócitos T. Com este estímulo, dependendo da natureza do antígeno fagocitado e processado, inicia-se o processo de maturação das DCs e, além do aumento da expressão de moléculas do MHC II, também aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40. Para a apresentação dos antígenos, as DCs, e todas as outras APCs, utilizam as moléculas do MHC para apresentar os antígenos processados na membrana (Bach et al., 1975; Shortman e Liu, 2002).

Além da divisão entre cDCs e pDCs, podemos classificar as DCs quanto ao seu estado de ativação como maduras e imaturas (mDC e iDC respectivamente). As iDC são assim classificadas pela baixa expressão de MHC II e de outras moléculas co-estimuladoras (B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) e CD40) e relacionadas à migração (CCR7) além da alta capacidade fagocítica (Villadangos e Schnorrer, 2007). Dentre as substâncias que podem causar este tipo de estímulo ativador de iDC podemos citar moléculas exógenas, como o LPS (lipopolisacarídeo presente na parede celular de bactérias gram negativas), RNA dupla fita, peptidoglicano, ou endógenas como citocinas

inflamatórias, imunoglobulinas através de receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcRs), bradicininas entre outras (Guermonprez et al., 2002).

Uma vez que a iDC inicia o processo de maturação por algum estímulo, ela se torna mDC e perde parte da capacidade de internalizar, processar antígenos e ganha a capacidade de apresentá-los e ativar linfócitos T. Esse fato pode ser explicado pela mudança funcional e fenotípica, envolvendo expressão de genes importantes para o transporte do antígeno para a membrana e expressão de moléculas importantes para a apresentação antigênica e estudos também comprovam que a migração das DCs ativadas para o linfonodo é muito mais eficiente uma vez que a DC se transformou em mDC (Guermonprez et al., 2002). Por outro lado, Steinman e Nussenweig (2002) comprovam a capacidade de DCs de migrar para órgãos linfóides secundários e apresentar antígenos mesmo na ausência de sinais de maturação, sugerindo que as DCs migrariam para os linfonodos para apresentar antígenos próprios, coletados de um possível dano tecidual, e manter a tolerância periférica.

Uma das etapas na apresentação de antígenos é a discriminação entre padrões moleculares de agentes exógenos e padrões moleculares próprios, de estruturas presentes no organismo. Uma vez que a DC consegue fazer a distinção entre o próprio e o não próprio, ela pode dar início à resposta imune. Alguns mecanismos fazem parte dessa distinção como o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs do inglês pathogen associated molecular patterns) por receptores específicos (PRRs do inglês pathogen recognition receptors) (Fearon e Locksley, 1996,; Hoffman et al., 1999). Se houver falha na distinção entre próprio e não próprio, uma resposta imune contra componentes de estruturas do próprio organismo pode ser iniciada levando ao desenvolvimento de doenças autoimunes.

Para o controle das doenças auto-imunes o sistema imunológico conta com vários mecanismos de tolerância ao próprio. O mecanismo mais importante, e que ocorre mais cedo durante o desenvolvimento do sistema imune, é a tolerância central que envolve o timo. Este órgão linfóide primário é responsável por garantir que os linfócitos que irão popular os órgãos linfóides secundários não são autorreativos, ou seja, não possuem TCR (do inglês T cell

receptor) que reconhece estruturas próprias. No timo, há APCs que apresentam antígenos próprios, que precisam ser reconhecidos pelo TCR dos linfócitos T com baixa afinidade para poderem ser selecionados positivamente, e migrarem para a periferia do sistema imune. Para que as células do timo expressem antígenos próprios no timo, é preciso que haja a expressão de um gene chamado AIRE (do inglês, autoimmune regulator) que garante a expressão promíscua de antígenos presentes em tecidos diversos do organismo (Derbinski et al., 2005; Anderson et al., 2005). Os linfócitos T que reconhecem os antígenos próprios com alta afinidade sofrem deleção clonal para que não migrem para a periferia e iniciem resposta contra o antígeno que reconheceram no timo (Kyewski e Derbinski, 2004).

Após a seleção clonal que ocorre no timo, os linfócitos migram para os órgãos linfóides secundários como o baço, linfonodos, placa de Peyer, entre outros. Apesar da fina seleção pela qual os linfócitos passam no timo, há a possibilidade de alguns clones autorreativos escaparem desta seleção negativa e migrarem para a periferia. Para que os clones possivelmente patogênicos não iniciem resposta contra o antígeno para o qual são específicos, há diversos mecanismos de tolerância periférica que mantêm a homeostasia do sistema imune.

A ignorância imunológica é o mecanismo de tolerância periférica no qual os auto antígenos são ignorados pelos linfócitos T específicos que escaparam da seleção negativa. Este fato pode ser comprovado pelo estudo de Ohashi et al. (1991) que utiliza camundongos com TCR específico para uma glicoproteína encontrada no vírus causador da coriomeningite linfocítica (LCMV do inglês lymphocytic choriomeningitis virus), e camundongos transgênicos que expressam essa glicoproteína nas células β das ilhotas pancreáticas. A transferência de células do animal com TCR específico para a glicoproteína para o animal que a expressa no pâncreas não leva ao desenvolvimento de resposta imune contra as células β . A falta de resposta das células inoculadas pode ser revertida com a indução da expressão desta glicoproteína no animal com TCR transgênico, por meio de infecção do camundongo com LMCV, o que demonstra que o mecanismo de tolerância não envolve deleção de clones autorreativos ou anergia, mas sim o fato de o linfócito não ter sido previamente

exposto à glicoproteína. O estudo de Bianchi et al. (2009) demonstra que a transferência de células T provenientes de camundongos OT-I e OT-II, com TCR específico para OVA para camundongos com expressão de OVA em queratinócitos induzida por um promotor de queratina, não desenvolvem autoimunidade, apesar de haver proliferação destas células nos órgãos linfóides. Assim como o estudo de Ohashi et al. (2001), o estudo de Bianchi et al. (2009) sugere que a ignorância do linfócito T ao antígeno para o qual é específico evita a ação deste linfócito na periferia, sendo assim um mecanismo de tolerância periférica. Outro evento que pode ocorrer dentro dos órgãos linfóides secundários é a apresentação de auto antígenos pelas células estromais dos linfonodos. A apresentação de auto antígenos requer a expressão de AIRE, que faz com que estas células estromais CD45⁻ apresentem auto antígenos tanto no contexto de MHC I quanto MHC II de maneira não imunogênica, contribuindo assim para a manutenção da tolerância periférica (Lee et al., 2007).

Ao processo de não responsividade funcional ao reconhecimento do antígeno próprio damos o nome de anergia clonal, que pode ser induzida de várias maneiras, porém as vias mais estudadas são as interações de moléculas inibidoras como CTLA-4 (do inglês cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) e PD-1 (do inglês programmed cell death 1). A molécula CTLA-4 é um homólogo estrutural do CD28 só que apresenta maior afinidade por B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) quando comparado com a interação destas com o CD28. A expressão de CTLA-4 é considerada tardia, pois ocorre longos períodos após a ativação do linfócito T, apesar de desempenhar importante papel na contrarregulação da progressão do ciclo celular (Walunas et al., 1994, Krummel e Allison, 1996). Os animais deficientes em CTLA-4 apresentam linfoproliferação espontânea de células T e autoimunidade (Waterhouse et al., 1995; Tivol et al., 1995). A molécula PD-1 funciona como uma segunda molécula contrarreguladora que está relacionada com a indução e manutenção da tolerância, já que a deleção dos genes que codificam tanto PD-1 quanto os seus ligantes (PDL-1 e PDL-2) leva ao desenvolvimento de autoimunidade sistêmica (Nishimura et al., 1999, Freeman et al., 2000; Keir et al., 2006).

A deleção clonal também é importante para a manutenção da tolerância periférica, uma vez que a ativação crônica de linfócitos autorreativos leva à morte destes por apoptose como resultado de uma combinação de eventos moleculares. Basicamente há a ligação do receptor Fas com o seu ligante FasL que leva a morte celular mitocondrial dependente da molécula Bim (Marrack e Kappler, 2004). A deficiência de moléculas como Fas em camundongos é responsável por doenças linfoproliferativas e autoimunidade acarretadas pela falta do sinal indutor de morte nos linfócitos T (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). As células T dos camundongos Bim deficientes também são resistentes à apoptose e além disso, os animais desenvolvem doenças linfoproliferativas e glomerulonefrite induzida pelo depósito de imunocomplexos nos rins (Bouillet et al., 1999).

A importância das DCs no desenvolvimento da resposta imune já foi descrita anteriormente, mas a capacidade destas células na indução da tolerância periférica ainda não está muito clara. Existem evidências que sugerem que uma forma de maturação incompleta de DCs é capaz de induzir caráter tolerogênico para estas células. Para tentar elucidar este fenômeno, o grupo de Nussenzweig desenvolveu um anticorpo monoclonal associado à HEL (do inglês hen egg lysozyme) que induz a fagocitose deste antígeno, entretanto não induz a maturação das DCs. A apresentação destes antígenos de HEL para células 3A9 (linfócitos T com TCR específico para HEL) não levou à proliferação destas células e nem a produção de citocinas que indicassem que a célula T foi ativada, como IFN- γ . Além de não proliferarem pela apresentação do antígeno pela DC, uma segunda estimulação com HEL foi realizada e não houve resposta por parte das células 3A9 (Hawiger et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados com células T CD8⁺ após contato com DCs esplênicas expostas a células em processo de morte. O antígeno OVA foi introduzido por choque osmótico em esplenócitos em processo de morte, e estas células foram cultivadas com DCs. Quando estas DCs foram co-cultivadas com linfócitos T CD8⁺ com TCR específico para OVA (OT-II), não houve ativação e proliferação destes linfócitos, sugerindo que na ausência de estímulos inflamatórios, as DCs apresentam antígenos de forma não imunogênica, gerando assim tolerância (Liu et al., 2002).

Há ainda outro tipo de seleção que ocorre com os linfócitos que reconhecem o antígeno próprio com alta afinidade no timo. Estes são selecionados positivamente e migram para a periferia, mas com outra função diferente dos outros linfócitos selecionados por baixa afinidade. A função destes linfócitos T cujos TCRs reconhecem antígenos próprios com alta afinidade seria regular a resposta imune contra os antígenos para os quais são específicos. Vários trabalhos já demonstraram que o timo produz células autorreativas e que elas migram para a periferia para regular a resposta a antígenos próprios (Itoh et al., 1999; Jordan et al., 2001). Apesar de estar comprovado que estas células autorreativas migram para a periferia, muitos dos mecanismos que envolvem essa seleção positiva ainda não estão bem explicados. A ação dos linfócitos T reguladores faz parte dos mecanismos imunológicos de tolerância periférica, que fazem com que as células que possivelmente escaparem da seleção negativa no timo possam ser mantidas em constante vigilância ou até serem eliminadas dependendo da situação.

Os estudos de Nishizuka et al. (1969), descreveram que a timectomia neonatal de camundongos fêmeas levavam à atrofia do ovário e esterilidade das mesmas. Já nos machos esse fenômeno não era observado em relação aos testículos. A reconstituição do timo nestes animais pouco tempo após a timectomia era capaz de reverter o quadro de esterilidade. Com isso, foi levantada a hipótese de que o timo gerava algo capaz de suprimir a doença observada nas fêmeas. No início dos anos 70, um grupo de pesquisadores chegou à conclusão que um tipo de célula T era capaz tanto de intensificar quanto de diminuir uma resposta imune. Este grupo também percebeu que esse tipo celular era diferente das células T auxiliares que já eram conhecidas (Gershon e Kondo, 1970). A partir deste ponto, as chamadas “células T supressoras” tornaram-se foco de vários estudos pelo mundo inteiro e já nos anos 80, foram sugeridos mecanismos para o poder supressor deste subtipo de células T, como secreção de substâncias imunossupressoras que seriam descritas posteriormente como IL-10 e TGF- β (Chen et al., 1994; Nakamura et al. 2001; Cools et al., 2007). Estudos foram feitos para fenotipar estas células e relacionar algum tipo de marcador de superfície celular com o poder de inibir ou intensificar a autoimunidade. Dentre as moléculas estudadas até hoje está o

CD4 e o CD25, cadeia α do receptor para IL-2 expresso em células T ativadas (Sakaguchi et al., 1995). As células T reguladoras possuem algumas características exclusivas, que não são observadas nas outras células do sistema imune, já que uma vez ativadas via TCR não proliferam (Itoh et al., 1999), possuem TCR autorreativo (Jordan et al., 2001), não produzem IL-2 como os outros linfócitos ativados (Takahashi et al., 2000), além de terem a capacidade de suprimir a proliferação de células CD4⁺ e CD8⁺ *in vitro* (Suri-Payer et al., 1998).

Outra molécula relacionada ao subtipo de linfócitos T com capacidade reguladora é o CD45RB. Os trabalhos de Powrie et al. (1993, 1995) comprovaram que as células CD4⁺CD45RB^{low} são capazes de modular a colite induzida pela transferência de células CD4⁺CD45RB^{high} em animais linfopênicos SCID. A transferência de células CD4⁺CD45RB^{high} era capaz de induzir colite inflamatória pela falta de mecanismos que conseguissem regular a resposta Th1 induzida pelas bactérias presentes no trato gastrointestinal, uma vez que a transferência conjunta de células CD4⁺CD45RB^{low} foi capaz de prevenir a indução de colite nestes animais.

O estudo de Sakaguchi et al. (1995) demonstra que a co-transferência de células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ é capaz de impedir o desenvolvimento de autoimunidade em camundongos atímicos Nude. A transferência de células de baço e linfonodo CD4⁺CD25⁻ induziu vários focos de autoimunidade, sugerindo que estas células, que populam a periferia do sistema imune de camundongos, possuem TCR específico para antígenos próprios. Como há células autorreativas na periferia, é necessário que haja algum tipo de mecanismo que seja capaz de manter as células potencialmente patogênicas em constante vigilância. A prevenção da autoimunidade foi atingida quando foram transferidas células CD4⁺CD25⁺, sugerindo que as células que expressam estas moléculas são dotadas de alguma capacidade de impedir que as células patogênicas ajam. Estas células seriam responsáveis pela manutenção da homeostasia periférica.

Mais recentemente, outra molécula passou a ser associada às Tregs, o fator de transcrição Foxp3 que codifica a proteína scurfin. Este fator de transcrição intracelular foi classificado como indispensável para a diferenciação

e manutenção das células CD4⁺CD25⁺ (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003; Roncador et al., 2005). Estudos mais antigos revelaram que a ausência deste fator de transcrição, tanto em camundongos, quanto em humanos, causa uma doença proliferativa no sistema imune como consequência de ativação crônica de células T. Por outro lado, a expressão excessiva de Foxp3 leva a redução da população madura de linfócitos T e diminuição da função da mesma em modelos murinos (Khattari et al., 2001). Os estudos de Hori et al. (2003) e Fontenot et al. (2003) também demonstram que a expressão ectópica de Foxp3 confere à célula capacidade reguladora, capaz até de impedir o desenvolvimento de IBD (do inglês inflammatory bowel disease) quando transferidas para animais linfopênicos. Recentemente o trabalho de Lipscomb et al. (2010) demonstrou que a expressão ectópica de Foxp3 em células não linfóides como as DCs também é capaz de conferir capacidade reguladora, impedindo o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1, e aumentando a população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ que modulam a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como a produção de IFN- γ .

A criação do camundongo Foxp3 GFP (do inglês green fluorescent protein) permitiu que o estudo das células reguladoras pudesse ser mais específico, já que a marcação das células Foxp3⁺ impedia a utilização posterior destas células para ensaios de supressão, uma vez que, para a marcação do fator de transcrição, era necessário que as células fossem permeabilizadas. O camundongo Foxp3 GFP knock in possui uma inserção no DNA que faz com que a expressão de Foxp3 leve à expressão de GFP permitindo assim a identificação da célula em tecidos linfóides e a separação para utilização da população reguladora em ensaios celulares (Fontenot et al., 2005). Este mesmo estudo mostra a necessidade da sinalização da citocina IL-2 para a manutenção das células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vivo*, pois ela regula a expressão de genes envolvidos com o crescimento celular e metabolismo. Além disso, o mesmo estudo comprova que timócitos de camundongos knock out para IL-2 e a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25) são capazes de expressar Foxp3 e também as células Foxp3⁺ isoladas da periferia do sistema imune possuem capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T *in vitro*. Até então a IL-2 era tida como uma citocina indispensável para o

desenvolvimento e função das células T reguladoras. O estudo de Setoguchi et al. (2005) demonstra que *in vivo*, a IL-2 é necessária para a manutenção das células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, mas não para o desenvolvimento das mesmas, ou seja, no timo a sinalização da IL-2 não é necessária, mas na periferia sim.

Outro camundongo foi criado para o estudo da função do Foxp3 com o auxílio das técnicas moleculares de Cre-Lox para a inserção de uma sequência de DNA, que codifica o receptor para a toxina diftérica (DTR) no locus genético do Foxp3. Assim, quando a célula expressasse Foxp3, também expressaria o DTR e pode ser eliminada com a administração de toxina diftérica. Assim foi criado um modelo de depleção de células Foxp3⁺ que permite que este procedimento seja feito em qualquer momento da vida do animal, seja na fase neonatal, ou no animal adulto. Com a criação deste animal, o trabalho de Kim et al. (2007) sugere que o Foxp3 é necessário para o monitoramento de clones autorreativos tanto na fase neonatal quanto na vida adulta do animal. Quando a depleção de Foxp3 foi induzida, houve a quebra da tolerância periférica e o animal desenvolveu autoimunidade, demonstrando que os clones autorreativos gerados durante o desenvolvimento linfocitário não são totalmente eliminados durante a seleção tímica, podendo migrar para a periferia. Migrando para a periferia, estes linfócitos autorreativos são monitorados por células Foxp3⁺ que garantem a integridade do organismo. Um dos mecanismos estudados seria o controle da proliferação e geração de DCs por parte das células Foxp3⁺. O número de DCs que proliferam nos órgãos linfóides aumenta, e a geração destas células a partir de precursores da medula óssea também aumenta nos animais depletados de Foxp3, sugerindo que haja uma regulação desta proliferação e geração por parte das células Foxp3⁺.

Segundo Yamazaki et al. (2006), as DCs são mais eficientes na geração de Tregs quando amadurecidas com produtos bacterianos como o CFA (adjuvante completo de Freund). Neste mesmo estudo, foi provada a baixa eficácia de macrófagos e linfócitos B em expandir células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e também a importância de APCs CD80/CD86⁺ para a conversão em células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Apesar da importância destas moléculas para a ativação de linfócitos T, as APCs CD80/CD86⁻ ainda são capazes de induzir Tregs, embora em quantidades muito baixas. Até hoje, todos os estudos com

interação de DCs e células T sugerem que o contato entre essas duas células é indispensável para que ocorra a ativação da célula T e a posterior expressão de CD4⁺CD25⁺ (Yamazaki et al., 2003; Hara et al., 2001; Giorgini e Noble, 2007; Jiang et al., 2003).

Atualmente o “clearance” de células em apoptose é considerado muito importante para a manutenção da tolerância periférica, e boa parte dos estudos mostra a importância das DCs neste processo. O trabalho de Voll et al. (1997) foi o primeiro trabalho a mostrar a importância das células apoptóticas na indução da imunossupressão aumentando a produção de IL-10 e diminuindo a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-12 por monócitos humanos, sendo independente do estímulo para o início da apoptose. A fagocitose de células em apoptose também pode modular a expressão de moléculas co-estimuladoras pelas APCs, não só mantendo DCs imaturas, mas ativamente induzindo resistência à maturação (Galucci et al., 1999; Sauter et al., 2000; Steinmann et al., 2000,). Também foi relatado que as DCs que fagocitam células em apoptose diminuem a capacidade de estimular e ativar linfócitos T, e essa perda na capacidade de ativação estaria relacionada com os efeitos inibitórios observados como a diminuição na expressão de moléculas co-estimuladoras, mas não seria um defeito na apresentação de antígenos, uma vez que as DCs que fagocitam células em apoptose continuam apresentando antígenos destas células via moléculas do MHC (Urban et al., 2001; Stuart et al., 2002).

Ainda, as células em apoptose, por terem a capacidade de impedir a maturação das DCs, podem induzir a expansão de células com capacidade reguladora, uma vez que iDCs são mais eficientes na expansão de células Foxp3⁺ quando comparadas às DCs expostas a estímulos de maturação (Marguti et al., 2009). Os estudos de Kushwah et al. (2009, 2010) mostram que as DCs que fagocitaram DCs em apoptose são capazes de expandir populações de células com propriedades reguladoras *in vitro*. Nesse caso houve expansão de células CD4⁺Foxp3⁺ que produzem altas quantidades de TGF- β e suprimem a proliferação de células CD4⁺ *in vitro*, demonstrando a capacidade das células apoptóticas na indução de imunossupressão.

Nesse contexto, estudos anteriores no nosso laboratório mostraram um aumento expressivo da porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ quando

células totais do linfonodo foram co-cultivadas com DCs imaturas ou maduras previamente incubadas ou não com células alogênicas em apoptose (Marguti et al., 2009). Apesar da observação de que todas as condições experimentais levaram à expansão da população de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, quando comparadas à população de células Treg do linfonodo, a maior eficácia na expansão destas células foi vista quando as iDCs pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, foram cultivadas com células dos linfonodos. No entanto, apesar da significativa expansão dessas células *in vitro*, não há dados sobre a capacidade reguladora das mesmas. Sendo assim nos propomos a caracterizar funcionalmente essa população de Tregs geradas *in vitro* na modulação da resposta imune *in vitro* e *in vivo*.

CONCLUSÕES

- ❖ As células dendríticas pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose são mais eficazes na expansão de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ quando comparadas às células dendríticas pulsadas com timócitos singênicos.
- ❖ A expansão das células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ é dependente de contato entre a célula dendrítica e a célula proveniente do linfonodo.
- ❖ O protocolo utilizado para a expansão de células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ leva à produção de citocinas como IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 e TGF- β . A produção diferencial destas citocinas pode estar relacionada com a expansão diferencial das células com potencial regulador.
- ❖ As células T $CD4^+CD25^+$ geradas *in vitro* são capazes de regular a resposta imune *in vitro* de forma específica e inespecífica.

- ❖ As células T $CD4^+CD25^+$ geradas *in vitro* são capazes de regular a resposta imune *in vivo* modulando a proliferação de células nos órgãos linfóides e impedindo a infiltração de células nos órgãos alvo de autoimunidade.

REFERÊNCIAS*

Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*. 2005 Aug;23(2):227-39.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*. 1999 Oct 4;190(7):995-1004.

Bach FH, Alter BJ, Schendel DJ, Segall M, Bach ML. Genetic and cellular control of in vitro models of allograft reactivity. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975;11(1):467-76.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, Atkins CJ, Christensen J, O'Garra A, et al. CD25⁺ CD4⁺ T cells compete with naive CD4⁺ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol*. 2005 Mar;17(3):279-88.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bianchi T, Pincus LB, Wurbel MA, Rich BE, Kupper TS, Fuhlbrigge RC, et al. Maintenance of peripheral tolerance through controlled tissue homing of antigen-specific T cells in K14-mOVA mice. *J Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):4665-74.

Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, et al. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol.* 2006 Dec 1;177(11):7551-8.

Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1303-10.

Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 1999 Nov 26;286(5445):1735-8.

Brandenburg S, Takahashi T, de la Rosa M, Janke M, Karsten G, Muzzulini T, et al. IL-2 induces in vivo suppression by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2008 Jun;38(6):1643-53.

Brodbeck WG, Macewan M, Colton E, Meyerson H, Anderson JM. Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Aug 1;74(2):222-9.

Chang DT, Jones JA, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, et al. Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine,

chemokine, and matrix protein production. J Biomed Mater Res A. 2008 Dec 1;87(3):676-87.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺. J Exp Med. 2003 Dec 15;198(12):1875-86.

Chen X, Doffek K, Sugg SL, Shilyansky J. Phosphatidylserine regulates the maturation of human dendritic cells. J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):2985-94.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science. 1994 Aug 26;265(5176):1237-40.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. J Leukoc Biol. 2007 Dec;82(6):1365-74.

de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. Eur J Immunol. 2004 Sep;34(9):2480-8.

Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenhausen M, et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. J Exp Med. 2005 Jul 4;202(1):33-45.

DiPaolo RJ, Brinster C, Davidson TS, Andersson J, Glass D, Shevach EM. Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3⁺ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. J Immunol. 2007 Oct 1;179(7):4685-93.

Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4⁺CD25 T cells. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2041-5.

Dustin ML. Making a little affinity go a long way: a topological view of LFA-1 regulation. *Cell Adhes Commun*. 1998;6(2-3):255-62.

El-Sawy T, Miura M, Fairchild R. Early T cell response to allografts occurring prior to alloantigen priming up-regulates innate-mediated inflammation and graft necrosis. *Am J Pathol*. 2004 Jul;165(1):147-57.

Fahlen L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):737-46.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1206-12.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5149-53.

Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):50-3.

Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007 Feb;5(2):e38.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1142-51.

Fransen JH, Hilbrands LB, Ruben J, Stoffels M, Adema GJ, van de V, et al. Mouse dendritic cells matured by ingestion of apoptotic blebs induce T cells to produce interleukin-17. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2304-13.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1027-34.

Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3⁺ T-regulatory cells from CD4⁺ C. *Am J Transplant.* 2004 Oct;4(10):1614-27.

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 1999 Nov;5(11):1249-55.

Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970 May;18(5):723-37.

Giorgini A, Noble A. Blockade of chronic graft-versus-host disease by alloantigen-induced CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in nonlymphopenic hosts. *J Leukoc Biol.* 2007 Nov;82(5):1053-61.

Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):882-8.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):737-42.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-67.

Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol.* 2001 Mar 15;166(6):3789-96.

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):769-79.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1313-8.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2002 Jan;109(1):41-50.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. 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. 1999 May 1;162(9):5317-26.

Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells ex vivo. Blood. 2003 Sep 15;102(6):2180-6.

Joetham A, Takeda K, Okamoto M, Taube C, Matsuda H, Dakhama A, et al. Antigen specificity is not required for modulation of lung allergic responses by naturally occurring regulatory T cells. J Immunol. 2009 Aug 1;183(3):1821-7.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. Nat Immunol. 2001 Apr;2(4):301-6.

Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of ^{high}-mobility group box-1 protein. Immunity. 2008 Jul 18;29(1):21-32.

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. J Exp Med. 2006 Apr 17;203(4):883-95.

Khatti R, Kasproicz D, Cox T, Mortrud M, Appleby MW, Brunkow ME, et al. The amount of scurf protein determines peripheral T cell number and responsiveness. J Immunol. 2001 Dec 1;167(11):6312-20.

Kim JD, Choi BK, Bae JS, Lee UH, Han IS, Lee HW, et al. Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun.* 2003 Dec;4(8):564-9.

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):191-7.

Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 1996 Jun 1;183(6):2533-40.

Kushwah R, Oliver JR, Zhang J, Siminovitch KA, Hu J. Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7104-18.

Kushwah R, Wu J, Oliver JR, Jiang G, Zhang J, Siminovitch KA, et al. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3(+) Treg. *Eur J Immunol.* 2010 Jan 25.

Kyewski B, Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol.* 2004 Sep;4(9):688-98.

Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):181-90.

Lipscomb MW, Taylor JL, Goldbach CJ, Watkins SC, Wesa AK, Storkus WJ. DC expressing transgene Foxp3 are regulatory APC. *Eur J Immunol*. 2010 Feb;40(2):480-93.

Liu C, Wang Q, Liu F, Li H, Zhu F, Wang X, et al. The allogeneic but not syngeneic dendritic cells effectively generated regulatory T cells from total CD4⁺ population without exogenous cytokines. *Scand J Immunol*. 2010 Jan;71(1):12-9.

Liu G, Wu C, Wu Y, Zhao Y. Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand J Immunol*. 2006 Jul;64(1):1-9.

Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med*. 2002 Oct 21;196(8):1091-7.

MacEwan MR, Brodbeck WG, Matsuda T, Anderson JM. Student Research Award in the Undergraduate Degree Candidate category, 30th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Memphis, Tennessee, April 27-30, 2005. Monocyte/lymphocyte interactions and the foreign body response: in vitro effects of biomaterial surface chemistry. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Sep 1;74(3):285-93.

Marguti I, Yamamoto GL, da Costa TB, Rizzo LV, de Moraes LV. Expansion of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells by bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 2009 May;127(1):50-61.

Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1061-7.

Marrack P, Kappler J. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:765-87.

Matejuk A, Buenafe AC, Dwyer J, Ito A, Silverman M, Zamora A, et al. Endogenous CD4⁺B. *J Neurosci Res*. 2003 Jan 1;71(1):89-103.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):311-23.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):298-300.

Mellman I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:63-7.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):762-74.

Morelli AE, Larregina AT. Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis*. 2010 Feb 6.

Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P. CD25⁺CD4⁺ T cells contribute to the control of memory CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8832-7.

Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004. Jan 15;172(2):834-42.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001 Sep 3;194(5):629-44.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999 Aug;11(2):141-51.

Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 1969 Nov 7;166(906):753-5.

Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006 Jun;118(2):240-9.

Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*. 1991 Apr 19;65(2):305-17.

Pandiyar P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1353-62.

Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun.* 2007 Dec;29(4):303-9.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol.* 1993 Nov;5(11):1461-71.

Powrie F, Leach MW. Genetic and spontaneous models of inflammatory bowel disease in rodents: evidence for abnormalities in mucosal immune regulation. *Ther Immunol.* 1995 Apr;2(2):115-23.

Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F. CD38⁺ CD45RB^(low) CD4⁺ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol.* 1998 Nov;28(11):3435-47.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):295-302.

Read S, Powrie F. Induction of inflammatory bowel disease in immunodeficient mice by depletion of regulatory T cells. *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 15:Unit.

Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Menarguez J, et al. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia.* 2005 Dec;19(12):2247-53.

Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, et al. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*. 2004 Mar;34(3):613-22.

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):546-58.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37 Suppl 1:S116-S123.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000 May 26;101(5):455-8.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*. 1999 Feb 15;189(4):611-4.

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2000 Feb 7;191(3):423-34.

Schramm C, Huber S, Protschka M, Czochra P, Burg J, Schmitt E, et al. TGFbeta regulates the CD4⁺CD25⁺ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int Immunol*. 2004 Sep;16(9):1241-9.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):723-35.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002 Feb;3(2):135-42.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):151-61.

Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):19-30.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973 May 1;137(5):1142-62.

Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Oct;75(10):5132-6.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells: features and functions. *Immunol Rev*. 1980;53:127-47.

Steinman RM, Inaba K. Stimulation of the primary mixed leukocyte reaction. Crit Rev Immunol. 1985;5(4):331-48.

Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. J Exp Med. 2000 Feb 7;191(3):411-6.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jan 8;99(1):351-8.

Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, et al. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells. J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):5008-20.

Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. J Immunol. 2002 Feb 15;168(4):1627-35.

Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. 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. 1998 Feb 1;160(3):1212-8.

Takahashi M, Kobayashi Y. Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. Cell Immunol. 2003 Dec;226(2):105-15.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998 Dec;10(12):1969-80.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303-10.

Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol*. 2006 Jan;7(1):83-92.

Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *J Immunol*. 2004 Jun 1;172(11):6519-23.

Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.

Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*. 2000 Jan 1;164(1):183-90.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue

destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995 Nov;3(5):541-7.

Tone M, Tone Y, Adams E, Yates SF, Frewin MR, Cobbold SP, et al. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 9;100(25):15059-64.

Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 2009 Mar 5;458(7234):78-82.

Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007 Oct;219:118-42.

Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8750-5.

Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jul;7(7):543-55.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997 Nov 27;390(6658):350-1.

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):405-13.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):314-7.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985-8.

Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Jul 21;198(2):235-47.

Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, Steinman RM. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:314-29. A

Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Feb 21;103(8):2758-63. B

Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Dermatol Sci*. 2009 May;54(2):69-75.

Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1571-9.