



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Regulación de la expresión de Foxp3 por TIF1 γ en
células Treg**

PRESENTA:

Biólogo: Eugenio Contreras Castillo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Paula Licona Limón
(Instituto de Fisiología Celular)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Claudia González Espinosa (CINVESTAV SUR)
Dr. Félix Recillas Targa (Instituto de Fisiología Celular)

Ciudad de México, Junio, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***A la flor de Oceloxóchitl,
por que en la
cotidianidad del día a
día me muestras que
vale la pena levantarse,
seguir a delante y
disfrutar de la vida. Te
quiero siempre.***

***A la flor de Copihue, a la
persistencia del
recuerdo, la nitidez de la
memoria y a la
esperanza de volver a
encontrarte en otro
espacio, en otro tiempo
o en otra vida.***

Agradecimientos académicas

A mi país y a las oportunidades que me ha brindado, la educación como sustento base para el progreso de una nación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las herramientas para mi crecimiento académico e intelectual.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, perteneciente al departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a la Dra. Paula Licon Limón por abrirme las puertas de su laboratorio, confiar en mí para ser parte de su laboratorio y transmitirme sus conocimientos en inmunología y su amor por la ciencia.

A los miembros de mi comité : Dr. Felix Recillas Targa y a la Dra. Claudia González Espinosa por sus comentarios y por sus consejos durante este proyecto.

A los miembros del jurado por su tiempo y sus comentarios para revisar mi proyecto: a la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, Dr Rafael Saavedra Duran, Dr. Víctor Julián Valdés, Dr. José Carlos Crispín Acuña y a la Dra. Marina Macias Silva.

A la M. En IBB Gabriela Xochitl Ayala Méndez, Dra. Claudia Rivera Cerecedo y al Dr. Héctor Malagón Rivero por su apoyo en el cuidado y reproducción de los animales del bioterio en el Instituto de Fisiología Celular.

Al M. en C. Carlos Castellanos Barba por la ayuda brindada para la irradiación de células en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al Dr. Rafael Saavedra Duran por proporcionarnos la cepa B6.Cg-Foxp3^{tm2Tch/J} utilizada en este trabajo.

Al laboratorio Crispín-Rosetti por el apoyo durante este proyecto, con reactivos y comentarios con respecto al proyecto.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Soldevila por el apoyo con reactivos y comentarios con respecto al proyecto.

A la Dra. Mayra Furlan por su apoyo y su apertura para resolver dudas de epigenética.

A la Q.F.B. Dámaris Priscila Romero Rodríguez encargada de la unidad de citometría del INER.

Al LabNaCiT, por brindarme las herramientas y el equipo necesario para la realización de este proyecto.

Agradecimientos personales

A mi familia: mis padres por darme la vida, aceptarme y brindarme un amor infinito e incondicional; mis hermanos por siempre aconsejarme, brindarme su cariño y reconfortarme con sus palabras de ánimo y mis abuelos por su cariño incondicional, los consejos de vida y por su apoyo infinito.

A mi tía Abigail por estar siempre dispuesta a darme una palabra de aliento en los momentos difíciles, por brindarme su cariño y la oportunidad de conocerla. Por las noches de desvelo viendo películas, brindándome consejos y palabras para seguir adelante. Por abrirme las puertas de tu casa y de tu corazón.

A la Doc. Paula por ser siempre una guía, por escucharme y brindarme su confianza. Por tener una paciencia de acero, y siempre apoyarme con mis ideas. Por tener siempre un carácter crítico y enseñarnos a ser jueces de nuestros propios resultados. Por el amor a la ciencia, la inmunología y al excelencia académica.

A los integrantes del laboratorio 125 Nte, que a pesar de ser compañeros son mis amigos, hacen el día a día un espacio ameno y me aguantan mis locuras.

A mi comadre Lupe y mi compadre Gustavo por escucharme, brindarme su amistad y cariño sincero; por abrir su corazón conmigo, por aguantarme y siempre tolerarme a pesar de todo; y por darme la oportunidad de ser parte de su familia. A Rosa, por que cada mañana puedo llegar a cantar y compartir vivencias, y experiencias. Al team Trim: a Diego, por formar parte crucial de este proyecto, por ser mi amigo, escucharme, ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación, además de siempre llegar al lab con una gran sonrisa; a Fernanda, por que compartir experiencias desde el INER por aguantarme, por ser mi amiga y tener confianza conmigo, y por llenarme de orgullo. A mi amigo Emanuel por siempre llegar al lab con una sonrisa, su apoyo y su ayuda. A Jose Luis y a Enrique, por siempre aguantarme desde el inicio de los tiempos, por tolerarme, por los bonitos recuerdos y las salidas por alitas. A Ofelia, por su corazón tan bondadoso y generoso y brindarme desde el día cero una amistad sincera. A los antiguos integrantes del laboratorio: Aranzazú, por los recuerdos, las risas y la amistad verdadera y finalmente a Rafal por ser siempre parte del equipo del perreo.

A mi mejor amigo Jerónimo, por siempre estar ahí para darme una palabra de apoyo, escucharme, compartir risas y recuerdos. A Lalo, por brindarme su amistad y cariño sincero.

A Mariana por ser una buena mamá con Enolita, por tu corazón generoso y por tu amistad generosa para conmigo. Por aconsejarme y brindarme palabras de apoyo.

A mi amigo Ricardo, por la confianza, la buena charla, por los recuerdos y siempre todo el apoyo.

A Nisa y a José Luis, por siempre estar ahí, por escucharme y hacerme sentir orgulloso de todos sus logros.

A mis Soldeamigos, a Saúl, Sandra y Samuel, por adoptarme en su laboratorio, por escucharme, por siempre considerarme y por la amistad que perdurará estemos donde estemos. Y a todos los integrantes del laboratorio de la Dra. Soldevila.

A mis compañeros del laboratorio de la Dra. Furlan, particularmente a mi amigo Andrés. Por brindarme la oportunidad de conocerlo, abrirme las puertas de su casa y de su familia.

A Víctor por echarme porras para terminar este camino que se hacia interminable, por toda la buena música y por el café de las mañanas.

A mis amigos de la facultad Ganesh, Ameyalli y Zaida por que siempre que recuerdo mi época de la facultad están ahí presentes.

A mi segunda familia Andrea, Ofelia, Víctor y Janette porque se que siempre puedo contar con ustedes con su cariño y apoyo.

A mi amigo Juan y amigo Jose Luis Bañales por que siempre eos llevo en el corazón.

A mis amigas Eli y Estrella porque la edad no es impedimento para una bonita amistad.

A ti que ya no estas, por hacerme feliz, por creer en mi, por tu sonrisa de cada mañana, por brindarme el amor sincero que necesitaba, porque pensar en tu recuerdo me llena de alegría y porque se... que ahora eres feliz.

Contenido

1. Abreviaturas.....	11
2. Resumen	13
3. Introducción	15
a. Desarrollo de linfocitos T	16
b. Linfocitos Treg	19
i. Identificación de <i>Foxp3</i> y células Treg.....	19
ii. Células Treg naturales: nTreg.....	20
iii. Células Treg de periferia: pTreg	22
iv. Células Treg inducidas: iTreg.....	23
v. Estado de activación de una Treg.....	24
vi. Regulación de la expresión de <i>Foxp3</i>	26
vii. La señal de IL-2 en el desarrollo y función de linfocitos T reg.....	29
c. Señalización por TGF- β	31
d. <i>TIF1γ</i> : factor transcripcional intermediario 1- γ	35
e. La señalización del TGF- β regula distintos linajes efectoros de células T....	40
4. Antecedentes.....	46
5. Hipótesis.....	50
6. Objetivo general	50
a. Objetivos particulares.....	50
7. Metodología.....	51
a. Animales experimentales.....	51
b. Genotipificación de ratones.....	51
c. Determinación de fenotipos basales en órganos linfoides de ratones <i>TIF1γ</i>	52
d. Cultivos celulares de células Treg.....	54
e. Cultivo de línea celular B16-F10.....	54
f. Modelo de inmunidad tumoral.....	55
g. Análisis estadístico.....	56
8. Resultados.....	57
a. Generación de cepa CD4 Cre <i>TIF1γ</i> fx/fx en fondo <i>Foxp3 EGFP</i>	57
b. Frecuencias basales de Treg en ratones CD4 fx/fx <i>TIF1γ</i> de 8 semanas....	58
c. Fenotipo de activación de células Treg (CD4+ <i>Foxp3</i> +) en ratones CD4 fx/fx <i>TIF1γ</i> de 8 semanas.....	62
d. Frecuencias basales de Treg en ratones CD4 fx/fx <i>TIF1γ</i> de más de 40 semanas.....	64
e. Fenotipo de activación de células Treg (CD4+ <i>Foxp3</i> +) en ratones CD4 fx/fx <i>TIF1γ</i> de más de 40 semanas.....	67
f. Ensayo de inducción de iTreg a partir de células CD4 deficientes de <i>TIF1γ</i>	69
g. Ensayo de estabilidad de Treg deficientes de <i>TIF1γ</i>	72
h. Modelo de inmunidad tumoral.....	73
9. Discusión	78

10. Modelo propuesto con respecto a las observaciones experimentales de la función de TIF1 γ en linfocitos Treg.....	87
11. Conclusión.....	88
12. Perspectivas	88
13. Referencias.	90
14. Anexo.....	100

Abreviaturas

Aire	Autoimmune regulator
APC/C	Anaphase-promoting complex
BMP	Bone morphogenetic protein
CNS	Conserved non-coding sequence
cTEC	Cortical thymic epithelial cell
DN	Double negative
EGF	Epidermal growth factor
FACT	Facilitates chromatin transcription
Fezf2	FEZ Family Zinc Finger 2
Foxp3	Forkhead box P3
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
EGFP	Enhanced Green fluorescent protein
KRAB	Krüppel associated box
MH	Mad homology domain
MHC	Major histocompatibility complex
Mixl1	Mix Paired-Like Homeobox
mTEC	Medullary thymic epithelial cell
NKT	Natural killer T cells.
Nrp-1	Neuropilin 1
pTEFb	The positive transcription elongation factor
RFP	Red fluorescent protein
Smad	Sma: small body size and Mad: mothers against decapentaplegic
SnoN1	Ski novel gene
Sox2	Sex determining Region Y-box 2
TCR	T cell receptor
TET	Ten-eleven Translocator
TGF-β	Transforming growth factor beta
TGFbR	Transforming growth factor beta receptor
TIF1γ	Transcriptional intermediary factor 1 gamma

TRIM	Tripartite motif
Ubc9	Ubiquitin carrier 9
WNT	Wingless/Integrated

Resumen

El TGF- β es una citocina pleiotrópica requerida para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, su desarrollo y el control del sistema inmunológico. En linfocitos T el TGF- β ejerce una función dual: por un lado, promueve un fenotipo pro-inflamatorio al promover diferenciación de linfocitos Th9 y Th17, por otro lado, inhibe perfiles inflamatorios como es Th1 y Th2 e induce diferenciación de linfocitos Treg. Dentro de las moléculas señalizadoras que participan en la vía del TGF- β se encuentra la vía canónica de las Smads, en la que el complejo Smad2/3 puede interaccionar con Smad4 o TIF1 γ y llevar a la célula a distintas respuestas funcionales. Hasta el momento, la contribución de los distintos componentes de la vía de TGF- β en linfocitos T no se han dilucidado por completo; en particular, se desconoce el papel de TIF1 γ en la generación, función y mantenimiento de células Treg. En este trabajo, usando ratones condicionales deficientes de TIF1 γ con el sistema Cre-lox en células CD4+, describimos el papel de TIF1 γ en la biología de células Treg. Nuestros datos sugieren que en homeostasis, la ausencia de TIF1 γ , no afecta la expresión de Foxp3, pero si induce un incremento en la expresión de marcadores asociados a la funcionalidad de Treg, específicamente CD25. También observamos que en ratones viejos, la ausencia de TIF1 γ afecta la frecuencia de células Treg, así como en su estado de activación. En condiciones de diferenciación *in vitro*, la ausencia de TIF1 γ repercute negativamente en la capacidad de conversión de células T vírgenes hacia iTreg. Al evaluar la estabilidad de linfocitos Treg *in vitro* mediante su activación policlonal,, encontramos un decremento en la frecuencia de células Treg deficientes de TIF1 γ . Adicionalmente, al evaluar la funcionalidad de las células Treg en un modelo de inmunidad tumoral, observamos que en ausencia de TIF1 γ , el volumen del tumor tiende a ser más pequeño con respecto al volumen en ratones silvestres. En conclusión, nuestros datos sugieren que TIF1 γ es importante para la diferenciación de iTregs *in vitro* y regula el estado de activación, la expresión de CD25, la estabilidad y la función de células Treg *in vivo*.

Abstract

TGF- β is a pleiotropic cytokine required for the maintenance of homeostasis, cell development and the control of the immune system. In T lymphocytes, TGF- β exerts a dual function: it promotes a pro-inflammatory phenotype by inducing differentiation of Th9 and Th17 lymphocytes and also it inhibits inflammatory profiles such as Th1 and Th2, and induces differentiation of Treg. Among the molecules that participate in the TGF- β pathway, the canonical pathway depends on Smad proteins. In this pathway the Smad2/3 complex can interact with Smad4 or TIF1 γ and lead the cell to different functional responses. So far, the contribution of the different components of the TGF- β pathway in T lymphocytes have not been fully elucidated, in particular the role of TIF1 γ in the generation, function and maintenance of Treg cells. In this work, using TIF1 γ -conditional deficient mice with the Cre-lox system in CD4 + cells, we describe the role of TIF1 γ in the biology of Treg cells. Our data suggest that in homeostasis, the absence of TIF1 γ results in normal Foxp3 expression but increases the expression of molecules related to Treg function including CD25. We also observed that in older mice, the absence of TIF1 γ reduces the frequency of Treg cells, as well as their activation state. Under *in vitro* Treg differentiation conditions, the absence of TIF1 γ decreases the conversion of naïve T cells into iTregs. When evaluating the stability of Tregs *in vitro*, through polyclonal activation of these cells, we found a decrease in the frequency of Foxp3 in TIF1 γ deficient Tregs. In addition, when we evaluated the functionality of Treg cells in a tumor model, we observed that in absence of TIF1 γ , the tumor volume is smaller compared to that in wildtype mice. In conclusion, our data suggest that TIF1 γ is important for the differentiation of iTregs *in vitro*, the regulation of the activation state, CD25 expression, stability and function of Treg cells *in vivo*.

Introducción

Todo organismo multicelular necesita de un sistema inmune que provee mecanismos de defensa y asegura su sobrevivencia. A lo largo del proceso evolutivo, una gran variedad de estrategias de defensa han surgido para el mantenimiento de la homeostasis de los organismos. Estrategias de sistema inmune innato se han conservado a lo largo de la evolución desde bacterias hasta vertebrados ¹. Sin embargo, es a partir de los vertebrados mandibulados donde podemos encontrar un sistema inmunológico con la capacidad de montar una respuesta de memoria antígeno específica, comúnmente llamado sistema inmune adaptativo ².

Dentro de las células del sistema inmune adaptativo encontramos a los linfocitos T, los cuales podemos dividir en linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos de acuerdo a la expresión de la glicoproteína de membrana CD4 o CD8, respectivamente. Los linfocitos T expresan en su superficie receptores antigénicos conocidos como TCR (*T Cell Receptor*) con capacidad de reconocer péptidos presentados en el complejo principal de histocompatibilidad o MHC (*Major Histocompatibility Complex*) por células presentadoras de antígeno profesionales. ³.

Los linfocitos T derivan de un precursor hematopoyético generado en la médula ósea. Dicho precursor migra por torrente sanguíneo hacia el timo, en donde adquiere un compromiso celular hacia el linaje linfoide, ocurren los procesos de re-arreglo de las cadenas del receptor de TCR y generación de linfocitos T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Los linfocitos $\alpha\beta$ se pueden comprometer hacia distintos sublinajes como son: linfocitos CD4, CD8 ó NKT (*Natural killer T cell*) ⁴.

Desarrollo de linfocitos T

El desarrollo de linfocitos T ocurre en el timo, el cual es un órgano bilobulado localizado detrás del esternón, por encima del corazón. El tamaño del timo varía con respecto a la edad del individuo, puesto que sufre un proceso de involución, siendo más grande en infantes que en adultos ⁵. En el timo se pueden distinguir dos regiones, la región cortical y la medular, donde ocurren 2 procesos importantes para la generación de linfocitos T: la selección positiva y la selección negativa.

La maduración de linfocitos T ocurre a través de una serie de pasos que se caracterizan por la expresión diferencial de moléculas de superficie, principalmente CD4 y CD8. Tanto en humanos como en ratón, el desarrollo ocurre de la siguiente forma: los precursores tempranos parten de un estadio doble negativo DN (CD4⁻ CD8⁻), el cual se puede subdividir en cuatro estadios (DN1 a DN4) con base a la expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD25. Posteriormente, pasan a un estadio doble positivo DP (CD4⁺ CD8⁺) y finalmente maduran a un estadio simple positivo o SP (CD4⁺ CD8⁻ ó CD4⁻ CD8⁺) ⁵.

Durante el proceso de diferenciación de un estadio DP a un estadio simple positivo (SP), los timocitos pasan por un proceso de selección positiva y negativa (Figura 1). Durante la selección positiva los timocitos DP interactúan con las células tímicas epiteliales corticales (cTEC) en donde se presentan péptidos corticales cargados en moléculas MHC tipo I y tipo II. Si los timocitos DP tienen un TCR funcional e interactúan y reconocen las moléculas MHCI o MHCII, continúan con su proceso de diferenciación en la médula expresando CD4 o CD8 (SP), dependiendo de la afinidad hacia moléculas MHCII o MHCI respectivamente (Figura 1A); si no tiene un TCR funcional, el timocito muere por apoptosis (Figura 1B). Durante este proceso de selección sólo del 10% al 30% de los timocitos tienen un TCR funcional y sobreviven.

Posteriormente, el timocito SP continúa su proceso de diferenciación en la médula donde se da el proceso de selección negativa y se asegura que los TCR no sean autorreactivos (Figura 1 C). En la médula las células epiteliales tímicas medulares (mTECs) expresan péptidos tejido específicos, mientras que las células dendríticas expresan antígenos más ubicuos y antígenos que pueden proceder de la periferia, cargados en moléculas de MHCI o MHCII. La expresión de antígenos tejido específico ocurre debido a que hay expresión de dos factores de transcripción: *Aire* (*Autoimmune regulator*) y *Fezf2* (*Fez family zinc finger 2*)⁶, los cuales permiten la expresión de distintos antígenos de periferia. En este proceso, si el TCR de la célula SP interacciona con alta afinidad, el timocito muere por apoptosis (Figura 1D); sin embargo, si el timocito reconoce al péptido con baja afinidad, continúa su proceso de maduración y migra como linfocito vírgen CD4⁺ CD62L⁺ ó CD8⁺ CD62L⁺ a los distintos órganos linfáticos y bazo. Por otro lado, si el reconocimiento del antígeno por el TCR es de una afinidad intermedia el timocito se diferencia hacia un linfocito T regulador (Treg: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (Figura 1E). De todos los precursores que migran al timo, sólo un 1-5% termina su proceso de maduración y sale a periferia.

Figura 1. Proceso de maduración de linfocitos T en el timo. Selección positiva (A-B). Selección negativa (C-D). A) Los timocitos dobles positivos interactúan con células epiteliales corticales (cTEC) donde se presentan péptidos del provenientes del timoproteosoma en moléculas MHCI y MHCII, si tienen un TCR funcional el timocito madura a SP y migra a la médula. B) Si el timocito no tiene un TCR funcional muere por apoptosis. C) El timocito SP interactúa con células epiteliales medulares (mTEC) donde se presentan antígenos propios, dependiendo de la afinidad con la que el timocito reconozca el antígeno puede tener distintos destinos: alta afinidad: apoptosis D), afinidad intermedia o baja: linfocitos Treg o linfocitos CD4/CD8 vírgenes, respectivamente E). Modificado de Kurd⁷

Posterior al proceso de selección positiva y negativa en el timo, los linfocitos T migran a la periferia como linfocitos T vírgenes. En periferia los linfocitos recirculan continuamente entre órganos linfáticos secundarios y sangre a través del sistema linfático, mediante la expresión de receptores quimioatrayentes como CCR7 (*CC-chemokine receptor 7*) y la molécula transmembranal CD62L (L-selectina) ⁸.

Los linfocitos CD4+ vírgenes dependiendo del tipo de infección y de los estímulos de distintas citocinas, pueden diferenciarse a distintos linajes efectoros. Estos linajes se caracterizan por la expresión de factores de transcripción linaje-específico y por la capacidad de secretar citocinas efectoras particulares; dentro de estos linajes encontramos linfocitos de las subpoblaciones:

- **Th1:** Linfocitos que regulan la respuesta a bacterias intracelulares, virus y en autoinmunidad. Se caracterizan por la expresión del factor transcripcional T-bet, y la producción de IFN γ .
- **Th2:** Linfocitos que participan en la respuesta en contra de parásitos extracelulares, en la reparación tisular y en procesos de alergia. Se caracterizan por la expresión del factor transcripcional Gata3 y la producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13.
- **Th17:** Linfocitos que regulan la respuesta a hongos, bacterias extracelulares y autoinmunidad. Se caracterizan por la expresión del factor transcripcional ROR γ y por secretar la citocina IL-17.
- **Th9:** Linfocitos que regulan la respuesta a parásitos extracelulares, reparación tisular y en procesos de alergia. Se caracterizan por la expresión de IL-9.

- **Tfh:** Linfocitos que regulan la inmunidad humoral así como la generación de centros germinales. Se caracterizan por la expresión del factor transcripcional Bcl6 y la secreción de IL-21.
- **Tr1:** Linfocitos con capacidad supresora, cuya función no depende de la expresión de Foxp3. Dichos linfocitos dependen de IL-10 para diferenciarse. Su mecanismo de supresión depende de la expresión de IL-10 y TGF- β ; se pueden distinguir por la coexpresión de Lag3 y CD49b⁹.
- **Treg:** Linfocitos que modulan de manera negativa los procesos de inflamación debido a que secretan citocinas anti inflamatorias como TGF- β , IL-10 e IL-35. Un subgrupo de estos linfocitos expresa el factor transcripcional maestro Foxp3. Estos linfocitos poseen una capacidad inmunosupresora que es de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y para la prevención del desarrollo de autoinmunidad al suprimir clones de células T autoreactivas.

El presente proyecto se centra en el estudio de los linfocitos con fenotipo regulador que expresan Foxp3.

Linfocitos Treg

Identificación de Foxp3 y células Treg

En 1949 estudios sobre el efecto de la radiación en mamíferos, en el Laboratorio de genética de los mamíferos en Oak Ridge, llevaron a la generación del ratón *Scurfy*. Este ratón se caracteriza por tener la piel escaldada, ojos enrojecidos, linfoproliferación, esplenomegalia y muerte prematura. En 1991, Virginia Godfrey describió por primera vez que en estos ratones existía un infiltrado de células linfoides y mieloides en distintos órganos, generando procesos de inflamación sistémica y autoinmunidad¹⁰. Al realizar el mapeo genético de los ratones *Scurfy*, se pudo demostrar que en estos ratones existía una inserción de dos pares de bases que generaban una proteína trunca de un gen que

se llamó *Foxp3* (*Forkhead box P3*). Posteriormente, estudios liderados por Shimon Sakaguchi, demostraron que *Foxp3* es el factor transcripcional de la familia de reguladores transcripcionales forkhead/winged-helix, requerido para la generación de linfocitos T reguladores (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺), y que la deficiencia de este factor desemboca en el fenotipo de autoinmunidad observado en los ratones *Scurfy* (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003).

En humanos se han mapeado más de 60 mutaciones en regiones codificantes y no codificantes del gen de *FOXP3*, mismas que llevan al desarrollo del síndrome IPEX (*Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked* o síndrome de inmunodisregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al cromosoma X) ¹¹. Dicho síndrome provoca una enfermedad autoinmune sistémica cuyo único tratamiento se basa en el trasplante de medula ósea ¹².

En condiciones homeostáticas, las células Treg constituyen alrededor del 1-2% del total de células T CD4⁺ en sangre periférica y se pueden identificar por la expresión del co-receptor CD4, la cadena α del receptor de interleucina 2 IL-2R α :CD25 y el factor transcripcional *Foxp3*. En ratón y en humanos, la frecuencia de células T reguladoras aumenta con respecto a la edad, particularmente en órganos linfáticos periféricos y bazo, no así en sangre periférica ¹³.

En general podemos clasificar a las células Treg por su origen:

- Células Treg naturales o tímicas (nTreg)
- Células Treg periféricas (pTreg)
- Células Treg inducidas *in vitro* (iTreg)

Células Treg naturales: nTreg

Las células Treg naturales o de origen tímico, representan un linaje de linfocitos CD4+ cuyo principal papel es el mantenimiento de la tolerancia. Las células nTreg son células que se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3 y por expresar en su superficie de manera constitutiva CD25¹⁴. Su diferenciación ocurre en la región medular del timo y se requieren la señal del TCR, CD28, IL-2 y parcialmente la de TGF- β ¹⁵⁻¹⁸.

Las células nTreg se identificaron en estudios pioneros que describieron la existencia de una población de células T capaces de mediar tolerancia y suprimir la inflamación. Estos estudios definieron fenotípicamente y descubrieron una población de linfocitos T con actividad supresora, células que no se generaban en ausencia de timo¹⁹. Dichas células tienen su origen en el timo entre los días 2 y 4 después del nacimiento y la timectomía en neonatos en este periodo, generaba autoinmunidad y muerte prematura^{20,21}. Este hallazgo llevó a la identificación de las células Treg con base en la expresión de los marcadores CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺. Se definió además, que estas células constituyen un linaje de células T derivadas de timo que poseen capacidades de suprimir la activación y la función de células T efectoras, así como la supresión de células presentadoras de antígeno, como células dendríticas, células B y monocitos²².

Se ha propuesto un modelo de 2 pasos requeridos para la generación de células Treg en el timo. En primera instancia, el reconocimiento del péptido presentado en contexto de MHC-II por el TCR del timocito, aunado a la señal de coestimulación mediada por CD80 o CD86, inducen la estabilización del timocito, la apertura y remodelación del locus de *Foxp3* y la expresión a la alta de CD25. Estos eventos generan una población de timocitos identificados como CD4⁺ Foxp3⁻ CD25⁺ que se han denominado precursores de células Treg. Como segundo requerimiento, la señalización mediada por IL-2 e IL-15, promueve que en las células precursoras Treg se inicie la transcripción de Foxp3 y se promueva una expresión estable de este factor transcripcional (Figura 2)^{17,23}. Recientemente se ha descrito que las células Treg de origen tímico pueden provenir de

un precursor $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^-$ ²⁴, sin embargo este es un tema en constante debate en el campo.

Por otro lado se ha postulado que el factor de crecimiento transformante: $\text{TGF-}\beta$, es necesario para la expresión inicial de *Foxp3* en precursores de células Treg, y que posteriormente, la señal de IL-2 promueve la supervivencia y expansión de estas células²⁵. $\text{TGF-}\beta$ se expresa en timo durante el proceso de selección negativa, cuando los macrófagos fagocitan cuerpos apoptóticos por lo que podría influenciar el desarrollo de linfocitos Treg. A las células Treg naturales se les puede identificar además de los marcadores antes mencionados (que comparten con otras poblaciones de células Treg), por la expresión del factor de transcripción Helios y la molécula de superficie Neuropilina 1 (Nrp-1)^{25,26}.

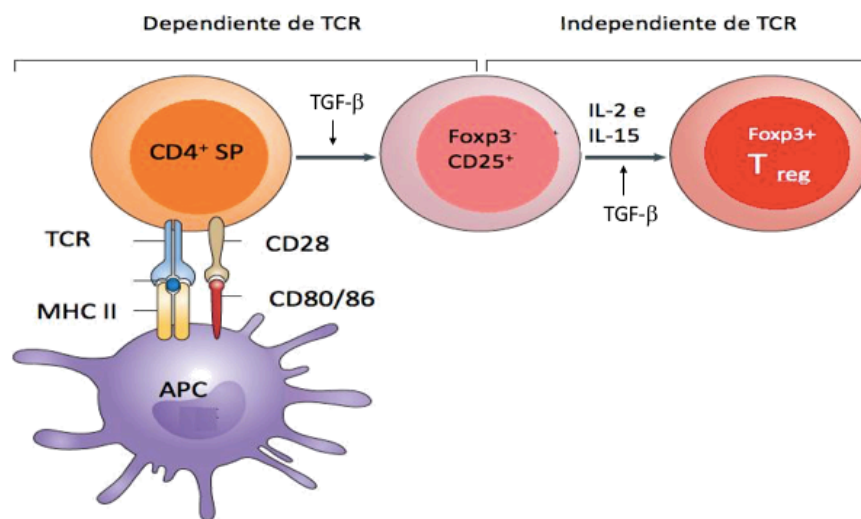


Figura 2. Generación de células Treg en el timo. En la médula del timo células presentadoras de antígeno presentan el péptido en contexto de MHC de clase II. Si se da el reconocimiento de antígeno con alta afinidad, en presencia de moléculas coestimuladoras como CD80 o CD86, hay selección de precursores $\text{Foxp3}^- \text{CD25}^+$ Treg. Posteriormente la señalización de IL-2, STAT5 y $\text{TGF-}\beta$ facilitan la inducción de *novio* de *Foxp3*, supervivencia y mantenimiento de estas células.

Células Treg de periferia: pTreg

Otra forma de generación de las células Treg es a través de la inducción *de novo* de la expresión de *Foxp3* en células CD4⁺ vírgenes en periferia, específicamente en nódulos linfáticos, intestino y sitios de inflamación. A estas células se les denomina células Treg de periferia o pTreg. En condiciones homeostáticas, las células pTreg constituyen alrededor del 20 al 40% del total de células Treg. Las condiciones que favorecen la inducción de las células Treg de periferia incluyen: presentación antigénica y coestimulación por células dendríticas, dosis sub-inmunogénicas del péptido agonista (señal baja de TCR), administración del péptido vía oral, microambiente en mucosas y la presencia de citocinas como TGF- β , IL-2 y/o ácido retinóico ²². En comparación a las células T reguladoras naturales, la diferenciación hacia el linaje regulador de periferia requiere bajas señales de coestimulación vía CD28 ²⁷. En particular las células pTreg se pueden inducir en tejidos con mucosas como el intestino donde se requiere tolerancia para bacterias comensales, así como el desarrollo de la tolerancia oral. También las células T anérgicas (linfocitos T que recibieron señal de TCR pero no una señal de coestimulación) pueden diferenciarse en linfocitos T reguladores, dependiendo de la expresión de moléculas como CD73 (5'ectonucleotidasa) y FR4 (receptor de folato 4) ²⁸.

Células Treg inducidas: iTreg

En condiciones experimentales en el laboratorio se pueden generar células T reguladoras a partir de células vírgenes CD4⁺ CD62L⁺ CD44⁻. Debido a su origen inducido *in vitro* se les ha denominado iTreg. Para la diferenciación de una iTreg se requieren las señales de CD3, CD28 y la presencia de TGF- β . Diversos estudios indican que para la generación de linfocitos iTreg no sólo se requiere a TGF- β sino también a IL-2 ²⁷. En este contexto, se puede argumentar que la sola presencia de TGF- β en un cultivo es suficiente para la diferenciación de iTreg. Sin embargo, en cultivos de linfocitos T vírgenes deficientes de IL-2, la generación de iTreg *in vitro* se ve afectada incluso con la presencia de TGF- β en el medio (Povoleri et.al., 2013). Por lo tanto, la generación de linfocitos Treg requiere IL-2, ya sea producida por el mismo linfocito T vía señal TCR, o

por la adición exógena de IL-2 ²⁹ (Tabla 1). Para fines de este trabajo, a partir de este momento se distinguirá una célula inducida *in vivo* de una *in vitro*, denominándolas pTreg e iTreg respectivamente.

	nTreg	pTreg	iTreg
Origen	Timo	Órganos periféricos	Diferenciadas <i>in vitro</i>
Señales de diferenciación	IL-2, IL-15 y TGF- β	Ácido retinóico, IL-2 y TGF- β	TGF- β +IL-2
Estabilidad	+++	++	+
Función supresora	+++	++	+

Tabla 1. Tabla comparativa entre los distintos tipos de Treg (nTreg, pTreg e iTreg).

Estado de activación de una Treg

Las células Treg pueden dividirse en activadas o en reposo con base en la expresión de los marcadores de activación y adhesión CD44 y CD62L respectivamente. De manera interesante, cada una de estas células presenta distintos patrones de localización y migración en tejidos como se resume en la Tabla 2. ^{18,30}.

Las células Treg en reposo se pueden identificar por los marcadores de superficie CD62L⁺ CD44^{low}. Estas células también tienen expresión incrementada de CCR7, el cual es un quimiorreceptor que promueve la recirculación y mantenimiento de las células Treg a tejidos linfoides. Su función supresora es localizada a nódulos linfáticos y particularmente a suprimir la activación y proliferación de linfocitos T vírgenes ^{31,32}. Así mismo, se ha identificado que la expresión de CCR7 favorece la localización de estas células Treg a zonas específicas dentro de los nódulos linfáticos y bazo, caracterizadas por una alta expresión de IL-2. También se ha reportado que la estabilidad de estas células Treg depende de la señalización de IL-2 y estas células expresan más CD25 que su contraparte activada ³¹. Con respecto a su origen, se considera que el fenotipo de reposo se adquiere desde el proceso de desarrollo en el timo, pues se trata de

emigrantes tímicos recientes. Nuevos hallazgos indican que en estas poblaciones se encuentran expresados los factores de transcripción Bach2 y Satb1, esenciales para la maduración de células nTreg, corroborando así su origen tímico ³³.

Por otro lado, las células Treg activadas se pueden identificar por los marcadores de superficie CD62L⁻ CD44^{hi}. Las células Treg activadas tienen expresión de CCR7 pero su expresión se encuentra disminuida a comparación de las Treg en reposo. Se localizan en órganos no linfoides y preferencialmente en sitios de inflamación ³². Con respecto a moléculas de adhesión y quimiorreceptores de superficie, estas células tienen mayor expresión de CXCR3, CD103 y ligando de P-selectina; así mismo muestran expresión incrementada de marcadores de activación como CD69, KLRG1 e ICOS ^{31,33}, en comparación con su contraparte en reposo. Con respecto a su activación y proliferación, se ha reportado que en las células Treg activadas, estos procesos están regulados por células dendríticas y dependen del ligando de ICOS (ICOSL) pero no de la señal de IL-2, como su contraparte en reposo, para su mantenimiento. El fenotipo de activación en linfocitos reguladores se ha asociado a la expresión de los factores de transcripción Blimp-1 e IRF4 ³⁴.

Fenotipo	Marcadores	Distribución	Generación	Homeostasis	Función
Reposo	CD62L ⁺ CD44 ^{low}	Órganos linfoides secundarios y recirculación por linfa y sangre.	Emigrantes tímicos recientes	IL-2, pero no TCR; baja tasa de proliferación y muerte celular.	Inhibición de activación y diferenciación de linfocitos T por consumo de IL-2.
Activadas	CD62L ⁻ CD44 ^{hi}	Residencia en órganos no linfoides y recirculación por linfa y sangre.	Estimulación por TCR	TCR y citocinas, altos niveles de proliferación y muerte celular.	Supresión de diferenciación y función de células efectoras: como linfocitos CD8 ⁺ .

Tabla 2. Tabla comparativa entre células Treg en reposo (CD44^{low} CD62L⁺) o activadas (CD44^{hi} CD62L⁻).

Regulación de la expresión de Foxp3

El control de la expresión génica de Foxp3 depende de múltiples factores a nivel epigenético como metilación del DNA, modificaciones de las colas de histonas, complejos remodeladores de la cromatina, RNA no codificantes; así como de distintos factores de transcripción. La expresión de *Foxp3* está controlada por cinco elementos principales a nivel de secuencia de DNA: el promotor y 4 secuencias altamente conservadas no codificantes denominadas CNS (*Conserved non-coding sequences*) cuyas funciones se han caracterizado en Tregs y pueden modular la diferenciación, la estabilidad y la función de células Treg. Entendemos estabilidad como la capacidad de las células Tregs de: 1) Mantener la expresión de Foxp3, 2) mantener capacidad supresora, y 3) ausencia de funciones efectoras (eg. Producción de IL2, citocinas pro-inflamatorias, proliferación, etc) ³⁵. La ubicación de estas regiones CNSs es: CNS0, se localiza en un intron del gen aledaño del locus de *Foxp3* en la región 5', CNS1 y CNS2 se localizan en el primer intron, y CNS3 está localizado en el segundo intron a 7 kb río abajo del sitio de inicio de la transcripción ^{27,36,37}. Estos sitios están regulados por modificaciones epigenéticas que determinan el estado de la cromatina y el estatus de metilación del DNA, modificando la accesibilidad de distintos factores de transcripción a las regiones reguladoras de *Foxp3* (Figura 3).

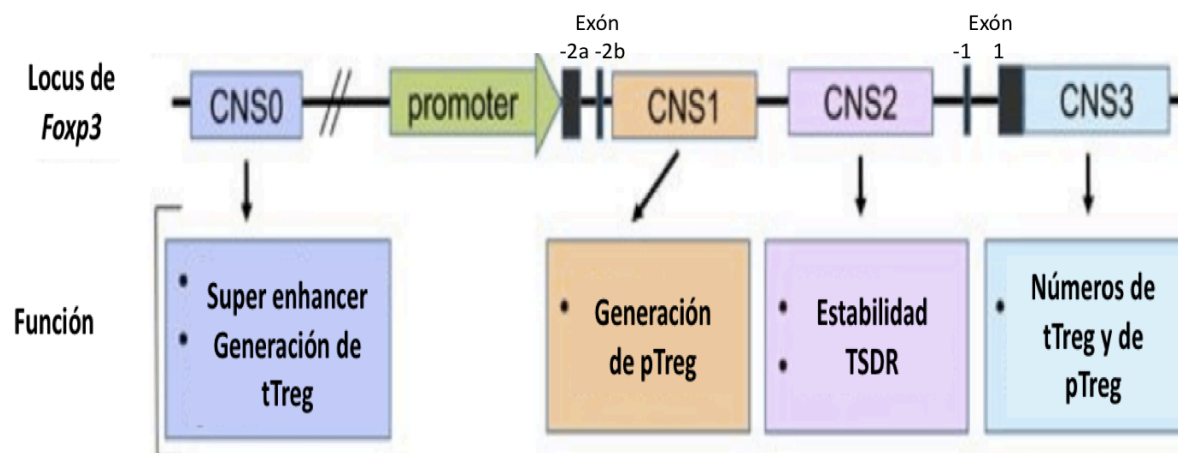


Figura 3. Regiones regulatorias del gen de Foxp3. En el locus de Foxp3 se distribuyen 4 regiones regulatorias: el promotor, CNS1, CNS2 y CNS3, además de una región regulatoria en un gen aledaño denominada CNS0, cada una con una función descrita en la parte inferior de la figura. Distintos factores de transcripción se unen a estas regiones para permitir la apertura de la cromatina e inducir la expresión estable de *Foxp3*. Modificado de Lee ³⁸

De los elementos conservados antes mencionados, cabe destacar que la región CNS1 es esencial para la inducción en periferia de células Treg y se han identificado sitios de unión a TGF- β , particularmente sitios de unión a Smad3, además de sitios de unión a AP-1, FOXO y NFAT. Particularmente, el sitio de unión a Smad3 es esencial para el potencial de diferenciación *in vitro* de iTreg, y para la diferenciación *in vivo* de pTreg en el intestino ³⁹. Esta región está formada por repeticiones intercaladas de mamíferos (mammalian-wide interspersed repeats:MIR) que se ha conservado a lo largo de la evolución de los mamíferos placentados, pero no así de los monotremas o marsupiales. En condiciones de homeostasis la presencia de esta secuencia promueve la diferenciación extratímica de linfocitos Treg para potenciar la tolerancia materno-fetal ⁴⁰.

Por otro lado, la región CNS2, también llamada TSDR (*Treg specific demethylated region*) se encuentra completamente desmetilada en células Treg pero metilada en células T convencionales. También se pueden identificar marcas de histonas acetiladas como H3Ac y H4Ac y diversos sitios de unión de factores de transcripción como: STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5), CREB/ATF, Runx1, Ets-1, c-Rel y Foxp3. En células Treg de origen tímico, la región CNS2 se encuentra altamente desmetilada, y en células Treg inducidas en periferia se encuentra parcialmente metilado ⁴¹ (Figura 4). En condiciones de diferenciación *in vitro* se ha descrito que la señal de TGF- β induce desmetilación parcial de la región de CNS2. Se sabe que el estado de metilación no es necesario para la expresión *de novo* de Foxp3, pero sí para la estabilización y el mantenimiento de la expresión de Foxp3 ^{42,43}.

Figura 4. Mapa de metilación del promotor y CNS2 del gen de *Foxp3*. A) promotor y B) CNS2 en células CD4⁺ CD25⁻ (vírgenes) y CD4⁺ CD25⁺ (Treg) provenientes de ratones machos y hembras. Se observa que en células Treg provenientes de ratones machos tanto la región promotora como CNS2 se encuentra completamente desmetilada y no así en células provenientes de ratones hembras. Modificado de Kim ⁴¹.

Dentro de los factores que promueven la desmetilación de la región promotora y de la región CNS2 del gen de *Foxp3* se han descrito la señal de IL-2, el reconocimiento de antígeno por el TCR y la señal de TGF- β , siendo este último un factor importante para la desmetilación de estas dos regiones (Figura 5) ⁴¹. Trabajos recientes han descrito que la señal del TGF- β participa en el proceso de desmetilación activa en células cancerosas ⁴⁴.

Figura 5. Mapa de metilación del promotor y CNS2 del gen de *Foxp3* influenciado por TGF- β . A) promotor y B) CNS2 en células CD4⁺ CD25⁺ (Treg) provenientes de ratones machos cultivadas por 6 días en presencia o ausencia de TGF- β . Modificado de Kim ⁴¹.

La señal de IL-2 en el desarrollo y función de linfocitos Treg

Identificada originalmente como factor de crecimiento de células T *in vitro*⁴⁵, IL-2 es una citocina producida principalmente por células CD4+ y CD8+. El receptor de IL-2 esta compuesto por tres subunidades, IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) y la cadena γ común (CD132). Las células Treg y las células T convencionales activadas son las poblaciones celulares que expresan predominantemente las tres subunidades del receptor⁴⁶. Las células Treg requieren la señal de IL-2 para conferir sobrevivencia, sin embargo no producen IL-2, por lo que la expresión de IL-2R α se encuentra incrementado a comparación de sus contrapartes de células T convencionales .

En la señalización de IL-2, la citocina se une a IL-2R α , posteriormente se forma un complejo con IL-2R β y la cadena γ común. Después se acoplan las cinasas JAK1 (Janus Kinase) y JAK3 a los dominios citoplasmáticos de IL-2R β y la cadena γ común, lo que genera fosforilación de las cinasas JAKs y fosforilación de residuos de serina en el dominio citoplasmáticos de IL-2R β (Figura 6). Los eventos de fosforilación activan tres vías de señalización intracelulares: la vía de las MAP cinasas, la vía de PI3K y STAT5 (compuesta por STAT5A y STAT5B). En los linfocitos Treg, la transducción de señales es mediada por STAT5, en parte porque los linfocitos Treg tienen expresión incrementada de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), misma que actúa inhibiendo a PI3K y representa una señal deletérea para las células Treg⁴⁷.

Figura 6. Vía de señalización de IL-2 en células Treg. La IL-2 soluble se une a la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25/IL2RA), posteriormente se forma un complejo con la cadena γ común y la cadena β del receptor (CD122/IL2RB). Con la formación de este complejo se activan las cinasas JAK1 y JAK3, lo que promueve la fosforilación de STAT5. Dímeros de STAT5 fosforilados se translocan al núcleo e inducen la expresión de genes asociados a conferir estabilidad y supervivencia a una célula Treg.

En las células Treg, la señal de IL-2 induce el incremento de Foxp3 y de CD25 a través de STAT5 mediante un sistema de retroalimentación positiva para establecer y mantener la identidad de las células Treg. En modelos murinos donde se depleta a IL-2, CD25 o CD122, se observa una enfermedad linfoproliferativa y autoinmunidad fatal multiorgánica. En el timo, los precursores de células Treg requieren la señal de IL-2, mediada por STAT5, para adquirir el fenotipo regulador. Distintas evidencias sugieren la importancia del papel de IL-2, ejemplo de ello es el fenotipo de ratones deficientes de TRAF3, molécula que inhibe la señal de IL-2R, dichos ratones exhiben un incremento de linfocitos Treg de origen tímico ⁴⁸. La señal de IL-2 no sólo es necesaria para inducir la

expresión de Foxp3, sino también para prevenir la apoptosis induciendo la expresión de Bcl-2 ⁴⁹.

Con respecto a las células Treg de periferia, la señal de IL-2 en conjunto con el TGF- β , promueven la diferenciación de linfocitos pTreg en intestino, inhibiendo a su vez la diferenciación de células Th17 ⁴⁶. La señal de IL-2 también estabiliza a las células Treg bajo condiciones de inflamación, esto se debe a que STAT5 se une a la región de CNS2 y al promotor de Foxp3 promoviendo la desmetilación de dichas regiones⁴³.

La señal de IL-2 es necesaria para la diferenciación de iTreg *in vitro* a partir de células vírgenes, esta señal es esencial para que ocurra la inducción de Foxp3 mediada por TGF- β , así como la expansión clonal y la adquisición de fenotipo supresor ⁵⁰

Dentro de las moléculas involucradas para la generación, función y mantenimiento de las células Treg; se ha descrito que la vía de TGF- β tiene un papel fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de este linaje de linfocitos T, y es la molécula inductora de las señales activadas en linfocitos Treg que estudiamos en esta tesis.

Señalización por TGF- β

La familia de la citocina TGF- β incluye una gran variedad de moléculas solubles dentro de las cuales podemos citar a: TGF- β 1, 2 y 3; activinas, inhibinas, Lefty, hormona antimulleriana, proteínas morfogenéticas de hueso o BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), Nodal, miostatina, GDFs (*Growth differentiation factor*) y el factor neurotrófico derivado de línea celular de glía o GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) ^{22,51,52}. Todas estas citocinas ejercen y controlan distintas funciones celulares como diferenciación, proliferación, adhesión, migración, muerte, y señalizan a través de distintas moléculas adaptadoras. Esencialmente, todas las células del cuerpo pueden percibir señales de la familia de TGF- β y responder al estímulo induciendo distintos tipos de respuestas ⁵¹. De todas las isoformas expresadas, TGF- β 1 es altamente expresada por células del sistema inmune y la ausencia de esta molécula induce muerte prematura e inflamación sistémica.

El TGF- β 1 señala a través de complejos de receptores transmembranales con actividad de cinasa de serina y treonina denominados TGF- β RI y TGF- β RII. El receptor activo esta formado por una estructura tetramérica, compuesto por un homodímero del receptor I y uno del receptor II. Inicialmente el TGF- β se une al homodímero formado por el receptor tipo II, el cual con su dominio de cinasa en la región citoplasmática, fosforila el dominio citoplasmático del receptor tipo I. La transfosforilación del receptor tipo I modifica un sitio de unión de la proteína FKBP12, la cual silencia la actividad cinasa del receptor, a un sitio permisible para la interacción con proteínas Smads. Dentro de estas, Smad2 y Smad3 son reclutadas al dominio intracelular del receptor tipo I, el cual fosforila al complejo Smad2/3. El complejo fosforilado forma una estructura trimérica con Smad4, el cual se transloca al núcleo para regular la expresión génica mediante la unión a regiones regulatorias de respuesta a Smad. La vía parcialmente dependiente de la canónica suple a Smad4 por TIF1 γ formando complejos con las R-Smads. También existen vías de señalización independientes a las Smads incluídas la vía de las MAP cinasas, la vía de PI3K y las Rho GTPasas (Figura 7).

Figura 7. Cascada de señalización del TGF β . La unión de TGF- β con TGF β RII induce transfosforilación en residuos de serina/treonina del TGF β RI, el cual fosforila al complejo Smad2/3. Dicho complejo puede unirse a Smad4, translocarse al núcleo y regular la expresión génica o unirse a TIF1 γ y regular la expresión de otros genes blanco. Existen vías independientes a las Smads como las MAP cinasas, la vía de PI3K y las Rho GTPasas. Modificada de Travis ⁵³

La familia de proteínas Smads está conformada por tres grupos: R-Smads (Smads reguladas por receptor), Co-Smad (Smad común) e I-Smads (Smads inhibitorias). Tanto las R-Smads (Smad 1,2,3,5 y 8) como la Co-Smad (Smad4) consisten de un dominio amino y carboxilo terminal globular, conocidos como dominios MH1 y MH2 (*Mad-homology*), separados por una región linker, lo cual permite interacción con distintas proteínas que promueven una diversidad de respuestas celulares. Por ejemplo, el dominio MH1 se une a DNA, y el dominio MH2 permite la interacción con otras Smads, distintos factores de transcripción, lectores de cromatina y coactivadores como CBP/p300. Por otro lado, las I-Smads (Smads 6 y 7), las cuales antagonizan la función de las R-Smads y las Co-Smads, carecen de dominio MH1, sin embargo pueden inhibir la señal de las vías de TGF- β y BMPs. Las I-Smads antagonizan la señalización de las Smad a distintos niveles: 1) asociándose al receptor tipo I, 2) reclutando a ligasas de

ubiquitina como Smurf1 o Smurf2, 3) uniéndose a las R-Smads e interfiriendo su asociación con la co-smad o 4) bloqueando su interacción con el DNA y complejos Smad nucleares ⁵⁴.

Alternativamente a la vía clásica, se ha descrito que Smad2/3 puede unirse a la proteína nuclear TIF1 γ (*Transcriptional intermediary factor 1*) y modular la expresión génica de manera distinta a la vía canónica a través de Smad4. Interesantemente, en precursores hematopoyéticos la vía de señalización de TGF- β depende de la unión del complejo Smad2/3 con Smad4 y TIF1 γ para regular distintos destinos celulares de un mismo precursor (Figura 8) ^{55,56}.

Figura 8. Señal del TGF- β en precursores hematopoyéticos. La señal en respuesta al TGF- β dependiente de Smad4 o TIF1 γ , mantiene pluripotencia o induce la diferenciación de células precursoras hematopoyéticas hacia eritropoyesis respectivamente. Modificado de He ⁵⁵.

TIF1 γ : factor transcripcional intermediario 1- γ .

La proteína TIF1 γ , también llamado Ectodermina o TRIM33, forma parte de la familia de proteínas TRIM, caracterizado por tener tres motivos conservados: un dominio de ubiquitina ligasa, dos dominios de tipo caja y un dominio súper enrollado; los cuales son necesarios para la interacción con otros dominios protéicos. TIF1 γ posee además una región linker donde se encuentra el dominio de unión a Smads y dominios PHD y bromo en el extremo carboxilo terminal que reconocen metilaciones y acetilaciones en la histona 3 (Figura 9).

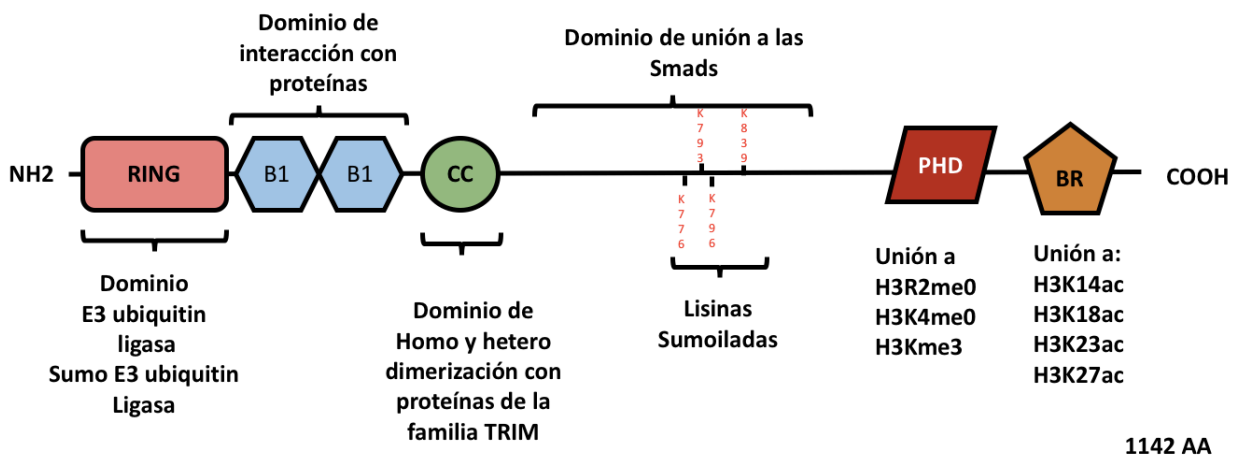


Figura 9. Estructura de TIF1 γ . En su extremo carboxilo terminal encontramos tres diferentes dominios conservados propios de la familia TRIM: un dominio RING, dos dominios de tipo Box (B1), y un dominio CC (Super enrollado). Entre su extremo amino y extremo carboxilo, se encuentra el dominio de interacción con las Smads y un par de lisinas que pueden ser sumoiladas para promover o reducir su interacción con las Smads. Finalmente, en su extremo carboxilo se encuentran dos dominios: uno PHD (Plant homodomain), y un bromodominio (BR). Adaptado de Agricola ⁵⁷.

El gen de TIF1 γ se compone de 20 exones abarcando en el genoma murino alrededor de 77kb. Se localiza en el cromosoma 3 y codifica para una proteína de 1142 aminoácidos. Durante el inicio del desarrollo embrionario su expresión es ubicua y esencial, sin embargo, su expresión incrementa durante el desarrollo de la corteza cerebral y la médula espinal; así como durante el desarrollo del epitelio sensorial (la cóclea, la retina y el epitelio olfatorio), y el desarrollo de distintos órganos como el timo,

el pulmón, el estómago, el intestino, el hígado, y la corteza del riñón. En el ratón adulto, la expresión es ubicua y los testículos son el tejido con mayor expresión ⁵⁸.

Dentro de la familia de proteínas TRIM, la subfamilia de proteínas TIF está formada por tres miembros (α , β y γ) los cuales contienen en su dominio carboxilo terminal un dominio PHD (plant homeodomain) y un bromodominio, dominios asociados a factores remodeladores de la cromatina capaces de unirse a histonas metiladas y acetiladas respectivamente. TIF1 α se ha demostrado que interacciona con una serie de receptores nucleares hormonales y funciona como coactivador de receptores nucleares de ácido retinoico ⁵⁹. TIF1 β se ha reportado como un correpresor de la familia de factores de transcripción KRAB (*Krüppel-associated box*) ⁶⁰. TIF1 γ no se ha reportado que interaccione con receptores nucleares o proteínas de la familia KRAB, sin embargo, estudios bioquímicos indican que puede formar homodímeros o heterodímeros con TIF1 α pero no así con TIF1 β ⁶¹. Se ha descrito que TIF1 γ puede regular la expresión génica a nivel de cromatina. A través del dominio PHD-bromo, TIF1 γ tiene la capacidad de unirse a residuos en la histona 3 de: Lys4 y Arg2 no modificadas, trimetilación de la lisina 9 H3K9me3 y acetilación de dos o más lisinas K,14,18, 23 y 27 ⁵⁷.

TIF1 γ participa en la vía de TGF- β al unirse a complejos Smad2/3 fosforilados y regular de manera distinta a la que lo haría el complejo de Smad4, la expresión de genes blanco. Además, TIF1 γ puede regular negativamente la función de Smad4 al modular su localización celular por monoubiquitinación, promoviendo su exporte de núcleo y translocación a citoplasma (Figura 8). TIF1 γ puede unirse entonces al complejo R-Smad y regular la expresión génica de una célula de manera distinta a la que ejercería el complejo Smad4/R-Smads ^{55,62,63}.

La capacidad de TIF1 γ de ubiquitinar a Smad4, no sólo depende de su dominio RING, sino también de sus dominios PHD y bromo. La unión de estos dominios a histonas acetiladas activa su dominio RING para poder ubiquitinar a Smad4 en las lisinas 519 y 507 o autoubiquitinarse para limitar la función transcripcional de Smad4 (Figura 10). ⁵⁷.

La regulación de Smad4 y de la vía canónica del TGF- β por TIF1 γ puede también modularse mediante la sumoilación, dicha modificación en su dominio de interacción con las Smads, ocurre en el núcleo y es mediada por Ubc9 (*Ubiquitin carrier 9*)⁶⁴.

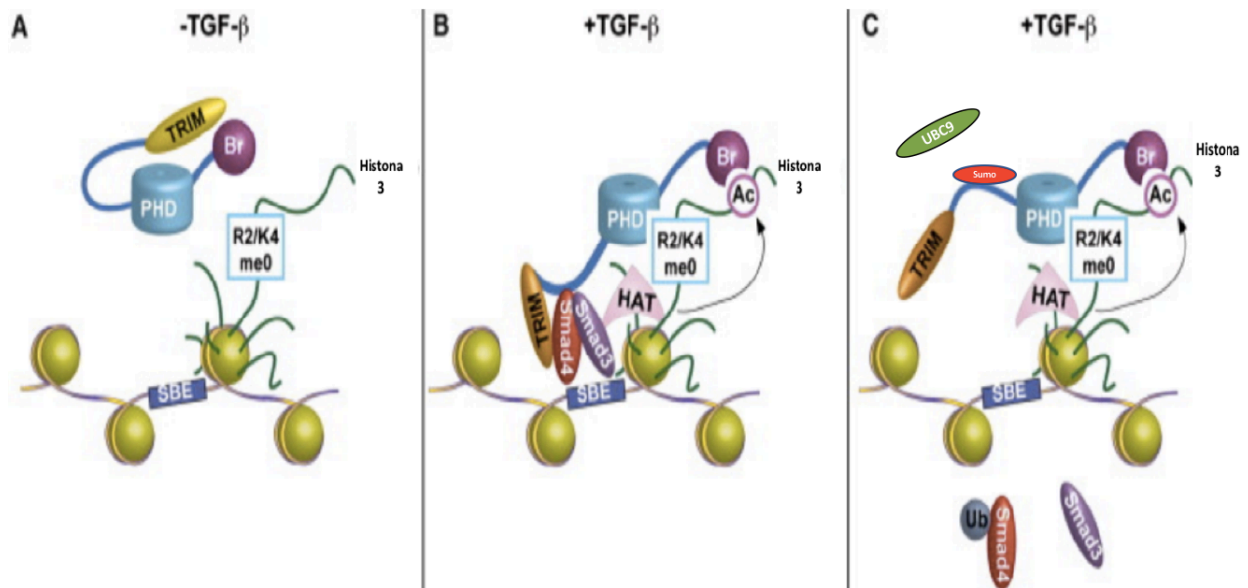


Figura 10. Modelo de acción TIF1 γ . A) En ausencia de TGF- β el dominio TRIM de TIF1 γ interacciona con los dominios PHD y Bromo dominio en su extremo amino terminal, inactivando su papel de ubiquitina ligasa. B) En presencia de TGF- β el complejo Smad2/3/4 se acumula en el núcleo ejerciendo su papel como factor de transcripción. Las Smads activadas reclutan acetilasas de histonas HAT (*Histone acetyltransferases*), como p300/CBP, que acetilan residuos de las histonas 3 y 4. Las marcas de histonas promueven la unión del bromo dominio a las histonas acetiladas y la liberación del dominio TRIM. El dominio TRIM liberado interacciona con el complejo Smad2/3/4 y ubiquitina a Smad4. C) La ubiquitinación de Smad4 interrumpe su interacción con Smad2/3 y reduce la actividad transcripcional de los genes de respuesta a Smad. También TIF1 γ puede ser sumoilado por UBC9 y modular la interacción con las Smads. SBE: Smad Binding Elements. Modificado de Agricola⁵⁷.

Por otro lado, se ha reportado que en células madres embrionarias TIF1 γ coopera con Smad4 para promover la apertura de la cromatina y la transcripción génica. El complejo TIF1 γ / Smad2/3 reconoce las marcas de histonas H3K9me3 y H3K18ac, lo cual desplaza a proteínas represoras de la cromatina como HP1 (*Heterochromatin protein1*), permitiendo la apertura de la cromatina; posteriormente el complejo Smad2/3/4 se une a la cromatina. Esta unión promueve, por un lado la expresión de genes y por otro lado la acetilación en la lisina 18 de la histona 3 (H3K18ac), señal que incrementa la unión del

complejo TIF1 γ /Smad2/3 a la cromatina manteniendo un estado de eucromatina. Estos datos indican que TIF1 γ no sólo regula negativamente a Smad4 mediante monoubiquitinación, sino que también promueve su función transcripcional abriendo la cromatina para que pueda ejercer su función como factor de transcripción ^{65 50} (Figura 11).

Figura 11. Cooperación de TIF1 γ y Smad4 para la inducción de la expresión génica. A) La unión de la proteína HP1 a la marca K3K9me3 induce represión de genes de respuesta a Activina. B) La señal de Nodal induce la fosforilación de las proteínas Smad2/3 lo que permite que interaccione con TIF1 γ o Smad4. C) TIF1 γ desplaza a HP1 de la cromatina, y se une con su PHD a la H3K9me3 promoviendo la apertura de la cromatina. D) Abierta la cromatina, Smad4 promueve la expresión del gene de respuesta a Activina y la acetilación de la lisina 18 en la histona 3 (H3K18ac), la cual incrementa la interacción de TIF1 γ a la cromatina favoreciendo el mantenimiento de la apertura de la cromatina. Modificado de Xi⁵⁰.

También se ha reportado que TIF1 γ funciona como ligasa de grupos sumo (*Small ubiquitin-like modifier*), TIF1 γ sumoila distintos residuos de lisina en SnoN1 (*Ski novel gene*), un regulador negativo de la señalización de TGF- β que interacciona con proteínas Smad2, Smad3 y Smad4, de esta forma podría regular indirectamente la señal dependiente de Smads ⁶⁶.

En células madre hematopoyéticas TIF1 γ puede regular la transcripción al interactuar con factores de inicio de la transcripción, como el complejo SCL (formado por distintos

grupos de proteínas requeridas para la diferenciación del linaje eritroide) y factores que estabilizan la elongación como p-TEFb (*The positive transcription elongation factor*) y FACT (*Facilitates chromatin transcription*)^{67,68}. También puede interactuar con factores de transcripción para reprimir su función incluyendo a TAL1 y PU.1⁶⁹.

Hay evidencia acumulada que sugiere que la función de TIF γ depende del contexto y tipo celular. Dentro de las funciones descritas independiente de la vía de TGF- β , se ha reportado que TIF1 γ pertenece al complejo de regulación mitótica APC/C (*Anaphase promoting complex/Cyclosome*), y promueve la transición de metafase a anafase⁷⁰. También se ha descrito que TIF γ interactúa con β -catenina, un componente de la vía de WNT (*Wingless/Integrated*). En líneas celulares de cáncer de colon y de cerebro, TIF γ se asocia a β -catenina, la ubiquitina y reduce su abundancia en el núcleo⁷¹. Por otro lado, en líneas celulares embrionarias, el complejo TIF γ interactúa con β -catenina pero no la degrada, sino que promueve la expresión de genes asociados a la diferenciación de mesodermo como *Mixl1* (*Mixed paired-like homeobox*), blanco de la vía de WNT⁷².

Dentro de los mecanismos de regulación de TIF1 γ se ha descrito que Sox2 (*Sex determining Region Y-box 2*) regula negativamente la expresión del gen de TIF1 γ ⁷³. Por otro lado, la señal de la enzima tirosina cinasa c-Abl, enzima río abajo del factor de crecimiento epidermal EGF (*Epidermal growth factor*), fosforila a TIF γ en los residuos 524, 610 y 1048 dentro del núcleo. Dicha fosforilación reduce su interacción con Smad2/3 favoreciendo que el complejo Smad2/3 se asocie nuevamente a Smad4, promoviendo la vía de TGF- β dependiente de la vía canónica a través de Smad4⁷⁴.

La señalización del TGF- β regula distintos linajes efectores de células T.

Bajo distintos contextos de inflamación, la señal de TGF- β puede promover un fenotipo inflamatorio como la generación de células Th17, Tfh y Th9. Por otro lado, la señalización de TGF- β también puede inducir un fenotipo anti-inflamatorio a través de la inhibición de la proliferación y diferenciación de células Th1, Th2 e inducción de células Treg (Figura 12).

Figura 12. Regulación de la diferenciación de linfocitos T CD4 por el TGF- β . El TGF- β participa en la inducción de fenotipo pro inflamatorio al promover linfocitos Th17, Th9 y Tfh, así como en la inducción de un fenotipo anti-inflamatorio mediante la inhibición de células Th1 y Th2 y la generación de células Treg.

Para caracterizar a nivel molecular los componentes de la vía canónica mediante los cuáles el TGF- β pudiera llevar a diversos destinos celulares o respuestas funcionales en linfocitos T; diversos grupos de investigación han determinado el requerimiento de cada una de las moléculas involucradas en dicha vía (TGF- β 1, TGF- β RI, TGF- β RII, Smad2, Smad3 y Smad4) mediante la utilización de modelos transgénicos donde se elimina parcial o totalmente cada una de ellas.

Los ratones condicionales deficientes de TGF- β 1 en células T mediante el sistema CD4Cre/loxP desarrollan una enfermedad autoinmune sistémica, asociada con proliferación de linfocitos T, activación y diferenciación hacia linaje Th1 y Th2. Con respecto a la generación de Treg, la ausencia de TGF- β 1 no repercute en la generación,

pero si regula negativamente la expansión de células Treg de origen tímico. De manera interesante, la acción autócrina de TGF- β 1 en linfocitos Treg es necesaria para la inhibición de la diferenciación de perfiles Th1 y prevención del desarrollo de colitis ⁷⁵.

Por otro lado, se ha demostrado que la señal de TGF- β confiere, particularmente en células Treg de periferia, estabilidad, funcionalidad y promueve la expresión de Foxp3 ⁷⁶. A nivel molecular se ha demostrado que la señal de TGF- β en conjunto con la de IL-2 promueve la unión de TET1 y TET2 (*Ten-eleven Translocator*), al promotor y región CNS2 de Foxp3, ambas regiones asociadas a mantenimiento de la expresión y estabilidad de una célula Treg ⁷⁷.

Cuando se elimina condicionalmente el receptor tipo I del TGF- β , usando la línea Lck Cre, se observa que hay afectación en la generación posnatal de linfocitos Treg (día 3-5). A las 4 semanas, el ratón presenta inflamación sistémica, con reducción de linfocitos reguladores en periferia; sin embargo en el timo la frecuencia de linfocitos Treg se encuentra incrementada. En dichos linfocitos Treg se observa un incremento de CD25, haciéndolos más propensos a responder a IL-2. En estos ratones la señal de IL-2 promueve la proliferación y generación de linfocitos Treg, por lo que cuando se analiza la ausencia del receptor I en fondo deficiente para IL-2, se observa una ausencia de Treg. Estos resultados indican que en ausencia de la señal del TGF- β , la señal de IL-2 promueve compensar y permitir la generación y diferenciación de linfocitos Treg ⁷⁸. Por otro lado, al eliminar el receptor I en fondo Foxp3 Cre, se observa que no hay repercusión en la generación de linfocitos Treg; sin embargo, la señal del TGF- β es necesaria para controlar la respuesta Th17, inducir la expresión de CD103, y la acumulación y retención de linfocitos Treg en distintos tejidos, particularmente el colon ⁷⁹. Estos datos indican que una vez que las células Treg se diferencian, la señal de TGF- β no es necesaria para su mantenimiento en homeostasis.

De la misma manera, ratones en cuyas células T se elimina el receptor tipo II de TGF- β , usando la línea CD4 Cre presentan un fenotipo de autoinmunidad y mortalidad del 100%. La ausencia del receptor induce la diferenciación exacerbada de células Th1 y la

promoción de la actividad citolítica de las células CD8⁺. Con respecto a las células Treg, la ausencia del receptor no impacta en la generación de linfocitos Treg en timo, sin embargo se ha observado que la señal de TGF- β repercute en la supervivencia de Tregs durante la selección negativa⁸⁰. Por otro lado, en un modelo de eliminación condicional con la línea CD4 Cre, la ausencia del receptor tipo II impacta en la diferenciación de linfocitos T en periferia⁸¹.

El análisis de células T deficientes de miembros de la familia de proteínas Smad aporta evidencia de la participación de esta vía en la prevención de la inflamación. La eliminación de una sola de las R-Smads no lleva a fenotipos evidentes debido a mecanismos compensatorios⁸². Sin embargo, los ratones condicionales deficientes de Smad2 en células T, en fondo deficiente de Smad3, desarrollan una enfermedad autoinmune durante las primeras 3 semanas después del nacimiento, fenotipo similar al ratón condicional deficiente de TGF- β 1. Con respecto a las Tregs, las células T deficientes de Smad2 y Smad3, no tienen un fenotipo que afecte la generación de nTreg cuando se eliminan en el estadio doble positivo (*CD4-Cre*)⁸², sin embargo cuando estas Smads se eliminan más temprano en desarrollo, durante el estadio doble negativo (*Lck-Cre*), hay deficiencia en la generación de nTreg⁸³. Lo anterior sugiere que la señal de Smad2/Smad3 se requiere para el desarrollo de linfocitos Treg en ciertos procesos a tiempos específicos de la diferenciación en el timo, pero no en todos los procesos que ocurren ahí. Con respecto a la generación de pTreg, tanto *in vivo* como *in vitro*, la ausencia de estas dos moléculas repercute en la capacidad de inducción, independientemente del estadio donde se eliminen los genes⁸³. Por otro lado, en cuanto a cambios en la estabilidad de Tregs, la ausencia de estas moléculas puede afectarla, sin embargo eso no repercute en su funcionalidad, incluso aún cuando se eliminen las proteínas Smad2/3 específicamente en una célula Treg (*Foxp3 Cre*)⁸². La estabilidad promovida por Smad3 depende de su capacidad de unirse a TET1, TET2 y reclutarlas a las regiones del promotor y CNS2 donde promueven desmetilación de las secuencias blanco⁷⁷. Por lo tanto, a la fecha el papel de las moléculas Smad de receptor (R-Smad) en la funcionalidad, estabilidad y generación de células Treg aún es tema de extenso estudio y debate.

Considerando que la señalización del TGF- β depende de complejos de Smad2/3 con Smad4 o con TIF1 γ , otros grupos de trabajo han explorado la dependencia de cada una de ellas en el fenotipo observado con las R-Smads. Al estudiar el papel de Smad4 en el desarrollo función y mantenimiento de las células Treg, se describió que la ausencia de Smad4 no repercute en la generación ni en la función de células Treg *in vivo*, pero si en la inducción de iTreg^{84,85}. Por otro lado, al estudiar la función de Smad4 independiente a la señal de TGF- β (TGF- β RIIKO vs TGF- β RKIIIO Smad4 KO) se ha reportado que en homeostasis, Smad4 no es necesaria para la generación de linfocitos Treg ni para su función supresora. Sin embargo, en un fondo CD4 Cre TGFBRII fx/fx, la ausencia de Smad4 promueve que la señal de IFN γ desestabilice a las Treg y pierda el fenotipo regulador *in vitro*⁸⁶. Los distintos modelos y fenotipos observados en ausencia de componentes de la vía del TGF- β en linfocitos Treg se resumen a continuación en la Tabla 3.

Fenotipo de ratones de condicionales de los distintos componentes de la vía canónica de TGF- β					
	Características	nTreg	pTreg	iTreg	Referencia
TGF-β					
CD4 Cre	Desarrollo	✓	✓	✓	75
	Función supresora	✗	✗	NE	
	Proliferación	✗	✗	NE	
	Estabilidad	NE	X	NE	
	Autoinmunidad Sistémica				
TGF-β RI					
Lck Cre	Desarrollo	X	NE	X	78
	Función supresora	NE	NE	NE	
	Proliferación	NE	NE	NE	
	Estabilidad	NE	NE	NE	
	Autoinmunidad Sistémica				
Foxp3 Cre	Desarrollo	✓	✓	?	79
	Función supresora	✓	✓	?	
	Proliferación	NE	NE	NE	
	Estabilidad	NE	NE	NE	
	Autoinmunidad Sistémica				
TGF-β RII					
CD4 Cre	Desarrollo	X	X	NE	80, 81
	Función supresora	NE	NE	NE	
	Proliferación	NE	NE	NE	
	Estabilidad	NE	NE	NE	
	Autoinmunidad Sistémica				
Smad2/3					
Lck Cre	Desarrollo	X	X	✓	82, 83
	Función supresora	✓	✓	NE	
	Proliferación	NE	NE	NE	
	Estabilidad	X	X	NE	
	Autoinmunidad Sistémica				
Smad4					
CD4 Cre	Desarrollo	✓	✓	X	84, 85, 86
	Función supresora	✓	✓	NE	
	Proliferación	NE	NE	NE	
	Estabilidad	NE	X	NE	
	No hay autoinmunidad				

Tabla 3. Fenotipos observados en células Treg al eliminar condicionalmente componentes de la vía de TGF- β . ✓ representa función/desarrollo correcto, ✗ función/desarrollo incorrecto y no evaluado(NE).

Estudios recientes, usando un sistema de eliminación condicional de TIF1 γ mediante el sistema *CD4-Cre*, identificaron que esta proteína es esencial para la generación de linfocitos Th17, mediante el reclutamiento de TIF1 γ , junto con Smad2 y ROR- γ , para la inducción correcta del programa transcripcional del perfil Th17. En ausencia de TIF1 γ , los linfocitos Th17 comienzan a producir IL-10. Esta regulación por TIF1 γ es mediada principalmente por la inducción de marcas de histonas represoras o activadoras en locus de genes asociados al perfil Th17 o Tr1. Por otro lado, no se observa ninguna diferencia en la generación de linfocitos Treg tanto *in vitro* como *in vivo*⁸⁷; sin embargo, no se descartó la posibilidad del papel de TIF1 γ en el mantenimiento de la expresión de *Foxp3* en contextos de inflamación. En nuestro laboratorio contamos con evidencia preliminar que sugiere que TIF1 γ podría tener un papel importante en la regulación y mantenimiento del fenotipo supresor en poblaciones de linfocitos Treg.

Por lo anterior, dado que los ratones deficientes de Smad4 no recapitulan el fenotipo de autoinmunidad se sugiere que el complejo Smad2/3 regula la señalización de TGF- β en células Treg de manera independiente a la señalización de Smad4. Nuestra propuesta postula que TIF1 γ , en conjunto con Smad2/3, puede mantener la señalización de TGF- β y la expresión de *Foxp3* en células Treg en un contexto de inflamación.

Antecedentes

Para determinar si TIF1 γ se encontraba diferencialmente expresado en distintos linajes de linfocitos T se analizó el RNAm de TIF1 γ en cultivos de linfocitos T bajo distintas condiciones polarizantes (Figura 13). Se purificaron linfocitos vírgenes por citometría de flujo (CD25-CD62L+CD44-) y se cultivaron bajo condiciones polarizantes hacia distintos linajes efectoras en presencia de anticuerpos pegados a placa anti-CD3 (2 μ g/mL para Th2, 5 μ g/mL para Th1 y Treg, y 10 μ g/mL para Th17) y anti-CD28 (10 μ g/mL para Th2, 2 μ g/mL para Th1 y Treg, y 2 μ g/mL para Th17). Se sembraron 7.5 x 10⁴ células en placas de 96 pozos durante 5 días bajo las distintas condiciones de polarización: Th1: IL-12 (10ng/mL), anti IL-4 (10 μ g/mL), e IL-2 (20U/mL); Th2: IL-4 (20ng/mL), anti INF- γ (10 μ g/mL), e IL-2 (20U/mL); **TGF- β** (0.5 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), IL-23 (50 ng/ml), anti-IL-4 (10 μ g/ml), anti-IFN- γ (10 μ g/ml); y Treg : **TGF- β** (2 ng/ml). Al quinto día de cultivo se extrajo el RNA y se evaluó la expresión de TIF1 γ en las distintas condiciones de diferenciación, comparando con células vírgenes y como control células de testículo. Se observó que la expresión de TIF1 γ es ubicua en todos los linajes de linfocitos T, pero se encuentra incrementado en mayor cantidad en células Treg.

Figura 13 Expresión diferencial de TIF1 γ en linfocitos T bajo distintas condiciones polarizantes. Análisis de la expresión relativa de mRNA de TIF1 γ en cultivos *in vitro* de células T bajo distintas condiciones polarizantes: Th0, Th1, Th2, Th17, Treg y células CD4⁺ vírgenes. Como control se evaluó la expresión en testículo.

Se evaluó la expresión de la proteína por Western Blot usando un ratón reportero bicistrónico para Foxp3 el cual expresa la proteína roja fluorescente RFP (*Red Fluorescent protein*)⁸⁸, se realizaron cultivos de linfocitos vírgenes bajo condiciones polarizantes hacia iTreg (previamente descritos). Se separaron las células por citometría de flujo seleccionando las células RFP- (Foxp3-) y RFP+ (Foxp3+) y se evaluó a nivel de proteína la expresión de TIF1 γ por Western Blot (Figura 14). Se puede observar que la expresión de la proteína se encuentra presente tanto en células vírgenes, RFP⁻ y RFP⁺.

Figura 14. Análisis de la expresión de TIF1 γ por Western Blot. De izquierda a derecha: Lisado de testículo (control positivo), RFP+ (Treg: Foxp3+), RFP- (Foxp3-) y células vírgenes. Como control de carga se muestra el western blot contra β -Actina en la parte inferior.

Adicionalmente, resultados preliminares de nuestro laboratorio, analizando ratones condicionales deficientes de TIF1 γ en células T con el sistema CD4-Cre/Lox, indican que la ausencia de esta molécula no afecta la generación de células Treg naturales en homeostasis. Sin embargo, experimentos funcionales de células Treg en un modelo de inflamación *in vivo* (colitis), sugieren que TIF1 γ es necesario para el mantenimiento del fenotipo de célula Treg. Para la funcionalidad de las células Treg en un modelo de supresión *in vivo*, se realizaron ensayos de supresión en un modelo de colitis. En este modelo se utilizaron ratones Rag^{-/-}, a los cuáles se les transfieren células T vírgenes (CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high}) las cuales proliferan y a largo plazo llevan a la inflamación y desarrollo de colitis. Si en este modelo se co-transfieren células Treg funcionales

(CD4⁺CD25⁺CD45RB⁻) las células Treg regulan negativamente la inflamación evitando el desarrollo de la colitis. Se probaron cuatro condiciones experimentales: transferencia de linfocitos T vírgenes silvestres (WT) o linfocitos T vírgenes deficientes de TIF1 γ), o co-transferencia de linfocitos T vírgenes silvestres (WT) con linfocitos Treg silvestres o deficientes de TIF1 γ). Días después de la transferencia se pesaban los ratones para determinar la progresión de la enfermedad en los distintos grupos experimentales medido como pérdida de peso con respecto al inicial (Figura 15). Se puede observar que en el grupo de la co-transferencia de linfocitos vírgenes con linfocitos Treg silvestres, la enfermedad es controlada y por ende los ratones no pierden peso, pero esto no ocurre en la co-transferencia con linfocitos Treg deficientes de TIF1 γ .

Figura 15. Las células Treg deficientes de TIF1 γ no previenen del desarrollo de colitis por transferencia

adoptiva de células T. Ratones Rag^{-/-} fueron transferidos con células T CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻:vírgenes WT (azul) o KO (negro), en ambos grupos hubo una pérdida de más del 20% del peso corporal inicial, sugiriendo una inflamación sistémica y desarrollo de colitis. La co-transferencia de células vírgenes con células Treg WT (rojo) protegen el desarrollo de la enfermedad mientras que la co-transferencia con células Treg KO (verde), no protegen el desarrollo de colitis n=1 .

Debido a la función de TGF- β en el desarrollo, función y mantenimiento de las células Treg, es necesario dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales TGF- β señala y controla todos estos procesos en linfocitos Treg. Recientemente, se ha abordado la

dependencia de TIF1 γ en el desarrollo y activación de linfocitos Treg en homeostasis ⁸⁷ concluyendo que TIF1 γ es prescindible para controlar dichos procesos en células Treg; sin embargo, en ese estudio no se evaluó el papel de TIF1 γ en un contexto de inflamación. Con base a los resultados *in vivo* en nuestro modelo de colitis en ausencia de TIF1 γ , el hecho de que TIF1 γ puede señalizar río abajo de la vía del TGF- β , y dado que en su extremo carboxilo terminal contiene dominios de unión a histonas acetiladas y metiladas; postulamos que TIF1 γ puede tener un papel importante en la función y mantenimiento de linfocitos Treg mediante mecanismos de control epigenéticos regulados por el TGF- β en un contexto inflamatorio.

Los datos obtenidos a partir de este trabajo definirán si los mecanismos de control de poblaciones Treg por el TGF- β en distintos ámbitos (homeostasis vs inflamación), son molecularmente distintos y dependen diferencialmente de distintos componentes de la señal del TGF- β .

Hipótesis

La señal de TGF- β mediada por TIF1 γ regula la inducción y mantenimiento de la expresión de Foxp3, promoviendo la función de las Treg en un contexto de inflamación.

Objetivo general

Determinar el papel de TIF1 γ en el desarrollo, función y mantenimiento de células T reguladoras.

Objetivos Particulares

1. Determinar si la ausencia de TIF-1 γ afecta a las poblaciones de células Treg en condiciones de homeostasis.
2. Determinar la capacidad de diferenciación de linfocitos vírgenes hacia iTreg en ausencia de TIF-1 γ .
3. Evaluar la capacidad supresora de células Treg deficientes de TIF-1 γ .
4. Evaluar la estabilidad de células Treg *in vitro* bajo señales de activación.
5. Evaluar la estabilidad de células Treg *in vivo* bajo señales de activación en un modelo de inmunidad tumoral.

Metodología

Animales experimentales

Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa C57BL/6J $Foxp3^{EGFP^{2589}}$ knock-in (B6.Cg- $Foxp3^{tm2Tch/J}$, donado por el Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán) nombrados en este trabajo como ratón EGFP. Los ratones EGFP se cruzaron con los ratones de la cepa C57BL/6J $TIF1\gamma$ f/f que tienen dos sitios loxP entre los exones 1 y 5 del gen de $TIF1\gamma$ ⁹⁰, dichos ratones se nombraron como EGFP $TIF1\gamma$ f/f. Finalmente los ratones EGFP $TIF1\gamma$ f/f se cruzaron con los ratones B6.Cg-Tg(Cd4-cre)1Cwi/BfluJ, donado por el doctor Richard Flavell nombrados en este trabajo como ratones $TIF1\gamma$ f/f EGFP CD4 Cre. Para los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron ratones EGFP $TIF1\gamma$ f/f (WT) y $TIF1\gamma$ f/f EGFP CD4 Cre (KO). Todos los ratones se mantuvieron en el área de ratones transgénicos del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, siguiendo el cuidado y las normas de éticas y bioseguridad de acuerdo a la NOM-062-Z00-1999. Todos los protocolos fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-IFC).

Genotipificación de ratones

Todos los ratones utilizados en este estudio fueron genotipificados mediante la técnica de PCR punto final. Para su genotipificación, al día 10 después del nacimiento se les tomó una biopsia de los dígitos de sus extremidades inferiores (alrededor de 20 mm). La muestra fue resuspendida en 150µl de buffer de lisis (50mM Tris pH 8.0, 50mM KCL, 2.5mM EDTA, 0.45% NP40 (*Nonidet-40*), 0.45% Tween20) + proteínasa K (Goldbio DBK-P480) 20µg/mL), e incubada a 56°C por 12 hrs. Al término de la incubación se centrifugó a 10,000rpm por 5 min y se procedió a la PCR usando el protocolo de la Taq Polimerasa (*Taq DNA Polymerase Recombinant Invitrogen 11615-010*) usando los primers y condiciones de reacción correspondientes (Tabla 4).

Primers CD4 Cre.

Rev1 5' TGGTCCCAAGTCAGAAAC 3' Rev2 5' GCAAACGGACAGAAGCATT 3'

Fwd 5' TAGTTTGGCAGGACCTTTGG 3'

Productos esperados: CD4 Cre: 400pb CD4 WT: 297pb

Primers TIF1 γ fx/fx

Rev 5' CCATCTGGGAAAGGAAAACA 3' Fwd 5' CCCAGTTGTCCTGGA ACTA 3'

Productos esperados: TIF1 γ fx/fx : 180 pb WT: 237pb

Primers Foxp3 GFP

Rev 5' ATTGTGGGTCAAGGGAAG 3' Fwd 5' CACCTATGCCACCCTTATCC 3'

Productos esperados: Foxp3 GFP: 400 pb WT: 350 pb

CD4 Cre	TIF1 γ fx/fx	Foxp3 GFP
94 °C 4'	95 °C 15'	94 °C 4'
94 °C 45''	94 °C 1'	94 °C 25''
65 °C 45''	60 °C 1' X 36	60.5 °C 25'' X 38
(-0.3 °C por ciclo) X 35		
72 °C 1'	72 °C 1'	72 °C 25''
72 °C 5'	72 °C 10'	72 °C 10'
4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

Tabla 4 Condiciones de reacción de PCR utilizados en genotipificación de ratones experimentales.

Determinación de fenotipos basales en órganos linfoides de ratones TIF1 γ condicionales deficientes y controles

Los ganglios linfáticos mesentérico y periféricos, así como el bazo y el timo fueron extraídos directamente de sus correspondientes regiones anatómicas en cada grupo de animales. Los órganos fueron macerados y filtrados por una malla fina para evitar la formación de agregados o la presencia de tejido conectivo, las células obtenidas fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min y el botón resultante fue resuspendido en un

volumen conocido de medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest Cat: S1810-500) para la cuantificación del número de células. El bazo requiere un paso adicional de lisis de eritrocitos con buffer de lisis ACK (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10Mm, Na₂EDTA 0.1 mM) durante un min posterior a la filtración de las células con la malla, posteriormente se adiciona medio Clicks (Sigma Aldrich Cat:C5572) suplementado al 10 % con FBS.

Las células extraídas de los distintos órganos fueron teñidas con anticuerpos acoplados a fluorocromos para determinar las poblaciones basales de células linfoides en condiciones de homeostasis tanto en ratones WT como en ratones TIF1 γ condicionales deficientes mediante citometría de flujo. Una alícuota de cada población celular obtenida fue centrifugada a 1500 rpm durante 5 min, retiramos el sobrenadante y resuspendimos las células en 100 μ L de buffer de FACS (solución buffer de fosfatos [PBS] con 2% de FBS) conteniendo los siguientes anticuerpos mencionados en la tabla 5.

	Fluorocromo	Clona	Marca
Anti-CD4	Brilliant Violet 605 APC	GK1.5	Biologend
Anti-CD8	PB	53-6.7	Biologend
Anti-CD25	PE PB	PC61	Biologend
Anti-CD44	PE/Cy7	IM7	Biologend
Anti-CD62L	APC/Cy7	MEL-14	Biologend
Anti-Foxp3	APC	FJK-16s	Biologend

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en este trabajo

Las muestras se incubaron 30 min a 4°C y posteriormente se realizó un lavado con 400 μ L de buffer de FACS, las células fueron nuevamente centrifugadas y resuspendidas en 300uL de buffer de FACS para su análisis en un citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific) en el Labnalcit en donde se adquieren 100uL de las muestra. La estrategia de análisis se encuentra explicada en el Anexo 1.

Cultivos celulares de células Treg

El cultivo de diferenciación hacia iTreg se realizó a partir de la purificación de linfocitos T CD4 vírgenes ($CD4^+ CD44^- CD62L^+$) de nódulos linfáticos y bazo. Las células T CD4 vírgenes se aislaron por sort en la unidad de citometría del INER (FACS ARIA II) o en la unidad de Sort (MoFlo) en el LABNACIT. Para estos cultivos, 50 μ l de linfocitos CD4 vírgenes a una densidad de 4×10^6 /ml en medio Clicks suplementado con 10% FBS y 1X Penicilina/Estreptomicina/Glutamina (Gibco Cat:1631431), con 50 μ l de células de bazo irradiadas a una densidad de 8×10^5 /ml, fueron incubadas junto con 100 μ l de un cocktail de polarización 2X para iTreg en placas de 96 pozos. Este cocktail incluye TGF- β a una concentración que al diluir llega a una concentración final de 1 ng/ml, IL-2 a una concentración de 20ng/ml y 2 μ g/ml de anti-CD3 soluble. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ durante 5 días, momento en el que se evaluaron las frecuencias de linfocitos Treg por citometría de flujo.

Para el ensayo de re-estimulación, células Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+:EGFP^+$) se sortearon en un FACS ARIA II a partir de ratones TIF1 γ silvestres: TIF1 γ f/f EGFP (WT) o TIF1 γ f/f EGFP CD4 Cre (Knock out: KO). Las células se cultivaron por 48 hrs a una proporción de 1:5 (APC irradiadas/Treg) con condiciones de activación previamente establecidas: 20ng/ml de IL-2 y 2 μ g de anti-CD3 soluble. Al finalizar el tiempo de activación se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células Treg, particularmente la expresión de CD25 y Foxp3.

Cultivo de línea celular B16-F10

Las células de melanoma murino B16-F10 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% FBS y 1X PSG, en una incubadora a 37°C y 5% CO₂. Cuando la caja de cultivo llegó a una confluencia del 70%, se retiró el medio y se adicionaron 5 ml de tripsina/EDTA, se incubaron 5 min a 37°C en 5% CO₂ y se adicionaron 5 ml de medio frío suplementado. Se colectaron las células, se

centrifugaron 5 min a 1500 rpm y se resuspendieron en medio para evaluar viabilidad y contar el número de células en cámaras de Neubauer.

Modelo de inmunidad tumoral

Se inyectaron subcutáneamente 1×10^5 células en suspensión de la línea de melanoma B16F10 a ratones TIF1 γ f/f CD4 Cre (KO) o ratones TIF1 γ f/f (WT). Una vez inyectados, los ratones se mantuvieron en observación evaluando ganancia de peso, supervivencia y midiendo con un vernier el tamaño del tumor. Al momento del sacrificio se aislaron los ganglios drenantes (denominamos drenantes a aquellos ganglios más cercanos al tumor), ganglios no drenantes, y se purificaron los linfocitos infiltrantes de tumor, para su posterior análisis por citometría de flujo.

El tumor se pesó antes de procesarlo. Los tumores se disgregaron en seco con tijeras de disección y se resuspendieron en 1 mL de buffer de digestión (RPMI 5% SFB, Colagenasa 1mg/mL, DNase 40ng/mL) para pasar a tubos Falcon de 15 mL y se llevó a un volumen final de 3 mL con el mismo buffer de digestión. Todos los tumores se pusieron a digerir a 37°C en agitación (250 rpm) durante 1 hr. La muestra se filtró en una malla, y se disgregó con el émbolo de 1 jeringa. La muestra se resuspendió en 1 mL de RPMI y se centrifugó por 5 min a 1500rpm, el sobrenadante se descartó. La muestra se resuspendió en 1 mL de RPMI suplementado con 5% SFB, 1X PSG y se mezcló con 4 mL de buffer de gradiente Optiprep 27.5% (Optiprep, Tricina PBS1X). Se añadió 1 mL de RPMI sobre la mezcla cuidando la separación de fases. Se centrifugó a 2750 rpm por 20 min sin freno. Posteriormente se tomaron las células en la interfase y se lavaron con 5 mL de RPMI suplementado con 5% SFB, 1X PSG. Se lisaron eritrocitos con ACK (1mL/1min) y se inactivó con 4 mL de RPMI suplementado. La suspensión celular se cuantificó y se procedió a hacer las tinciones para su análisis por citometría.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la prueba T de Student de dos colas, pareado para las IMF (Intensidad media de fluorescencia) y no pareado para las frecuencias y los números totales, usando el programa estadístico Graph Pad Prism 6. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Resultados

Generación de la cepa TIF1 γ f/f EGFP CD4 Cre.

Se expandió la colonia de ratones CD4 Cre. En la Figura 16A se muestra un gel de agarosa al 2% donde se carga el producto de genotipificación usando los primers para detectar la recombinasa de Cre. Las muestras enumeradas como 61 y 63 se consideran positivas para la recombinasa de Cre puesto que se observa la banda de 400 pb. Los ratones portadores del transgene CD4 Cre, se cruzaron con ratones con ratones homocigotos para TIF1 γ fx/fx. En la Figura 16B se muestra un gel de agarosa al 2% donde se carga el producto de genotipificación usando los primers para detectar el alelo TIF1- γ con los sitios flox. La banda de 180 pb indica el alelo con los sitios flox y la banda de 237 indica el alelo silvestre, se observa que las muestras enumeradas como 61 y 63 son heterocigotas para el alelo TIF1- γ floxeadado. Al tener ratones homocigotos, se procedió a realizar cruza con ratones Foxp3 EGFP. La genotipificación de Foxp3 se ejemplifica en la Figura 16C, donde la banda de 400 pb representa el gen de foxp3 reportero EGFP y la banda de 350 pb representa el gen silvestre de Foxp3. En el gel de agarosa se muestra el raton 61 es homocigoto para el gen reportero y las muestras 62-64 son heterocigotas.

Figura 16. Genotipificación de ratones de la colonia TIF1 γ CD4-Cre Foxp3 EGFP. A) Imagen de un gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación por PCR con primers para detectar el transgen CD4 Cre (400pb) o gen control CD4 (297 pb) en ratones 61-64, un control negativo (-) y un control positivo (+). B) Imagen de un gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación por PCR con primers para detectar el alelo TIF1 γ con sitios lox (180pb) o el alelo silvestre (237pb) en ratones 61-64, un control wt, control homocigoto fx/fx y control negativo. C) Imagen de un gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación por PCR con primers para detectar el gen reportero GFP en el locus de Foxp3 en ratones 61-64, alelo silvestre (350 pb) alelo reportero (400 pb).

Frecuencias basales de Treg en ratones TIF1 γ f/f EGFP CD4 Cre de 8 semanas.

Una vez obtenidas la línea de ratón TIF1 γ f/f EGFP CD4 Cre quisimos determinar si la ausencia de TIF1 γ afectaba las frecuencias de poblaciones de Treg en condiciones de homeostasis. Se sacrificaron ratones de 8 semanas (WT o KO) y se aislaron distintos órganos linfáticos (timo, bazo, nódulos linfáticos periféricos y mesentéricos). Se analizaron las poblaciones celulares con base en la expresión de Foxp3 y dentro de ellas se analizó a las células que expresaran o no CD25 (CD25⁺ o CD25⁻ respectivamente). La estrategia de análisis se muestra en la Figura 17, donde se puede observar que partimos de células vivas (Figura 17A), seleccionamos singuletes en granularidad y tamaño (Figuras 17B y 17C), linfocitos CD4⁺ (Figura 17E) y finalmente evaluamos las frecuencias de linfocitos Treg con base a la expresión de CD25 y Foxp3 (Figura 17F).

Figura 17 Estrategia de análisis de Células Treg en órganos linfoides identificadas como CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺.

A) Se seleccionaron las células vivas usando el colorante Zombie Aqua. B) Se realizaron selección de singuletes (SSC-H vs SSC-A) C) Se realizó una segunda selección de singuletes (FSA-A vs FSC-H) D) Se seleccionaron a las células por tamaño y granularidad (SSC-A vs FSC-A) E) Se realizó la selección de células CD4⁺ F) Se analizó la población de CD4⁺ con base en la expresión de Foxp3⁺ y CD25⁺.

Al analizar la frecuencia de las poblaciones Foxp3⁺ CD25⁻ en ratones deficientes de TIF1 γ , se observó que hay una tendencia a disminuir en todos los órganos analizados (ver gráfica representativa en Figura 18).

Figura 18. Gráficas de densidad representativas de poblaciones Foxp3⁺ CD25⁻ y Foxp3⁺ CD25⁺. Análisis a partir de células positivas para CD4⁺ provenientes de distintos órganos de ratones TIF1 γ /f EGFP (WT) o TIF1 γ /f EGFP CD4 Cre (KO) de A) Nódulo linfático periférico, B) Nódulo linfático mesentérico, C) Bazo y D) Timo. Se muestran las gráficas de puntos representativas de 10 experimentos independientes con 1-2 ratones por experimentos.

Dicha disminución en la frecuencia de estas células fue significativa en bazo de los ratones deficientes TIF1 γ /f EGFP CD4 Cre (Figura 19A). Con respecto a la expresión de Foxp3 en esta población, observamos que en ausencia de TIF1 γ la expresión de Foxp3 disminuye significativamente en nódulo linfático mesentérico y en el timo (Figura 19B-C) y no en células Treg de nódulos linfáticos periféricos y bazo.

Al analizar poblaciones de células $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$ no se observó ninguna diferencia en frecuencia ni en la expresión de Foxp3 (Figura 18, 19D-F). Sin embargo, al analizar la expresión de CD25 en linfocitos $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$ deficientes de $\text{TIF1}\gamma$, se observó un incremento significativo en todas las células de los distintos órganos analizados (Figura 19G-H). Estos datos indican que en condiciones de homeostasis, la ausencia de $\text{TIF1}\gamma$ repercute negativamente en la expresión de Foxp3 en poblaciones que no expresan CD25 en timo y nódulo linfático mesentérico. Por otro lado, la expresión de CD25 en linfocitos $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$ se encuentra incrementada en ausencia de $\text{TIF1}\gamma$.

Figura 18. Fenotipificación basal de células Treg en ratones $\text{TIF1}\gamma$ deficientes. A) Frecuencias basales de células Treg en distintos órganos linfoides identificadas como $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^-$ de ratones $\text{TIF1}\gamma \text{ fx/fx EGFP}$ (WT) y $\text{TIF1}\gamma \text{ fx/fx EGFP Cre}$ (KO). B) Intensidad media de fluorescencia de Foxp3 en poblaciones $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^-$. C) Histograma representativo de la IMF de Foxp3 en poblaciones $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^-$ en el NLM, el número representa el valor de IMF en cada muestra. D) Frecuencias basales de células Treg en distintos órganos linfoides identificadas como $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$ de ratones $\text{TIF1}\gamma \text{ fx/fx}$ (WT) y $\text{TIF1}\gamma \text{ fx/fx Cre}$ (KO). E) Intensidad media de fluorescencia de Foxp3 en poblaciones $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$. F) Histograma representativo de la IMF de Foxp3 en poblaciones $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$ en el NLM, el número representa el valor de IMF en cada muestra. G) Intensidad media de fluorescencia de CD25 en poblaciones $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$. H) Histograma representativo de la IMF de CD25 en poblaciones $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+$ de NLM, el número representa el valor de IMF en cada muestra. NLP (Nódulo linfático periférico) NLM (Nódulo linfático mesentérico). $n=10$ (Bazo y NLP), 9 (NLM) y 6 (Timo). Análisis Prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Datos de 10 experimentos independientes.

Fenotipo de activación de células Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) en ratones CD4 fx/fx TIF1 γ de 8 semanas.

Dado que la gran mayoría de los fenotipos observados en ratones deficientes de los distintos componentes de señalización del TGF- β en células T se asocian a cambios en el estado de activación celular³⁰; decidimos evaluar el estado de activación de las células Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) deficientes de TIF1 γ con respecto a la expresión de CD62L y CD44³⁰. En la Figura 20 se muestra la estrategia de análisis para diferenciar entre células activadas: aTreg (CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁻CD44⁺) y células en reposo: rTreg (CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺CD44^{low}).

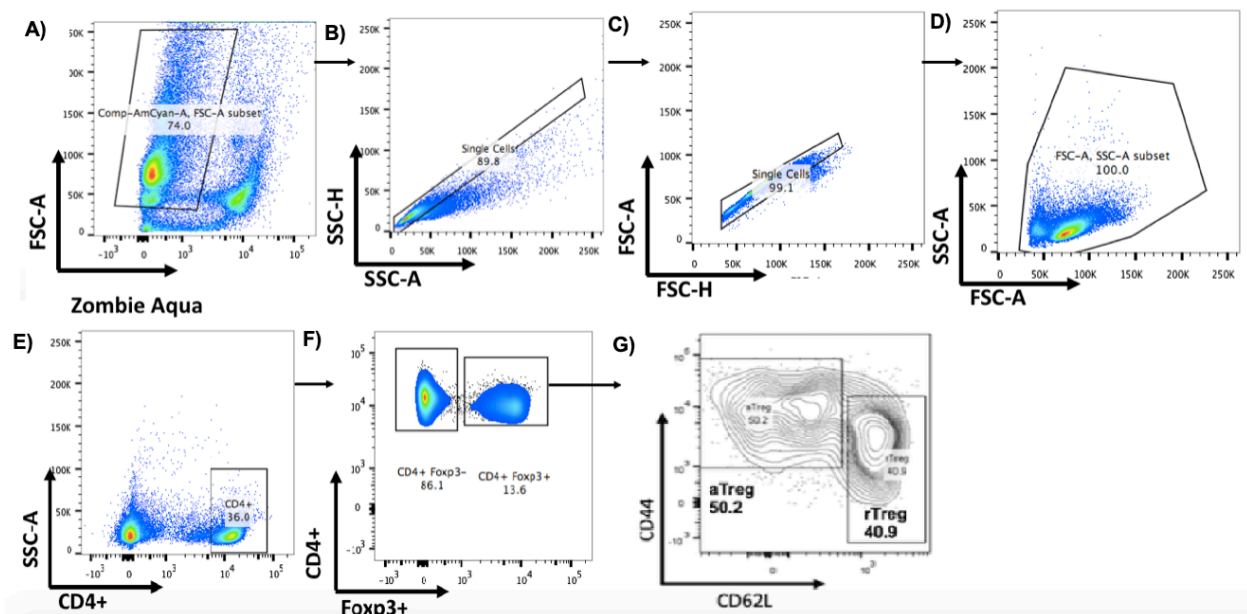


Figura 20. Estrategia de análisis de estado de activación de células CD4⁺ Foxp3⁺ en órganos linfoides. A) Se seleccionaron las células vivas usando el colorante Zombie Aqua. B) Se realizaron selección de singuletes (SSC-H vs SSC-A) C) Se realizó una segunda selección de singuletes (FSA-A vs FSC-H) D) Se seleccionaron a las células por tamaño y granularidad (SSC-A vs FSC-A) E) Se realizó la selección de células CD4⁺ F) Se seleccionó la población de CD4⁺ con base en la expresión de Foxp3⁺. G) Finalmente, se seleccionaron las células activadas (CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁻CD44⁺ (aTreg)) y células en reposo (CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺CD44^{low} (rTreg)) con base en la expresión de CD44⁺ y CD62L⁻

Al analizar las poblaciones de células activadas o en reposo en ratones de 8 semanas en homeostasis, no se observó una diferencia significativa en las frecuencias de células Treg ($CD4^+Foxp3^+$) activadas o en reposo entre el grupo WT o deficiente de $TIF1\gamma$ (Figura 21, 22A y 22D). Con respecto a la expresión de $Foxp3$ no se observó diferencia en la IMF en ninguna de las poblaciones de Treg analizadas (activadas o en reposo), entre grupo WT o deficiente de $TIF1\gamma$ (Figura 22B y 22E). La expresión de $CD25$ en las células Treg en reposo $Foxp3^+ CD62L^+$ se encontró incrementada en todos los órganos analizados en los ratones deficientes de $TIF1\gamma$; sin embargo este incremento sólo se observó en células Treg con fenotipo de activación $CD62L^-$ en el bazo. (Figura 22C y 22F).

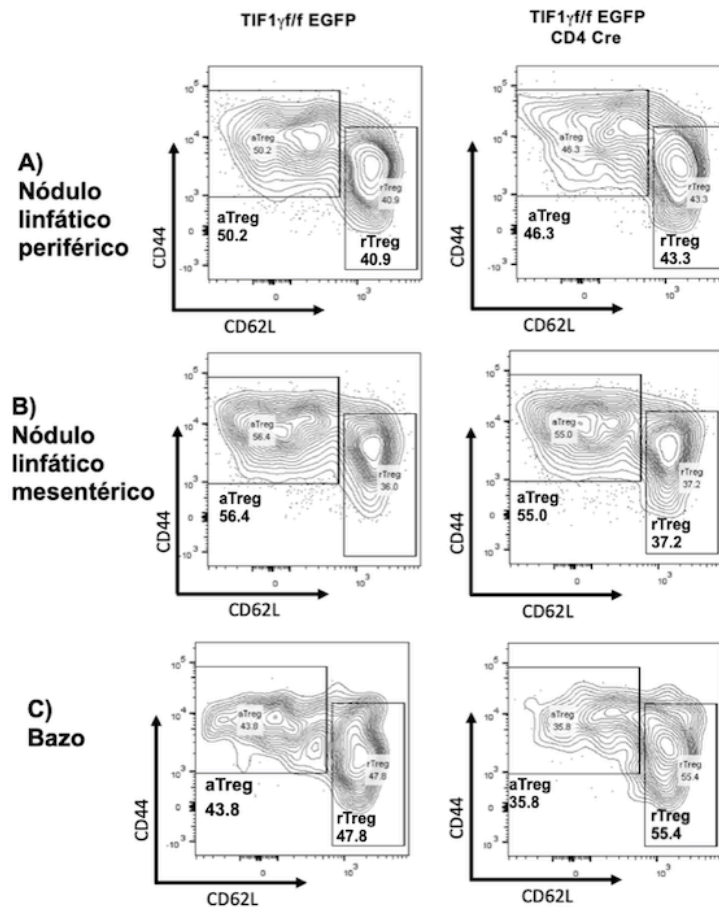


Figura 21. Gráficas de contorno representativas de poblaciones $CD4^+Foxp3^+CD62L^+CD44^{low}$ (Treg en reposo: rTreg) y $CD4^+Foxp3^+CD62L^-CD44^+$ (Treg activadas: aTreg). Análisis a partir de células positivas para $CD4^+$ provenientes de distintos órganos de ratones $TIF1\gamma/f$ EGFP (WT) o $TIF1\gamma/f$ EGFP CD4 Cre (KO). A) Nódulo linfático periférico, B) Nódulo linfático mesentérico y C) Bazo. Se muestran las gráficas de contorno representativas de 10 experimentos independientes.

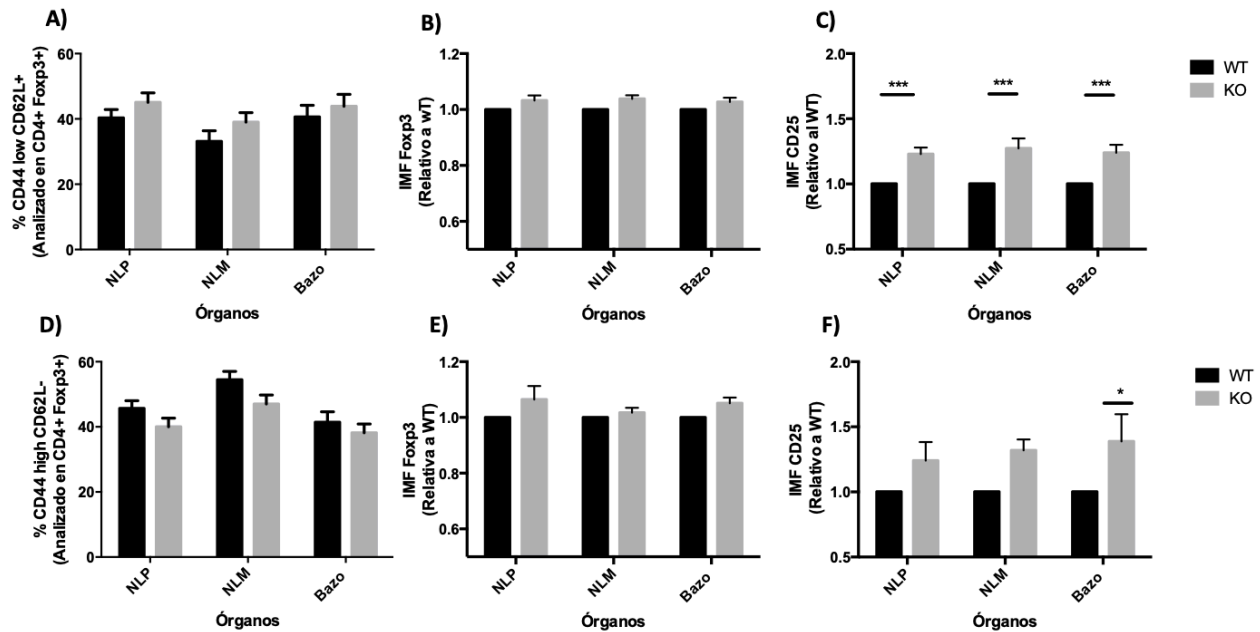


Figura 22. Estado de activación de células CD4⁺ Foxp3⁺ de ratones deficientes de TIF1 γ . A) Frecuencias basales de células CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺CD44^{low} (Treg en reposo:rTreg) en ratones de 8 semanas en distintos órganos linfáticos de ratones TIF1 γ fx/fx (WT) y TIF1 γ fx/fx Cre (KO). B) IMF de Foxp3 en células Treg en reposo. C) IMF de CD25 en células Treg en reposo. D) Frecuencias basales de células CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁻CD44⁺ (Treg activadas: aTreg). E) IMF de Foxp3 en células Treg activadas. F) IMF de CD25 en células Treg activadas. NLP (Nódulo linfático periférico), NLM (Nódulo linfático mesentérico). n= 10 (Bazo y NLP), 9 (NLM) y 6 (Timo). El análisis estadístico consistió en una prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) o pareada (para el análisis de IMF) *p<0.05, **p<0.01. Datos de 10 experimentos independientes.

Frecuencias basales de Treg en ratones CD4 fx/fx TIF1 γ de más de 40 semanas.

Se ha descrito que la eliminación de algunas moléculas o regiones que participan en la inducción de iTreg en periferia como la musculina y el CNS1, lleva a fenotipos de inflamación en ratones que se consideran viejos o mayores a 40 semanas^{91,92}. Para asegurarnos que no estuviéramos ignorando algún fenotipo de aparición tardía en nuestros ratones como los descritos anteriormente, decidimos evaluar si la ausencia de TIF1 γ repercute en la diferenciación y funcionalidad de células Treg promoviendo un fenotipo de inflamación en ratones de edad avanzada. Para dicho análisis, se sacrificaron ratones de más de 40 semanas y se aislaron distintos órganos linfáticos (timo, bazo, nódulos linfáticos periféricos y mesentéricos) y se analizaron las poblaciones de celulares

con base en la expresión de Foxp3 y dentro de ellas se analizó las células que expresaran o no CD25 (CD25⁺ o CD25⁻ respectivamente). En la Figura 23 se muestran gráficas representativas de este análisis.

Figura 23 . Graficas de densidad representativas de poblaciones Foxp3⁺CD25⁻ y Foxp3⁺CD25⁺. Análisis a partir de células positivas para CD4⁺ provenientes de distintos órganos de ratones TIF1 γ /f EGFP (WT) o TIF1 γ /f EGFP CD4 Cre (KO). A) Nódulo linfático periférico B) Nódulo linfático mesentérico C) Bazo. Se muestran las gráficas de puntos representativas de 3 experimentos independientes.

Al analizar las células Treg de ratones viejos, se puede observar que en ausencia de TIF1 γ la frecuencia de células Foxp3⁺CD25⁻ se encuentra reducida en comparación con las células del ratón WT de la misma edad (Figura 24A). Esta diferencia no se observa en los números totales de células (Figura 24B). De manera interesante, cuando se evalúa la expresión de Foxp3 en estas células, se observó una reducción en la expresión de Foxp3 en todos los órganos analizados (Figura 24C-D). Al analizar las células Treg de fenotipo Foxp3⁺CD25⁺ en ratones deficientes de TIF1 γ de más de 40 semanas, no se

observan diferencias con respecto al control ni en la frecuencia ni en el número de células (Figura 24E-F). En cuanto a los valores de IMF de Foxp3 y CD25 en esta población, sólo se observa un incremento en la expresión de CD25 en las células Treg deficientes de TIF1 γ (Figura 24G-J).

Figura 24. Fenotipificación basal de células Treg en ratones TIF1 γ deficientes de más de 40 semanas. A) Frecuencias basales de células Treg en distintos órganos linfoides identificadas como Foxp3⁺CD25⁻ de ratones TIF1 γ fx/fx (WT) y TIF1 γ fx/fx Cre (KO). B) Número total de células Treg Foxp3⁺CD25⁻. C) Intensidad media de fluorescencia de Foxp3 en poblaciones Foxp3⁺CD25⁻. D) Histograma representativo de la IMF de Foxp3 en poblaciones Foxp3⁺CD25⁻ en NLM el número representa el valor de IMF en la población analizada. E) Frecuencias basales de células Treg en distintos órganos linfoides identificadas como Foxp3⁺CD25⁺ de ratones TIF1 γ fx/fx (WT) y TIF1 γ fx/fx Cre (KO). F) Número total de células Treg Foxp3⁺CD25⁺. G) Intensidad media de fluorescencia de Foxp3 en poblaciones Foxp3⁺CD25⁺. H) Histograma representativo de la IMF de Foxp3 en poblaciones Foxp3⁺CD25⁺ en NLM, número representa el valor de IMF en la población analizada. I) Intensidad media de fluorescencia de CD25 en poblaciones Foxp3⁺CD25⁺. J) Histograma representativo de la IMF de CD25 en poblaciones Foxp3⁺CD25⁺ en NLM el número representa el valor de IMF en la población analizada. NLP (Nódulo linfático periférico), NLM (Nódulo linfático mesentérico).). n= 10 (WT- TIF1 γ fx/fx EGFP) y 11 (KO- TIF1 γ fx/fx Cre EGFP) Análisis Prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) *p<0.05, **p<0.01. Datos de 3 experimentos independientes.

Fenotipo de activación de células Treg ($CD4^+ Foxp3^+$) en ratones $CD4$ fx/fx $TIF1\gamma$ de más de 40 semanas.

Posteriormente, se evaluó si la deficiencia de $TIF1\gamma$ en linfocitos T de ratones de más de 40 semanas repercutía en el estado de activación de los linfocitos Treg. Una vez más se identificó a células activadas o en reposo: $CD4^+Foxp3^+CD62L^+CD44^{low}$ (en reposo: rTreg) y $CD4^+Foxp3^+CD62L^-CD44^+$ (activadas: aTreg) (Figura 20). En la figura 25 se muestran gráficas de contorno representativas de estas poblaciones en los distintos órganos analizados.

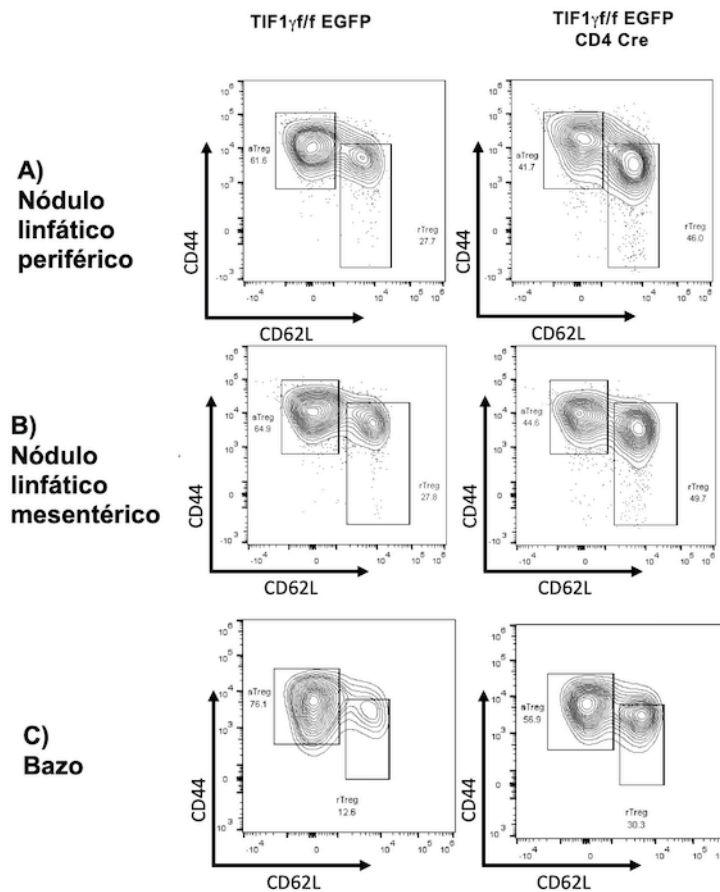


Figura 25. Gráficas de contorno representativas de poblaciones $CD4^+Foxp3^+CD62L^+CD44^{low}$ (Treg en reposo: rTreg) y $CD4^+Foxp3^+CD62L^-CD44^+$ (Treg activadas: aTreg). Análisis a partir de células positivas para $CD4^+$ provenientes de distintos órganos de ratones $TIF1\gamma^{ff}$ EGFP (WT) o $TIF1\gamma^{ff}$ EGFP CD4 Cre (KO). A) Nódulo linfático periférico B) Nódulo linfático mesentérico C) Bazo. Se muestran las gráficas de contorno representativas de 3 experimentos independientes.

Al analizar el fenotipo de activación de células CD4⁺ Foxp3⁺ de ratones deficientes de TIF1 γ , observamos un incremento en la frecuencia de células Treg en reposo en nódulo linfático mesentérico y bazo (Figura 26A) y una disminución en células Treg activadas en los distintos órganos de ratones deficientes de TIF1 γ (Figura 26E). Con respecto al número de células, observamos un incremento de células Treg en reposo, solamente en el bazo de ratones deficientes de TIF1 γ (Figura 26B). Al analizar la IMF de Foxp3 se observó una disminución en las células Treg deficientes de TIF1 γ en bazo; por otro lado con respecto a la expresión de CD25, se observó un incremento en las células Treg en reposo del órgano linfático mesentérico y periférico (Figura 26D). El número total de linfocitos Treg activados no fue distinto entre ratones silvestres de 40 semanas y ratones deficientes de TIF1 γ de la misma edad (Figura 26F), lo mismo que la IMF de Foxp3 en estas células. Sin embargo, observamos un incremento de CD25 en las Treg activadas de ratones deficientes de TIF1 γ en nódulos linfáticos mesentérico, periférico y bazo (Figura 26H).

Figura 26. Estado de activación de células CD4⁺Foxp3⁺ de ratones deficientes de TIF1 γ de más de 40 semanas.

A) Frecuencias basales de células CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺CD44^{low} (Treg en reposo: rTreg) en ratones mayores de 40 semanas en distintos órganos linfáticos. B) Número total de células Treg en reposo. C) IMF de Foxp3 en células Treg en reposo. D) IMF de CD25 en células Treg en reposo. E) Frecuencias basales de células CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁻CD44^{high} (Treg activadas: aTreg). F) Número total de células Treg activadas. G) IMF de Foxp3 en células Treg activadas. H) IMF de CD25 en células Treg activadas. NLP (Nódulo linfático periférico), NLM (Nódulo linfático mesentérico). n= 10 (WT- TIF1 γ fx/fx EGFP) y 11 (KO- TIF1 γ fx/fx Cre EGFP). Análisis, prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) o pareada (para el análisis de IMF) *p<0.05 ***p<0.001. Datos de 3 experimentos independientes.

Ensayo de inducción de iTreg a partir de células CD4 deficientes de TIF-1 γ

Con la finalidad de identificar la participación de TIF1 γ en la diferenciación *in vitro* de iTreg, se aislaron por FACS células CD4 vírgenes identificadas como CD4⁺Foxp3⁻CD62L⁺CD44⁻ de ratones reporteros WT o deficientes de TIF1 γ . Se diferenciaron co-cultivando los linfocitos vírgenes con células de bazo irradiadas (como células presentadoras de antígeno), TGF- β e IL-2. Al quinto día se analizó por FACS el porcentaje de diferenciación y la intensidad media de fluorescencia de Foxp3 y CD25 de acuerdo a la estrategia de análisis de la Figura 27.

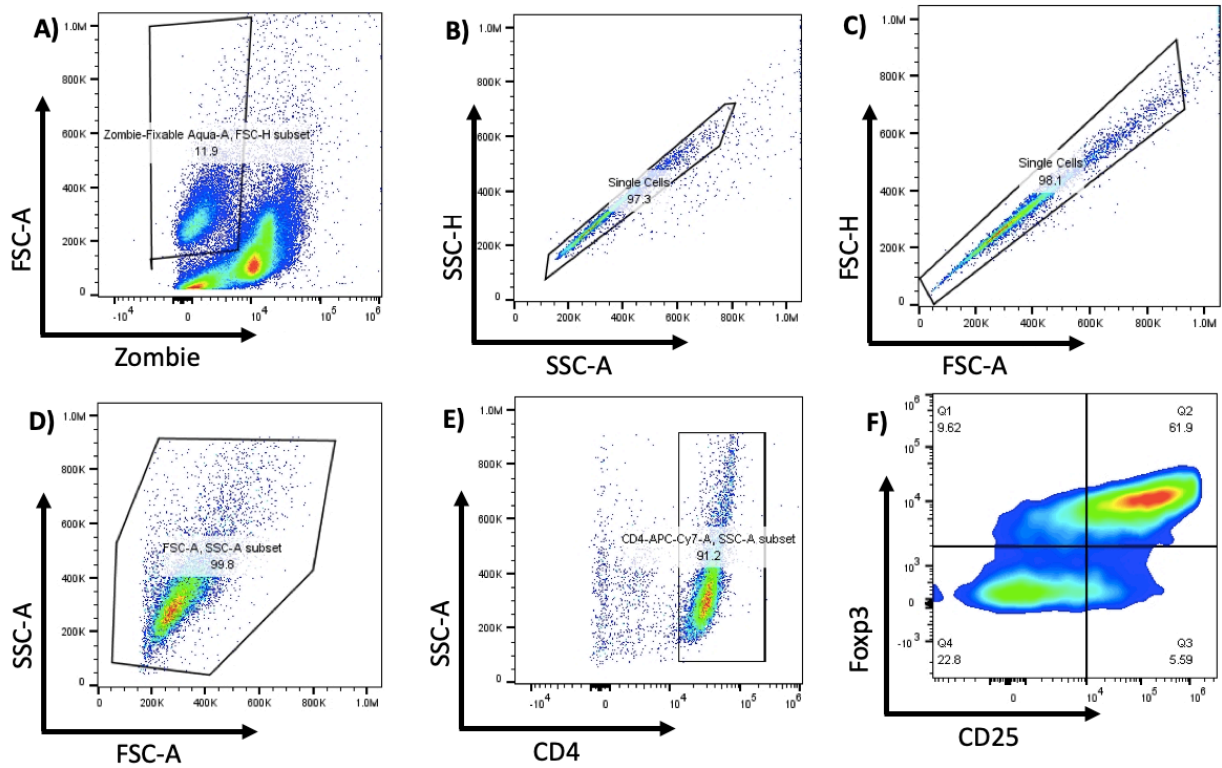


Figura 27. Estrategia de análisis de células iTreg identificadas como CD4⁺Fopx3⁺ o CD4⁺Fopx3⁺CD25⁺. A) Se seleccionaron las células vivas usando el colorante Zombie Aqua. B) Se realizaron selección de singuletes (SSC-H vs SSC-A) C) Se realizó una segunda selección de singuletes (FSA-A vs FSC-H) D) Se seleccionar a las células por tamaño y granularidad (SSC-A vs FSC-A) E) Se realizó la selección de células CD4⁺ F) Se analizó la población de CD4⁺ con base en la expresión de Fopx3⁺ y CD25⁺.

Al quinto día de cultivo de analizaron poblaciones con base en la expresión de Fopx3⁺ y CD25⁺. En la Figura 28 se muestran gráficas representativas de este tipo de análisis en cultivos de iTreg.

Figura 28. Grafica de puntos representativa de cultivos de 5 días de linfocitos vírgenes diferenciados bajo condiciones polarizantes para iTreg . Células de ratones TIF1 γ f/f EGFP (WT) o TIF1 γ f/f EGFP CD4 Cre (KO). Datos representativos de 6 experimentos independientes con 1-2 ratones por grupo.

Se puede observar que hay una tendencia a disminuir poblaciones $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^-$ en cultivos provenientes de ratones deficientes de $\text{TIF1}\gamma$ (Figura 29A). En esta población se observó una disminución en la expresión Foxp3 en aquellas Treg deficientes de $\text{TIF1}\gamma$ (Figura 29B-C). Por otro lado, se puede observar que en ausencia de $\text{TIF1}\gamma$, hay afectación en el potencial de diferenciación de células vírgenes hacia células iTreg identificadas como $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+$ (Figura 29D). Sin embargo, al evaluar la expresión de Foxp3 no se observaron diferencias entre células WT o deficientes de $\text{TIF1}\gamma$ (Figura 29E-F). Por otro lado, en esta población si se observa un incremento significativo en la expresión de CD25 en células deficientes de $\text{TIF1}\gamma$ (Figura 29G-H).

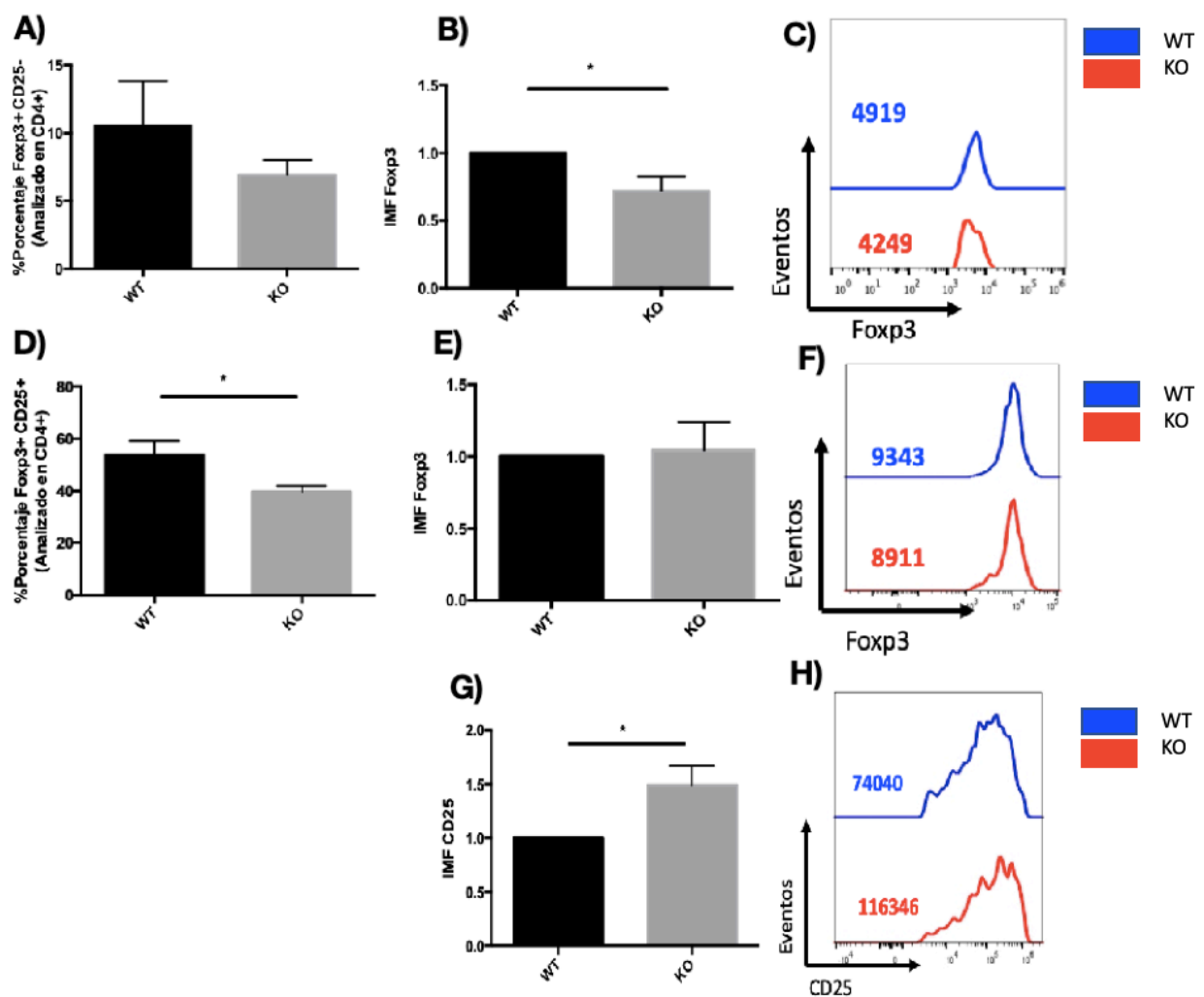


Figura 29. Cultivo de diferenciación de iTreg de células T deficientes de $\text{TIF1}\gamma$. A) Frecuencia de inducción de células iTreg $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^-$ provenientes de ratones silvestres $\text{TIF1}\gamma/f/f$ EGFP (WT) o deficientes de $\text{TIF1}\gamma$ $\text{TIF1}\gamma/f/f$ EGFP $\text{CD4}^+\text{Cre}$ (KO) después de 5 días de cultivos *in vitro*. B) IMF de Foxp3 en poblaciones $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^-$. C)

Histograma representativo de IMF de Fxp3 en poblaciones Fxp3⁺ CD25⁻, el número representa el valor de IMF en cada población. D) Frecuencia de inducción de células iTreg identificadas como Fxp3⁺CD25⁺, provenientes de ratones WT o KO después de 5 días de cultivos *in vitro*. E) Intensidad media de fluorescencia de Fxp3 en poblaciones Fxp3⁺CD25⁺. F) Histograma representativo de la IMF de Fxp3 en poblaciones Fxp3⁺CD25⁺, el número representa el valor de IMF en cada población. G) Intensidad media de fluorescencia de CD25 en poblaciones Fxp3⁺CD25⁺. H) Histograma representativo de la IMF de CD25 en poblaciones Fxp3⁺CD25⁺, el número representa el valor de IMF en cada población. Análisis Prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) *p<0.05, Datos de 6 experimentos independientes con 1-2 ratones por grupo.

Ensayo de estabilidad de células Treg deficientes de *TIF1 γ* .

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de una célula Treg deficiente de *TIF1 γ* *in vitro*, se aislaron por FACS células Treg CD4⁺Fxp3⁺CD25⁺ de nódulos linfáticos y bazo; se colocaron bajo condiciones de activación por 48 hrs (con células presentadoras de antígeno irradiadas, anti-CD3 e IL-2) y se determinó por citometría la frecuencia de células Treg al final del cultivo (Figura 30).

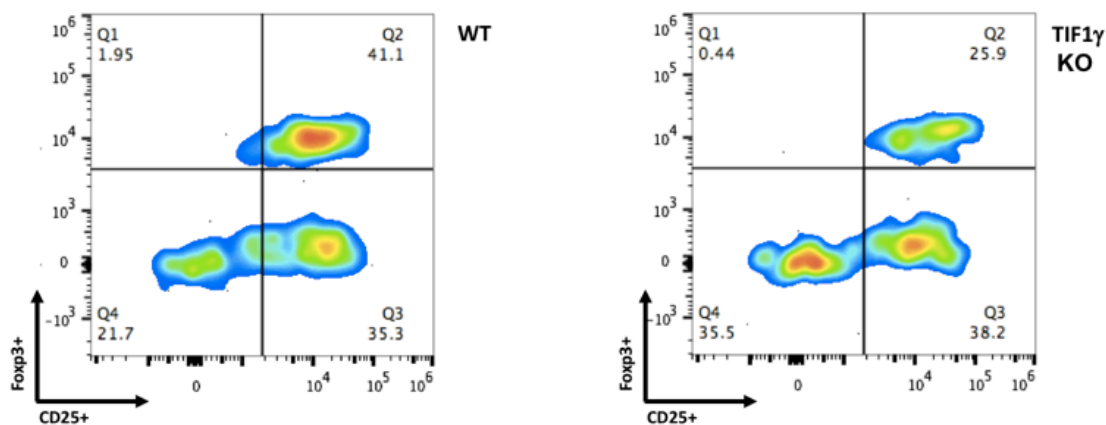


Figura 30. Estrategia de análisis de células Treg CD4⁺ Fxp3⁺ CD25⁺ activadas *in vitro* por 48 hrs. Gráfica representativa de frecuencia de células Treg posterior al reto de activación con APCs, anti-CD3 e IL-2 por 48 hrs de ratones *TIF1 γ fx/fx EGFP* (WT) y *TIF1 γ fx/fx Cre EGFP* (KO). Dato representativo de 3 experimentos independientes con 1-2 ratones por grupo.

En este grupo de experimentos, observamos que tanto en cultivos de activación de Treg WT como de KO de TIF1 γ hay una pérdida de la expresión de Foxp3, sin embargo, este efecto se ve más evidente en las células Treg que carecen de TIF1 γ y la frecuencia al final del cultivo es significativamente menor comparada con aquella observada en cultivos de Treg silvestres (Figura 31A). Al evaluar la expresión de Foxp3 y CD25 en las células que mantuvieron en fenotipo Treg en estos cultivos, observamos que no hubo cambios en la expresión de Foxp3 pero si encontramos un incremento significativo en la expresión de CD25 (Figura 31B-C). Sin embargo, no podemos descartar que este aumento en la expresión de CD25 se deba a que basalmente las células expresaban más este receptor, como sabemos ocurre en condiciones basales en ausencia de TIF1 γ .

Figura 31. Cultivo de activación de linfocitos Treg deficientes de TIF1 γ . A) Frecuencia de células Foxp3⁺CD25⁺ 48 hrs después de la activación *in vitro* de ratones WT o deficientes de TIF1 γ . B) IMF de Foxp3. C) IMF de CD25. n=3
Análisis, prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) *p<0.05

Modelo de inmunidad tumoral

Finalmente, para evaluar la funcionalidad de células Treg deficientes de TIF1 γ consideramos el modelo de progresión tumoral. Hipotetizamos que si la presencia de TIF1 γ fuera necesaria para la funcionalidad de las células Treg, en un modelo de progresión tumoral con ratones cuyas células T carecen de TIF1 γ , el tumor sería más pequeño y la proporción CD8/Treg sería mayor. Se inocularon 1x10⁵ células de la línea de melanoma murina B16 por vía subcutánea y se monitoreó por 14 días el crecimiento del tumor en grupos de ratones controles y deficientes. Al observar la cinética de crecimiento tumoral observamos una tendencia de menor crecimiento en el grupo de

ratones deficientes de TIF1 γ comparado con el grupo control (Figura 32A). Esta tendencia a menor crecimiento del tumor en ratones KO, también se observó cuando determinamos el peso tumoral al final del experimento (Figura 32B).

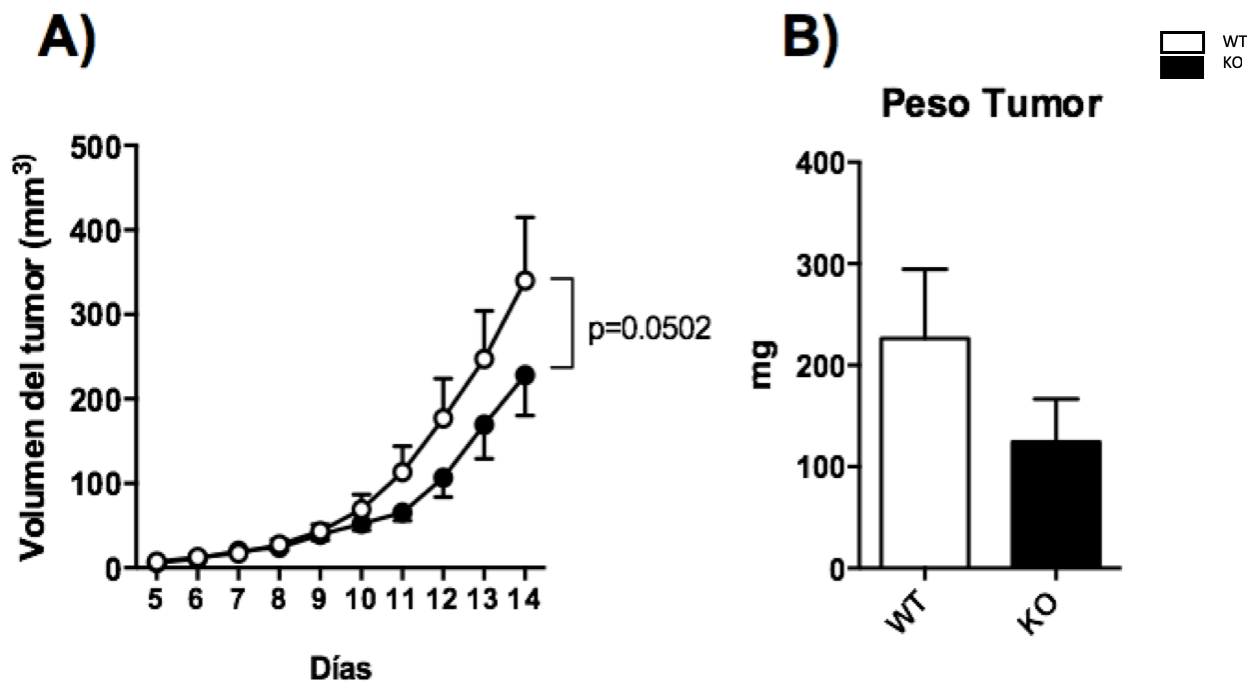
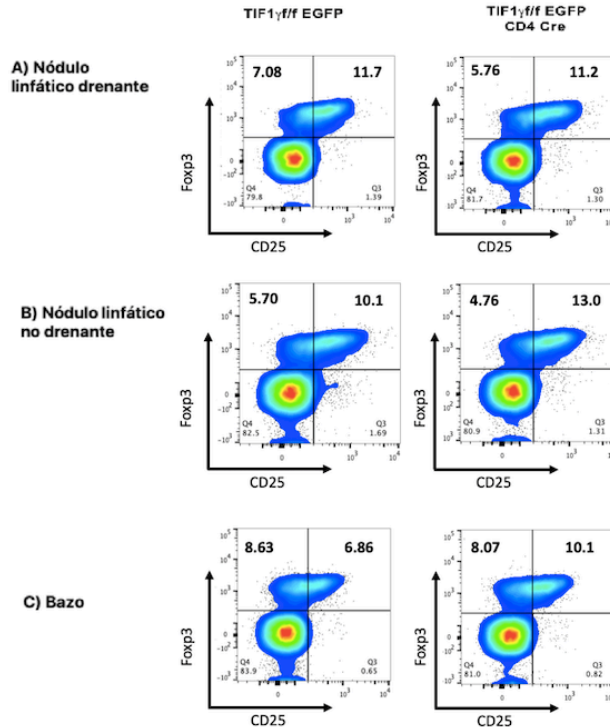


Figura 32. Modelo de inmunidad tumoral en ratones deficientes de TIF1 γ . A) Cinética de crecimiento de volumen tumoral de ratones WT o deficientes de TIF1 γ inoculados con células de melanoma B16. B) Gráfica de peso del tumor al día del sacrificio (d14 post-inoculación). n= 14(WT) y 17 (KO) de 3 experimentos independientes. Prueba de observaciones repetidas para A) y prueba de t de dos colas no pareada para B).

Al día 14 post-inoculación de las células B16F10, se aislaron los ganglios drenantes, no drenantes, el bazo y el tumor para analizar las poblaciones de linfocitos en cada órgano linfoide y los linfocitos infiltrantes del tumor. En la Figura 33 se muestran unas gráficas representativas del análisis realizado para este experimento *in vivo*.



Grafica 33. Gráficas de densidad representativas de poblaciones $Foxp3^+CD25^-$ y $Foxp3^+CD25^+$ en el modelo de tumor. Análisis a partir de células positivas para $CD4^+$ provenientes de distintos órganos de ratones TIF1 γ f/f (WT) o TIF1 γ f/f CD4 Cre (KO). A) Nódulo linfático drenante B) Nódulo linfático no drenante C) Bazo. Gráficas representativas de 3 experimentos independientes, n=14 WT y n=17 KO.

Al analizar la población de linfocitos reguladores con base en la expresión de Foxp3 y CD25, se observó una disminución en la frecuencia de células $Foxp3^+CD25^-$ en la población infiltrante de tumor (Figura 34A), sin embargo no hubo cambios en el número total de estas células en ninguno de los órganos analizados (Figura 34B). Con respecto a la expresión de Foxp3 se observó un incremento significativo en la población $Foxp3^+CD25^-$ de nódulos linfáticos no drenantes (NLND) provenientes de ratones deficientes de TIF1 γ (Figura 34C).

Por otro lado, al evaluar la frecuencia de células $Foxp3^+CD25^+$ se observó un incremento significativo en la frecuencia de células en nódulo linfático no drenante y el bazo, no así en órganos cercanos al tumor o en el tumor mismo (Figura 34D). Tampoco encontramos diferencias significativas en el número total de células $Foxp3^+CD25^+$ en los distintos órganos analizados (Figura 34E). Con respecto a la expresión de Foxp3 en esta

población, se observó un incremento en el nódulo linfático no drenante de ratones deficientes de TIF1 γ (Figura 34F). Mientras que al medir la expresión de CD25, observamos un incremento en la expresión de este marcador en todos los órganos analizados, a excepción de los linfocitos infiltrantes del tumor, en ratones deficientes de TIF1 γ (Figura 34G).

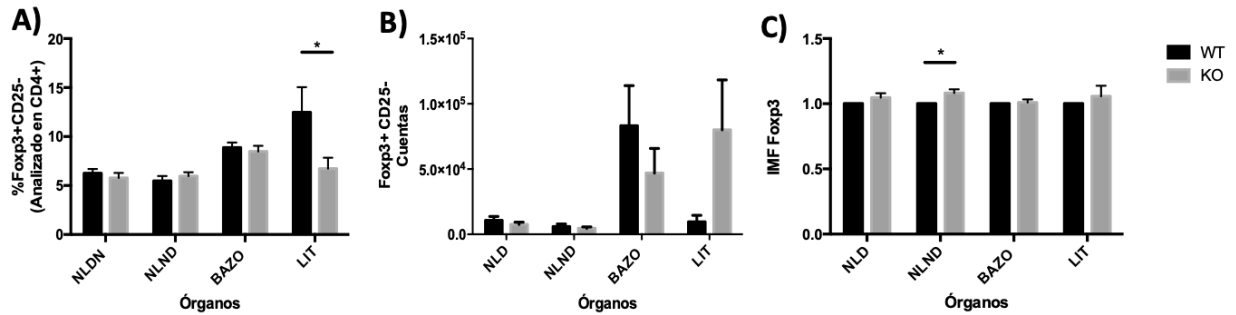


Figura 34. Análisis de células Treg en ratones CD4 Cre TIF1 γ en un modelo de inmunidad tumoral. A) Frecuencias de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻ a los 14 días post-inóculo de células de melanoma B16F10 en distintos órganos. B) Número total de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻. C) IMF de Foxp3 en células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻. D) Frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ a los 14 días post-inóculo de células de melanoma B16F10 en distintos órganos. E) Número total de células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺. F) IMF de Foxp3 en células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺. G) IMF de CD25 en

células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺. NLD (Nódulo linfático drenantes) NLND (Nódulo linfático no drenantes), bazo y LIT (linfocitos infiltrantes de tumor) de ratones TIF1 γ fx/fx (WT) y TIF1 γ fx/fx Cre (KO). n= 14 (WT) y n=17 (KO) de 3 experimentos independientes. Análisis Prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) *p<0.05.

En este modelo de tumor, también se calculó la razón CD8/Treg, indicadora de la respuesta citotóxica y el estado anti-inflamatorio en los distintos tejidos. Como se puede observar en la Figura 35, la razón CD8/Treg se encuentra disminuida en nódulos linfáticos no drenantes de ratones deficientes de TIF1 γ . Lo anterior podría indicar que en estos ratones si hay linfocitos Treg (incluso más en el NLND), sin embargo dado el fenotipo global en el tamaño del tumor; posiblemente no están ejerciendo una función supresora correcta. En experimentos futuros consideramos que será necesario evaluar otros marcadores de funcionalidad como CTLA-4, CD73, CD39, secreción de citocinas anti-inflamatorias como TGF- β , IL-10 e IL-35 para poder concluir algo al respecto.

Figura 35. Razón de células CD8 y Treg en distintos órganos en el modelo de tumor. NLD (Nódulo linfático drenantes) NLND (Nódulo linfático no drenantes), bazo y LIT (linfocitos infiltrantes de tumor) de ratones TIF1 γ fx/fx (WT) y TIF1 γ fx/fx Cre (KO). n= 14 (WT) y n=17 (KO) de 3 experimentos independientes. Análisis Prueba de t de dos colas no pareada (95% intervalo de confianza) *p<0.05.

Discusión

Las células Treg son necesarias para el mantenimiento de la homeostasis en un individuo, por ende, el entendimiento de su regulación, mantenimiento y función es esencial. Dentro de las señales de diferenciación de linfocitos Treg, la vía de TGF- β es importante para la diferenciación, mantenimiento y estabilidad bajo señales de activación^{51,76,79}. Sin embargo, hasta el momento no se ha dilucidado por completo cuáles son los mecanismos moleculares mediante los cuáles TGF- β puede controlar dichas funciones de linfocitos Treg. En este trabajo, iniciamos la caracterización del papel de TIF1 γ en las señales dependientes de TGF- β en linfocitos Treg y proponemos que dicha proteína participa, por un lado, en el control de marcadores que identifican a una célula Treg como CD25, y, por otro lado, en el mantenimiento de la identidad de las células Treg de una manera contexto dependiente.

En condiciones de homeostasis, los ratones deficientes de TIF1 γ en las células CD4, presentan una disminución en la frecuencia de células Foxp3⁺CD25⁻ así como en la expresión de Foxp3 en nódulos linfáticos mesentéricos y el timo, órganos expuestos a una mayor expresión endógena de TGF- β . Particularmente en el timo se ha descrito que se pueden distinguir dos poblaciones que se pueden dividir con base en la expresión de Foxp3 y CD25: CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ y CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻; las primeras se consideran Treg maduras y las segundas células precursoras de Treg²⁴, en nuestros datos se observa una disminución en la expresión de Foxp3 en las células precursoras de Treg, por lo que consideramos importante evaluar la relevancia de TIF1 γ en la regulación de generación y función de células Treg precursoras tímicas, en futuros experimentos planeados para mi trabajo de doctorado.

Al analizar la población de células Foxp3⁺CD25⁺ en ausencia de TIF1 γ , no se observó una disminución en la frecuencia ni en la expresión de Foxp3⁺. Dicho fenotipo, es distinto al observado en ausencia de otros componentes de la vía de TGF- β , tales como el receptor tipo I, tipo II, y las Smads de receptor (Smads 2/3), donde se observa una disminución en la expresión de Foxp3 y en la frecuencia de dicha población *in vivo*. De

manera interesante, el fenotipo inducido por la ausencia de Smad4 tampoco repercute en la generación de Tregs ni en la expresión de Foxp3, recapitulando el fenotipo observado al eliminar a TIF1 γ ^{26,78,81-86}. Lo anterior podría explicarse por al menos dos posibles mecanismos: 1) que la función de Smad4 y TIF1 γ sea redundante para la generación de células Treg, y en ausencia de sólo una de ellas existan mecanismos de compensación, ó 2) que exista una vía parcialmente dependiente de los componentes de la vía de las Smads en la que ni Smad4, ni TIF1 γ participen y ésta sea la vía en respuesta al TGF- β responsable de la generación de linfocitos Treg.

Por otro lado, nuestros datos de expresión de CD25, al analizar esta misma población Foxp3⁺CD25⁺, sugieren que TIF1 γ es necesario para la expresión normal de ésta molécula en condiciones de homeostasis en todos los órganos analizados (NLP, NLM, Bazo y Timo); y que en su ausencia hay una mayor expresión con respecto a su contraparte silvestre. Relacionado a esta observación, se ha descrito que la señal de TGF- β , mediada por componentes de la vía canónica Smad3/Smad4, en conjunto con la señal de TCR son importantes para inducir la expresión de CD25 ⁶⁵. Con base en una de las funciones descritas de TIF1 γ ⁹³, como competidor de Smad4, al eliminarlo, Smad4 podría estar ejerciendo una mayor actividad transcripcional, promoviendo así la mayor expresión de CD25 observada en nuestro modelo deficiente de TIF1 γ .

Dada la naturaleza de las Tregs y su desarrollo, no podemos descartar que las células Treg localizadas en órganos periféricos sean exclusivamente pTreg, por lo que tendríamos que distinguir a las células Treg dependiendo de su origen (timo o periferia) usando marcadores como Helios o Neuropilina-1 para evaluar y distinguir la función de TIF1 γ en estas dos poblaciones.

Por otro lado, se han reportado distintas moléculas importantes para el control de la homeostasis de las células Treg en ratones que se consideran viejos ^{91,92}, donde se ha reportado que ocurre una inflamación “natural” conforme avanza la edad. Al analizar ratones mayores de 40 semanas deficientes TIF1 γ , no observamos indicios de

inflamación sistémica en estos ratones (datos obtenidos por el estudiante de LIBB Diego Pérez en nuestro laboratorio) comparados con ratones silvestres de la misma edad. Debido a que en nuestro sistema experimental, eliminamos a TIF1 γ en todos los compartimentos de linfocitos T, no descartamos la posibilidad de que esta molécula sea también importante para la activación y función efectora de otros linfocitos T (CD4⁺ o CD8⁺) y no sólo poblaciones de Treg. También se ha descrito, que en ausencia de TIF1 γ en linfocitos T, hay un incremento en la frecuencia de células productoras de IL-10 en condiciones de inflamación ⁹⁴, por lo que existe la posibilidad que en ratones viejos aunque exista una disminución del compartimento de linfocitos Treg, un posible incremento de células T productoras de IL-10 mantenga la homeostasis y el control de la inflamación.

Al separar a las células Treg con base en la expresión de Foxp3 y CD25, observamos que en ausencia de TIF1 γ no hay afectación en el compartimento doble positivo (Foxp3⁺CD25⁺) pero si una disminución en la población Foxp3⁺CD25⁻, donde observamos una disminución en la expresión de Foxp3. Este fenotipo sugiere que probablemente en ausencia de TIF1 γ , el incremento de CD25 en poblaciones Foxp3⁺CD25⁺ compensa la ausencia de TIF1 γ y su participación en la expresión de Foxp3, hipótesis que habrá que demostrarse en estudios futuros. Apoyando a esta hipótesis, cabe mencionar que en un modelo de delección condicional con la cepa LckCre donde se elimina al TGF- β RI desde un estadio DN del timo, no se encuentran cambios en las frecuencias de nTreg Foxp3⁺ pero si se observa un incremento en la expresión de CD25 en estas células, mismo que rescata de un fenotipo de autoinmunidad a estos ratones, demostrado por el fenotipo del mismo ratón en fondo IL-2KO, donde se observa autoinmunidad asociado a la ausencia de células Treg ⁷⁸.

Relacionado al fenotipo en la población Foxp3⁺CD25⁻, inicialmente no se podía considerar que estas células fueran reguladoras, puesto que durante la activación de linfocitos T hay una expresión transitoria de Foxp3 ⁹⁵. Sin embargo, distintos reportes indican que las células Foxp3⁺CD25⁻ son células que se encuentran incrementadas en ratones en proceso de envejecimiento, en pacientes con lupus, diabetes, pacientes con

infección del virus de la inmunodeficiencia humana, *Mycobacterium tuberculosis* y *Bordetella pertussis*; las cuales tienen distintas capacidades supresoras^{96–101}. En los casos mencionados anteriormente, podemos destacar que en todos estos procesos inflamatorios hay mecanismos de inmunidad humoral y producción de anticuerpos. De manera interesante, se describió que existe una población de células Treg, localizada en los centros germinales, especializada en regular a las células T foliculares y por ende la producción de anticuerpos. Dichas células se caracterizan por la expresión de Foxp3⁺CXCR5⁺PD-1⁺CD25⁻^{102–104}, pese a los cánones descritos en la literatura, la disminución de CD25 en las células Tfr (T foliculares reguladoras) es esencial para la supresión de las células T foliculares. En este sentido, también se ha descrito que en los centros germinales, la señal de TGF- β regula negativamente la expresión de CD25 en las células T en los centros germinales¹⁰⁵. Con lo antes mencionado, consideramos importante evaluar la participación de TIF1 γ en la regulación de las células Tfr en modelos de inmunidad humoral.

Otros de los fenotipos observados en las células Treg de ratones mayores de 40 semanas es su fenotipo de activación. En ausencia de TIF1 γ , hay incremento de células Treg en reposo (CD62L⁺) y una disminución de células Treg activadas (CD44⁺), sugiriendo una afectación durante los procesos de activación. Consideramos que existe los procesos de activación están comprometidos, puesto que se ha reportado que cuando una célula Treg se activa se disminuye la expresión de CD62L y de CD25¹⁰⁶. No obstante, no descartamos la posibilidad de que la ausencia de TIF1 γ afecte los procesos de activación de otros linajes de linfocitos CD4 y CD8. Lo anterior, se hipotetiza a partir de la observación que en el ratón doble deficiente Smad4 fx/fx/TGFR1I fx/fx CD4 Cre, hay una disminución de linfocitos T activados, por lo que se propone que un componente dependiente de la vía de TGF- β , independiente a Smad4, es el que promueve un estado de activación en el linfocito T⁸⁶. Por otro lado, para asegurarnos de que el fenotipo observado sea únicamente dependiente de los linfocitos Treg, tendríamos que utilizar otras herramientas de eliminación condicional como lo serían ratones Foxp3 Cre.

Por otro lado, se ha descrito que la señal de IL-2 y del TCR se requiere para mantener a la población de células Treg en reposo en nódulos linfáticos secundarios^{31,107,108}, particularmente en el área de linfocitos T. Esta localización es mediada en parte por la expresión de CCR7, receptor de quimiocina ligada al mantenimiento de linfocitos T en nódulos linfáticos. La localización de los linfocitos Treg en estas zonas es importante para el mantenimiento de la tolerancia y supresión de linfocitos T autoreactivos, mediante el incremento de la expresión de CD25, CD73 y CTLA-4. Dado que la señal de IL-2 es importante para el mantenimiento de la población de Treg en reposo, y dado el fenotipo de incremento de CD25 en ausencia de TIF1 γ , es posible que la señal de CD25 mantenga la población y fenotipo de reposo y promueva su retención en nódulos linfáticos, incluso en ambientes inflamatorios.

Con respecto a la capacidad deficiente de diferenciación de linfocitos T deficientes de TIF1 γ hacia iTreg. Consideramos que dada la importancia de la vía de TGF- β y Smad3 para la inducción de células iTreg, es necesario evaluar la participación de TIF1 γ y su potencial unión a Smad3 en el enhancer CNS1, requerido para la diferenciación *in vitro* de Treg^{36,39,40}. Nuestros datos concuerdan con lo reportado previamente por la vía de TGF- β , en donde tanto los receptores, como la Smad3 y Smad4 son necesarias para la diferenciación de linfocitos Treg *in vitro*^{85,109}; por lo que se podría hipotetizar que Smad4 y TIF1 γ cooperan para promover una diferenciación de novo de Treg en condiciones *in vitro*. También será necesario evaluar si la deficiencia que observamos al día 5 de cultivo se deba a que en el proceso de diferenciación, la ausencia de TIF1 γ promueva muerte celular, dado el papel anti-apoptótico de TIF1 γ descrito previamente en iNKT¹¹⁰. Cabe recalcar que, en el trabajo publicado por Tanaka y colaboradores⁹⁴, la ausencia de TIF1 γ no repercute en la diferenciación de iTreg. Con respecto a este punto podemos encontrar dos diferencias: 1) nuestro protocolo de diferenciación utiliza células de bazo irradiadas, mientras que el protocolo de Tanaka utiliza anticuerpos pegados a placa y 2) la colecta de células es al 5 día y no al 4 día como el protocolo de diferenciación de Tanaka. En este sentido, podemos especular que la señal de activación del TCR o co-estimulación recibida en los distintos protocolos sea importante para la participación de TIF1 γ en la regulación de la generación de Tregs *in vitro*.

De igual modo, observamos que la estabilidad de las células Treg se ve afectada en ausencia de TIF1 γ . Estos datos concuerdan con lo observado en distintas cepas de ratones asociadas a la vía de TGF- β : ratones CD4 Cre TGF- β ⁷⁶, Foxp3 Cre Smad2/3⁸² y Smad4 CD4 Cre en fondo TGFBR2 KO⁸⁶, por lo que proponemos que con respecto al mantenimiento de la estabilidad de las células Treg, se requiere la activación de la vía canónica de TGF- β y posiblemente una cooperación entre TIF1 γ y Smad4 para conferir estabilidad a una célula Treg. Otra opción es que haya mecanismos de compensación en los que en ausencia de Smad4, TIF1 γ supla de dicha deficiencia (y viceversa) de tal modo que no se observa el fenotipo de autoinmunidad observado en otros modelos. Entendemos estabilidad como la capacidad de las células Tregs de: 1) mantener la expresión de Foxp3, 2) mantener capacidad supresora, y 3) ausencia de funciones efectoras (eg. producción de IL2, citocinas pro-inflamatorias, proliferación, etc)³⁵. Existen otros factores importantes para conferir estabilidad de las células Tregs, particularmente: el estado de metilación de la región promotora y de la región CNS2 en el locus de Foxp3^{42,43}, la señal de IL-2 mediada por STAT5¹¹¹, y las señales del TCR¹¹². En nuestras condiciones de activación con APCs irradiadas e IL-2, observamos un decremento en la frecuencia de células Foxp3⁺ después del proceso de activación. No podemos descartar la posibilidad que las células Treg que carecen de TIF1 γ se estén muriendo durante el proceso de activación. Sin embargo, existe la posibilidad de que exista un fallo en los procesos de desmetilación de la región CNS2 en las células Treg, ya que se sabe que dentro de las señales que inducen desmetilación de la región de CNS2, TCR e IL-2, TGF- β se ha reportado como una citocina importante para mantener desmetilado CNS2¹¹³. Esto es mediante el reclutamiento, mediado por Smad3 y STAT5, de las enzimas TET1/TET2 a CNS2, las cuales convierten 5-metil citosina a 5-hidroximetil citosina, reacción importante para los proceso de desmetilación⁷⁷. También consideramos necesario evaluar si es posible que bajo señales de inflamación, asociado a un perfil efector como IFN γ , IL-4, IL-12, IL-17 o IL-6, las células pudieran ser más susceptibles a perder estabilidad dependiendo del estímulo. Todas estas opciones podrían probarse *in vitro* o incluso evaluar los niveles de dichas citocinas en suero de ratones de 8 semanas y mayores de 40 deficientes de TIF1 γ para explorar esta posibilidad.

Con respecto a la capacidad supresora de las células Treg deficientes de TIF1 γ células, nuestros experimentos *in vitro* no son concluyentes (datos no presentados) por lo que no podemos hacer una aseveración última. Sin embargo, los datos del modelo de colitis como parte de los experimentos preliminares y antecedentes directos de este proyecto, junto con los datos del modelo de inmunidad tumoral *in vivo*, sugieren que hay un defecto en la función de las células Treg. Distintos grupos de investigación han logrado caracterizar componentes de la vía de TGF- β importantes para promover funcionalidad de células Treg; por un lado la señal autocrina de TGF- β promueve el control de perfiles Th1 y colitis ⁷⁵, por otro lado la señal de TGF- β favorece la retención de células Treg en el colon mediante la inducción de CD103, molécula asociada a la retención de tejidos ⁷⁹. La observación de que en ratones deficientes de TIF1 γ los tumores tenían un volumen más pequeño, puede evidenciar la funcionalidad deficiente de linfocitos Treg. Con respecto a la señal de TGF- β y Smad4, cuando se realiza el modelo de melanoma en el ratón donde se elimina condicionalmente a Smad4 en células CD4, se observa que la incidencia de tumores mayores a 3mm de diámetro incrementa con respecto a ratones control. Dicho fenotipo pudiera deberse a deficiencias en el control de poblaciones efectoras con función antitumoral o a promoción de funciones reguladoras, sin embargo estas opciones no se exploraron o descartaron en ese reporte. Por otro lado, si comparamos nuestros resultados con lo observado en el ratón deficiente de Smad4 en linfocitos T, podríamos especular que TIF1 γ y Smad4 tienen funciones antagónicas en el modelo de inmunidad tumoral, por un lado regulando la actividad antitumoral de linfocitos T proinflamatorios y por otro, controlando poblaciones de linfocitos Treg ⁸⁶. En futuros experimentos será importante separar la contribución de la ausencia de TIF1 γ en poblaciones reguladoras vs proinflamatorias para dilucidar los mecanismos posibles que pudieran estarse afectando en cada subpoblación. Por ahora, dada la naturaleza de nuestro ratón (CD4 cre), no podemos descartar que el fenómeno observado se deba a la suma del fenotipo de la ausencia de TIF1 γ en otros linajes celulares como linfocitos CD8⁺ o CD4⁺. En nuestro laboratorio, observamos que en este modelo no hay cambios en las poblaciones de linfocitos Th1 ni células CD8⁺, y por otro lado observamos un incremento de linfocitos Treg en ratones CD4 Cre TIF1 γ condicionales. Este incremento

particularmente en nódulos linfáticos no drenantes y el bazo, puede sugerir una retención de linfocitos Treg, y por ende un fallo en su función supresora por lo que nos interesa primordialmente abordar el estudio de TIF1 γ en fondo Foxp3Cre.

De manera paralela, se ha observado que en ausencia del receptor II de TGF- β en linfocitos Treg, hay una afectación en el reclutamiento y retención en sitios de inflamación asociados al tracto gastrointestinal ⁷⁹, sin embargo no podemos descartar que la misma señal de TGF- β mediada por TIF1 γ regule el reclutamiento y retención en modelos de inmunidad tumoral. Estos datos concuerdan con la observación de que hay un incremento en células Treg CD62L⁺, sugiriendo un fallo en la activación de dichos linfocitos Treg en condiciones de inflamación. Por otro lado, de manera interesante cuando analizamos la expresión de CD25⁺ en células Treg encontramos que no hay incremento en las células Treg infiltrantes del tumor. De acuerdo a los datos reportados por el grupo del Dr. Rudensky ¹⁰⁶, donde se indica que cuando una Treg se activa disminuye la expresión de CD25; podríamos postular que en ausencia de TIF1 γ no hay una activación correcta de linfocitos Treg, particularmente en el sitio de inflamación fenotipo que habría que demostrarse en futuros experimentos.

Debido a la estructura de TIF1 γ y su capacidad de unión a cromatina bivalente, es posible que en las células Treg, exista una regulación a nivel de cromatina particularmente en CNS2, una región crucial para el mantenimiento de la expresión bajo condiciones inflamatorias. En los experimentos *in vitro* y parcialmente en los *in vivo*, observamos que las células Treg son inestables y no están ejerciendo una función efectora correcta. Dado que este fenómeno sólo se observa en un ambiente de inflamación, creemos que las Treg están perdiendo identidad. Nuestros resultados concuerdan con el ratón Foxp3 Cre CNS2 en donde se depleta CNS2 en células Treg. Este ratón, al igual que nuestro ratón deficiente de TIF1 γ , presenta frecuencia de células Treg similares al de un ratón WT en homeostasis; sin embargo, en condiciones de inflamación *in vitro* e *in vivo*, las células Treg no son funcionales y pierden identidad. Así mismo la ausencia de TIF1 γ fenocopia al ratón Foxp3 Cre CNS2 con respecto al incremento de CD25 y de células Treg en reposo ^{42,43}, sugiriendo un posible mecanismo

de acción de TIF1 γ directamente en una de las regiones reguladoras del gen de Foxp3, misma que habrá que demostrarse en futuros experimentos.

Finalmente, consideramos importante evaluar si en ausencia de TIF1 γ , la fosforilación y señalización de STAT5 es correcta. Se sabe que en células mamarias Smad4 inhibe la señalización y fosforilación de STAT5, y que en ausencia de TIF1 γ la inhibición se exagera ¹¹⁴. En nuestros resultados observamos un incremento en CD25, sin embargo esto no implica que aunque las células Treg puedan captar más IL-2, exista una señalización correcta de STAT5. Por lo que será interesante evaluar si en linfocitos Treg la ausencia de TIF1 γ repercute en primera instancia en un incremento en la concentración de Smad4, y esto promueva una inhibición exacerbada de la señal de STAT5.

También consideramos la posibilidad que en ausencia de TIF1 γ , la señal de Smad4 se encuentre desregulada y que parte del fenotipo se deba a cambios en la vía canónica dependientes de Smad4. Por un lado, de acuerdo al modelo de competencia, TIF1 γ al ser un regulador negativo de Smad4, podría en su ausencia, exagerar la función transcripcional de Smad4. Por otro lado, en el modelo de cooperación, Smad4 y TIF1 γ sinergizan para inducir la expresión génica, es este caso podríamos esperar que ocurrieran mecanismos compensatorios en ausencia de TIF1 γ y que Smad4, pudiera compensar en la inducción de genes blanco. Este segundo mecanismo se ve apoyado por datos no publicados de nuestro grupo en el que sólo en ausencia de ambas moléculas (igual que el doble KO Smad 2/3), es posible observar el fenotipo de autoinmunidad observado en los ratones deficientes del ligando o receptores de TGF- β . Por lo anterior, creemos que será importante dilucidar cuál de estos dos escenarios ocurren en la regulación de la respuesta al TGF- β en células Treg, para entender la participación de TIF1 γ en la misma.

Modelo propuesto con respecto a las observaciones experimentales de la función de TIF1 γ en linfocitos Treg

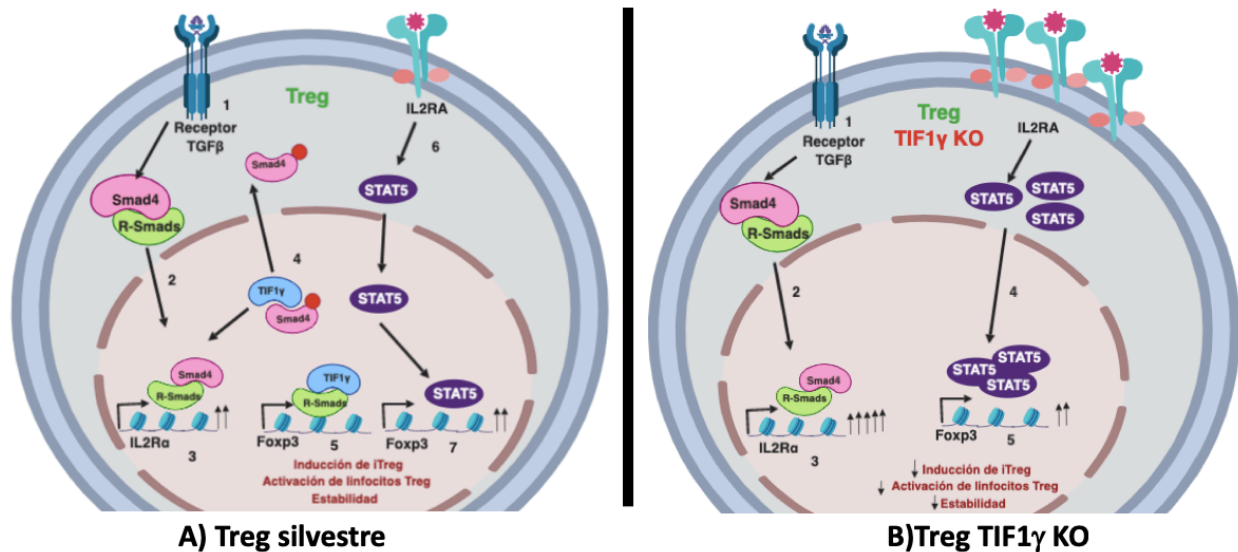


Figura 36. Función de TIF1 γ en linfocitos Treg. A) Treg silvestre 1. La unión de TGF- β con su receptor promueve la fosforilación de las R-Smads y su unión con Smad4. 2. El complejo Smad4/R-Smads se transloca el núcleo. 3. El complejo Smad4/R-Smads se une a distintos sitios de respuesta a Smad, incluyendo a las regiones reguladoras de IL2RA, promoviendo su expresión. 4. TIF1 γ ubiquitina a Smad4 promoviendo su translocación al citosol. 5. Nuestra hipótesis es que TIF1 γ regula positivamente la expresión de Foxp3 en conjunto con las R-Smads 6. La señalización de IL2 por su receptor induce la activación de Stat5. 7. Stat5 se transloca al núcleo y promueve la expresión de Foxp3. TIF1 γ ejerce funciones promoviendo la diferenciación de iTreg, la activación de linfocitos Treg y su estabilidad bajo señales de activación. **B) Treg deficiente de TIF1 γ** 1. La unión de TGF- β con su receptor promueve la fosforilación de las R-Smads y su unión con Smad4. 2. El complejo Smad4/R-Smads se transloca el núcleo. 3. El complejo Smad4/R-Smads promueve la sobre expresión de IL2RA, al no haber translocación al citoplasma de Smad4 mediada por TIF1 γ se promueve la expresión de IL2RA. 4. El aumento del receptor de IL2R promueve un incremento en la señal de IL-2 y un aumento en la señalización de Stat5. 5. Un incremento en la señalización de Stat5 promueve el mantenimiento de la expresión de Foxp3 en ausencia de TIF1 γ . Sin embargo en ausencia de TIF1 γ hay afectación en la inducción de iTreg, activación de linfocitos Treg y su estabilidad bajo señales de activación.

Conclusiones

- La ausencia de TIF1 γ induce un incremento de CD25 en linfocitos Treg Foxp3⁺ CD25⁺.
- En ratones viejos, la ausencia de TIF1 γ repercute negativamente en la frecuencia de células CD4⁺Foxp3⁺ CD25⁻ y en el estado de activación de linfocitos Treg.
- La ausencia de TIF1 γ afecta negativamente la diferenciación de linfocitos iTreg y la estabilidad de células pTreg en condiciones de activación *in vitro*.
- En condiciones de inflamación la ausencia de TIF1 γ parece afectar la capacidad supresora de linfocitos Treg.

Perspectivas

- Determinar el papel de TIF1 γ en la capacidad de proliferación y apoptosis de células Treg.
- Evaluar la posible unión de TIF1 γ a CNS2 dentro del locus de Foxp3.
- Evaluar el perfil de metilación en el locus de Foxp3 de linfocitos Treg en ausencia de TIF1 γ .
- Determinar la capacidad supresora de linfocitos Treg deficientes de TIF1 γ en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Analizar el perfil de expresión génica de linfocitos Treg deficientes de TIF1 γ .
- Evaluar el fenotipo de ratones deficientes de TIF1 γ únicamente en células Treg, utilizando el ratón Foxp3 Cre.

Referencias.

1. Pérez-Vázquez, D., Contreras-Castillo, E. & Licona-Limón, P. Innate Immune memory, the missing piece of the Immunological response. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **21**, 112–123 (2018).
2. Boehm, T. Evolution of vertebrate immunity. *Current Biology* **22**, (2012).
3. Owen, J. Kuby Immunology. *Kuby Immunol.* **6**, 574 (2012).
4. Hosokawa, H. & Rothenberg, E. V. Cytokines, Transcription Factors, and the Initiation of T-Cell Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a028621 (2018).
5. Famili, F., Wiekmeijer, A.-S. & Staal, F. J. The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Futur. Sci. OA* **3**, FSO186 (2017).
6. Takaba, H. & Takayanagi, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* **38**, 805–816 (2017).
7. Kurd, N. & Robey, E. A. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol. Rev.* **271**, 114–126 (2016).
8. van den Broek, T., Borghans, J. A. M. & van Wijk, F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 363–373 (2018).
9. Roncarolo, M. G., Gregori, S., Bacchetta, R., Battaglia, M. & Gagliani, N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity* **49**, 1004–1019 (2018).
10. Ramsdell, F. & Ziegler, S. F. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 343–349 (2014).
11. Hsieh, C. S., Lee, H. M. & Lio, C. W. J. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature Reviews Immunology* **12**, 157–167 (2012).
12. Bin Dhuban, K. & Piccirillo, C. A. The immunological and genetic basis of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **15**, 525–532 (2015).
13. Jagger, A., Shimojima, Y., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review. *Gerontology* **60**, 130–7 (2014).

14. Chávez Sánchez, F. R., Rojas-Lemus, M., Fortoul Van Der Goes, T. I. & Tenorio Zumárraga, E. P. *Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y en la enfermedad*. **60**, (2017).
15. Konkel, J. E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J. R. & Chen, W. Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E465–E473 (2014).
16. Weist, B. M., Kurd, N., Boussier, J., Chan, S. W. & Robey, E. A. Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat. Immunol.* **16**, 635–641 (2015).
17. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. & Singer, A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* **6**, 152–162 (2005).
18. Li, M. O. & Rudensky, A. Y. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nature Reviews Immunology* **16**, 220–233 (2016).
19. 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.* **155**, 1151–64 (1995).
20. Asano, M. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**, 387–396 (1996).
21. Josefowicz, S. Z. & Rudensky, A. Control of Regulatory T Cell Lineage Commitment and Maintenance. *Immunity* **30**, 616–625 (2009).
22. Huang, H., Ma, Y., Dawicki, W., Zhang, X. & Gordon, J. R. Comparison of Induced versus Natural Regulatory T Cells of the Same TCR Specificity for Induction of Tolerance to an Environmental Antigen. *J. Immunol.* **191**, 1136–1143 (2013).
23. Lio, C. W. J. & Hsieh, C. S. A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* **28**, 100–111 (2008).
24. Owen, D. L. *et al.* Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat. Immunol.* **1** (2019). doi:10.1038/s41590-018-0289-6

25. Chen, W. & Konkel, J. E. Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- β matters. *Eur. J. Immunol.* **45**, 958–65 (2015).
26. Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q. & Li, M. O. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* **32**, 642–653 (2010).
27. Povoleri, G. A. M. *et al.* Thymic versus induced regulatory T cells—who regulates the regulators? *Frontiers in Immunology* **4**, (2013).
28. Kalekar, L. A. *et al.* CD4+ T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. *Nat. Immunol.* **17**, 304–314 (2016).
29. Freudenberg, K. *et al.* Critical role of TGF- β and IL-2 receptor signaling in Foxp3 induction by an inhibitor of DNA methylation. *Front. Immunol.* **9**, 1–13 (2018).
30. Luo, C. T., Liao, W., Dadi, S., Toure, A. & Li, M. O. Graded Foxo1 activity in Treg cells differentiates tumour immunity from spontaneous autoimmunity. *Nature* **529**, 532–536 (2016).
31. Smigielski, K. S. *et al.* CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.* **211**, 121–136 (2014).
32. Menning, A. *et al.* Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1575–1583 (2007).
33. Zemmour, D. *et al.* Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR. *Nat. Immunol.* **19**, 291–301 (2018).
34. Cretney, E. *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 304–311 (2011).
35. Overacre, A. E. & Vignali, D. A. Treg stability: to be or not to be. *Curr. Opin. Immunol.* **39**, 39–43 (2016).
36. Zheng, Y. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* **463**, 808–812 (2010).
37. Kitagawa, Y. *et al.* Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* **18**, 173–183 (2016).

38. Lee, W. & Lee, G. R. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp. Mol. Med.* **50**, e456 (2018).
39. Schlenner, S. M., Weigmann, B., Ruan, Q., Chen, Y. & von Boehmer, H. Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *J. Exp. Med.* **209**, 1529–35 (2012).
40. Samstein, R. M., Josefowicz, S. Z., Arvey, A., Treuting, P. M. & Rudensky, A. Y. Extrathymic Generation of Regulatory T Cells in Placental Mammals Mitigates Maternal-Fetal Conflict. *Cell* **150**, 29–38 (2012).
41. Kim, H.-P. & Leonard, W. J. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J. Exp. Med.* **204**, 1543–51 (2007).
42. Feng, Y. *et al.* Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the foxp3 locus. *Cell* **158**, 749–763 (2014).
43. Li, X., Liang, Y., Leblanc, M., Benner, C. & Zheng, Y. Function of a foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell* **158**, 734–748 (2014).
44. Thillainadesan, G. *et al.* TGF- β -Dependent Active Demethylation and Expression of the p15ink4b Tumor Suppressor Are Impaired by the ZNF217/CoREST Complex. *Mol. Cell* **46**, 636–649 (2012).
45. Morgan, D., Ruscetti, F. & Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science (80-.)*. **193**, 1007–1008 (1976).
46. Toomer, K. H. & Malek, T. R. Cytokine Signaling in the Development and Homeostasis of Regulatory T cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a028597 (2018).
47. Huynh, A. *et al.* Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nat. Immunol.* **16**, 188–96 (2015).
48. Yi, Z., Lin, W. W., Stunz, L. L. & Bishop, G. A. The adaptor TRAF3 restrains the lineage determination of thymic regulatory T cells by modulating signaling via the receptor for IL-2. *Nat. Immunol.* **15**, 866–874 (2014).
49. Tai, X. *et al.* Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* **38**, 1116–28 (2013).

50. Xi, Q. *et al.* A Poised Chromatin Platform for TGF- β Access to Master Regulators. *Cell* **147**, 1511–1524 (2011).
51. David, C. J. & Massagué, J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1** (2018). doi:10.1038/s41580-018-0007-0
52. Xu, X. *et al.* Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res.* **6**, 2 (2018).
53. Travis, M. A. & Sheppard, D. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 51–82 (2014).
54. Hata, A. & Chen, Y.-G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a022061 (2016).
55. He, W. *et al.* Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell* **125**, 929–41 (2006).
56. Massagué, J. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–30 (2012).
57. Agricola, E., Randall, R. A., Gaarenstroom, T., Dupont, S. & Hill, C. S. Recruitment of TIF1 γ to Chromatin via Its PHD Finger-Bromodomain Activates Its Ubiquitin Ligase and Transcriptional Repressor Activities. *Mol. Cell* **43**, 85–96 (2011).
58. Yan, K.-P. *et al.* Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene* **334**, 3–13 (2004).
59. Khetchoumian, K. *et al.* Loss of Trim24 (Tif1 α) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat. Genet.* **39**, 1500–1506 (2007).
60. Abrink, M. *et al.* Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 1422–1426 (2001).
61. Ransom, D. G. *et al.* The Zebrafish moonshine Gene Encodes Transcriptional Intermediary Factor 1 γ , an Essential Regulator of Hematopoiesis. *PLoS Biol.* **2**, e237 (2004).
62. Morsut, L. *et al.* Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1 patterns the mammalian embryo. *Development* **137**, 2571–2578 (2010).
63. Hesling, C. *et al.* Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* **12**, 665–672 (2011).

64. Fattet, L. *et al.* TIF1 γ requires sumoylation to exert its repressive activity on TGF β signaling. *J. Cell Sci.* **126**, 3713–23 (2013).
65. Kim, H.-P., Kim, B.-G., Letterio, J. & Leonard, W. J. Smad-dependent cooperative regulation of interleukin 2 receptor alpha chain gene expression by T cell receptor and transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **280**, 34042–7 (2005).
66. Ikeuchi, Y. *et al.* TIF1 γ protein regulates epithelial-mesenchymal transition by operating as a small ubiquitin-like modifier (SUMO) E3 ligase for the transcriptional regulator SnoN1. *J. Biol. Chem.* **289**, 25067–78 (2014).
67. Bai, X. *et al.* TIF1 γ Controls Erythroid Cell Fate by Regulating Transcription Elongation. *Cell* **142**, 133–143 (2010).
68. Bai, X. *et al.* Tif1-gamma plays an essential role in murine hematopoiesis and regulates transcriptional elongation of erythroid genes. *Dev. Biol.* **373**, 422–430 (2013).
69. Kusy, S. *et al.* Adult Hematopoiesis is Regulated by TIF1 γ , a Repressor of TAL1 and PU.1 Transcriptional Activity. *Cell Stem Cell* **8**, 412–425 (2011).
70. Sedgwick, G. G. *et al.* Transcriptional intermediary factor 1 γ binds to the anaphase-promoting complex/cyclosome and promotes mitosis. *Oncogene* **32**, 4622–33 (2013).
71. Xue, J. *et al.* Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear β -catenin degradation. *Nat. Commun.* **6**, 6156 (2015).
72. Xia, X. *et al.* Role of TRIM33 in Wnt signaling during mesendoderm differentiation. *Sci. China Life Sci.* **60**, 1142–1149 (2017).
73. Wang, L. *et al.* Repression of TIF1 γ by SOX2 promotes TGF- β -induced epithelial–mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **35**, 867–877 (2016).
74. Yuki, R. *et al.* Desuppression of TGF- β signaling via nuclear c-Abl-mediated phosphorylation of TIF1 γ /TRIM33 at Tyr-524, -610, and -1048. *Oncogene* (2018). doi:10.1038/s41388-018-0481-z
75. Li, M. O., Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* **26**, 579–591 (2007).
76. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. TGF- β 1 Maintains suppressor

- function and Foxp3 expression in CD4 + CD25 + regulatory T cells. *J. Exp. Med. JEM* **201**, 1061–1067 (2005).
77. Yang, R. *et al.* Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. *Immunity* **43**, 251–263 (2015).
 78. Liu, Y. *et al.* A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 632–640 (2008).
 79. Konkel, J. E. *et al.* Transforming Growth Factor- β Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* **46**, 660–674 (2017).
 80. Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q. & Li, M. O. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* **32**, 642–53 (2010).
 81. Marie, J. C., Liggitt, D. & Rudensky, A. Y. Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity* **25**, 441–454 (2006).
 82. Gu, A.-D., Wang, Y., Lin, L., Zhang, S. S. & Wan, Y. Y. Requirements of transcription factor Smad-dependent and -independent TGF- β signaling to control discrete T-cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 905–910 (2011).
 83. Yoshimura Eiichi Hasegawa, A. *et al.* Th1 Development Regulation of Regulatory T Plasticity and Mediated – β Essential for the TGF- Smad2 and Smad3 Are Redundantly. *J. Immunol.* **185**, 842–855 (2010).
 84. Yang, X. O. *et al.* Molecular Antagonism and Plasticity of Regulatory and Inflammatory T Cell Programs. *Immunity* **29**, 44–56 (2008).
 85. Hahn, J. N., Falck, V. G. & Jirik, F. R. Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4030–42 (2011).
 86. Gu, A.-D. *et al.* A Critical Role for Transcription Factor Smad4 in T Cell Function that Is Independent of Transforming Growth Factor β Receptor Signaling Highlights d Smad4 deletion rescues the lethal autoimmunity in mice lacking TGF- β R signaling A Critical Role

- for Transcription Factor Smad4 in T Cell Function that Is Independent of Transforming Growth Factor b Receptor Signaling. *Immunity* **42**, 68–79 (2015).
87. Tanaka, S. *et al.* Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J. Exp. Med.* **215**, jem.20170779 (2018).
 88. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5126–31 (2005).
 89. Williams, C. B. *et al.* Antigen Primary Immune Response to Foreign Regulatory T Cells Dynamically Control the. (2007). doi:10.4049/jimmunol.178.5.2961
 90. Kim, J. & Kaartinen, V. Generation of Mice With a Conditional Allele for Trim33. *Genesis* **46**, 329–333 (2008).
 91. Josefowicz, S. Z. *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* **482**, 395–9 (2012).
 92. Wu, C. *et al.* The transcription factor musculin promotes the unidirectional development of peripheral Treg cells by suppressing the TH2 transcriptional program. *Nat. Immunol.* **18**, 344–353 (2017).
 93. Andrieux, G., Fattet, L., Le Borgne, M., Rimokh, R. & Théret, N. Dynamic Regulation of Tgf-B Signaling by Tif1γ: A Computational Approach. *PLoS One* **7**, e33761 (2012).
 94. Tanaka, S. *et al.* Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J. Exp. Med.* **215**, 1853–1868 (2018).
 95. Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I. H., Huizinga, T. W. J. & Toes, R. E. M. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 129–138 (2007).
 96. Sakaguchi Tomohisa Nishioka, S., Shimizu, J. & Iida, R. T Cells in Aged Mice + Foxp3 – CD25 + T Cells and CD4 + Foxp3 + CD25 + CD4. *J. Immunol.* **176**, 6586–6593 (2006).
 97. Zhang, B. *et al.* Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1037–1040 (2008).
 98. Horwitz, D. A. Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE. *Arthritis Res. Ther.* **12**, 101 (2010).
 99. Ferreira, R. C. *et al.* Cells with Treg-specific FOXP3 demethylation but low CD25 are

- prevalent in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **84**, 75–86 (2017).
100. Angerami, M. T. *et al.* Expansion of CD25-Negative Forkhead Box P3-Positive T Cells during HIV and Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front. Immunol.* **8**, 528 (2017).
 101. Coleman, M. M. *et al.* The immunoregulatory role of CD4+FoxP3+CD25– regulatory T cells in lungs of mice infected with Bordetella pertussis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **64**, 413–424 (2012).
 102. Botta, D. *et al.* Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection. *Nat. Immunol.* **18**, 1249–1260 (2017).
 103. Ritvo, P.-G. G. *et al.* Tfr cells lack IL-2R α but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells. *Sci. Immunol.* **2**, eaan0368 (2017).
 104. Wing, J. B. *et al.* A distinct subpopulation of CD25– T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E6400–E6409 (2017).
 105. Marshall, H. D. *et al.* The transforming growth factor beta signaling pathway is critical for the formation of CD4 T follicular helper cells and isotype-switched antibody responses in the lung mucosa. *Elife* **4**, (2015).
 106. van der Veecken, J. *et al.* Memory of Inflammation in Regulatory T Cells. *Cell* **166**, 977–990 (2016).
 107. Liu, Z. *et al.* Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature* **528**, 225–230 (2015).
 108. Levine, A. G., Arvey, A., Jin, W. & Rudensky, A. Y. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat. Immunol.* **15**, 1070–1078 (2014).
 109. Martinez, G. J. *et al.* Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 35283–6 (2009).
 110. Doisne, J.-M. *et al.* iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF- β signaling. *J. Exp. Med.* **206**, 1365–1378 (2009).
 111. Chen, Q., Kim, Y. C., Laurence, A., Punkosdy, G. A. & Shevach, E. M. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. *J. Immunol.* **186**, 6329–37 (2011).
 112. Barbi, J., Pardoll, D. & Pan, F. Treg functional stability and its responsiveness to the

- microenvironment. *Immunol. Rev.* **259**, 115–39 (2014).
113. Li, C., Ebert, P. J. R. & Li, Q.-J. T Cell Receptor (TCR) and Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling Converge on DNA (Cytosine-5)-methyltransferase to Control *forkhead box protein 3* (*foxp3*) Locus Methylation and Inducible Regulatory T Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* **288**, 19127–19139 (2013).
114. Hesling, C. *et al.* Tif1 γ is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through SMAD4 inhibition. *Development* **140**, 167–75 (2013).

Anexo 1

Estrategia de análisis

Figura 37. Análisis de tamaño (FSC-A) contra viabilidad (Zombie Aqua).

El primer cuadrante de análisis representa en el eje de las Y el tamaño (FSC-A) y en el eje de las X la tinción con el colorante Zombie Aqua. Se seleccionan las células negativas para el colorante y con un tamaño por arriba de los 100K. Con este cuadrante se asegura que se seleccionen solamente las células vivas y que tengan un tamaño fisiológico y no sea debri celular.

Figura 38. Selección de singuletes y exclusión de dobletes SSC-H contra SSC-A.

El segundo cuadrante de análisis representa la estrategia para seleccionar singuletes y excluir dobletes. Durante el proceso de adquisición de la muestra, las células deben pasar una por una por el capilar para ser analizadas. Sin embargo, esto no siempre ocurre puesto que pueden pasar mas de dos células al mismo tiempo dando como resultado falsos positivos. Con esta estrategia de inclusión se seleccionan solamente células que fueron detectas una por una. En el eje de las Y se encuentra la granularidad SSC-H (Altura) y en el eje de las X granularidad SSC-A (Area).

Figura 39. Doble selección de singuletes y exlcusión de dobletes FSC-A contra FSC-H.

El tercer cuadrante de análisis representa la segunda excusión de dobletes con los parámetros tamaño FSC-A (Area) en el eje Y y tamaño FSC-H (Altura) en el eje X.

Figura 40. Selección de células por tamaño y granularidad FSC-A contra SSC-A.

En el cuarto cuadrante se seleccionan las células por tamaño (FSC-A) y por granularidad (SSC-A). Se seleccionan las células que engloben todas las células en el cuadrante. Se excluyen las células que se encuentren pegadas en el extremo inferior izquierdo.

Figura 41. Selección de células CD4+ (Linfocitos T cooperadores).

A partir del cuarto cuadrante se seleccionan aquellas células que son positivas para el marcador CD4+. Granularidad (SSC-A) y fluorocromo positivo para CD4+

A partir de este cuadrante se seleccionaron a las células Treg en unos casos como CD4⁺Foxp3⁺ (Figura 42) o CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ (Figura 43).

Figura 42. Selección de células CD4⁺Foxp3⁺.

A partir del quinto cuadrante SSC-A vs CD4⁺, se seleccionan a las células positivas para EGFP (Foxp3⁺) Consideramos a las células reguladoras a las células dobles positivas.

Figura 43. Distinción de células a partir la expresión de Foxp3+ y CD25+. A partir del quinto cuadrante SSC-A vs CD4+, se seleccionan a las células positivas para EGFP (Foxp3+) y para CD25+.

Figura 44. Detección de estado de activación de células Treg con base a la expresión de CD62L y CD44. A partir del cuadrante CD4+ Foxp3+ en el eje de las Y se identificaban las células positivas para CD44 y en el eje de las X a las células CD26L. Se identificaron dos poblaciones con base a la expresión de CD62L y CD44. Treg activadas CD44⁺ CD62L⁻ y Treg en reposo CD62L⁺ CD44^{low}

