



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE LAS INHIBINAS Y EL β -GLICANO EN LA ACTIVACIÓN Y
DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. SANDRA AMYRIS ORTEGA FRANCISCO

**DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
TUTOR PRINCIPAL**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
IMSS-SIGLO XXI**

**DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

Ciudad de México. Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la doctora María Gloria Soldevila Melgarejo por todo su apoyo, tanto académico como personal y por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Agradezco infinitamente el apoyo técnico al biólogo Jesús Ramsés Chávez Ríos, así como al M. en C. Oscar Hernández, al M. en C. Carlos Castellanos y a la QFB Gisela DuPont.

Agradezco también al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo y a todo el personal que labora en él. Un agradecimiento especial a la doctora Laura Bonifaz y al doctor Gustavo Pedraza por su orientación y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Agradezco también al Conacyt y al apoyo PAPIIT IN209615 para la realización de este proyecto; así como al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) por el apoyo recibido para la asistencia a congresos internacionales.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	13
2.1. Respuesta Inmunológica.....	13
2.2. Linfocitos T.....	16
2.2.1. Desarrollo tímico.....	16
2.2.2. Activación.....	20
2.2.3. Diferenciación de los linfocitos T cooperadores.....	24
2.3. La superfamilia del TGF- β	30
2.3.1. Inhibinas y Activinas.....	35
2.3.2. El β -Glicano o receptor tipo III del TGF- β (T β RIII)	40
3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	40
3.1. Inhibinas y β -Glicano como par molecular.....	46
3.2. Inhibinas y β -Glicano en la biología de los linfocitos T.....	48
4. JUSTIFICACIÓN.....	55
5. HIPÓTESIS.....	55
6. OBJETIVOS.....	56

7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	57
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
8.1. Ratones	59
8.2. Ensayos de activación.....	61
8.3. Ensayos de diferenciación Th1/Th17 <i>in vitro</i>	62
8.4. Evaluación de T β RIII en poblaciones de linfocitos periféricos.....	63
8.5. Ensayos de inducción de células T reguladoras y bloqueo del T β RIII.....	64
8.6. Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana.....	64
8.7. Evaluación de linfocitos T de sangre periférica humana.....	65
8.8. Ensayos de activación y de inducción de células T reguladoras de células humanas.....	65
8.9. Citometría de Flujo.....	65
8.10. Análisis estadístico.....	68
9. RESULTADOS.....	69
9.1. Papel del T β RIII en la activación y diferenciación funcional de linfocitos T.....	69
9.1.1. El T β RIII se expresa diferencialmente en linfocitos T periféricos.....	69

9.1.2. La expresión del TβRIII es inducida por activación de los linfocitos T.....	77
9.1.3. Los linfocitos T reguladores disminuyen la expresión del TβRIII en asociación con el aumento en la expresión de FOXP3.....	79
9.1.4. El TβRIII es necesario para la inducción de células T reguladoras FOXP3+.....	81
9.1.5. La expresión del TβRIII es menor en células T reguladoras humanas FOXP3+	83
9.1.6. La expresión del TβRIII incrementa a través de la señalización por el TCR, pero no durante la inducción de Tregs en células humanas.....	86
9.2. Papel de las Inhibinas en la activación y diferenciación funcional de linfocitos T.....	88
9.2.1. Los linfocitos T Inhα ^{-/-} expresan menos TβRIII después de la activación.....	88
9.2.2. Las células T naïve de los ratones Inhα ^{-/-} tienen un defecto en la activación.....	91
9.2.3. La ausencia de inhibinas tiene un efecto negativo en la diferenciación de los linfocitos Th1 y favorece la diferenciación Th17.	94
10. DISCUSIÓN.....	99

11. CONCLUSIONES.....	110
12. PERSPECTIVAS.....	111
13. REFERENCIAS.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Desarrollo y maduración de los linfocitos T en timo.....	18
Figura 2. Células T reguladoras tímicas.....	20
Figura 3. Señalización mediada por el TCR.....	22
Figura 4. Subtipos de los linfocitos TCD4⁺.....	25
Figura 5. Polarización de los subtipos de linfocitos T.....	26
Figura 6. Plasticidad de los linfocitos TCD4⁺.....	27
Tabla 1. Características principales de los subtipos efectores y reguladores de linfocitos T.....	29
Tabla 2. Receptores y ligandos de la superfamilia del TGF-β.....	31
Figura 7. Vía de señalización canónica de la superfamilia del TGF-β.....	33

Figura 8. Señalización no canónica del TGF-β.....	34
Figura 9. Modelo de la síntesis y secreción de la Inhibina	37
Figura 10. Antagonismo de las Activinas mediado por las Inhibinas y su unión con el TβRII (TGFβR3).....	39
Figura 11. Estructura del TβRIII.....	43
Figura 12. Función dual del TβRII en la señalización mediada por TGF-β.....	45
Figura 13. Activinas e Inhibinas en el desarrollo de los linfocitos T.	49
Figura 14. Activinas en la biología de los linfocitos T.....	51
Figura 15. El TβRIII en el desarrollo de los linfocitos T.....	54
Figura 16. Diseño experimental.....	57
Figura 17 Tipaje del modelo biológico $Inha^{-/-}$.....	61
Tabla 3. Condiciones utilizadas de diferenciación de células T efectoras.....	63
Figura 18. Evaluación de la expresión del TβRIII en linfocitos murinos	70
Figura 19. Evaluación de la expresión del TβRIII en subtipos de linfocitos T CD4⁺ murinos.....	72
Figura 20. Evaluación de la expresión del TβRIII en linfocitos T reguladores periféricos.....	74

Figura 21. Expresión del TβRIII en linfocitos T reguladores tímicos.....	76
Figura 22. Expresión del TβRIII en linfocitos T CD4⁺ activados	78
Figura 23. Expresión del TβRIII durante la inducción de células T reguladoras	80
Figura 24. El TβRIII es necesario para la inducción de células T reguladoras.....	82
Figura 25. Expresión del β-Glicano (TβRIII) en células humanas de sangre periférica.....	84
Figura 26. Expresión del TβRIII en células T reguladoras humanas de sangre periférica.....	85
Figura 27. Expresión del TβRIII, CD25, y FOXP3 durante la activación de células TCD4⁺ y la inducción de Tregs.....	87
Figura 28. Expresión de TβRIII en linfocitos T Inhα^{-/-} en homeostasis.....	89
Figura 29. Expresión del TβRIII durante activación de los linfocitos T.....	90
Figura 30. Cinética de activación de los linfocitos TCD4⁺ Inhα^{+/+} e Inh Inhα^{-/-}	92

Figura 31. Diferenciación Th1 de linfocitos T deficientes de Inhibinas.....96

Figura 32. Diferenciación Th17 de linfocitos T deficientes de Inhibinas.....98

Figura 33. Resumen de resultados.....109

ABREVIATURAS

Abs: Antibodies.

ACK: Ammonium-Chloride-Potassium.

ACTRIIA: Activin Type II Receptor.

ADAP: Adhesion and Degranulation-Promoting Adaptor Protein.

ALK: Activin receptor-like kinase.

AP-1: Activator Protein 1.

APC: Antigen Presenting Cells.

BCR: B Cell Receptor.

BMP: Bone Morphogenetic Proteins.

BMPR2: Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II.

Cdc42: Cell division control protein 42 homolog.

CMJ: Corticomedular Join.

CREB: cAMP response element-binding.

CRIP1: Cysteine-rich PDZ-Binding Protein.

cTECs: Cortical Thymic Epithelial Cells.

CTL: Cytotoxic T cell.

DAMPs: Damage-associated molecular pattern.

DCs: Dendritic Cells.

DN: Double Negatives.

DP: Double Positive.

ETP: Early Lymphoid Progenitors.

FMO: Fluorescence Minus One.

Foxo1: Forkhead box protein O1

FOXP3: Forkhead box P3

FSH: Follicle-Stimulating Hormone.

GAG: Glycosaminoglycans.

GDFs: Growth Differentiation Factor.

GIPC: GAIP-interacting protein C-terminus.

GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2.

HT: Heterozygous.

IFN- γ : Interferon Gamma.

ILC: Innate Lymphocyte Cells.

Inh α : Inhibin α .

IRF4: Interferon Regulatory Factor 4.

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif.

kDa: Kilodaltons.

Klf2: Krüppel-like factor 2

KO: Knock Out.

LAT: Linker for activation of T cells.

LCK: Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase.

LH: Luteinizing Hormone.

MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue.

MFI: Mean Fluorescence Intensity.

MHC: Molecule Histocompatibility Complex.

miRNAs: micro RNAs.

MPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MT: Metalloproteinases.

mTECs: Medular Thymic Epithelial Cells.

MyoD: Myoblast Determination Protein 1.

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells.

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B.

NKs: Natural Killer.

OVA: Ovalbumin.

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns.

PKA: Protein Kinase A.

PLC γ 1: Phospholipase C γ 1.

PRRs: Pattern-Recognition Receptors.

PZ: Pellucida Zone.

RNA_m: RNA mensajero.

Ror- γ t: RAR-related orphan receptor gamma.

S1P1: Sphingosine-1-phosphate receptor 1.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SIP1: Esfingosina 1 Fosfato.

SP: Simple Positives.

TCR: T cell receptor.

TGF- β : Transforming growth factor β

Th: T helper.

Thf: T Follicular Helper Cells.

TIF1 γ : Transcription intermediary factor 1- gamma.

Tr1: Type 1 regulatory T cell.

TRAF: Receptor-Associated Factor 1.

Tregs: T regulatory cells.

tTregs: Tymic T regulatory cells.

T β RIII: Type III TGF- β coreceptor

ZAP70: Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70.

1. RESUMEN

La superfamilia del TGF- β está conformada por los TGF- β s, BMPs y Activinas/Inhibinas. Recientemente, se ha evidenciado que todos ellos están involucrados en la respuesta inmune, y de manera específica, las Inhibinas y su ligando molecular, el β -Glicano (T β RIII), regulan el desarrollo de los linfocitos T durante su maduración en el timo. Sin embargo, se desconoce la participación de éstos durante la activación de los linfocitos T, así como su diferenciación a diferentes subtipos. Mediante la evaluación de la expresión del T β RIII en las poblaciones de los linfocitos T en homeostasis y bajo condiciones de activación e inducción hacia células T reguladoras *in vitro*, concluimos que el T β RIII se expresa diferencialmente en las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y que este correceptor se induce a través de la señalización mediada por el TCR y se regula a la baja por la inducción de FOXP3.

Nuestro estudio en el papel de las Inhibinas llevó un camino distinto, ya que trabajos recientes en el laboratorio demostraron que los linfocitos T secretan Inhibina cuando son activados a través de entrecruzamiento del TCR. Además, en un modelo biológico deficiente para la subunidad α (Inh $\alpha^{-/-}$) se observó que la falta de inhibinas promueve la diferenciación hacia Tregs FOXP3⁺. Mediante el uso de ratones Inh $\alpha^{-/-}$ observamos que las células deficientes de inhibinas presentan una menor activación. Posteriormente, evaluamos el papel de las inhibinas en la diferenciación de linajes efectores y se concluyó que las células T Inh $\alpha^{-/-}$ tienen un defecto en la diferenciación hacia el linaje Th1, y un incremento en la diferenciación a Th17, en comparación con las células Inh $\alpha^{+/+}$.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La respuesta inmunológica

La inmunidad es un término que proviene del antiguo vocablo latín “*immunitas*” que hacía referencia a los senadores que gozaban de protección contra procesos legales. En el contexto biológico, la inmunidad hace referencia a la protección contra la enfermedad y la Inmunología se define como la disciplina que estudia las respuestas inmunes: los acontecimientos celulares y moleculares que se producen después de que un organismo se encuentra con microorganismos u otras moléculas dañinas. El sistema inmune puede dar lugar a dos líneas fundamentales de respuesta: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa [1].

La **respuesta inmune innata** constituye la primera línea de defensa y se caracteriza por ser independiente del antígeno (no específica), por ser una respuesta temprana inmediata y por no poseer memoria. Sin embargo, recientemente se ha reportado la capacidad que tienen algunas células, catalogadas dentro de la respuesta inmune innata, de desencadenar una respuesta más rápida y eficaz hacia un antígeno con el que ya tuvo una previa interacción. Este fenómeno ha sido denominado “trained immunity”, y es el resultado de modificaciones epigenéticas [2]. Otra característica importante de la respuesta inmune innata es que los receptores implicados se encuentran codificados en la línea germinal, por lo cual, el rango de receptores es limitado y se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) [3]. Los componentes de la respuesta

inmune innata incluyen: barreras anatómicas, como la piel; barreras químicas, como el pH de las secreciones; factores solubles, como citocinas y quimiocinas; y componentes celulares, que se comparten entre todos los vertebrados mandibulados [4].

A pesar de que la mayoría de las células en el organismo contribuyen a la respuesta inmune innata, como las células epiteliales y fibroblastos, capaces de secretar moléculas inmunomoduladoras, sólo algunos tipos celulares están catalogados como componentes de la inmunidad innata: principalmente células del linaje mieloide como los monocitos-macrófagos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos; y células de linaje linfoide como, las recientemente descritas, células linfoides innatas (ILCs, por sus siglas en inglés) [5].

La **respuesta inmune adaptativa** es más tardía (días), es dependiente del antígeno y los receptores de reconocimiento requieren del rearreglo de sus genes, lo cual determina un amplio repertorio de receptores de alrededor de 10^{16} . Además, se caracteriza por generar memoria, lo que garantiza una respuesta más rápida y eficaz en subsecuentes encuentros con el antígeno. Este tipo de respuesta requiere del reconocimiento de los receptores específicos, los cuales pueden encontrarse expresados en las células de manera clonal: el receptor de los linfocitos B (BCR, por sus siglas en inglés) y el receptor de los linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés); o solubles, llamados anticuerpos (antibodies, Abs por sus siglas en inglés). Por lo que, se consideran como células inmunes adaptativas a los linfocitos B y los linfocitos T; ambos tipos celulares se desarrollan y maduran en los órganos linfoides primarios. Los **linfocitos B** llevan a cabo su proceso de desarrollo y maduración en

la médula ósea, donde su interacción con las células del estroma les permite recibir las señales de maduración necesarias, rearreglar los genes de su receptor antígeno-específico (BCR), además de seleccionar negativamente las clonas autorreactivas para inducir su apoptosis; las células B maduras salen a la circulación y se activan en los órganos linfoides secundarios, tras el reconocimiento de su antígeno específico, y pueden diferenciarse en linfocitos B de memoria o células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los linfocitos B, a través del BCR, reconocen a los antígenos directamente y en su forma nativa, a diferencia de los linfocitos T que requieren de la presentación del antígeno en el contexto de moléculas del MHC (complejo principal de histocompatibilidad), proceso que llevan a cabo las células presentadoras de antígeno [6]. Los **linfocitos T** se desarrollan y maduran en el timo, a partir de un progenitor linfoide proveniente de médula ósea, donde su interacción con las células epiteliales, principalmente, les provee las señales necesarias para que a partir de aquellos timocitos que han rearreglado su TCR puedan seleccionarse positivamente aquellas clonas con avidéz baja/intermedia y diferenciarse en linfocitos TCD4⁺ o cooperadores (Th, helper por sus siglas en inglés) y TCD8⁺ o citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés). Los linfocitos T maduros salen a la periferia como células T “naïve” o vírgenes, y se activan al reconocer a su antígeno; estos antígenos pueden ser derivados de patógenos o sus productos, de moléculas de respuesta a daño, o incluso de moléculas propias; en el contexto de moléculas de MHC de clase I para los linfocitos T CD8⁺ y de clase II para los linfocitos T CD4⁺. Estos últimos son capaces de diferenciarse a linajes efectores y reguladores dependiendo de las señales que reciba de las células presentadoras de antígeno, del microambiente en el que se

encuentren e incluso de la fuerza de la señal que reciban a través del TCR. Una vez que se ha resuelto el daño, se mantiene en el organismo un “pool” de linfocitos T de memoria, que son capaces de responder más rápido y con mayor eficacia en subsecuentes contactos con el antígeno. Se han reconocido a los linfocitos T como las principales células efectoras durante la respuesta inmune, por lo que estudiar su desarrollo, activación y diferenciación ha tomado gran importancia en diferentes contextos, tanto patológicos como fisiológicos [7].

2.2. Linfocitos T

2.2.1. Desarrollo tímico

El desarrollo y maduración de los linfocitos T se lleva a cabo en el timo. Este órgano linfoide primario se caracteriza por ser bilobulado y contener dos zonas anatómicas bien definidas: la corteza y la médula; además se compone de dos tipos de tejidos principales, el tejido epitelial y el tejido linfoide. En la zona de la corteza abundan las células epiteliales tímicas de la corteza (cTECs, por sus siglas en inglés), además de fibroblastos y macrófagos. En la médula se presenta una red de células dendríticas (DCs) y de células epiteliales tímicas medulares (mTECs, por sus siglas en inglés). La unión corticomedular (CMJ por sus siglas en inglés) contiene una red densa de células endoteliales que facilita la entrada y salida de los timocitos a la circulación sanguínea [8, 9]. El proceso de desarrollo de los linfocitos (**Figura 1**) comienza cuando los progenitores tempranos linfoides (ETP, Early Thymic Progenitor, por sus siglas en inglés) de médula ósea entran al timo a través de las vénulas cercanas a la región de unión córtico-medular (CMJ, cortico-medullary

junction). El primer estadio de diferenciación de los timocitos comienza en la corteza y se denomina dobles negativo (DN), ya que no expresan ninguno de los correceptores CD4 o CD8; este estadio a su vez se divide en sub-estadios DN1-DN4, en base a la expresión diferencial de CD25 y CD44 (DN1: CD44- CD25-; DN2: CD44+ CD25-; DN3: CD44+ CD25+; DN4: CD44- CD25+) [10]. Durante el estadio DN3 se lleva a cabo el rearreglo de la cadena β del TCR, la cual se ensambla con una cadena invariante pre-T α y con el complejo CD3 conformando el pre-TCR, que provee señales de supervivencia al timocito e induce el inicio del rearreglo de la cadena α (selección β) [11]. El siguiente estadio de diferenciación se denomina doble positivo (DP), ya que los timocitos se caracterizan por expresar tanto CD4 como CD8, y es el primer estadio donde se expresa un receptor maduro $\alpha\beta$ que permite que se seleccionen aquellos timocitos capaces de reconocer complejos propios péptidos-MHC con afinidad y avidéz intermedia. A este proceso se le denomina selección positiva, mientras que la ausencia de reconocimiento o un reconocimiento débil induce la apoptosis de los timocitos (muerte por negligencia) [9]. Posteriormente, los DP dan lugar a timocitos CD4⁺ o CD8⁺, por lo que esta etapa de maduración se le conoce como simples positivos (SP). La elección del linaje CD4⁺ o CD8⁺ está ligada al establecimiento de programas genéticos linaje-específicos, así como a la regulación epigénética. Así, se han reportado factores transcripcionales clave que median el desarrollo de células CD4 y células CD8 (por ejemplo, ThPOK y Runx3, respectivamente). La especificidad y señalización mediada por los TCRs en los precursores está muy relacionada con el proceso de determinación de linaje [12].

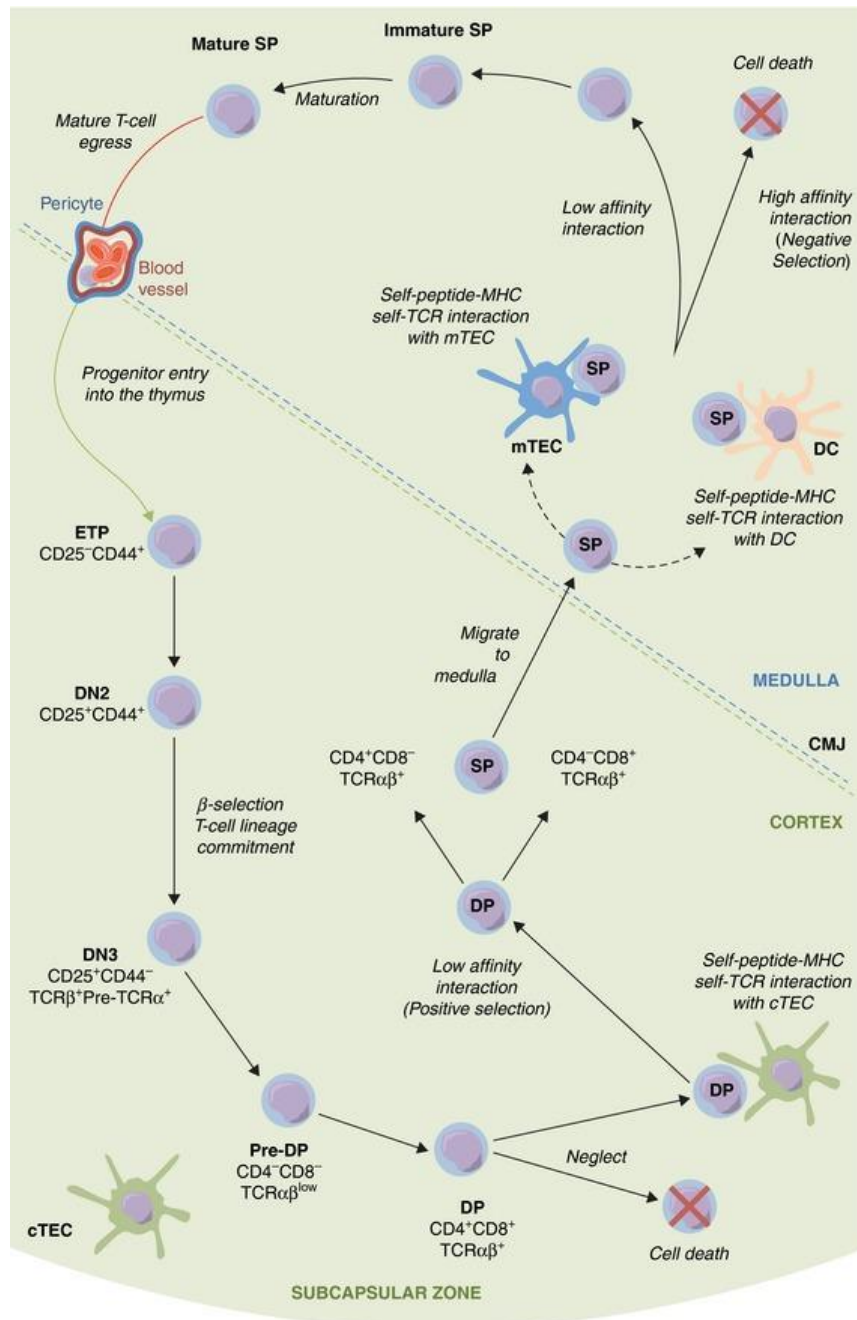


Figura 1. Desarrollo y maduración de los linfocitos T en timo. Los progenitores linfoides (ETPs) entran a través de la vena aferente y comienzan su primer estadio de maduración DN en la corteza donde ocurre el rearreglo de las cadenas β (selección β) y α del TCR. Posteriormente, en el estadio DP los timocitos se seleccionan positivamente a través de interacciones con las cTECs. Esto genera timocitos SP CD4⁺ o CD8⁺ que en la médula son seleccionados negativamente. Finalmente, los timocitos terminalmente maduros salen del timo a través de la vasculatura en la unión corticomedular (CMJ). Tomado de K.D. Jamenes et al. [13].

En la etapa final de maduración, los simples positivos migran a la médula, donde son eliminados por apoptosis los timocitos que expresen receptores con alta afinidad a péptidos propios, este proceso de tolerancia central, se denomina selección negativa o delección clonal. Durante este estadio de maduración, ocurre la generación de un subtipo celular de linfocitos TCD4⁺ con función supresora, llamados linfocitos T reguladores (Tregs), los cuales se caracterizan por expresar el factor de transcripción maestro FOXP3 y niveles altos de expresión de la cadena α del receptor para IL-2 (CD25) [14]. Este subtipo celular se requiere para mantener la tolerancia del organismo hacia sus propias células, tejidos y moléculas, previniendo respuestas autoreactivas que desencadenen enfermedades autoinmunes. Se ha identificado que la diferenciación de las células T reguladoras derivadas de timo (tTregs) depende de interacciones de alta avidéz del TCR con los complejos MHCII-péptidos propios, además de señalización a través del receptor para IL-2 (**Figura 2**) [15]. La salida de las células simples positivas maduras depende de señales mediadas por un gradiente de concentración de S1P1 (esfingosina 1 fosfato) a través del receptor S1P1R en los timocitos, también los timocitos SP maduros incrementan la expresión de reguladores como Foxo1 y Klf2, que en consecuencia, regulan el incremento de los niveles de expresión de CD62L, así como de S1PR1 y al mismo tiempo, disminuyen la expresión de CD69, por lo que los timocitos terminalmente maduros se caracterizan por el fenotipo S1P1R⁺, CD62L⁺, CD69⁻ [13].

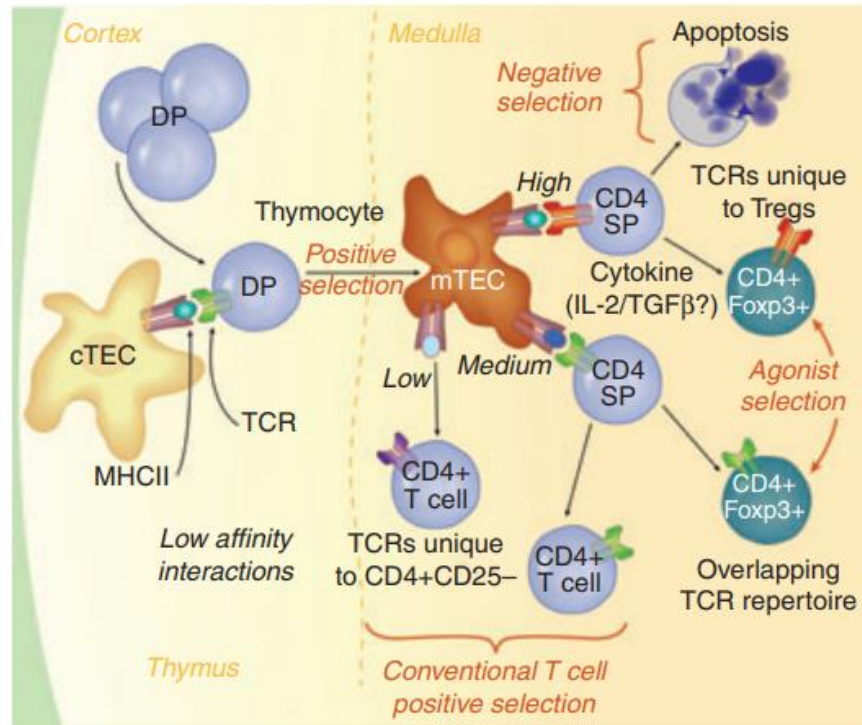


Figura 2. Células T reguladoras tímicas. Durante el desarrollo tímico, la diferenciación de células reguladoras integra señalización a través de citocinas, así como fuerza de la señal a través del TCR. Tomado de Moran et al. [15]

2.2.2. Activación

Después de su desarrollo y maduración en el timo, los linfocitos T salen a la circulación como linfocitos T naïve CD4⁺ o CD8⁺, o como células T reguladoras generadas en timo (tTregs). Los linfocitos T requieren reconocer su antígeno específico a través del TCR para activarse, proliferar y diferenciarse a subtipos efectores, reguladores o células de memoria. El reconocimiento del antígeno se lleva a cabo a través de moléculas del MHC que proveen las células presentadoras de antígeno, y se lleva a cabo principalmente en los órganos linfoides secundarios: ganglios, bazo o tejido linfoide asociado a mucosas (MALT por sus siglas en inglés).

La unión del TCR a su péptido agonista, cargado en el MHC, induce la formación de la sinapsis inmunológica entre el linfocito T y la APC, que involucra la unión de los correceptores CD8 y CD4 a MHC I y MHC II, respectivamente, así como el reconocimiento de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) a través del receptor CD28.

La señalización intracelular que se desencadena en el linfocito T está mediada por el complejo del TCR, conformado por las cadenas α y β , unido no covalentemente al complejo CD3 que está conformado por las cadenas γ , δ , dos cadenas ϵ y dos cadenas ζ . Las subunidades CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ contienen, cada una, un motivo ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), mientras que las subunidades CD3 ζ contienen 3 motivos ITAM en tándem, sumando un total de 10 ITAMs por TCR (**Figura 3**) [16]. Existe gran evidencia de que la vía de señalización mediada por el TCR no es lineal, iniciando con el receptor y terminando en el núcleo, sino que es compleja y requiere de regulación y retroalimentación en cada paso [17]. La transducción de la señal comienza con la fosforilación de los sitios ITAM de CD3, mediante la cinasa LCK, miembro de la familia de cinasas Src, esta fosforilación promueve el reclutamiento de la proteína ZAP70 (una cinasa de tirosinas). ZAP70 fosforila a la proteína LAT, una proteína de andamiaje que, al ser fosforilada, genera sitios de acoplamiento para el reclutamiento y activación de otras moléculas como GRB2, PLC γ 1, ADAP, entre otras, generando el complejo de señalización de LAT. La activación de las moléculas asociadas a LAT, desencadena varias vías de señalización como la vía de Ca⁺-Calcineurina, la vía de las MAP cinasas (MAPK), y la vía de señalización de NF- κ B, principalmente. Entre los

factores de transcripción que se activan y regulan la transcripción de distintos genes, se encuentran NFAT, AP-1 y NF- κ B [18]. Estas vías de señalización, junto con las vías que se activan por la coestimulación y las citocinas presentes en el microambiente, conllevan múltiples respuestas de los linfocitos T como la proliferación, la migración y la producción de citocinas.

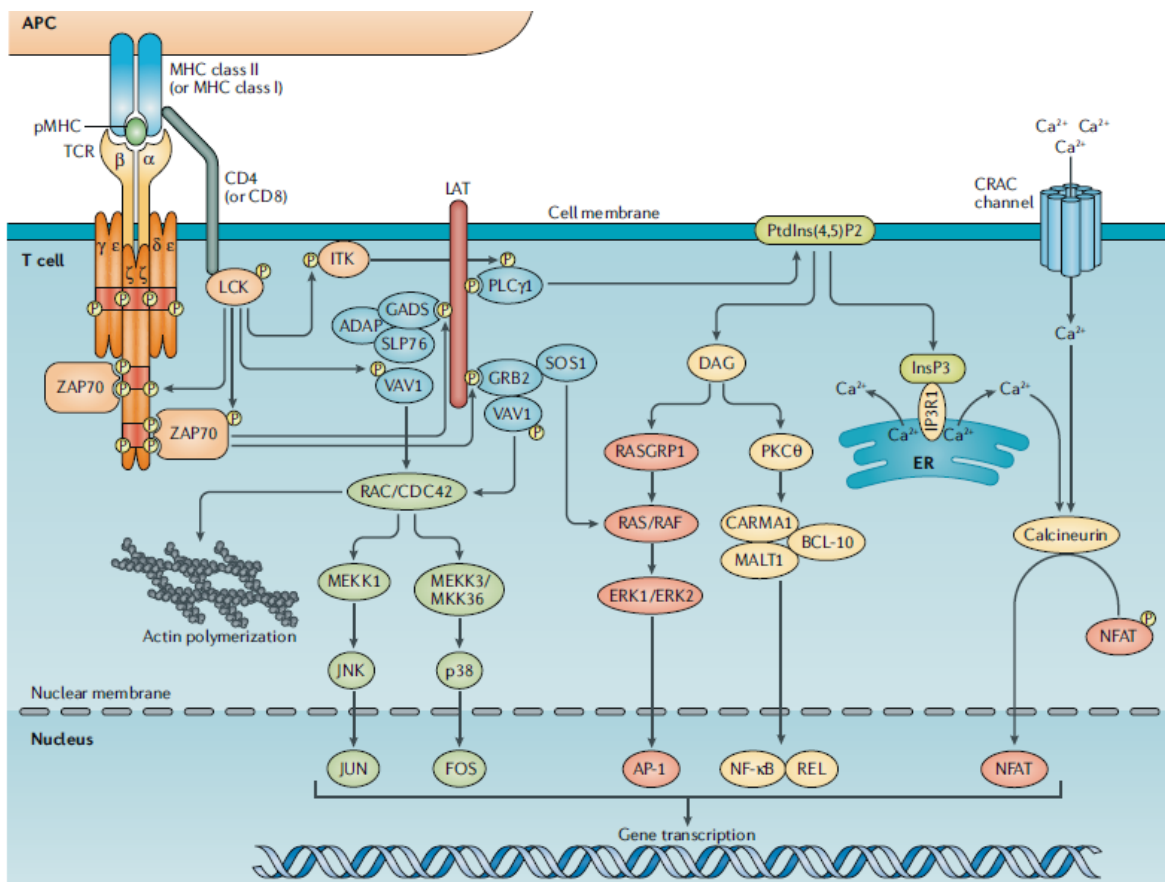


Figura 3. Señalización mediada por el TCR. Los linfocitos T se activan a reconocer el complejo antígeno-MHC durante la sinapsis inmunológica, que involucra también el reconocimiento de los correceptores CD4 o CD8. La transducción de la señal comienza cuando los sitios ITAM del complejo CD3 son fosforilados por la cinasa LCK. Esta fosforilación promueve la activación y el reclutamiento de la cinasa ZAP70, que a su vez fosforila la proteína de andamiaje LAT. La fosforilación de LAT promueve el reclutamiento de diversos mediadores que propagan la señal a 3 vías de señalización principales: la vía de calcio, la vía de las MAP quinasas y la vía de NF- κ B. Los principales factores de transcripción que regulan la respuesta en la activación de los linfocitos T son: NF- κ B, AP-1 y NFAT. Tomado de G. Gaud et al [18]

Las consecuencias funcionales de la señalización desencadenada, resulta en la expresión diferencial de patrones génicos dependiendo del contexto en el que se prende la vía de señalización mediada por el TCR. Por ejemplo, las isoformas de NFAT pueden formar complejos con otros factores de transcripción; la interacción más destacada es con AP1, que integra las señales de Ca^{2+} y de Ras, lo cual regula la expresión de genes importantes como el gen de IL-2, citocina autocrina importante para la supervivencia y proliferación de los linfocitos T [19]. Se sabe que la activación de NFAT en ausencia de AP1 induce la expresión de genes que conducen a la anergia de las células, que se caracteriza por la falta de producción de IL-2 [20]. También, las señales a través del TCR inician el rearrreglo del citoesqueleto, que es esencial para el funcionamiento de los linfocitos T, tanto para la polarización de la célula, como para la migración. Otra consecuencia importante de la activación de los linfocitos T, es la diferenciación hacia linaje efectores: los linfocitos T CD8^+ se diferencian a células citotóxicas (CTL); mientras que los linfocitos T CD4^+ se diferencian hacia varios subtipos efectores o reguladores. Se sabe que hay tres principales determinantes de los cuales depende la diferenciación: la fuerza de la señal a través del TCR, las señales costimuladoras o co-inhibidoras, y el contexto de citocinas presentes en el microambiente [21].

2.2.3. Diferenciación de los linfocitos T cooperadores

Debido a su interacción con las células presentadoras de antígeno, los linfocitos naïve T CD4⁺ pueden diferenciarse en diferentes subtipos, que originalmente se describieron por su capacidad de secretar citocinas específicas [22] . Sin embargo, actualmente se sabe que los linfocitos T CD4⁺ pueden adquirir un fenotipo funcional mucho más complejo, varios aspectos aún no están claros en la llamada teoría de la plasticidad de linfocitos T.

Se ha reportado que los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en varios subtipos efectores: las T helper 1 (Th1), Th2, Th9, Th17 y Th foliculares (Thf); y diferentes subtipos reguladores T reguladoras (Tregs) FOXP3+, y T reguladoras tipo 1 (Tr1) **(Figura 4)**.

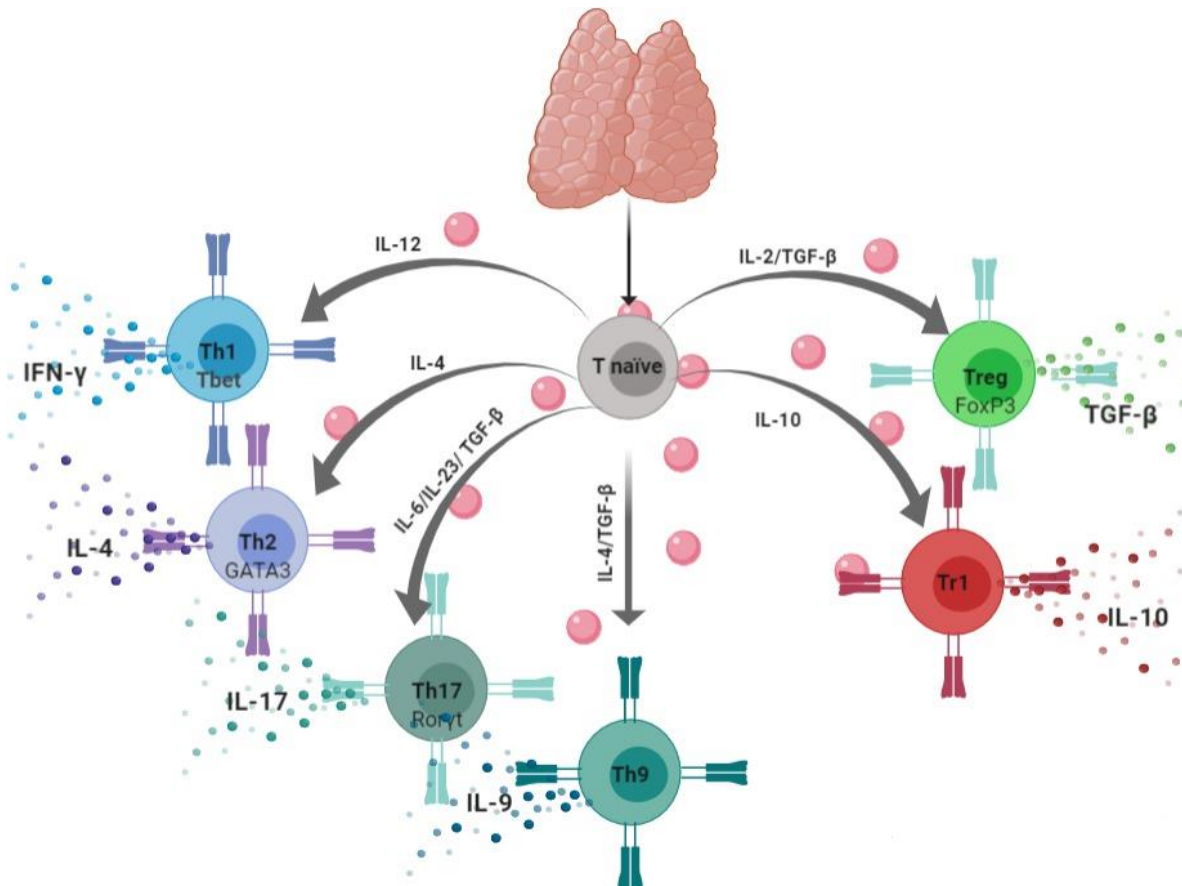


Figura 4. Subtipos de linfocitos TCD4+. Los linfocitos T CD4⁺ se diferencian en periferia a diferentes subtipos efectoros o reguladores. Los diferentes subtipos se clasifican por el tipo de citocinas que secretan y los factores de transcripción que expresan.

La clasificación de las células Th se basa en la producción de citocinas específicas y la expresión de factores de transcripción maestros [8] (**Figura 5**).

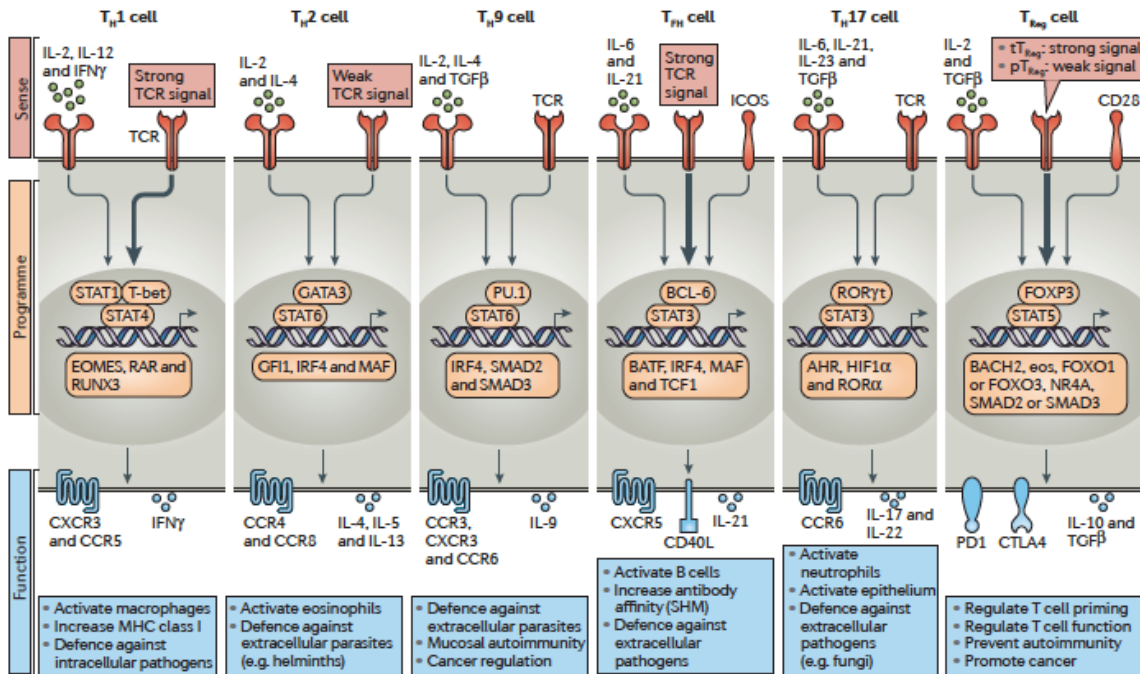


Figura 5. Polarización de los subtipos de linfocitos T. La clasificación de los subtipos de linfocitos T se basa en los factores de transcripción maestros que expresen y el tipo de citocinas que expresen. Para cada subtipo celular se han descrito funciones diversas. Tomado de Du Page and Bluestone [23]

Los linfocitos Th1 se caracterizan por secretar IFN- γ y expresar el factor de transcripción T-bet; los linfocitos Th2 secretan IL-4 principalmente y expresan el factor GATA-3; las células Th17 producen IL-17 y expresan Ror- γ t, los linfocitos Th9 secretan preferencialmente IL-9. En cuanto a los linfocitos T reguladores, se caracterizan por expresar el factor de transcripción FOXP3, mientras que las células Tr1 se caracterizan por secretar IL-10, principalmente (**Tabla 1**). Sin embargo, el uso de ratones reporteros permiten mapear el “destino” (“fate”) de los linfocitos T con un linaje específico” han permitido demostrar *ex vivo* e *in vivo* que el fenotipo de los linfocitos T CD4+ es mucho más complejo, ya que pueden expresar

simultáneamente diferentes factores de transcripción y secretar diversas citocinas(Figura 6) [24].

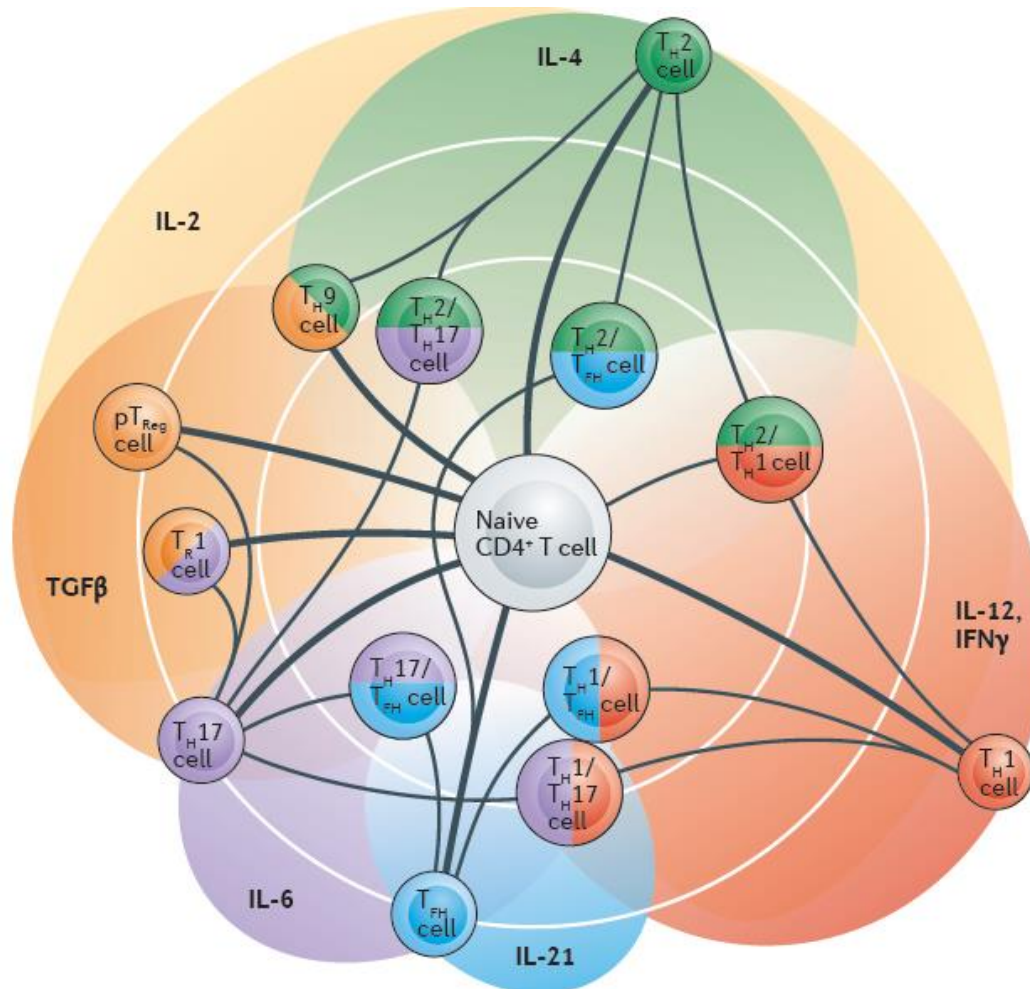


Figura 6. Plasticidad de los linfocitos TCD4+. La diferenciación de las células TCD4+ depende de la polarización dada por el microambiente de citocinas en el que se encuentre, y pueden adquirir características simultaneas de dos distintos subtipos de linfocitos T, Tomado de Dupage et al. [23].

El llamado fenómeno de **plasticidad** involucra que células previamente polarizadas a cierto subtipo, puedan mantener cierta flexibilidad de adquirir diferente fenotipo en respuesta a ciertos estímulos, es decir, las células T se adaptan a las circunstancias y adquieren plasticidad. Diversos estudios han reportado que la secreción de

citocinas no es estable [20], como se pensaba anteriormente, por ejemplo, se han observado células con producción simultánea de IFN- γ e IL-17 [25, 26].

Además de que las células Th pueden expresar más de un factor de transcripción maestro, por ejemplo, se han descrito células que expresan T-bet y FOXP3 [27]. Dupage et al. definen la plasticidad como la habilidad de una célula T CD4⁺ de tomar características de diferentes subtipos de células T simultáneamente o a diferentes tiempos durante su ciclo de vida, esto puede ocurrir transitoriamente o por una reprogramación entre subtipos. Las diferentes vías de señalización que se prenden en respuesta al microambiente regulan la expresión génica e influyen las decisiones del “destino” de los linfocitos T, incluyendo el linaje y las funciones efectoras que llevarán a cabo [28]. La regulación de expresión génica puede llevarse a cabo a nivel transcripcional, involucrando diferentes factores de transcripción, complejos de remodelación de la cromatina, así como la presencia de diferentes miRNAs; a nivel de procesamiento del RNAm; a nivel traduccional e incluso a nivel post-traduccional [29].

Las citocinas tienen el rol dominante de dirigir la diferenciación de linfocitos T, se ha establecido que para cada subtipo de linfocito T es necesaria la presencia de un determinado microambiente de citocinas (**Figura 5, Tabla 1**): las células Th1 requieren de la presencia de IL-12 para su diferenciación [30], mientras que los linfocitos Th2 requieren de IL-4 [31]. La diferenciación de los linfocitos Th17 depende de la presencia de IL-6 y TGF- β . Además, se ha descrito que citocinas como IL-23 e IL-1 β son necesarias para la completa maduración de estas células y para potenciar su función [32]. Por otro lado, los linfocitos Th9 requieren de IL-4 y

TGF- β [33]. En cuanto a los linfocitos iTreg, es necesaria la presencia de TGF- β [34], mientras que las células Tr1 requieren de IL-10 para su diferenciación [35].

Tabla 1. Características principales de los subtipos efectores y reguladores de linfocitos T.

Subtipo de linfocito T	Citocinas necesarias para su diferenciación	Factor de transcripción maestro	Citocinas características de secreción
Th1	IL-12	T-bet	IFN- γ
Th2	IL-4	GATA-3	IL-4
Th17	IL-6, TGF- β , IL-23 (IL-1 β)	Ror- γ t	IL-17
Th9	IL-4, TGF- β	-----	IL-9
iTreg	TGF- β , IL-2	FOXP3	TGF- β , IL-10
Tr1	IL-10	-----	IL-10

La afinidad del TCR también es clave en la determinación de linaje, ya que se ha reportado que la fuerza de la señal a través del TCR es importante para la favorecer la diferenciación de ciertos subtipos. Por ejemplo, se sabe que la diferenciación de células Th17 se favorece con baja fuerza del TCR [36]: a baja dosis de antígeno o

de entrecruzamiento policlonal con anti-CD3, anti-CD28 se promueve que el factor de transcripción NFAT se una al promotor de IL-17. También se sabe que la inducción de células T reguladoras *in vitro*, se favorece con bajas dosis de antígeno y de coestímulo [37].

Considerando que los linfocitos T responden a través de la interacción con las células dendríticas, es importante considerar también el papel de las células dendríticas en la diferenciación de los linfocitos T CD4+. Las células dendríticas son muy heterogéneas, y su función depende principalmente del tejido en el que se encuentren [38]; estas funciones están influenciadas por el ambiente que censan, el cual “condiciona” a las células dendríticas para activar a los linfocitos T en diferentes subtipos. Por lo tanto, es bien aceptado que el microambiente de citocinas en el que se lleve a cabo la activación de los linfocitos T, va a determinar la diferenciación de éstos [39].

2.3. La superfamilia del TGF- β

La superfamilia del TGF- β comprende una serie de más de 30 proteínas diméricas que se subdivide en 3 grandes familias: la familia de los TGF- β s; la familia de las Activinas e Inhibinas; y la familia de las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs por sus siglas en inglés). Además, esta superfamilia también incluye los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) [40].

Aunado a su homología estructural, esta superfamilia comparte receptores entre los ligandos y comparte la vía de señalización canónica, llamada vía de las SMADs [41]. Los ligandos se unen a un complejo de receptores heterodimericos, que consiste en subunidades de receptores tipo I y tipo II [42].

Se han descrito cuatro tipos de receptores tipo II: BMPR2, ACTRIIA, ACTRIIB y TGF β RII; y siete tipos de receptores tipo I, también llamados “cinastas tipo receptor de activina” (ALK por sus siglas en inglés): ALK1-7 [43]. **Tabla 2.**

Tabla 2. Receptores y ligandos de la superfamilia del TGF- β

Categoría molecular	TGF- β s	Activinas/inhibinas	BMPs
LIGANDOS	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3	Activina A, Activina B, Inhibina A, Inhibina B	BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, BMP9
RECEPTORES TIPO I	ALK5, ALK1	ALK4, ALK7	ALK1, ALK2, ALK3, ALK6
RECEPTORES TIPO II	T β RII	ACTRIIA, ACTRIIB	BMPR2, ACTRIIA, ACTRIIB

RECEPTORES TIPO III	TβRIII, Endoglina, CRIPTO3	CRIPTO1, CRIPTO3, TβRIII	RGMA, RGMB, RGMC, Endoglina
R-SMAD	SMAD2, SMAD3	SMAD2, SMAD3	SMAD1, SMAD5, SMAD8
Co-SMAD	SMAD4,	SMAD4	SMAD4
I-SMAD	SMAD7	SMAD7	SMAD6, SMAD7

La vía de señalización canónica inicia cuando TGF-βs, BMPs y Activinas se unen a sus receptores cinasas de serina-treonina y es llevada a cabo por proteínas SMADs. Los ligandos se unen primero a los receptores tipo II, esta unión induce el reclutamiento de receptores tipo I y la fosforilación de éstos por parte del receptor tipo II. El receptor I tipo recluta y fosforila a las SMAD receptoras(R-SMAD) provocando su activación: las Activinas y los TGF-βs señalizan a través de SMAD-2 y SMAD-3; mientras que la familia de las BMPs señaliza a través de SMAD-1, SMAD-5 y SMAD-8 [44, 45]. Una vez fosforiladas, forman heterodímeros con la SMAD común (co-SMAD: SMAD4) que transloca al núcleo regulando la expresión de distintos genes blanco (**Figura 7**). Cabe señalar que SMAD 2/3, alternativamente, se pueden unir a TIF1γ, regulando también la expresión génica [46]. Se ha reportado que los miembros de la superfamilia del TGF-β pueden activar vías de señalización no-canónicas, incluyendo la vía de las MAP cinasas, la vía de PI3K/AKT, la vía de las Rho-GTPasas, entre otras (**Figura 8**) [47, 48].

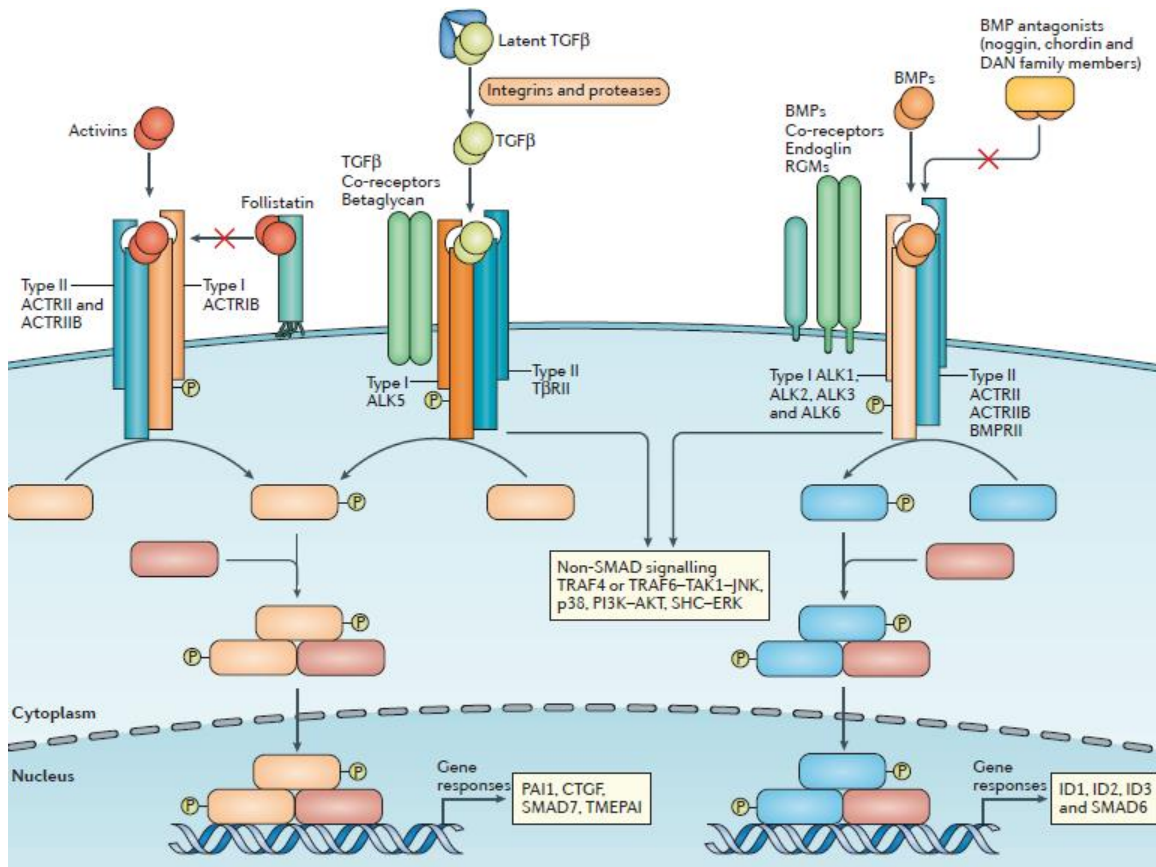


Figura 7. Vía de señalización canónica de la superfamilia del TGF-β. Los ligandos de la superfamilia se unen en la superficie celular a receptores tipo II, esta unión promueve el reclutamiento de receptores tipo I, promoviendo la fosforilación de las R-SMAD, las cuales dimerizan y se translocan al núcleo junto con la Co-SMAD, para regular la expresión de diferentes genes blanco. Tomado de Chen et al. [47]

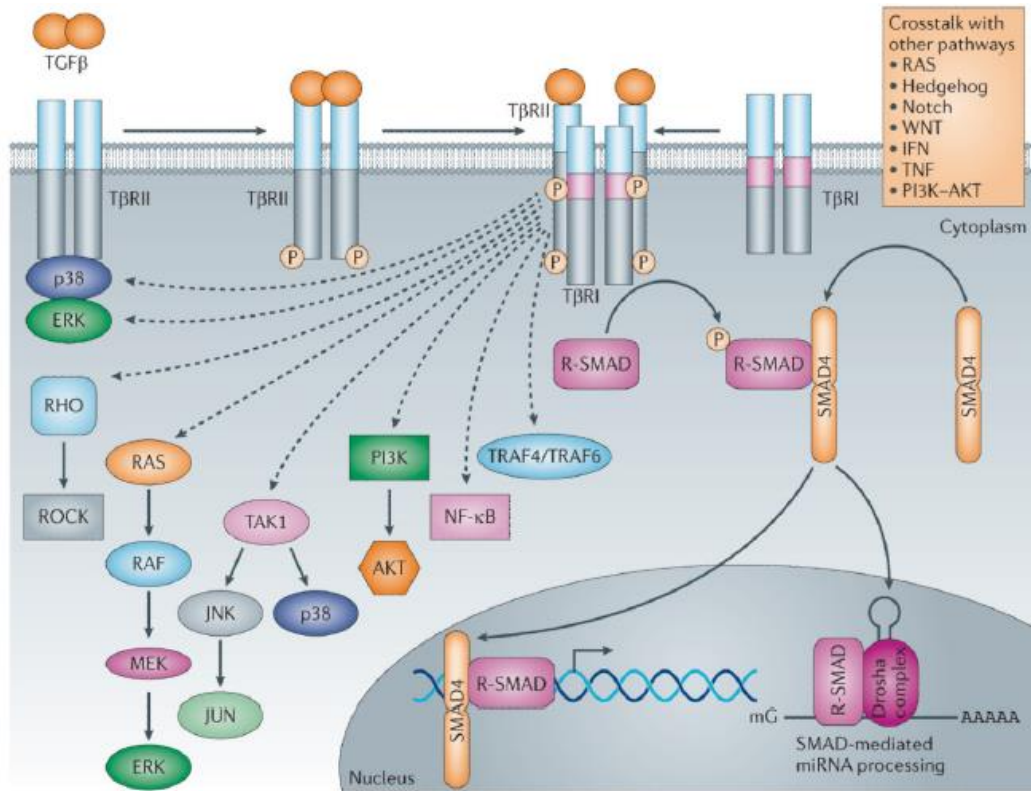


Figura 8. Señalización no canónica del TGF-β. En la vía no canónica, el complejo de receptores transmite la señal a través de otros factores como TRAF4, TRAF6, TAK1, PI3K, p38, ERK, RHO, RAS y NFκB. Tomado de Akhurst et al [43]

Los ligandos y receptores de la superfamilia, incluyendo las moléculas involucradas en la señalización, están ampliamente expresadas. Además, un solo receptor puede unir a más de un ligando y un miembro de la superfamilia del TGF-β puede asociarse con múltiples receptores [45]. Se ha reportado que tienen funciones pleiotrópicas y están involucrados en numerosos procesos, tanto fisiológicos como patológicos; regulan desarrollo, proliferación y diferenciación de varios tipos celulares [49]. De hecho, las BMPs originalmente se describieron por participar en la inducción de formación de hueso [50]; la subfamilia de las Activinas y las Inhibinas se identificó inicialmente por regular la expresión de la hormona folículo-estimulante (FSH por sus siglas en inglés) [51]; y por otro lado, el TGFβ ha sido extensamente estudiado

en el contexto inmunológico [52-54], mientras que los demás miembros de la superfamilia se han involucrado recientemente [47, 55, 56].

2.3.1. Inhibinas y Activinas

Las Inhibinas tienen un amplio rol endocrino, son producidas principalmente por las gónadas y proveen regulación negativa de la síntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) de la pituitaria anterior [57, 58]. Esto se ha observado ampliamente después de la castración de machos o hembras, lo que resulta en la pérdida de Inhibina circulante y un incremento sérico de la FSH [59, 60]. Las Inhibinas también tienen una acción local (parácrina y endócrina), regulando la foliculogénesis y la esteroidogénesis [61, 62]. En la clínica, los niveles séricos de Inhibina se utilizan como un biomarcador para el diagnóstico y monitoreo de condiciones asociadas a la reproducción y al embarazo [63, 64].

A pesar de que las Inhibinas se expresan principalmente en gónadas, se ha descrito la expresión de estas proteínas en diferentes tejidos, incluyendo placenta, endometrio, glándulas adrenales, pulmón, hígado, hueso y timo.[65-69]

Las Inhibinas son heterodímeros conformados por una subunidad α de 20 kDa y una subunidad β de 13kDa, unidas por un puente disulfuro, lo cual resulta en una proteína de 32kDa. Dependiendo de la subunidad β a la cual se une la subunidad α , se generan las isoformas Inhibina A (con la subunidad β A) e inhibina B (con la subunidad β B) [70].

El gen de la subunidad α de las Inhibinas se encuentra en el cromosoma 2 en humanos [71], mientras que en ratones reside en el cromosoma 1 [72]. Este gen está conformado por dos exones separados por un intrón, se ha descrito que en la región 5' no codificante contiene regiones promotoras con sitios de unión a CREB, AP-1, GATA, y elementos responsivos a SMADs [73]. Por otro lado, los genes de las subunidades β A y β B se encuentran en el cromosoma 7 y 2, respectivamente, en humanos; mientras que en ratón la subunidad β B se encuentra en el cromosoma 1 y β A en el cromosoma 13. La transcripción de la subunidad β B está asociada a la unión de las proteínas AP-1 y AP-2; mientras que la transcripción de la subunidad β A está regulada por las proteínas CREB, GATA, AP-1 y AP-2 [74].

La activación transcripcional de las Inhibinas en las gónadas está modulada por las gonadotropinas, a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G, la activación de la vía de PKA (proteína cinasa A, por sus siglas en inglés) y la subsecuente fosforilación de CREB. La fosforilación de CREB, promueve la transcripción de las Inhibinas mediante su interacción con la región CRE en los promotores de la subunidad α y β A [75]. Se ha descrito que la subunidad β B de las Inhibinas no está regulada por CREB, sin embargo, su expresión está regulada por varios miembros de la superfamilia del TGF- β , incluyendo la Activina A, BMP-2, TGF- β 1 y 2 [76-78]. Las subunidades α , β A y β B de las Inhibinas, son sintetizadas como precursores de 232, 290 y 264 aminoácidos, respectivamente, característicos de los miembros de la superfamilia. Los prodominios de la región N-terminal son necesarios para el plegamiento, la formación del puente disulfuro y el transporte de las

subunidades [79]. Después de la dimerización, los prodominios son escindidos por la convertasa furina [80] (**Figura 9**).

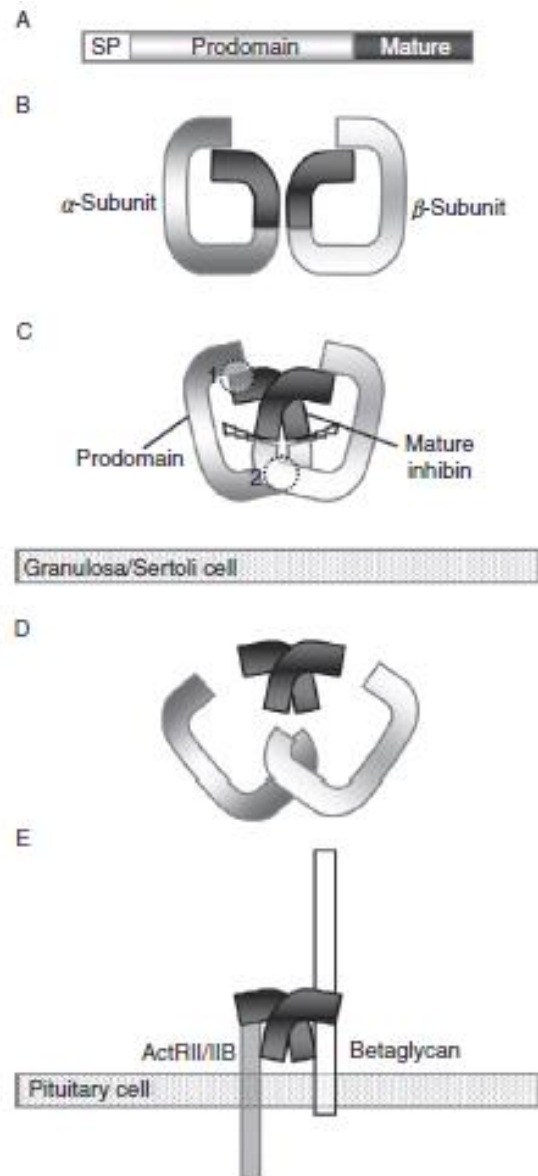


Figura 9. Modelo de la síntesis y secreción de la Inhibina. A) Las subunidades de las Inhibinas son sintetizadas como precursores con un predominio N-terminal y un dominio C-terminal maduro. B y C) Residuos hidrofóbicos dentro de la región N-terminal del predominio (región 1) y regiones del dominio maduro que interactúan no-covalentemente, manteniendo la molécula en una conformación competente para la dimerización. Los prodominios también se dimerizan vía no covalente en la región C-terminal (región 2). Los prodominios se escinden de los dominios maduros. D) Los dímeros son secretados de la célula. E) Las Inhibinas se unen a sus moléculas blanco (ACTRII y T β RIII) en la célula blanco. Tomado de Walton et al. [74]

Las Activinas son homodímeros conformados por dos subunidades β , que se comparten con las Inhibinas. Las Activinas se expresan en un amplio rango de tejidos además de los ovarios y los testículos, incluyendo la placenta, la glándula pituitaria, las glándulas adrenales, el bazo, la médula ósea y regiones específicas del cerebro. [81]. Se han caracterizado 4 tipos de subunidades β : β A, β B, β C y β E, sin embargo sólo los dímeros A, B y AB se han observado con alguna función biológica [82]. Se considera una proteína pleiotrópica debido a los múltiples procesos en los que se ha involucrado, tanto en el sistema reproductivo, en el sistema cardiovascular, respiratorio, renal, además del cerebro y el sistema inmune [83].

La mayoría de los efectos de las Inhibinas están asociados con su antagonismo en la señalización de Activinas, esto se ha visto a nivel endocrino, regulando los niveles de la FSH, y a nivel autocrino y paracrino, en esteroidogénesis, desarrollo de gametos y proliferación celular específica dentro de los tejidos reproductivos [84].

Se han propuesto diferentes mecanismos mediante los cuales las Inhibinas pueden antagonizar a las Activinas:

De manera endocrina, la síntesis diferencial de las subunidades se propone como mecanismo antagónico, ya que la subunidad α se produce diez veces más que la subunidad β [85]. Además, el receptor tipo II se une a la subunidad α de la Inhibina con baja afinidad, mientras que para la subunidad β de la Activina se une con alta afinidad [86, 87]. Las Inhibinas también pueden antagonizar la función de las Activinas, a través de la unión a β -Glicano, promoviendo el secuestro del receptor Tipo II, restringiendo su interacción con el receptor Tipo I, e inhibiendo de manera

consecuente la activación de SMADs [88] (**Figura 10**). Por otro lado, existen evidencias que las Inhibinas podrían unirse a un receptor “huérfano” aún no descrito [89].

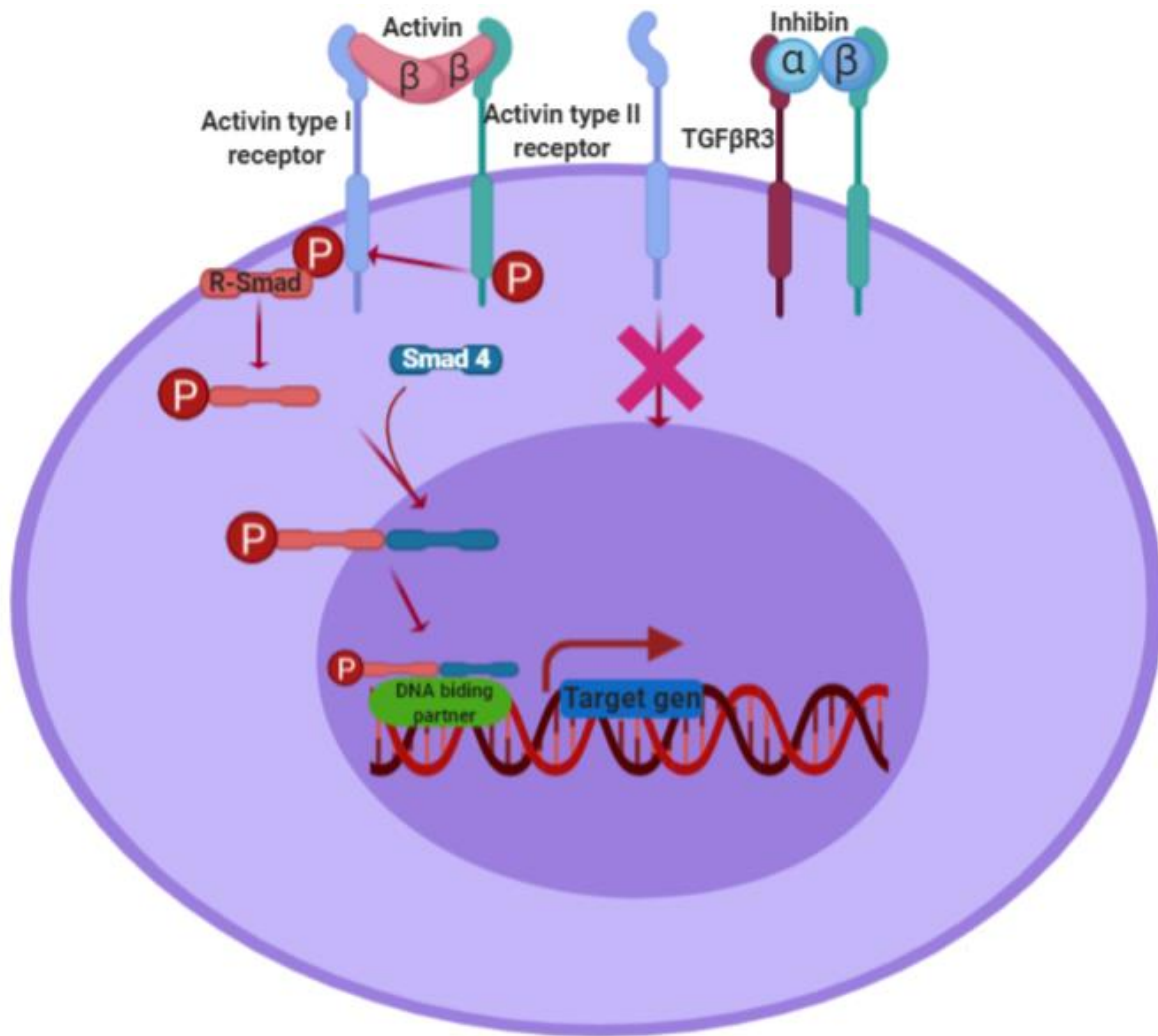


Figura 10 Antagonismo de las Activinas mediado por las Inhibinas y su unión con el TβRII (TGFβR3). Las Inhibinas se unen al receptor tipo II de las Activinas a través de la subunidad β, y al TβRIII a través de la subunidad α, impidiendo el reclutamiento del receptor tipo I y la subsecuente señal mediada por SMADs.

2.3.2. El β -Glicano o receptor tipo III del TGF- β (T β RIII)

El β -Glicano o receptor tipo III del TGF- β (T β RIII) es un proteoglicano transmembranal de 851 aminoácido con cadenas de heparan y condroitin sulfato. Fue descrito originalmente por López-Casillas et al. como correceptor, carente de señalización, de los ligandos de la superfamilia del TGF- β , con la función principal de presentar el ligando a sus receptores.[90, 91]

Este correceptor se encuentra codificado en el cromosoma 1, consta de 16 exones y su expresión es controlada por dos promotores (uno distal y uno proximal), se expresa en muchos tipos celulares y en niveles mayores que los receptores tipo I y II de la superfamilia [92-94]. El T β RIII se une a varios ligandos de la superfamilia del TGF- β , incluyendo las tres isoformas del TGF- β , BMPs y a las Inhibinas [88, 95, 96]. Se ha descrito que la unión a T β RIII, facilita la unión de los ligandos a los receptores tipo II TGF β RII, ActRIIA o ActRIIB [97]. El T β RIII mejora la unión de los tres TGF- β s a sus receptores [98], siendo más importante para el TGF- β 2 ya que requiere de la unión a T β RIII para llevar a cabo su función, promoviendo la unión a los receptores tipo II y I [99]; de hecho el ratón deficiente del T β RIII (T β RIII^{-/-}) muere perinatalmente en la semana 13.5 a 18.5 de gestación, debido a una falta de señalización mediada por el TGF- β 2 durante el desarrollo, presentando defectos cardiovasculares [100]. Además, el T β RIII promueve la unión de la BMP-2, BMP-4, BMP-7 y del GDF5 al receptor tipo I, incrementando la fosforilación de SMAD1 y la función de estos ligandos[96]. El T β RIII también promueve la unión de las Inhibinas a los receptores tipo II (ActRIIA o ActRIIB), secuestrando al receptor e inhibiendo el reclutamiento del receptor tipo I y la señalización mediada por Activinas [84].

Recientemente el T β RIII ha tomado gran importancia ya que se ha demostrado disminución o pérdida de la expresión de este correceptor en varios tipos de cáncer, incluidos mama, próstata, pulmón, páncreas, ovario y cáncer renal [101-106]. Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que el T β RIII es un importante regulador de la migración, la invasión y la angiogénesis, por lo que se considera un mediador importante durante la progresión del cáncer [107, 108].

El T β RIII es un proteoglicano con un dominio extracelular largo de 766 aminoácidos, que se puede dividir en dos subdominios: el dominio “orphan” y el dominio “zona pelucida” (PZ). El TGF- β y las BMPs pueden unirse a ambos dominios, mientras que la Inhibina sólo se une al dominio PZ [97] (**Figura 11**). El dominio extracelular también contiene dos sitios de glicosilación localizados en la serina 535 y la serina 546 [109, 110], a los que se unen cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) de heparan y condroitin sulfatos, el estado de glicosilación no es importante para la unión de los ligandos [91, 95], sin embargo, se ha observado que los GAGs son importantes para la función de adhesión [111]. El dominio transmembranal del T β RIII es de un solo paso y el dominio intracelular es corto, de 42 aminoácidos, sin alguna función enzimática descrita [90, 112]; sin embargo, se ha reportado que el dominio intracelular del T β RIII es capaz de unirse a la forma autofosforilada del receptor tipo II, lo cual promueve la formación del complejo de receptores I y II (T β RII/ T β RI) [113]; también se ha descrito que el dominio citoplásmico del T β RIII puede ser fosforilado por el T β RII en la treonina 841, lo cual permite el reclutamiento de la proteína de andamiaje β -arrestina 2, esta interacción induce la internalización

del complejo β -arrestina 2/ T β RII/ T β RIII y por lo tanto, la disminución de la señalización mediada por TGF- β [114, 115]. Esta regulación de la señal del TGF- β , también se ha observado en el caso de las BMPs, donde la interacción del dominio citoplásmico del T β RIII con la β -arrestina 2 promueve la generación de un complejo con el ALK-6, induciendo la endocitosis del complejo y la estimulación de las señales mediadas por las BMPs [116]. Finalmente, la interacción del T β RIII con la β -arrestina 2 regula negativamente la señalización mediada por NF κ B en células cancerígenas de mama [117] y disminuye la migración de células epiteliales de ovario normales y cancerígenas, a través de la activación de Cdc42 [111]. Por otro lado, el dominio citoplásmico del T β RIII presenta un motivo de unión a PDZ, por lo que se ha descrito que es capaz de interaccionar con la proteína GIPC (GAIP-interacting protein C-terminus), proteína que contiene un dominio PDZ, esta unión promueve que la expresión en membrana del T β RIII sea estable, promoviendo la señalización mediada por TGF- β [118]; también se propone que la interacción entre el T β RIII y GIPC es importante durante la progresión del cáncer de mama, ya que inhibe la migración y la progresión [119].

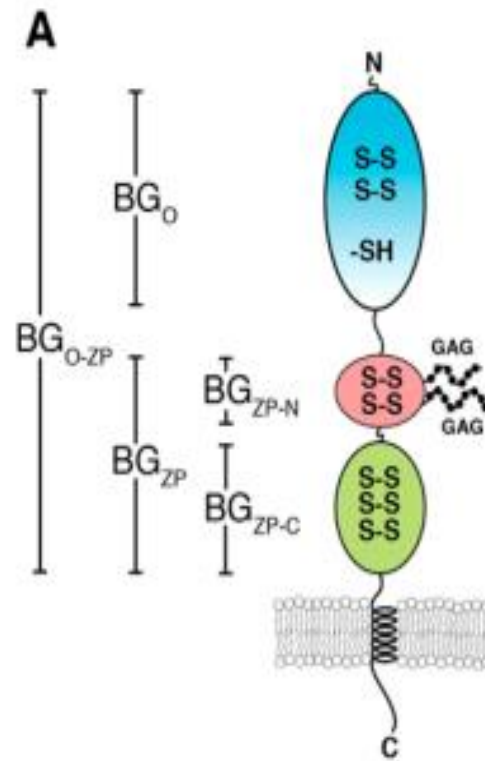


Figura 11. Estructura del TβRIII. El TβRIII contiene dos principales dominios, el dominio “orphan” (BG_O) y el dominio ZP “zona pelucida”. El TGF-β puede unirse a ambos dominios, mientras que las Inhibinas sólo se unen al dominio ZP. Tomado de Villareal et al. [97]

La expresión del TβRIII se regula a distintos niveles y durante diferentes procesos, por ejemplo, el TGF-β regula negativamente la expresión del TβRIII, inhibiendo la activación de su promotor distal [120, 121]. Se ha observado que la expresión del TβRIII disminuye durante la transición epitelio-mesenquima [105] y durante la transdiferenciación de células esteladas hepáticas a miofibroblastos [122]. Por otro lado, señales como la dexametasona, la hidrocortisona y la aldosterona, incrementan la transcripción del TβRIII en células hepáticas, miofibroblastos y osteoblastos [121, 123]; otros estímulos como MyoD y el ácido retinoico incrementan la expresión del TβRIII en miofibroblastos [124], la FSH, la hormona luteinizante (LH) y

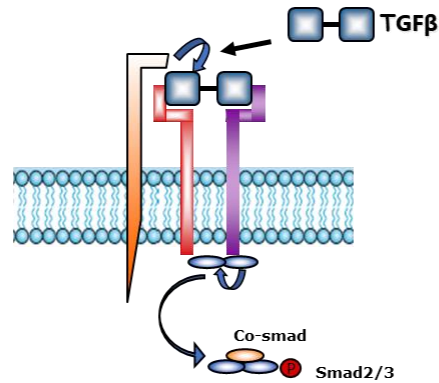
los estrógenos, regulan positivamente la expresión del T β RIII [125, 126]. A nivel epigénético, también se ha reportado regulación de la expresión del T β RIII, por ejemplo, en células cancerosas de ovario y próstata, se ha regulado su expresión mediante la adición de inhibidores de metiltransferasas y desacetilasas de histonas [103, 104]; se ha descrito también que el silenciamiento a nivel epigenético del factor de transcripción GATA-3 disminuye la activación transcripcional del T β RIII en carcinomas renales [127].

Otro mecanismo de regulación de la expresión del T β RIII es a través del corte del dominio extracelular, cerca del dominio transmembranal, generando una fracción soluble del receptor (sT β RIII). Este corte puede ser regulado por pervanadato, un inhibidor de fosfatasas de tirosinas, y se sugiere que puede ser mediado por metaloproteinasas como MT1/MT3-MMP o plasmina [128, 129]. La fracción soluble del T β RIII puede ser detectada en suero o en la matriz extracelular [90, 130].

La forma soluble del T β RIII, a diferencia del expresado en membrana, se ha descrito como un agente neutralizante de los TGF- β s, impidiendo la unión de los ligandos a sus receptores tipo II y I en la membrana celular, funcionando como trampa de ligando (**Figura 12**). El sT β RIII se une con mayor afinidad al TGF- β 2 seguido por el TGF- β 3, siendo el TGF- β 1 el de menor afinidad [131], se requieren de los dos dominios extracelulares del T β RIII (orphan y ZP) para la neutralización de los TGF- β s [97, 132]. Esta característica neutralizante del sT β RIII se ha considerado para el tratamiento de condiciones patológicas con señalización exacerbada del TGF- β , por ejemplo: el sT β RIII previene el daño renal en un modelo de ratón obeso/diabético [133]; también invierte el perfil Th2 a Th1, disminuyendo la carga bacteriana y la fibrosis, en un modelo de tuberculosis [134]; también se ha estudiado el uso del

sT β RIII en modelos de cáncer de mama y de próstata para reducir la angiogénesis y la progresión de tumores [135-140].

a) Función correceptora



b) Función como trampa de ligando

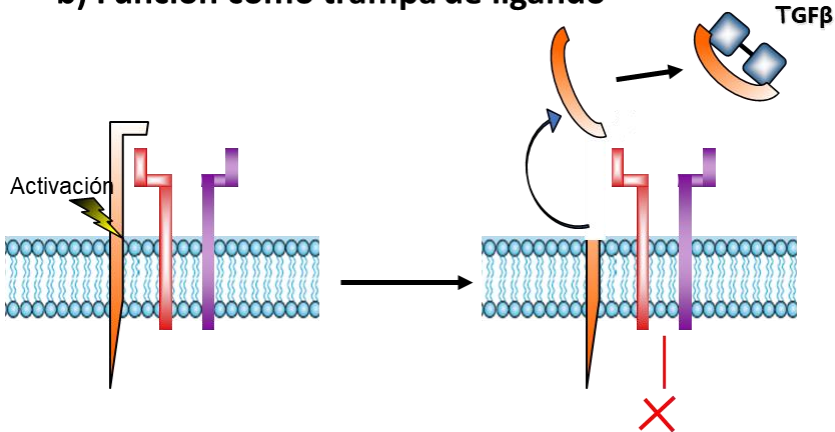


Figura 12. Función dual del T β RIII en la señalización mediada por TGF- β . a) El T β RIII expresado en membrana funciona como correceptor del TGF- β , promoviendo la unión de este ligando a sus receptores tipo I y II. b) El T β RIII puede escindirse de la membrana y funcionar como trampa de ligando, uniéndose al TGF- β disponible, evitando la unión con sus receptores.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

3.1. Inhibinas y T β RIII como par molecular

La función antagónica de las Inhibinas en la señalización mediada por Activinas en procesos reproductivos, se ha asociado ampliamente con su interacción con el T β RIII, este mecanismo consiste en la unión de alta afinidad de la subunidad α las Inhibinas al dominio PZ de la región extracelular del T β RIII y la formación de un complejo con el receptor ActRII, impidiendo el reclutamiento del receptor tipo I y por lo tanto, la señalización mediada por SMADs [88, 98, 141, 142] (**Figura 10**). Se ha estudiado estructuralmente esta interacción y se ha reportado que el epítipo específico de la subunidad α que se une al T β RIII está compuesto por los siguientes aminoácidos: Tyr50, Val108, Thr111, Ser112, Phe118, Lys119 y Try120 [142]; y por el lado del T β RIII, se ha descrito que se requieren los aminoácidos Ser608, Val614, Ala615, His619, y Val620 [95] en el dominio PZ de la región extracelular para la unión con inhibina [97]; a diferencia del TGF- β que requiere tanto del dominio orphan como del dominio PZ, y específicamente la Val614 y la Ala615 son importantes para la unión del TGF- β , por lo que se propone que al existir un solapamiento de los sitios de unión, las inhibinas pueden regular también, la unión de los TGF- β s. En este contexto, hay varios reportes que apoyan esta propuesta, por ejemplo, la inhibina A es capaz de reducir la unión del TGF- β 2 a través de la internalización del T β RIII [143]; por otro lado, el TGF- β 1 y 2 pueden atenuar la función de las inhibinas reduciendo tanto la expresión del T β RIII, como su unión con las inhibinas [144, 145]. En otro contexto, también se propone que las Inhibinas pueden competir con las BMPs, ya que su unión con el T β RIII facilita la unión de las Inhibinas a los receptores

ActRII y BMPRII, excluyendo al receptor tipo I y la señalización mediada por SMADs [146].

También se ha observado que el grado de glicosilación de la subunidad α afecta la afinidad con la que se unen las Inhibinas al T β RIII. Las Inhibinas contienen dos sitios de glicosilación en la Asn268 y en la Asn302, dependiendo si se glicosila sólo la Asn268 o ambas, se producen las isoformas de 31 y 34 kDa respectivamente [147]. Las isoformas de 31 kDa son más bioactivas, debido a que se unen con mayor afinidad al T β RIII, lo cual indica que la glicosilación en la Asn302 disminuye la afinidad de unión de las Inhibinas al T β RIII.

La dependencia funcional de las Inhibinas a través de su unión al T β RIII se reafirma con el patrón de expresión de ambas moléculas. Por ejemplo, en la hipófisis, donde las señales de las Inhibinas son muy abundantes, también el T β RIII se expresa en grandes cantidades [148] y se ha observado que la inhibición de la secreción de la FSH en la hipófisis por parte de la Inhibina, es dependiente de su unión con el T β RIII [149]. Además, varios estudios demuestran que el T β RIII que se expresa en células primarias gonadotrópicas y en la línea celular L β T2 es indispensable para el antagonismo de las Inhibinas en la producción de la FSH inducida por Activinas [150-152]. También se ha adjudicado la función de las Inhibinas y el T β RIII como supresores tumorales ya que el ratón deficiente de la subunidad α de Inhibinas (Inh $\alpha^{-/-}$) desarrolla tumores en gónadas [153] y en glándulas suprarrenales en caso de gonadectomizarlos [154]. Aunado a esto, analizando la generación de tumores en células de la granulosa de ovario, se han observado niveles incrementados de Inhibina circulante, y este incremento se asocia a un mecanismo compensatorio por una falta de respuesta a la Inhibina [155]. De acuerdo con estos datos, también se

ha reportado que el 53% de las células tumorales de la granulosa, presentan niveles disminuidos del T β RIII, justificando la falta de respuesta a las Inhibinas [156]. Mediante el silenciamiento de las Inhibinas o mediante mutaciones en los sitios de unión del T β RIII a sus ligandos, se demostró, que las Inhibinas regulan negativamente la migración e invasión de células tumorales de la granulosa, a través de su unión al T β RIII [156]. Por último, la sobreexpresión del T β RIII en células de cáncer ovárico resulta en una reducción significativa de la migración de las células, mientras que el silenciamiento de la expresión de Inhibinas mejora la migración e invasión [104].

En conjunto, estos hallazgos apoyan la asociación funcional de las Inhibinas y el T β RIII como un par molecular.

3.2. Inhibinas y T β RIII en la biología de los linfocitos T

Existe evidencia de que las Activinas/Inhibinas modulan la función de distintas células del sistema Inmune, como monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T, entre otros [157]. En cuanto a las células dendríticas, existen reportes que demuestran el papel de las Activinas en la diferenciación de las células de Langerhans en la epidermis [158], mientras que la expresión de Folistatina, antagonista de la Activina, en la epidermis de ratones transgénicos, redujo la diferenciación de células de Langerhans. Por otro lado, la Activina A tiene el potencial de regular negativamente las respuestas proinflamatorias y mediar la tolerancia periférica a través de regular negativamente la capacidad estimuladora de las DCs [159].

En cuanto a los linfocitos T maduros, se ha descrito que los linfocitos T al activarse producen Activina, incluso en condiciones polarizantes Th1, y se ha postulado a la Activina A como una nueva citocina Th2, secretada por células CD4+, ya que cuando se han diferenciado *in vitro* células Th, se ha detectado una alta secreción de Activina en cultivo con condiciones de diferenciación tipo Th2 [160]. También se ha observado un incremento en la producción de Activina A en clonas Th2 específicas para OVA, en respuesta al antígeno, o después del entrecruzamiento con anti-CD3. Por otro lado, se ha mostrado que la Activina A promueve la activación alternativa de macrófagos (M2) e indirectamente la producción de IgE por células B. Sin embargo, se ha sugerido que la Activina A también tiene un rol protector en suprimir la respuesta Th2 antígeno específica, a través de la generación de Tregs antígeno específicas; esta supresión, está mediada por IL-10 y TGF- β , y debido a que estas células no expresan FOXP3, posiblemente representan un fenotipo Tr1 [161]. Recientemente se ha demostrado que la Activina promueve la diferenciación Tr1 y la producción de IL-10 a través de la expresión del factor de transcripción IRF4 en células T humanas [162].

También se ha reportado que la Activina A puede inducir *in vitro* la conversión de células T vírgenes a Tregs CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺, después de la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28, aunque en menor proporción comparado con TGF- β [163]. Adicionalmente, la Activina A actúa de manera sinérgica con el TGF- β en la generación de Tregs inducidas FOXP3⁺. Por otro lado, se ha descrito que la Activina favorece también la diferenciación de células efectoras Th17, otro linaje dependiente de TGF- β [164] (**Figura 14**).

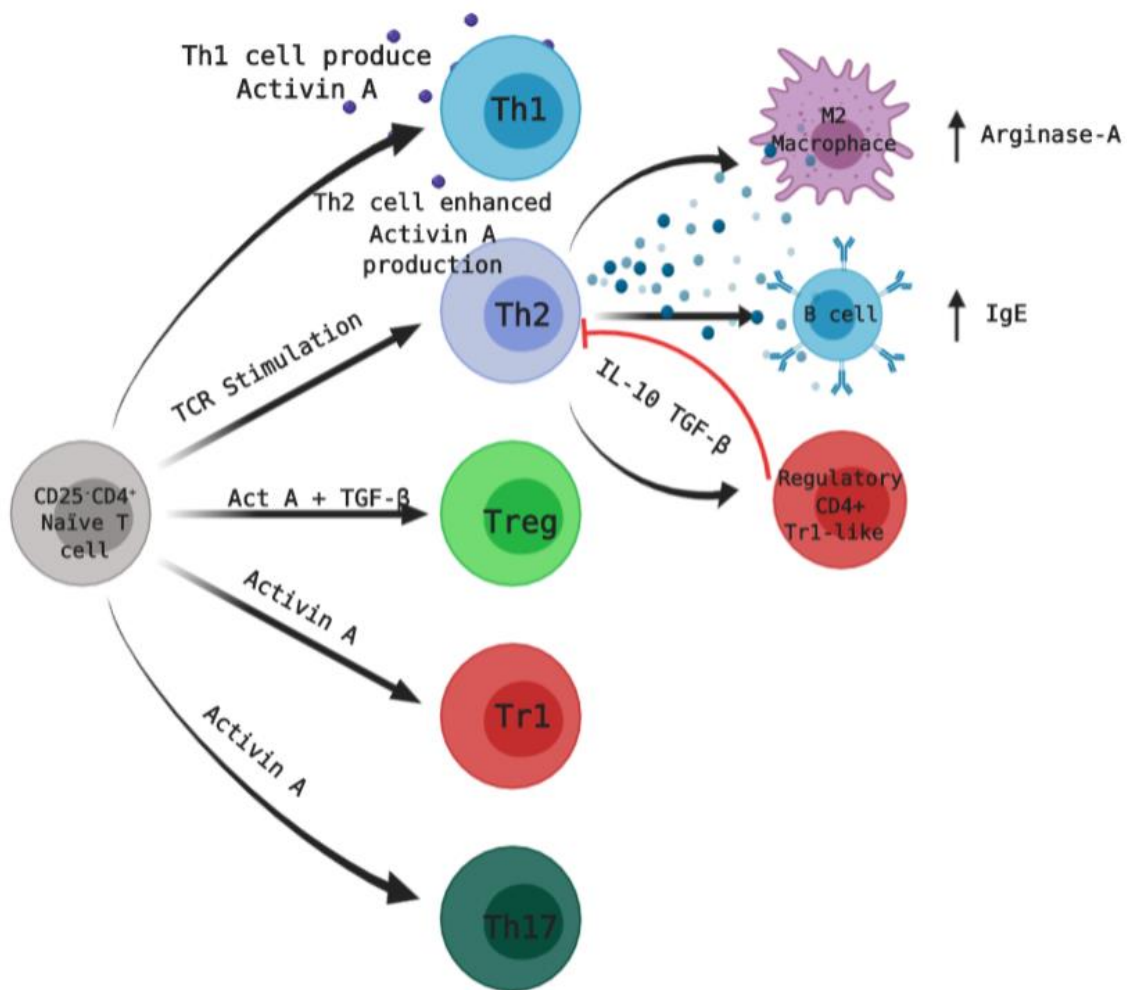


Figura 14. Activinas en la biología de los linfocitos T. La Activina A promueve una respuesta tipo Th2, sinergiza con el TGF- β durante la inducción de iTregs. Las Activinas también promueven la diferenciación de células Tr1 y de Th17.

Todos estos estudios, destacan la función de las Activinas e Inhibinas en la biología celular de los linfocitos T, influyendo en el desarrollo. En cuanto a las Activinas, se ha estudiado su participación en mecanismo de respuesta de linfocitos T maduros, sin embargo, no se ha estudiado el papel de las Inhibinas en la respuesta efectora de las células T maduras.

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, se estudió la biología de las células dendríticas en el ratón deficiente de Inhibinas. Se observó que las células dendríticas $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ presentaban un fenotipo tolerogénico, debido a la menor expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras después de su activación, además de promover en menor proporción la proliferación de linfocitos T alogénicos en comparación con su contraparte $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ [165]. También reportamos que los ratones deficientes de Inhibinas presentan mayor número de células T reguladoras periféricas en homeostasis en comparación con ratones silvestres. Y que en condiciones de inducción en presencia de células dendríticas tanto *in vitro* como *in vivo* se generaban más iTregs a partir de células T naïve $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ en comparación con células T $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ [166], sin embargo, poco se ha explorado acerca del papel intrínseco de las Inhibinas en linfocitos T. Resultados preliminares del laboratorio mostraron por primera vez que los linfocitos T producen Inhibina-A bajo un estímulo subóptimo de anti-CD3 y anti-CD28 y que el pico de secreción es previo al pico de Activina-A. Además, se observó que en linfocitos T deficientes de Inhibina no producen más Activina en comparación con los linfocitos T de ratones silvestres; y que en las células T deficientes de inhibinas se favorece la diferenciación de células T reguladoras FOXP3⁺ (Tesis de doctorado, Marisol de la Fuente, 2019).

Por otro lado, hay estudios que han reportado la expresión del T β RIII en células de la respuesta inmune, por ejemplo: neutrófilos [167], macrófagos [168], células dendríticas [169], e incluso en linfocitos T [170, 171], sin embargo, no se ha estudiado el papel funcional del T β RIII en estas células. Sólo hay un reporte que indica que el T β RIII en células dendríticas podría tener un papel regulador de la

acción supresora del TGF- β 1 para estimular a los linfocitos T [169]. A pesar de que se reconoce ampliamente al T β RIII como un regulador del TGF- β 1, una citocina muy importante de la respuesta inmune, se desconoce su papel funcional en las células inmunes.

En cuanto a los linfocitos T, recientemente nuestro grupo de trabajo analizó la expresión del T β RIII en el timo, y se observó que tanto las células linfoides como las células estromales lo expresan. De manera interesante, el T β RIII se expresa preferencialmente en las células más funcionalmente maduras CD4 y CD8 SP (CD69⁻CD62L^{+hi}), sugiriendo un papel en la diferenciación terminal de los timocitos, previo a su exportación del timo. Además, se observó un incremento en la expresión en la etapa DN3 que disminuye significativamente en la etapa DN4, sugiriendo una regulación dependiente de la señalización del pre-TCR [172]; aunado a esto, el T β RIII tiene niveles de expresión mayores en las células SP tanto CD4 como CD8, lo que sugiere que también se regula durante la selección positiva. En cultivos de timo fetal de un modelo de ratón deficiente de T β RIII se observó una disminución en el número de células DP y un enriquecimiento de DN, indicando un retraso en el paso DN a DP, similar al observado en el ratón deficiente de Inhibinas (**Figura 15**). El patrón de expresión y regulación que se observa durante el desarrollo de los timocitos sugiere que la Inhibina y el T β RIII actúan como un par molecular.

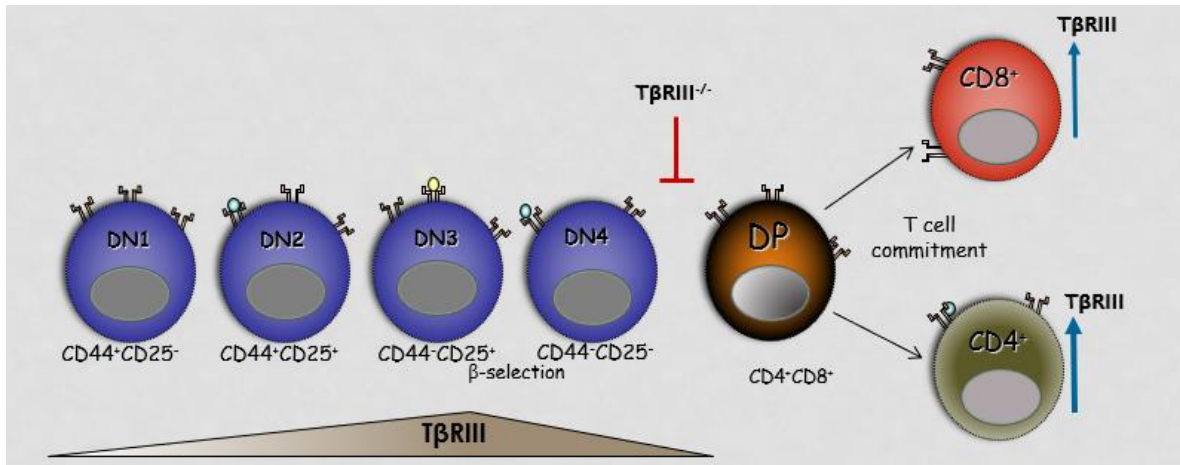


Figura 15. El TβRIII en el desarrollo de los linfocitos T. Regulación de la de la maduración de los timocitos por parte del TβRIII. Tomado de la Tesis de German Alemán (2012)

En trabajos recientes de nuestro grupo de colaboración se reportó que las células T deficientes del TβRIII, en un modelo deficiente condicional en células TCD4⁺ maduras (*Tgfb3^{ff}.dLckCre*), se observó un incremento en la diferenciación hacia el subtipo efector Th1 a partir de células T naïve en comparación con células silvestres [173].

Todos estos antecedentes nos llevan a preguntarnos si las Inhibinas y el TβRIII actúan también como par molecular durante procesos de activación y diferenciación de las células T maduras. Para lo cual es importante conocer la expresión del TβRIII en células T periféricas y en células en condiciones de activación. En cuanto a las Inhibinas, utilizaremos un modelo deficiente de estas proteínas para evaluar su papel durante la activación y su diferenciación a fenotipos efectores.

4. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que las proteínas pertenecientes a la familia del TGF- β influyen en el desarrollo y maduración de las células T; específicamente, la Activina, la Inhibina y su par molecular, el T β RIII, están involucrados en el desarrollo de timocitos. Por otro lado, se ha estudiado el papel de las Activinas en modelos de activación de linfocitos T, proponiéndose a la Activina como una citocina tipo Th2, así como citocina polarizante Th17, Treg y Tr1. Nuestro grupo ha reportado que las Inhibinas promueven la proliferación de linfocitos T y reducen la generación de células T reguladoras inducidas, favoreciendo la maduración de las células dendríticas. Sin embargo, se desconoce si las Inhibinas pueden ejercer un papel intrínseco en linfocitos T, por lo que es necesario investigar la participación de las Inhibinas y el T β RIII durante la activación de los linfocitos T y su diferenciación funcional hacia distintos linajes efectores. Las Inhibinas podrían ejercer su efecto a través de antagonizar las funciones de las Activinas, o de manera alternativa, modular la activación y función de los linfocitos T de manera independiente a las vías activadas por la Activina.

5. HIPÓTESIS

- Las Inhibinas y el T β RIII participan como par molecular durante el proceso de activación de los linfocitos TCD4⁺ y modulan su diferenciación funcional.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

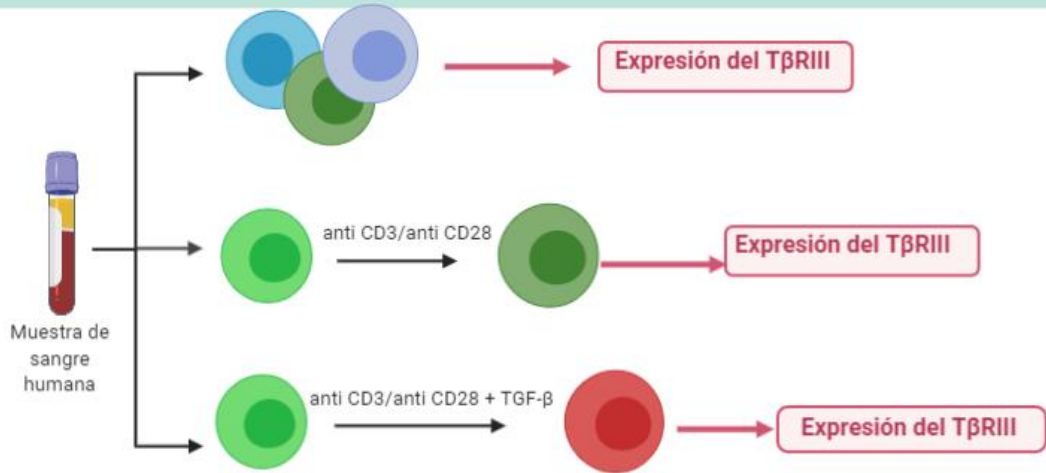
Evaluar el papel de las inhibinas y el T β RIII en la activación y la diferenciación funcional de linfocitos T.

OBJETIVOS PARTICULARES

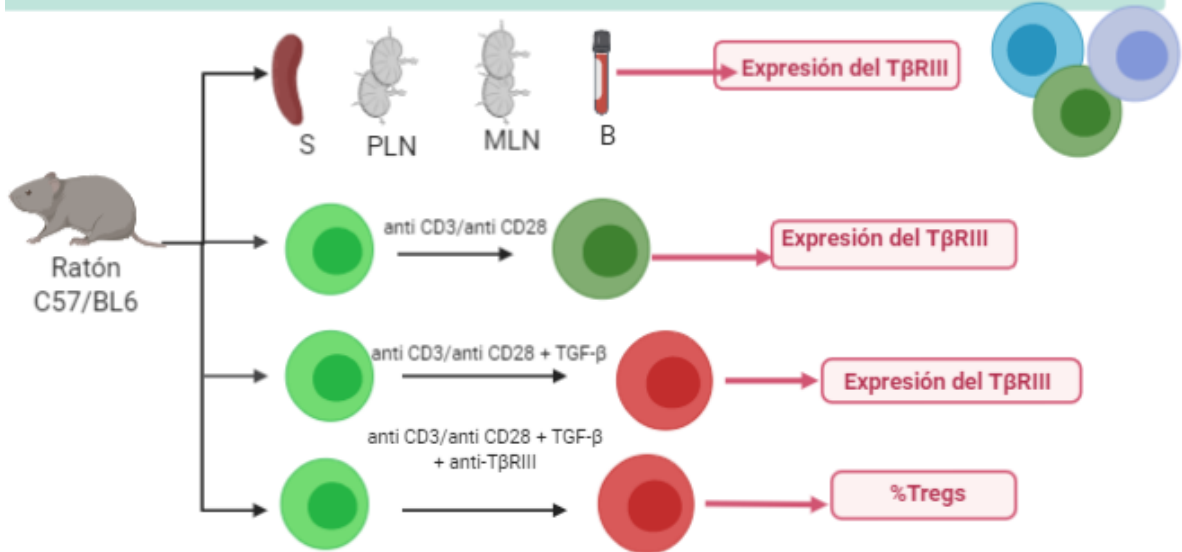
1. Evaluar la expresión de T β RIII en distintas poblaciones de linfocitos T (naive y memoria) así como en células T reguladoras.
2. Evaluar la expresión del T β RIII en la activación del linfocito T.
3. Evaluar el papel de T β RIII en la inducción de los linfocitos T reguladores
4. Evaluar la expresión de T β RIII en linfocitos T deficientes de Inhibina
5. Evaluar el efecto intrínseco de las Inhibinas en la activación del linfocito T
6. Evaluar el efecto intrínseco de las Inhibinas en diferenciación funcional de los linfocitos T (Th1 y Th17).

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

a) Papel del T β RIII en la activación y diferenciación de los linfocitos T



b) Papel del T β RIII en la activación y diferenciación de los linfocitos T



c) Papel de las Inhibinas en la activación y diferenciación de los linfocitos T

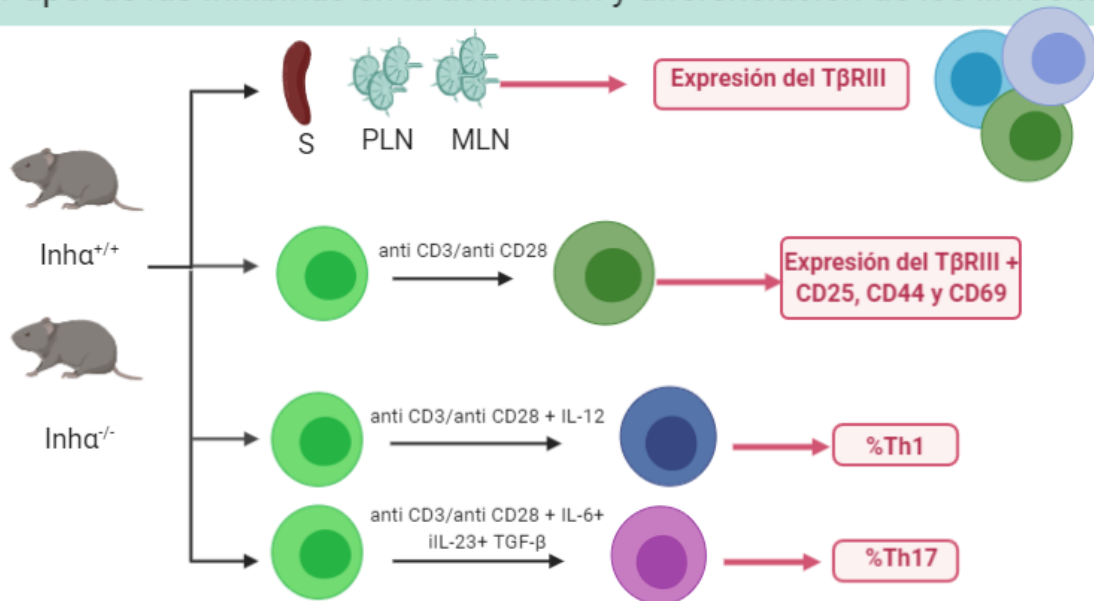


Figura 16. Diseño experimental: a) Para evaluar el papel del T β RII en la activación y diferenciación de los linfocitos T en células de ratón. b) Para evaluar el papel del T β RII en la activación y diferenciación de los linfocitos T en células humanas c) Para evaluar el papel de las Inhibinas en la activación y diferenciación de los linfocitos T.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Ratones

Ratón silvestre C57/BL6: En este estudio se utilizaron ratones silvestres para evaluar la expresión en homeostasis del T β RIII de las poblaciones celulares linfocíticas y tras la activación a través del TCR de las células naïve.

Ratón *knock-in* FOXP3-EGFP: En este estudio se utilizó este ratón reportero que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor del gen del FOXP3, con la finalidad de evaluar las células T reguladoras FOXP3⁺ *in vivo* y la inducción de estas a partir de células T naïve *in vitro*. Estos ratones fueron obtenidos del laboratorio Jackson.

Ratón *Inh α ^{-/-}*: En este estudio se utilizó como modelo biológico al ratón deficiente de la subunidad alfa de las Inhibinas *knock-out* (*Inh α ^{-/-}*), diseñado y descrito por Matzuk en 1992 [153], se utilizaron hembras de 4 semanas con la finalidad de evitar respuestas inducidas por los tumores que presenta este modelo biológico. Las cruces de los ratones se mantuvieron en heterocigosis (HT), debido a la infertilidad que presentan los ratones KO. Todos los experimentos se compararon con los ratones silvestres (*Inh α ^{+/+}*) nacidos de las mismas cruces HT. El genotipo de los ratones se determinó por PCR utilizando los siguientes primers:

Hprt3	GGATATGCCCTTGACTATAATG	Forward
Intrón	CCTGGGTGGAGCAGGATATGG	Reverse
Exón 2	GGTCTCCTGCGGCTTTGC	Forward

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con DNA extraído de un fragmento pequeño de las colitas de los ratones, digerido con NaOH (50mM) y Tris-base (10 M). Los amplificados, dan como resultado una banda KO de alrededor de 700 pb y una banda WT de 500 pb (**Figura 17**), debido a que la delección del gen se realizó por inserción de un cassette Hprt3. Ambos amplificados comparten una sección del primer que amplifica una sección del intrón.

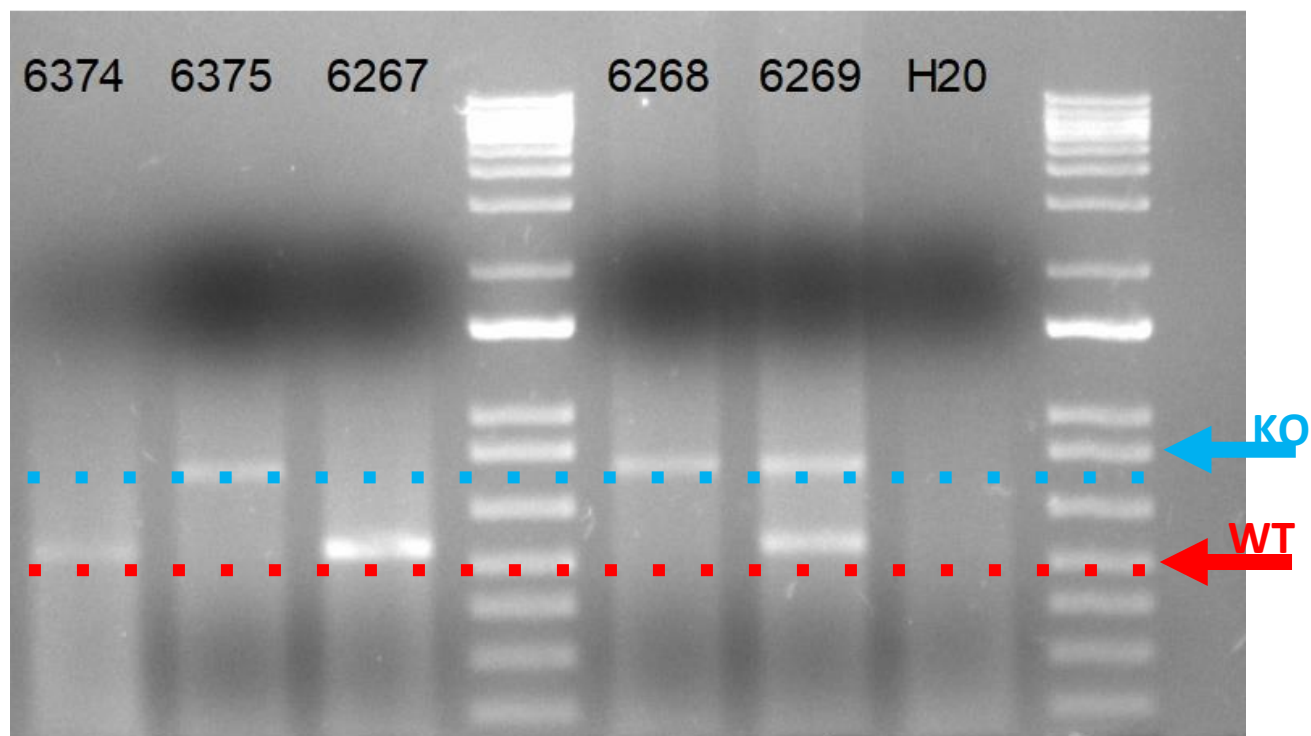


Figura 17. Tipaje del modelo biológico $Inha^{-/-}$. Electroforesis en gel de agarosa representativo del amplificado del DNA extraído de 5 ratones distintos, se muestra en azul la banda que pertenece a los amplificados KO y en rojo la banda de los amplificados WT.

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones libre de patógenos en las instalaciones de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. Los protocolos utilizados fueron revisados y aceptados por el comité de ética para el uso de animales experimentales de dicho instituto (CICUAL).

8.2. Ensayos de activación

Para evaluar la activación de los linfocitos T, se aislaron linfocitos T naive ($CD4^{+} CD25^{-}$, $CD44^{lo}$, $CD62L^{hi}$) por sorting, utilizando los equipos MoFlow o FACs Aria.

Las células se cultivaron en placas de 96 pozos previamente sensibilizados con anticuerpos de entrecruzamientos anti-CD3 y anti-CD28 (5 µg/ml de cada uno), se sembraron 300 mil células por pozo en medio RPMI 1640 complementado con 10%SFB con penicilina/estreptomicina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y mercaptoetanol. Se cosecharon las células 12 horas después y cada 24 horas durante 5 días. Posteriormente se evaluó la expresión de TβRIII, CD25, CD44 y CD69 en células vivas CD4+.

8.3. Ensayos de diferenciación Th1/Th17 *in vitro*

Para los ensayos con células CD4⁺ vírgenes se realizó la extracción de bazo y la lisis de eritrocitos con buffer ACK; además, se realizó enriquecimiento de células CD4⁺ mediante el uso de perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD4, posteriormente se realizó “sorting” de las células T “naïve”. Las células sorteadas se tiñeron con CellTrace Violet durante 15 min a 37°C. La reacción se detuvo con RPMI 10% de SFB y se lavaron dos veces con medio. Después de contar las células y comprobar la viabilidad con tinción de exclusión con azul tripán, se cultivaron 300 mil células por pozo con el estímulo correspondiente, basándonos en condiciones de diferenciación previamente reportadas (**Tabla 3**) por Christine M. et al (2014) [174].

Tabla 3. Condiciones utilizadas de diferenciación de células T efectoras.

Fenotipo	Condiciones de diferenciación
Th1	IL-12 (10 ng/ml) + anti-IL-4 5µg/ml
Th17	IL-6 (20 ng/ml) + TGFβ (1.5 ng/ml) +IL-23 (10ng/ml) + anti-IL-4 5µg/ml + anti-IFN-γ 10µg/ml

Se evaluó la diferenciación Th1 mediante la producción de IFN-γ y la de Th17 por la producción de IL-17. Después de tres días de cultivo en condiciones polarizantes, se realizó un reestímulo con 40 ng/ml de PMA y 400 ng/ml de Ionomicina, y se inhibió el tráfico de Golgi con Brefeldina A (Golgi Plug-BD) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se incubó durante 5 horas a 37°C para favorecer el enriquecimiento intracelular de citocinas. Posteriormente, se realizó la tinción superficial con anti-CD4 y la tinción de viabilidad con Zombie Nir, a temperatura ambiente durante 20 min. Después de lavar las células se realizó la permeabilización-fijación con FixPerm durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con PermBuffer y se continuo con el bloqueo de sitios Fc con anti-CD16/32 durante 20 min a 4°C. Después de lavar con Perm buffer, se realizó la tinción intracelular con anti-IFN-γ o anti-IL-17 según correspondiera.

8.4. Evaluación de TβRIII en poblaciones de linfocitos periféricos

Se extrajeron ganglios periféricos, ganglios mesentéricos, bazo y sangre periférica de ratones silvestres C57/BL6, se maceraron los órganos y se utilizaron 2 millones de células por órgano para teñir con anticuerpos monoclonales acoplados a

fluorocromos, más tinción de viabilidad por Aqua Zombie. Se incubaron las células 20 min a temperatura ambiente, se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 4% para su posterior adquisición por citometría de flujo.

8.5. Ensayos de inducción de células T reguladoras y bloqueo del T β RIII

Para la inducción de células T reguladoras FOXP3⁺, se aislaron células naive por sorting y se cultivaron bajo condiciones subóptimas de activación (1 μ g/ml de anti-CD3 pegado a placa + 2 μ g/ml de anti-CD28 soluble) + 1 ng/ml de TGF- β . Para el bloqueo con anti- T β RIII, se utilizó un anticuerpo policlonal bloqueante hecho en ratón, previamente evaluado como anticuerpo bloqueante[172]; se utilizó también como control bloqueante la fracción soluble del T β RIII, donados por el doctor Fernando López Casillas (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Como control negativo de inducción se utilizó anti- TGF- β .

8.6. Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana a partir de concentrados leucocitarios de donadores sanos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), mediante gradiente de densidad utilizando Ficoll Hypaque (GE Healthcare, UK).

8.7. Evaluación de linfocitos T de sangre periférica humana

Se contaron las células y se evaluó la viabilidad mediante exclusión con azul tripán. Se utilizó un millón de células por donador para evaluar la expresión del T β RIII en las diferentes poblaciones linfocíticas.

8.8. Ensayos de activación e de inducción de células T reguladoras de células humanas

Se aislaron las células T naive por sorting, como células CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺. Se cultivaron en placas previamente sensibilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 (10 μ g/ml) para activación óptima, se utilizó para activación subóptima 1 μ g/ml de cada anticuerpo, y a los cultivos de inducción de células T reguladoras se agregó TGF- β (5ng/ml) bajo condiciones de activación subóptima. Se colectaron las células cada 24 horas y se evaluó la expresión de CD25, FOXP3 y T β RIII.

8.9. Citometría de Flujo

Los siguientes anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, fueron utilizados para las diferentes evaluaciones realizadas en el presente trabajo mediante citometría de flujo:

Molécula blanco	Fluorocromo	Clona	Marca
CD4	APC	GK1.5	BIOLEGEND
	PECY5	GK1.5	TONBO
	APC CY7	RM4-5	TONBO
	BV421	RM4-5	BIOLEGEND
	BV510	RM4-5	BIOLEGEND
CD3	PECY5	145-2C11	TONBO
CD8	PECY7	53-6.7	BIOLEGEND
CD25	PECY5	PC61	BIOLEGEND
CD44	PE	IM7	BIOLEGEND
CD62L	APCCY7	MEL-14	BIOLEGEND
CD69	BV421	H1.2F3	BIOLEGEND
FOXP3	APC	3G3	TONBO
CCR7	PCF594	4B12	BD
IFN-Y	BV510	XMG1.2	BIOLEGEND
IL-17	PE	TC11-18H10.1	BIOLEGEND
CD3	PURO	145-2C11	TONBO
CD28	PURO	37.51	TONBO
SYRIAN HAMSTER	PURO	Poly4056	BIOLEGEND
BETAGLICANO	PURO	NS0	R and D

Para la evaluación de la expresión del T β RIII se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en cabra, por lo que se añadió un anticuerpo de detección secundario anti-IgG de cabra acoplado a AF488.

Para la evaluación de las células humanas, se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Molécula blanco	Fluorocromo	Clona	Marca
CD4	FITC	555346	BD PHARMIGEN
	PE	RPA-T4	TONBO
CD19	FITC	HIB19	BD PHARMIGEN
CD3	APCCY7	SK7	BD
CD25	PECY5	M-A251	BD PHARMIGEN
CD8	PECY7	RPA-T8	TONBO
CD127	PECY7	A019D5	BIOLEGEND
CD45 RA	APC	H1100	BD PHARMIGEN
BETAGLICANO	PE	Polyclonal	Ls BIO
FOXP3	APC	PCH101	Thermo Fisher

Los colorantes que se usaron para evaluar la viabilidad fueron: Aqua Zombie (Biolegend) y Zombie Nir (Biolegend). Los colorantes utilizados para evaluar la proliferación fueron CFSE y CTV (Biolegend)

Las tinciones superficiales se realizaron con 20 minutos de incubación a temperatura ambiente de los anticuerpos primarios, más dos lavados con buffer de FACS, en el caso de ser necesario, se continua con 20 minutos de incubación con anticuerpo secundario, después de lavar, las células se fijan con una solución de paraformaldehído al 4% durante 5 min, las células se lavan y finalmente se dejan en buffer de FACS hasta que se lleve a cabo su adquisición.

Todas las adquisiciones y los sortings se realizaron en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo. Los equipos utilizados fueron: FACS

Aria I (Becton & Dickinson); Mo Flow (Beckman Coulter); Attune Azul/Rojo (Thermo Scientific); Attune Azul/Violeta (Thermo Scientific); Attune Nxt(Thermo Scientific)

El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo X, proporcionado en las instalaciones del LabNalCit.

8.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de t de Student, para comparar las medias entre los grupos evaluados. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los datos se expresaron como promedios \pm error estándar.

9. RESULTADOS

9.1. Papel del T β RIII en la activación y diferenciación funcional de linfocitos

T.

9.1.1. El T β RIII se expresa diferencialmente en linfocitos T periféricos

En trabajos previos en el laboratorio, se analizó la expresión del RNA mensajero de las Activinas e Inhibinas [69], así como la expresión a nivel RNA mensajero y en superficie celular del T β RIII [172] durante los diferentes estadios de maduración de los timocitos. El patrón de expresión y el papel en la maduración de los timocitos que tienen el T β RIII, nos llevó a preguntarnos cómo se encontraba la expresión de este correceptor en los linfocitos T periféricos.

Evaluamos los linfocitos T CD4⁺, TCD8⁺ y los linfocitos B CD19⁺, en bazo (SP), nódulos linfáticos periféricos (PLN), ganglios mesentéricos (MLN) y sangre periférica (PB), se analizaron las poblaciones siguiendo la estrategia que se esquematiza en el inciso **a)** de la **Figura 18**. A partir de las células vivas, se analizó cada población de linfocitos, se evaluó el porcentaje de células que expresaban el T β RIII, así como los niveles de expresión de este correceptor; para evaluar la población positiva al T β RIII se tomó en cuenta el control fluorescencia menos uno (FMO, por sus siglas en inglés) para cada población (**Figura 18b**); se muestran las gráficas de porcentaje (**Figura 18c**) y de intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) (**Figura 18d**) de 3 ratones.

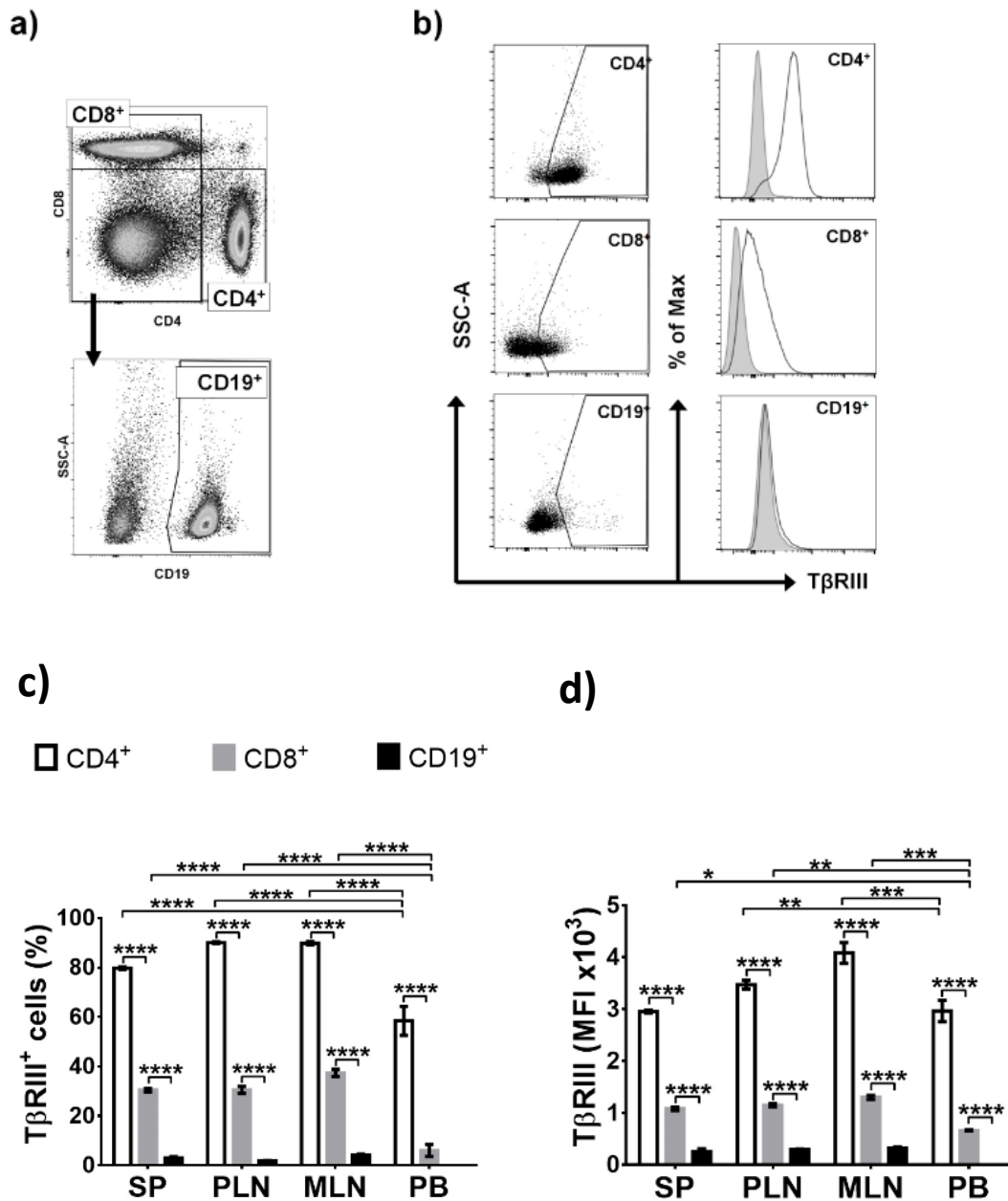


Figura 18. Evaluación de la expresión del TβRIII en linfocitos murinos. Análisis en Bazo (SP), nódulos linfáticos (LN), nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) y sangre periférica (PB). **a)** Dot plots representativos para la selección de células TC4⁺, TCD8⁺ y células B (CD19⁺). **b)** Dot plots representativos de células TβRIII⁺, la ventana de selección de la población positiva para cada tipo celular se estableció con base en el control FMO; e histogramas representativos de la expresión del TβRIII en linfocitos, el histograma sombreado representa el FMO mientras que el histograma vacío representa la población evaluada. **c)** Gráficas del porcentaje de células TβRIII⁺ en los diferentes órganos evaluados. **d)** Gráficas de la MFI de la expresión del TβRIII en los linfocitos, en los diferentes órganos evaluados.

Las gráficas de barras muestran el promedio ± SEM. Análisis estadístico de *t-student*. *p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001, **** p≤0.0001. n= 3.

Observamos que el T β RIII se expresa preferencialmente en los linfocitos T CD4⁺ en comparación con los T CD8⁺ y que sólo una pequeña proporción de los linfocitos B CD19⁺ expresan este receptor.

Dentro de la población de células vivas CD4⁺, analizamos también la subpoblación de linfocitos T naïve (CD44^{lo}, CD62L^{hi}, CCR7⁺), los linfocitos T de memoria central (CD44^{hi}, CD62L⁺, CCR7⁺) y los linfocitos T de memoria efectora (CD44^{hi}, CD62L⁻, CCR7⁻) (**Figura 19**). Para evaluar estos subtipos celulares, se analizaron las células vivas CD4⁺ y se separaron primero las poblaciones con base en la expresión de la selectina CD62L y de CD44 (**Figura 19a**), a partir de las células con expresión baja de CD44 y alta expresión de CD62L (CD44^{lo}, CD62L^{hi}), se determinaron las células T naïve como aquellas que expresan el receptor para quimiocinas CCR7 (CCR7⁺); por otro lado, las células CD44^{hi} se analizaron con base en su expresión de CD62L y de CCR7 para separar las células de memoria central (CD62L⁺, CCR7⁺) y las células de memoria efectora (CD62L⁻, CCR7⁻). Para todos los subtipos se analizó el porcentaje de células que expresaban el T β RIII, así como los niveles de expresión de este correceptor, se determinaron las células positivas al T β RIII con base en el control FMO (**Figura 19b**), las gráficas del porcentaje promedio y la intensidad media de fluorescencia de expresión del T β RIII se presentan en la **Figura 19c** y **19d**, respectivamente.

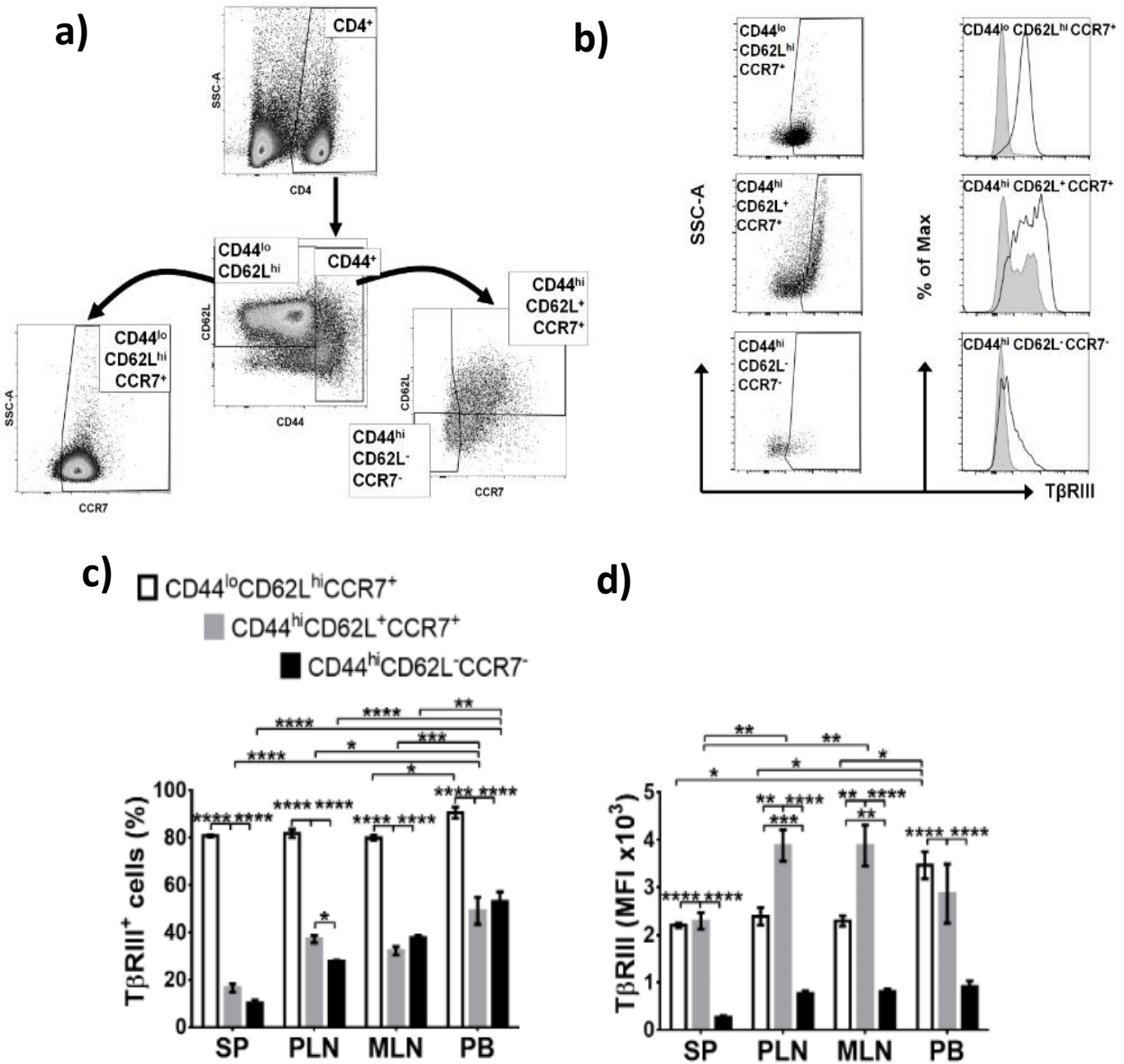


Figura 19. Evaluación de la expresión del TβRIII en subtipos de linfocitos TCD4⁺ murinos. Análisis en Bazo (SP), nódulos linfáticos (LN), nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) y sangre periférica (PB). **a)** Dot plots representativos para la selección de células naïve (CD44^{lo}CD62L^{hi}CCR7⁺), de memoria central (CD44^{hi}CD62L⁺CCR7⁺), y memoria efectora (CD44^{hi}CD62L⁻CCR7⁻). **b)** Dot plots representativos de células TβRIII⁺, la ventana de selección de la población positiva se estableció con base en el control FMO; e histogramas representativos de la expresión del TβRIII en los diferentes subtipos, el histograma sombreado representa el FMO mientras que el histograma vacío representa la población evaluada. **c)** Gráficas del porcentaje de células TβRIII⁺ en los diferentes órganos evaluados. **d)** Gráficas de la MFI de la expresión del TβRIII en los linfocitos, en los diferentes órganos evaluados. Las gráficas de barras muestran el promedio ± SEM. Análisis estadístico de *t-student*. *p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001, **** p≤0.0001. n = 3.

También observamos una expresión diferencial dentro de los subtipos de linfocitos T CD4⁺; alrededor del 80% de los linfocitos T naïve expresan TβRIII en los distintos tejidos analizados, mientras que sólo entre 20 y 40% las células de memoria lo expresan. En cuanto a IMF, las células de memoria central son la que expresan mayor cantidad de este correceptor en todos los órganos analizados.

Por otro lado, se analizó también otro subtipo de células T CD4⁺, las células T reguladoras (Tregs) de periferia (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺), este subtipo celular es dependiente del TGF-β para su inducción, sin embargo, no se había analizado la expresión del TβRIII en este subtipo celular, sólo se había reportado que, a nivel transcripcional (RNA mensajero), el TβRIII tenía una expresión a la baja en las Tregs [175]. Interesantemente, observamos que estas células tienen niveles de expresión celular del TβRIII significativamente menores en comparación a las células FOXP3⁺ (**Figura 20**). Para el análisis de las células T reguladoras, se utilizaron ratones reporteros FOXP3-GFP, se analizó a partir de las células CD4⁺, la población celular CD25⁺, FOXP3⁺(GFP⁺) (**Figura 20a**). Para todos los órganos evaluados, se determinaron los niveles de expresión de este correceptor en las células Treg con base en el control FMO (**Figura 20b**), las gráficas de la intensidad media de fluorescencia de expresión del TβRIII se presentan en la **Figura 20c**.

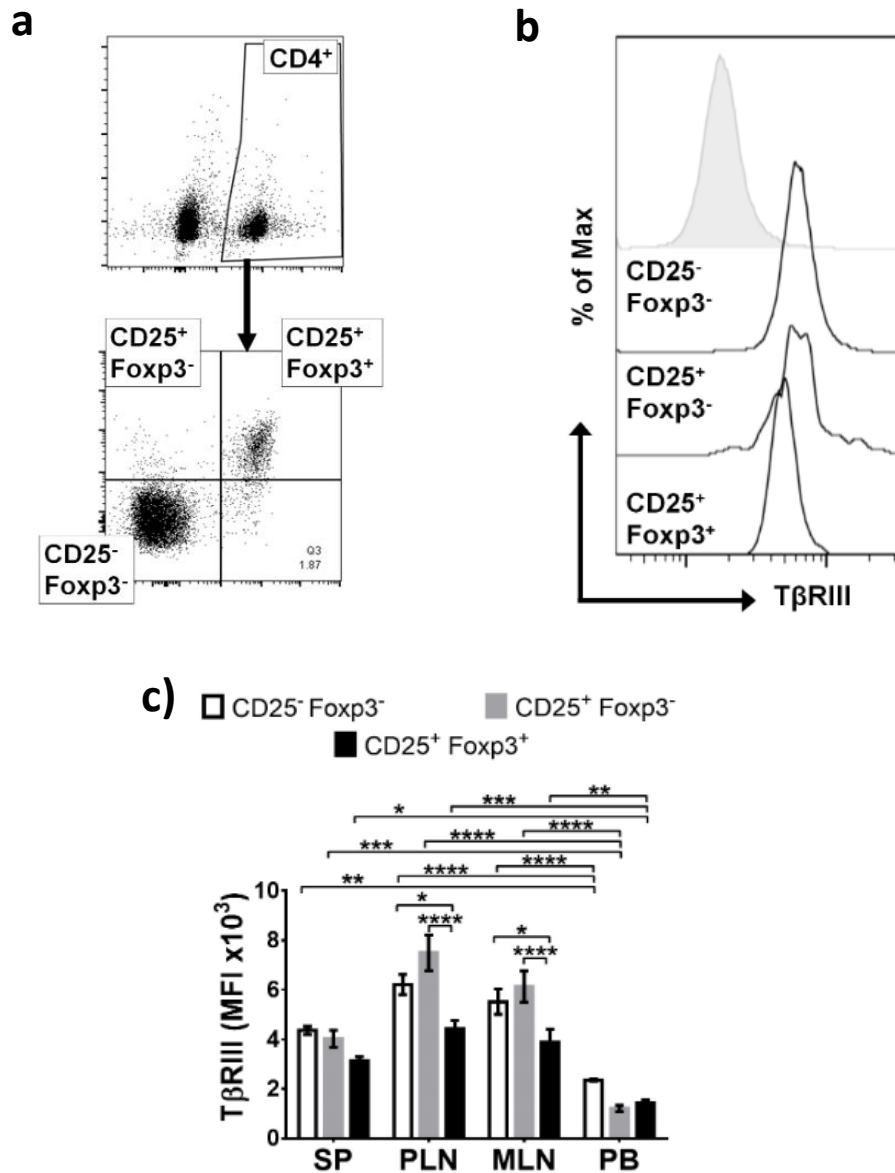


Figura 20. Evaluación de la expresión del TβRIII en linfocitos T reguladores periféricos. Análisis en Bazo (SP), nódulos linfáticos (LN), nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) y sangre periférica (PB). **a)** Dot plots representativos para la selección de células Tregs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ **b)** Histogramas representativos, el histograma sombreado representa el FMO mientras que el histograma vacío representa la población evaluada y **c)** Gráfica de IMF de la expresión del TβRIII en células CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁻ y Tregs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. La gráfica de barras muestra la IMF ± SEM. Análisis estadístico de *t-student*. *p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001 **** p≤0.0001. n= 3.

En un trabajo previo en el laboratorio, se evaluó el papel del T β RIII en varias poblaciones correspondientes a los diferentes estadios durante el desarrollo tímico, pero no se había evaluado la expresión de este correceptor en las células Tregs tímicas, por lo que decidimos evaluar también esta subpoblación, basándonos en los hallazgos obtenidos al evaluar las células T reguladoras de periferia. Observamos, de manera interesante, que también es menor la expresión del T β RIII en los linfocitos T reguladores tímicos (CD25⁺FOXP3⁺) (**Figura 21**), un comportamiento similar al observado en las células T reguladoras de periferia. Para este análisis, se evaluaron las células TCD4⁺ SP de timo de ratones reporteros FOXP3-GFP con base en la expresión de CD25 y de FOXP3. La expresión del T β RIII se determinó con base en el control FMO, en la **Figura 21a** se muestran los histogramas representativos de las poblaciones: TCD4⁺ SP total, y a partir de esta población, se evaluaron las subpoblaciones CD25⁻, FOXP3⁻; CD25⁺, FOXP3⁻; y CD25⁺FOXP3⁺. En la gráfica de barras de la **Figura 21b** se muestran los promedios de IMF del T β RIII para cada población.

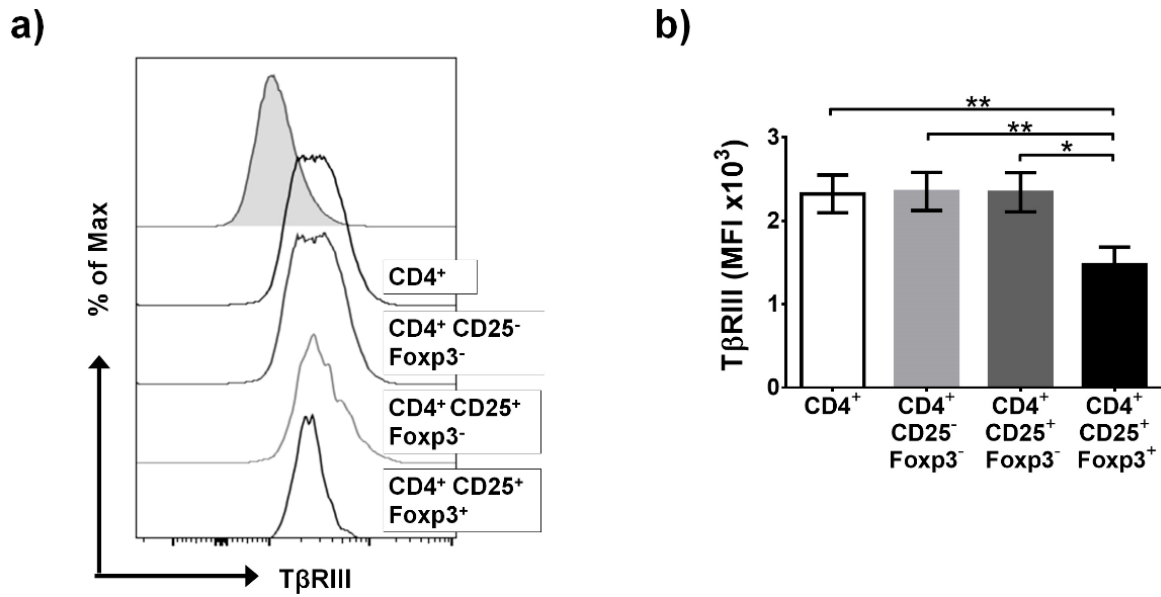


Figura 21. Expresión del TβRIII en linfocitos T reguladores tímicos. a) Histogramas representativos y b) graficas de IMF de la expresión del TβRIII en células CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁻ y Tregs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺.El histograma relleno muestra el control FMO. Las gráficas de barras muestran la ± SEM. Análisis estadístico de *t-student*. *p<0.05, ** p<0.01. n= 3.

9.1.2. La expresión del T β RIII es inducida por activación de los linfocitos T.

Los hallazgos obtenidos en el análisis de la expresión del T β RIII para las diferentes poblaciones de células TCD4⁺ en homeostasis, nos llevaron a preguntarnos la posible modulación de la expresión del T β RIII debida a la activación de las células. Con la finalidad de evaluar la expresión del T β RIII después de la activación, se cultivaron células T naïve, aisladas por sorting, con anti-CD3/ anti-CD28 (5 μ g/ml de cada uno), se realizó una cinética evaluando los marcadores de activación (CD25, CD44, CD69) a las 0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, además de la expresión del T β RIII (**Figura 22**). La estrategia de análisis se llevó a cabo a partir de las células vivas CD4⁺, en la **Figura 22a** se muestran los histogramas representativos de la expresión de CD25, CD44, CD69 y del T β RIII a diferentes tiempos, en las gráficas de la **Figura 22b** se muestra la MFI de expresión de cada molécula de 3 experimentos independientes.

Se observó que la expresión del T β RIII incrementa a partir de las 24 horas de activación y sigue una cinética de expresión similar a los otros marcadores de activación evaluados, con un pico de expresión a las 48 horas.

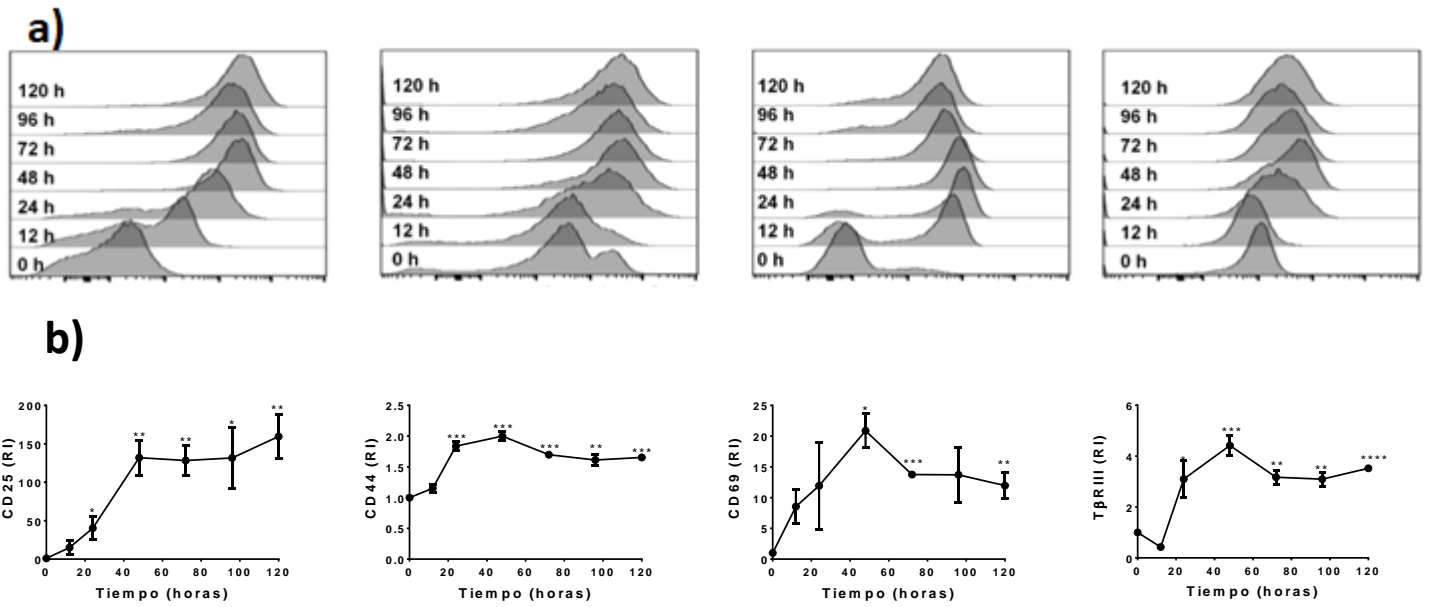


Figura 22. Expresión del TβRIII en linfocitos T CD4⁺ activados. La expresión del TβRIII, CD25, CD44 y CD69 se analizó a 0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas en células T CD4⁺ naïve aisladas y activadas con anti-CD3/anti-CD28 (5µg/ml). **a)** Histogramas representativos y **b)** Gráficas de incremento relativo (RI) de la MFI con respecto a la MFI del tiempo 0 horas ± SEM. Análisis estadístico de *t-student*. *p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001 **** p≤0.0001 n=3.

9.1.3. Los linfocitos T reguladores disminuyen la expresión del T β RIII en asociación con el aumento en la expresión de FOXP3.

Nuestra siguiente pregunta fue si el T β RIII se expresa diferencialmente durante la inducción de los linfocitos T reguladores FOXP3 *in vitro*, tomando en cuenta los datos obtenidos durante la evaluación de las Tregs tímicas y periféricas. Realizamos un cultivo de inducción *in vitro*, utilizando un protocolo de activación subóptima con anticuerpos anti-CD3 (1 μ g/ml) pegado a placa y anti-CD28 (2 μ g/ml) soluble, en presencia de TGF- β (5ng/ml). Se utilizaron células de ratones reporteros FOXP3-GFP, se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD25, FOXP3 y T β RIII, cada 24 horas durante 5 días de cultivo (**Figura 23**). Para el análisis de estos cultivos, evaluamos las células vivas CD4⁺ y, a partir de esta población, determinamos el porcentaje de células CD25⁺, FOXP3⁺. En la **Figura 23a** se muestra la gráfica del porcentaje de células T reguladoras obtenida con respecto a los días de cultivo para las condiciones de activación y activación + TGF- β . También evaluamos los niveles de expresión de CD25, FOXP3 y del T β RIII durante el cultivo de inducción, se determinó la MFI y se graficaron los niveles de expresión en relación con el cultivo sin TGF- β , el cual se normalizó a 1; las gráficas **23b-d** muestran el incremento relativo (RI) de expresión de CD24, FOXP3 y del T β RIII de las células bajo condiciones de inducción con respecto a las células sólo activadas.

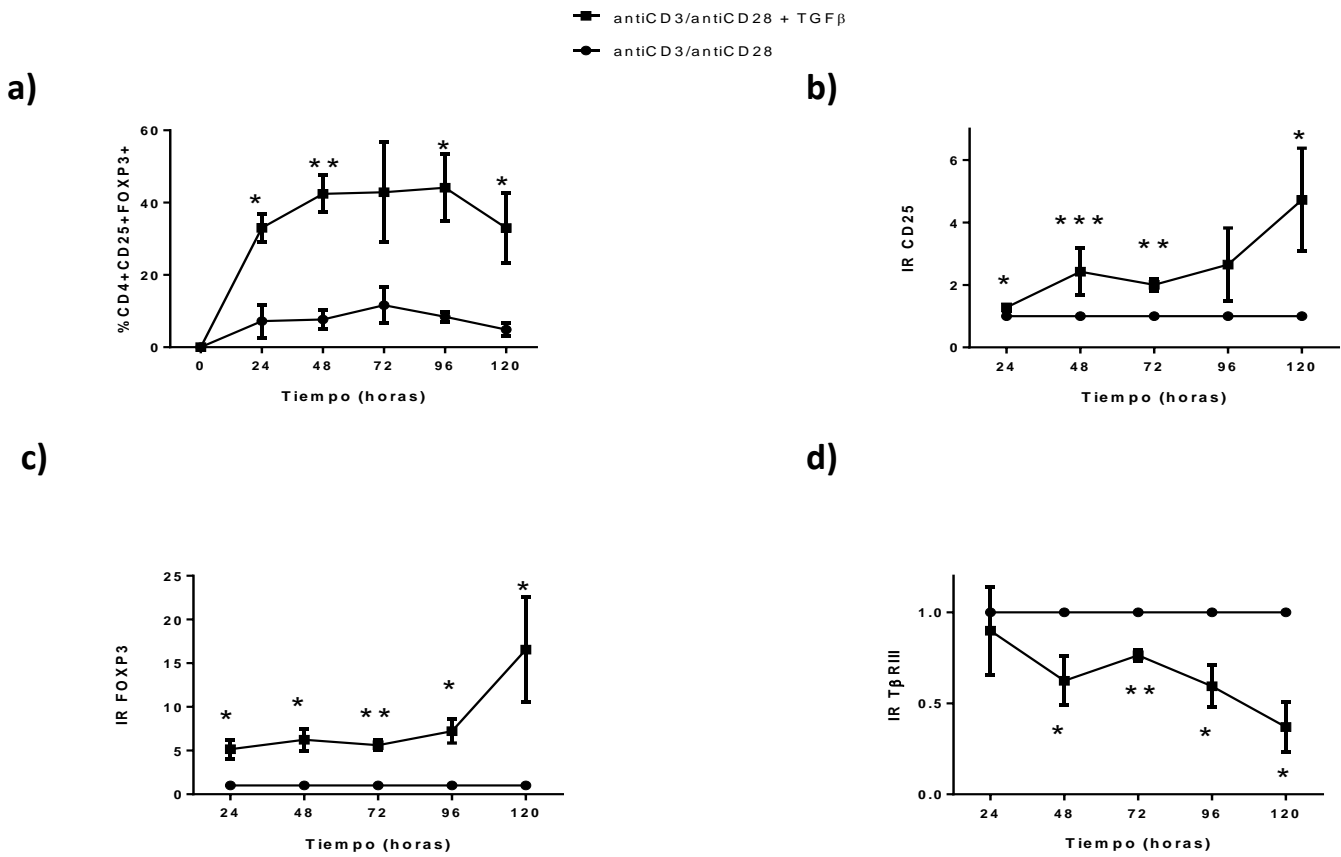


Figure 23. Expresión del TβRIII durante la inducción de células T reguladoras. Cultivo de células naïve activadas bajo condiciones subóptimas con anti-CD3 (1µg/ml) pegado a placa y anti-CD28 (2µg/ml) soluble o bajo condiciones de diferenciación de Tregs (activación subóptima + TGF-β). **a)** Gráfica de porcentaje de inducción de células T reguladoras (CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺) para ambas condiciones de cultivo. **b)** Gráfica de expresión relativa (RI) de CD25 en los cultivos de inducción en comparación con la activación subóptima. **c)** Gráfica de la expresión relativa de FOXP3 y **d)** Gráfica de la expresión relativa de TβRIII con respecto a la condición subóptima. Gráficas de promedio ± SEM. Análisis estadístico de *t-student*. *p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001 **** p≤0.0001 n=3.

Comparamos las células cultivadas en condiciones subóptimas en ausencia de TGF- β con las células bajo condiciones de inducción, observamos que el porcentaje de diferenciación de células T reguladoras es mayor al 60% después de los 3 días de cultivo, y decrece a 40% al día 5, probablemente debido a la muerte de las células después de varios días de activación. Observamos que el control negativo en ausencia de TGF- β mostró una inducción de células CD25⁺FOXP3⁺ menor al 20% a lo largo del cultivo. Al analizar la expresión relativa (RI) de CD25 y FOXP3 en los cultivos de inducción, en comparación con los cultivos de activación subóptima, observamos que incrementan los niveles de expresión durante el tiempo, y de manera muy interesante, observamos que disminuyen los niveles de expresión del T β RIII que concuerda con el aumento en la expresión de FOXP3.

9.1.4. El T β RIII es necesario para la inducción de células T reguladoras FOXP3⁺.

Por otro lado, nos preguntamos si el T β RIII tenía un papel importante para la inducción de células T reguladoras, por lo que utilizamos un anticuerpo policlonal bloqueante anti- T β RIII en cultivos bajo condiciones de diferenciación. Al término de 5 días de cultivo, evaluamos el porcentaje de células Tregs y observamos una inducción de hasta 80%, mientras que, con el anticuerpo bloqueante anti- T β RIII, observamos una disminución en el porcentaje de células diferenciadas en comparación con el control de suero preinmune (**Figura 24**). Como control utilizamos también la fracción soluble del β -Glicano (sT β RIII), que ya se ha

reportado como trampa de ligando del TGF- β [43, 44], observamos que, de forma esperada, disminuye significativamente la diferenciación, sin embargo, no disminuye a los mismos niveles que si usamos un anticuerpo bloqueante anti-TGF- β . Estos datos sugieren que el T β RIII juega un papel importante durante la diferenciación de células T reguladoras, posiblemente modulando la señalización mediada por TGF- β ; sería también importante evaluar su expresión y posible papel durante la diferenciación a otros subtipos funcionales de los linfocitos TCD4⁺, como las células efectoras.

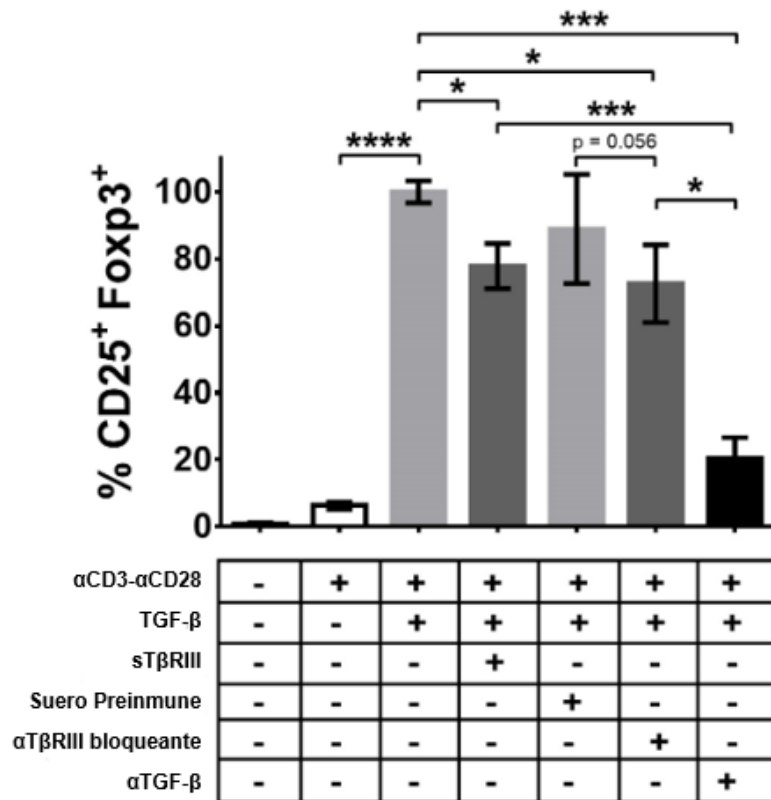


Figura 24. El T β RIII es necesario para la inducción de células T reguladoras. Cultivo de 5 días de células T naïve bajo condiciones de diferenciación de Tregs (activación subóptima + TGF- β) + sT β RIII, suero pre-inmune, con anticuerpo bloqueante anti T β RIII o con anticuerpo bloqueante anti-TGF- β . Las gráficas de barras muestran el promedio \pm SEM. Análisis estadístico de t-student. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. n= 3

9.1.5. La expresión del T β RIII es menor en células T reguladoras humanas FOXP3⁺

Después de caracterizar la expresión del T β RIII en linfocitos murinos, nos preguntamos cómo se encontraba la expresión de este correceptor en células humanas, analizamos linfocitos TCD3⁺CD4⁺, TCD3⁺CD8⁺ y linfocitos B (CD19⁺) y observamos que alrededor del 60% de los linfocitos T expresan T β RIII y sólo alrededor del 30% de los linfocitos B lo expresaban; lo cual coincide con lo observado en células de ratón. Interesantemente, en células humanas de sangre periférica, son los linfocitos TCD8⁺ los que mayores niveles de expresión tienen (**Figura 25**), posiblemente esta expresión diferencial se relacione con una función diferente en el linaje CD8⁺, o esté asociada a las condiciones medioambientales a las que están expuestos los donadores humanos, sin embargo, no hay reportes acerca de esto. Para el análisis de las células humanas de sangre periférica, se evaluaron las células vivas y a partir de esta población, se evaluó la población CD19⁺ y la población CD3⁺ como se muestra en el dot plot de la **Figura 25a**; también evaluamos las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ como se muestra en la **Figura 25b**. Para cada una de estas poblaciones analizamos el porcentaje de células T β RIII⁺ con base en el control FMO (**Figura 25c**); y en la gráfica **25d** se muestran los histogramas para la evaluación de los niveles de expresión del T β RIII para cada población en blanco y en gris se muestra el histograma del control FMO. El resumen de los resultados de 9 donadores distintos se muestra en las gráficas **25e y 25f**.

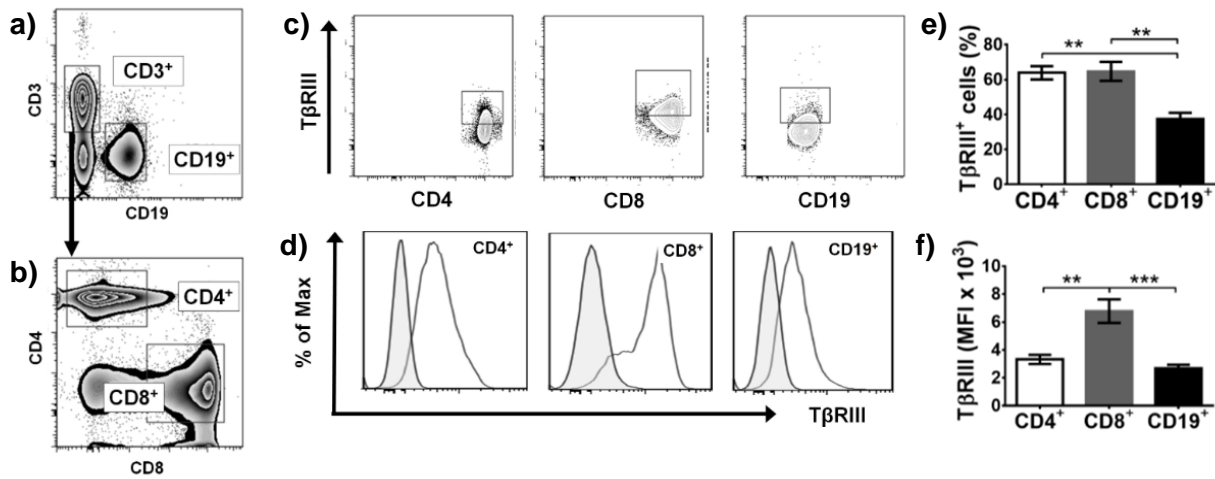


Figura 25. Expresión del β -Glicano (T β RIII) en células humanas de sangre periférica. a) Estrategia de análisis para las poblaciones linfocíticas T (CD3⁺) y linfocitos B (CD19⁺). **b)** Estrategia de análisis para evaluar la población CD4⁺ y CD8⁺. **c)** Dot plots representativos de la evaluación del porcentaje de células T β RIII⁺ para cada tipo celular. **d)** Histogramas representativos de los niveles de expresión del T β RIII en las diferentes poblaciones, el histograma gris representa el control FMO. **e)** Gráficas de porcentaje de células T β RIII⁺ y **f)** gráficas de MFI de expresión del T β RIII en células TC4⁺, TCD8⁺ y células B. Las gráficas de barras muestran el promedio \pm SEM. Análisis estadístico de t-student. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. n= 9.

También evaluamos la expresión del T β RIII en células T reguladoras humanas, las cuales se caracterizan por expresar CD25^{hi} y CD127^{lo} [176] dentro de los linfocitos TCD4⁺, estas células corresponden a las células FOXP3⁺. Para el análisis de las células T reguladoras, se evaluaron las células CD4⁺ y a partir de esta población se evaluó a expresión de CD25 y CD127, eligiendo las células CD25^{hi},CD127^{lo} (**Figura 26a**); para esta última población se evaluó la expresión de FOXP3 y se encontró que más del 90% de la población evaluada expresa FOXP3; también evaluamos la expresión del factor de transcripción Helios, ya que se ha propuesto como posible marcador de células T reguladoras tímicas [177], y observamos que más del 70% de la población CD25^{hi},CD127^{lo} expresa este marcador. Posteriormente evaluamos

la expresión del T β RIII para la población CD25⁻, la población CD25⁺, la cuál se analizó a partir de las células TCD4⁺; y para la población reguladora CD25^{hi}, CD127^{lo} (**Figura 26b**), el histograma gris corresponde al control FMO. La gráfica de expresión del T β RIII se muestra en la **Figura 26c**, como intensidad media de fluorescencia (MFI). Nuevamente encontramos que las células T reguladoras tienen menores niveles de expresión del T β RIII en comparación con las células CD25⁻, también observamos que las células FOXP3⁻ CD25⁺(activadas) son las que presentan mayores niveles de expresión de este proteoglicano, lo cual coincide con lo observado en células murinas.

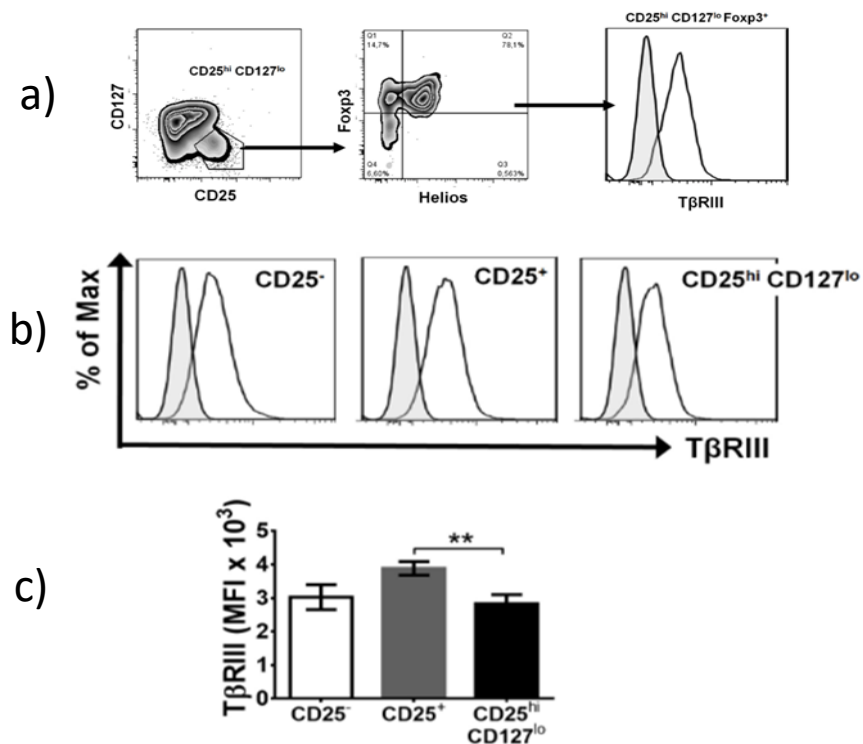


Figura 26. Expresión del T β RIII en células T reguladoras humanas de sangre periférica. a) estrategia de análisis para la evaluación de la población TCD4⁺, a partir de la cual se analizan las células dependiendo de la expresión de CD25, CD127 y posteriormente FOXP3 y Helios. **b)** Evaluación de niveles de expresión del T β RIII en las diferentes poblaciones analizadas. El histograma gris corresponde al control FMO. **c)** Gráfica de MFI de expresión del T β RIII en células TCD4⁺: CD25⁻ FoxP3⁻, CD25⁺ FoxP3⁻, y CD25^{hi}CD127^{lo} FoxP3⁺. La gráfica de barras muestra el promedio \pm SEM. Análisis estadístico de t-student. *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01.

9.1.6. La expresión del T β RIII incrementa a través de la señalización por el TCR, pero no durante la inducción de Tregs en células humanas.

Evaluamos también la expresión del T β RIII en células T humanas tras la activación del TCR *in vitro* y bajo condiciones de inducción de células T reguladoras. Se cultivaron células TCD4⁺ naïve bajo condiciones de activación óptima con 10 μ g/ml de anti-CD3 y anti-CD29; también evaluamos una condición con activación subóptima con 1 μ g/ml de entrecruzamiento; y finalmente, una condición de inducción para Tregs, con activación subóptima + TGF- β . Evaluamos la expresión de CD25, FOXP3 y TGF- β en las células CD4⁺ vivas cada 24 horas durante 6 días. En la **Figura 27a** se muestra la gráfica de MFI de CD25 de todas las condiciones evaluadas, en la gráfica **27b** se muestra la MFI de FOXP3 y en la gráfica **27c** se muestra la MFI del T β RIII a lo largo de los días evaluados. Observamos que, en todas las condiciones evaluadas, incrementa la expresión de CD25 a través del tiempo, mientras que la expresión de FOXP3 incrementa transitoriamente en las células activadas y se establece bajo condiciones de inducción de Tregs. De manera muy interesante, la expresión del T β RIII incrementa a partir de las 96 horas en las células activadas, pero bajo condiciones de inducción de Tregs no se observa ningún incremento en la expresión de este correceptor (**Figura 27**).

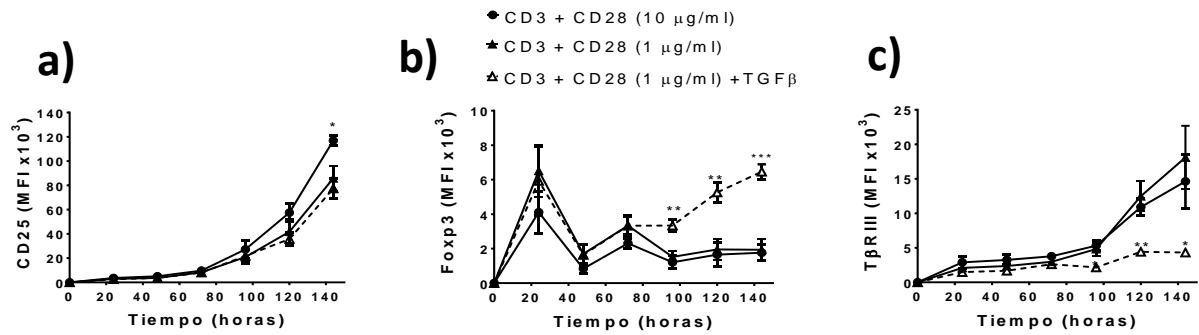


Figura 27. Expresión del TβRIII, CD25, y FOXP3 durante la activación de células TCD4⁺ y la inducción de Tregs. Se analizó la expresión del TβRIII, CD25 y FOXP3 a las 24, 48, 72, 96, 120 Y 144 horas en células T naïve sorteadas y activadas con un estímulo óptimo anti-CD3/anti-CD28 (10μg/ml), un estímulo subóptimo (1 μg/ml) y subóptimo en presencia de TGF-β. **a)** Gráfica de la MFI de CD25, **b)** Gráfica de MFI de la FOXP3 y **c)** Gráfica de la MFI del TβRIII. Las líneas con círculos indican la activación óptima, las de triángulos rellenos la activación suóptima, y la de triángulos vacíos la activación subóptima + TGF-β. Las gráficas muestran el promedio ± SEM. Análisis estadístico de t-student. *p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001. n= 6

9.2. Papel de las Inhibinas en la activación y diferenciación funcional de linfocitos T.

9.2.1. Los linfocitos T $Inh\alpha^{-/-}$ expresan menos T β RIII después de la activación

Puesto que demostramos que las distintas poblaciones de linfocitos T expresan niveles diferentes del T β RIII, evaluamos su expresión en el ratón $Inh\alpha^{-/-}$ en homeostasis, analizando los subtipos periféricos de células T CD4⁺ en ratones de 4 semanas y se compararon con células $Inh\alpha^{+/+}$.

Analizamos las células TCD4⁺ totales y de esta población, analizamos las poblaciones naïve (CD44^{lo}, CD62L^{hi}, CCR7⁺), de memoria central (CD44^{hi}, CD62L⁺, CCR7⁺) y de memoria efectora (CD44^{hi}, CD62L⁻, CCR7⁻) de bazo (S), nódulos linfáticos periféricos (PLN) y nódulos linfáticos mesentéricos (MLN), siguiendo la misma estrategia de análisis que en la **Figura 19**.

En las gráficas de la **Figura 28a, b y c**, se muestran los porcentajes de células que expresan el T β RIII en los distintos órganos evaluados. No observamos ninguna diferencia entre las células provenientes de los ratones deficientes de Inhibinas en comparación de las células silvestres. En cuanto a los niveles de expresión de este correceptor, en las gráficas **28d, e y f**, se muestran la expresión del T β RIII normalizando a 1 la expresión de los ratones silvestres, por lo que los valores se muestran como incremento relativo (IR). Tampoco observamos diferencias significativas entre las células $Inh\alpha^{-/-}$ con respecto a las $Inh\alpha^{+/+}$, sólo observamos una tendencia a una disminución en la expresión del T β RIII en las células de

memoria central $Inh\alpha^{-/-}$ en los ganglios mesentéricos, sin embargo, la diferencia no es significativa.

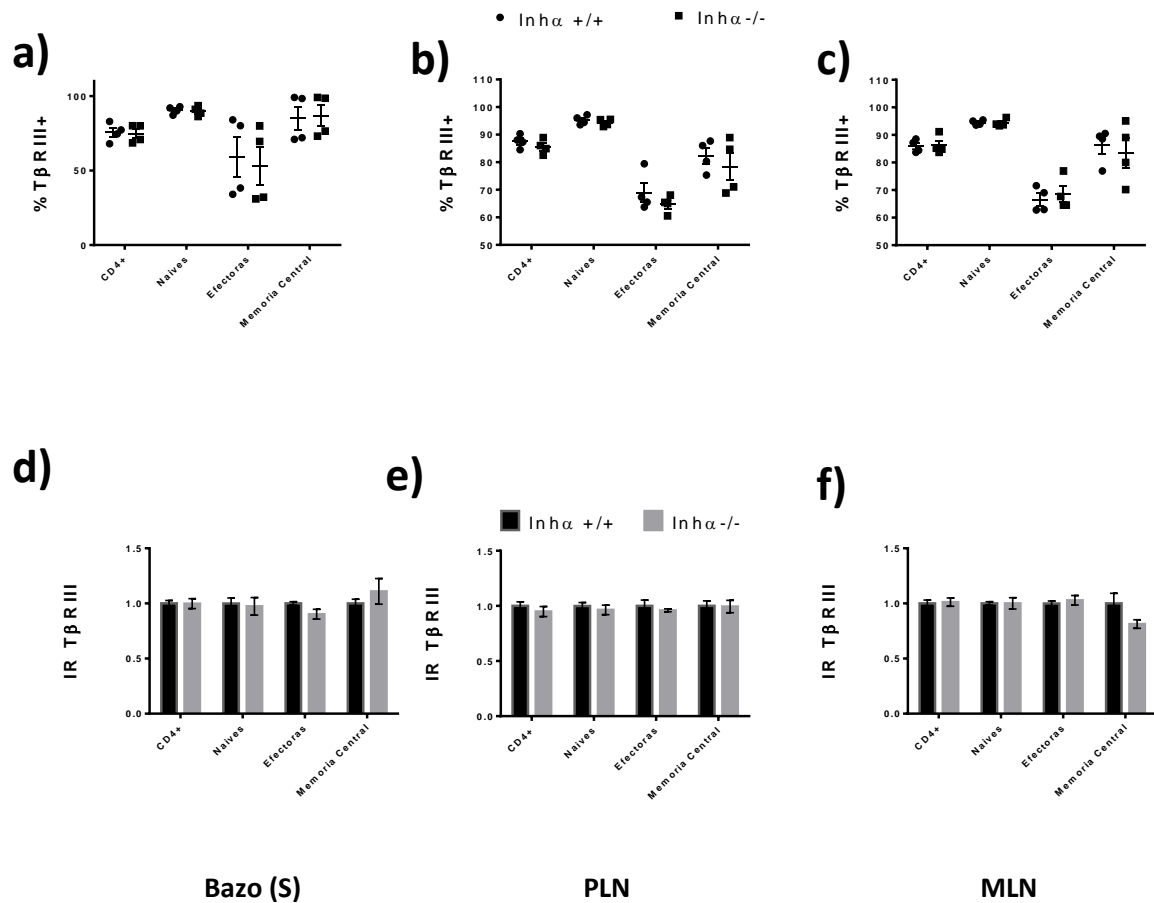


Figura 28. Expresión de TβRIII en linfocitos T $Inh\alpha^{-/-}$ en homeostasis. Frecuencia de células TβRIII⁺ en linfocitos T CD4⁺ células naives (CD44^{lo}CD62L^{hi}CCR7⁺), de memoria central (CD44^{hi}CD62L⁺CCR7⁺), y memoria efectora (CD44^{hi}CD62L⁻CCR7⁻) de ratones $Inh\alpha^{+/+}$ e $Inh\alpha^{-/-}$; en **a)** bazo, **b)** nódulos linfoides periféricos (PLN), y **c)** nódulos linfoides mesentéricos. Gráficas de incremento relativo de expresión del TβRIII en células e $Inh\alpha^{-/-}$ con respecto a las células $Inh\alpha^{+/+}$ para las diferentes poblaciones evaluados en: **d)** bazo, **e)** PLN, y **f)** MLN. Las gráficas muestran el promedio ± SEM. n=4

Además, al observar que los niveles del TβRIII incrementan cuando los linfocitos T se activan y que sigue la cinética de expresión que los marcadores típicos de

activación, evaluamos la expresión de este proteoglicano durante la activación de linfocitos T $Inh\alpha^{-/-}$ y los resultados se muestran en la **Figura 29**.

Se aislaron y activaron células T naïve de ratones deficientes de Inhibina y de ratones silvestres, se analizó el porcentaje de células $T\beta RIII^{+}$, así como los niveles de expresión de este correceptor de manera basal, a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas. No se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de células $T\beta RIII^{+}$, sin embargo, se observó una menor expresión de $T\beta RIII$ en las células deficientes de Inhibinas comparación con las células $Inh\alpha^{+/+}$ a las 24 horas; además también se observa menor expresión a las 48 y 96 horas. Estos datos sugieren que las inhibinas podrían modular la expresión del $T\beta RIII$ durante la activación de los linfocitos T.

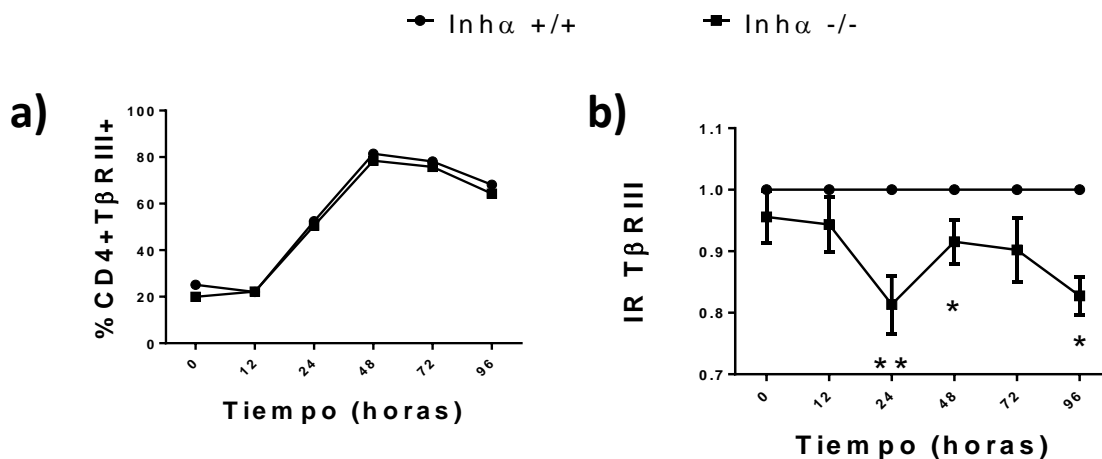


Figura 29. Expresión del $T\beta RIII$ durante activación de los linfocitos T. Se aislaron células T naïve con anti-CD3, anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) ratones $Inh\alpha^{+/+}$ e $Inh\alpha^{-/-}$; y se evaluó la expresión del $T\beta RIII$ a 0, 12, 24, 48 y 72 horas. a) Gráfica de porcentaje de células $T\beta RIII^{+}$, b) Gráfica de IR de la expresión del $T\beta RIII$ de las células $Inh\alpha^{-/-}$, respecto a las células silvestres. Las gráficas muestran el promedio \pm SEM. Análisis estadístico de t-student. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. n= 4

9.2.2. Las células T naïve de los ratones $Inh\alpha^{-/-}$ tienen un defecto en la activación.

Antecedentes del laboratorio muestran que, durante el desarrollo tímico, la Inhibina es el mayor ligando de la superfamilia que se encuentra expresado en el timo y que los timocitos expresan el mensajero tanto de las subunidades que constituyen a las Inhibinas, como de los receptores de Activinas. Debido a que la Inhibina es una proteína de secreción, en trabajos previos en el laboratorio, se evaluó la capacidad de los linfocitos T de producir Inhibina que pudiera actuar de manera autocrina. Datos recientes indican que los linfocitos T al ser activados, secretan Inhibina A, con un pico de 100 pg/ml a las 72 horas (manuscrito en preparación). Este hallazgo, indicó que las Inhibinas podrían tener un papel importante durante la activación de los linfocitos T, por lo que decidió evaluar la activación, a través de la expresión de los marcadores típicos de activación durante una cinética de activación de linfocitos T $Inh\alpha^{-/-}$ y $Inh\alpha^{+/+}$. Para ello los linfocitos T $CD4^{+}$ naïve se aislaron y se cultivaron bajo condiciones de activación con 1 μ g/ml de anti-CD3 y de anti-CD28 pegado a placa y se evaluaron los marcadores clásicos de activación (CD44, CD69 y CD25) a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo (**Figura 30**).

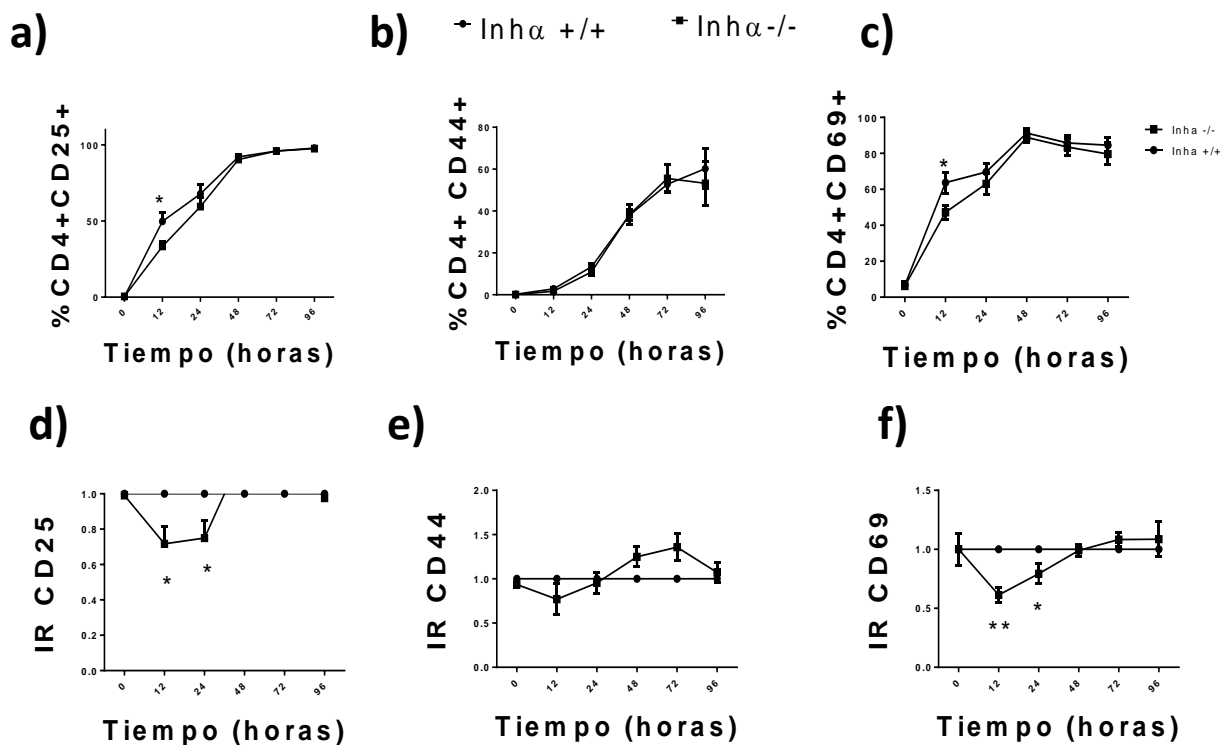


Figura 30. Cinética de activación de los linfocitos TCD4⁺ Inhα^{+/+} e Inhα^{-/-}. Se aislaron células naïve y se activaron con anti-CD3, anti-CD28 (1 µg/ml). Se evaluó la expresión de CD25, CD44, y CD69 a 0, 12, 24, 48 y 72 horas. a) Gráfica del porcentaje de células TCD4⁺CD25⁺. b) Gráfica del porcentaje de células TCD4⁺CD44⁺. c) Gráfica del porcentaje de células TCD4⁺CD69⁺. d) Gráfica de incremento relativo (IR) de expresión de CD25 de las células Inhα^{-/-} con respecto a las células Inhα^{+/+}. e) Gráfica de IR de la expresión de CD44. f) Gráfica de IR de expresión de CD69. Las líneas con puntos circulares representan las células Inhα^{+/+}, mientras que las células con cuadrados representan a las células Inhα^{-/-}. Las gráficas muestran el promedio ± SEM. Análisis estadístico de t-student. *p≤0.05, ** p≤0.01. n= 4

Se analizó la activación con base en el porcentaje de células CD4⁺ que expresaban CD25 (**Figura 30a**), CD44 (**Figura 30b**) y CD69 (**Figura 30c**). Se observa una disminución en el porcentaje de células CD25⁺ y CD69⁺ a las 12 horas en el cultivo de células Inhα^{-/-} en comparación con el de células Inhα^{+/+}. En cuanto a los niveles de expresión de cada uno de los marcadores, se normalizó la expresión con base en los niveles de expresión de las células silvestres a 1.

Se graficó el incremento relativo (IR) de expresión de CD25 (figura 24d), CD44 (figura 24e) y de CD69 (figura 24f) de las células $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ con respecto a las $\text{Inh}\alpha^{+/+}$.

Se observa que en las células $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ tienen un defecto en la activación a las 12 y 24 horas, ya que las células presentan una disminución significativa de expresión de los marcadores tempranos CD25 y CD69, similar a lo que se observa con el $\text{T}\beta\text{RIII}$, en comparación en su contraparte $\text{Inh}\alpha^{+/+}$. Aunque se observa una pequeña diferencia en los niveles de expresión de CD44, no es significativa. Los datos nos indican un retraso en la activación temprana, por lo que se propone evaluar la fosforilación de cinasas representativas de la vía de señalización río abajo del TCR y del coestimulo, como Zap 70, Erk, Akt y c-Cbl.

9.2.3. La ausencia de inhibinas tiene un efecto negativo en la diferenciación de los linfocitos Th1 y favorece la diferenciación Th17.

En trabajos en colaboración, hemos observado que en un modelo murino donde se deleta condicionalmente el T β RIII en células TCD4⁺ maduras (*Tgfb β 3^{fl/fl}.dLckCre*), hay un incremento en la diferenciación hacia el subtipo efector Th1a partir de células T naïve en comparación con células silvestres [173]. Puesto que nosotros observamos que las células deficientes de Inhibina tienen una menor expresión del T β RIII cuando se activan y también tienen defectos en la activación temprana; y debido a que los linfocitos Th1 requieren una señal fuerte del TCR, mientras que la diferenciación Th17 se favorece por una intensidad menor de la señal [23, 36], a continuación, se evaluó si existía un defecto en la diferenciación de los linfocitos *Inh α ^{-/-}*. Con la finalidad de evaluar el efecto intrínseco de la ausencia de inhibinas en las células T, se utilizó un modelo de activación de linfocitos T en ausencia de células presentadoras de antígeno. Se evaluó la diferenciación de células T efectoras a partir de linfocitos T naïve (CD4⁺, CD25⁻, CD62L^{hi}, CD44^{lo}) utilizando 1 μ g/ml de anti CD3 y de anti-CD28 pegado a placa, en presencia del cóctel de citocinas correspondiente para la diferenciación Th1 y Th17. Se determinó el porcentaje de diferenciación Th1 como las células CD4⁺ productoras de IFN- γ y de células Th17 como células CD4⁺, IL-17⁺. Se evaluó la diferenciación Th1 y Th17 a partir de células T naïve aisladas de ratones hembra de 4 semanas *Inh $\alpha^{+/+}$* en comparación con las aisladas de ratones *Inh $\alpha^{-/-}$* . Se analizó el cultivo a 3 días (previamente estandarizado) de incubación con cada cóctel de diferenciación

mediante citometría de flujo. Se realizaron 3 experimentos aislados con triplicados para la diferenciación Th1, después de 3 días de cultivo, se re-estimularon las células con PMA-Ionomicina en presencia de Brefeldina A, para favorecer el acúmulo intracelular de citocinas. Se realizó la tinción para el análisis por citometría de flujo, se incluyó: un marcador de viabilidad (zombie Nir), anti-CD4, y la tinción intracelular con anti-IFN- γ , después de permeabilizar las células. La estrategia de análisis que se siguió fue la siguiente: se eligieron las células vivas como aquellas negativas a Zombie Nir; dentro de las células vivas se eligieron las CD4⁺ y a partir de esta región, se analizaron las células productoras de IFN- γ (**Figura 31**).

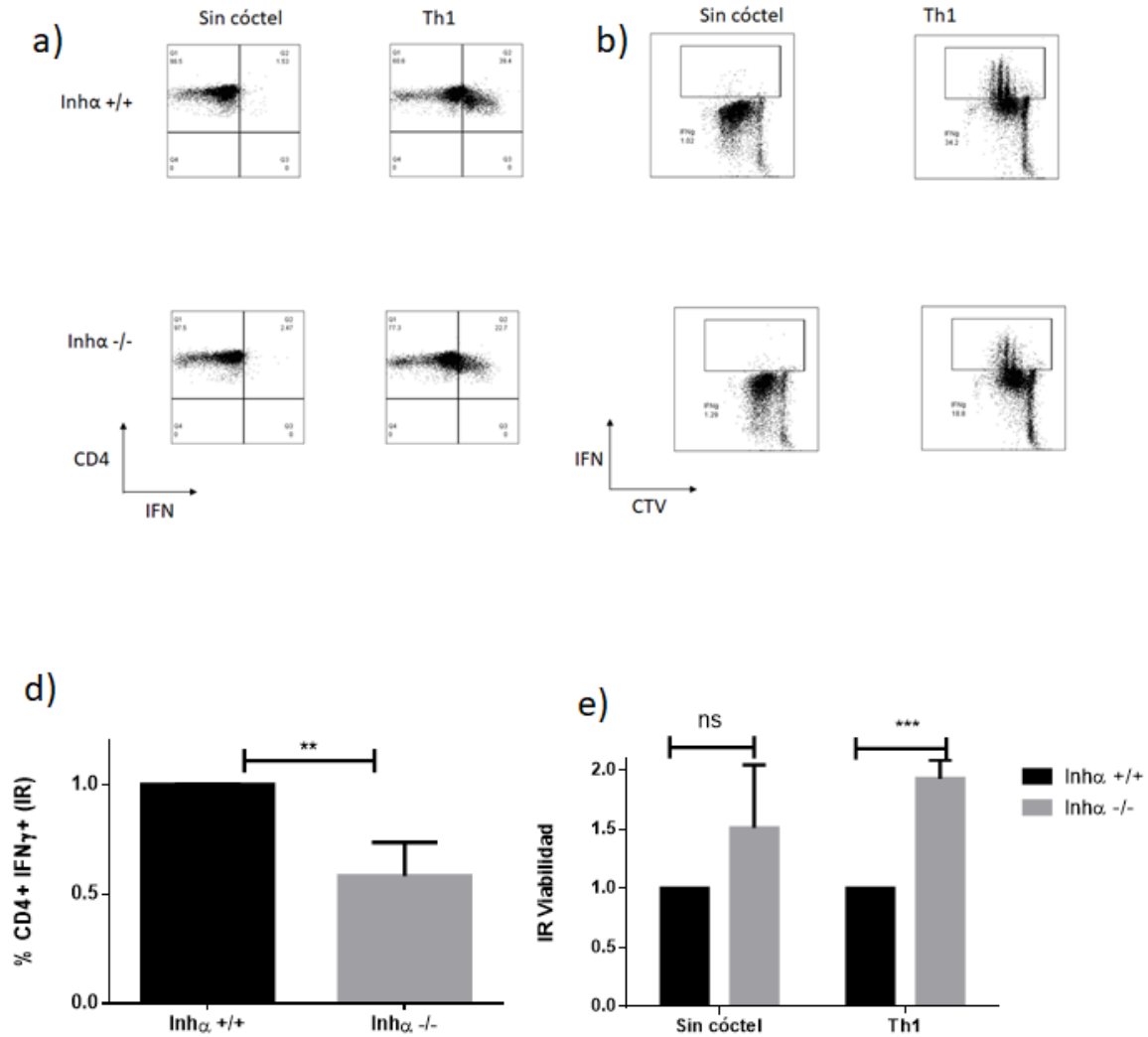


Figura 31. Diferenciación Th1 de linfocitos T deficientes de Inhibinas. Se asilaron células T naïve y se activaron en el modelo policlonal con estímulo anti-CD3, anti-CD28 (1 µg/ml) con o sin el cóctel de diferenciación Th1. **a)** Dot plots representativos de células CD4⁺ IFN-γ⁺ y **b)** de células proliferantes CTV⁺ CD4⁺ IFN-γ⁺, **c)** Gráficas de incremento relativo con respecto a las condiciones sin diferenciación (Sin cóctel). **d)** Gráficas de incremento relativo en el porcentaje de viabilidad, con respecto a las células $Inh\alpha^{+/+}$. Las gráficas muestran el promedio ± SEM. Análisis estadístico – t de student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p \leq 0.001$. n = 3

Se observó una disminución significativa en la diferenciación hacia el linaje Th1 de las células $Inh\alpha^{-/-}$ en porcentaje de células diferenciadas, en comparación con las células $Inh\alpha^{+/+}$. Se evaluó la producción de IFN-γ en las células CD4⁺ proliferantes (CTV⁺) y se observó que la producción de IFN-γ comienza a partir del tercer ciclo

de proliferación en los linfocitos $\text{Inh } \alpha^{-/-}$ en comparación con su contraparte silvestre, en la cual empieza a partir del segundo ciclo de proliferación. Por otro lado, al analizar la viabilidad en los cultivos, observamos que las células deficientes de Inhibina presentan mayor porcentaje de viabilidad con respecto a las células suficientes, se encontró un incremento significativo en condiciones de diferenciación Th1. Por lo tanto, las células $\text{Inh } \alpha^{-/-}$ tienen un defecto en la diferenciación hacia el subtipo Th1, a pesar de ser células más resistentes a la muerte.

En cuanto al linaje Th17, se observó que las células T $\text{Inh } \alpha^{-/-}$ incrementan los niveles de producción de IL-17, bajo condiciones de diferenciación, en comparación con las células $\text{Inh } \alpha^{+/+}$ (**Figura 32**).

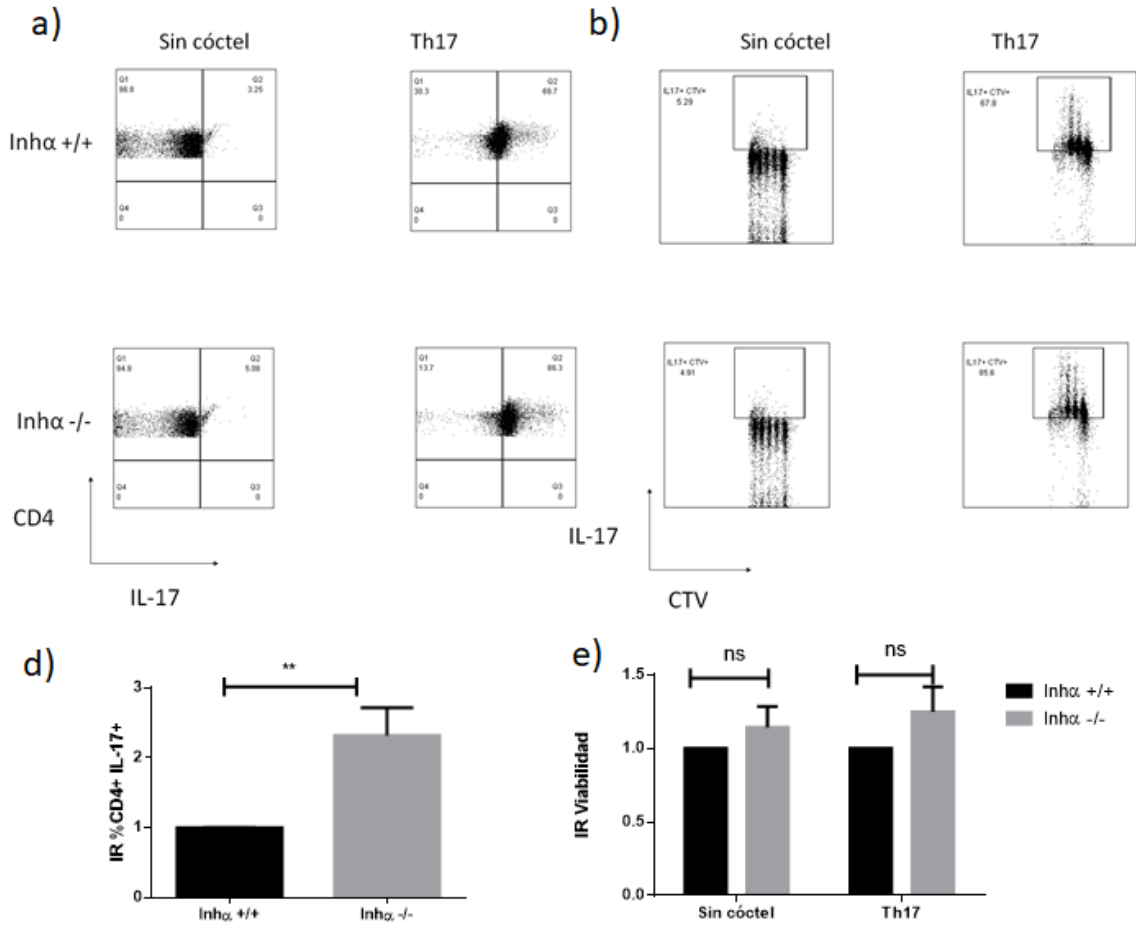


Figura 32. Diferenciación Th17 de linfocitos T deficientes de Inhibinas. Se asilaron células T naïve y se activaron en el modelo policonal con estímulo anti-CD3, anti-CD28 (1 µg/ml) con o sin el cóctel de diferenciación Th17. **a)** Dot plots representativos de células CD4⁺ IL-17⁺ y **b)** de células proliferantes CTV⁺ CD4⁺ IL-17⁺, **c)** Gráficas de incremento relativo con respecto a las condiciones sin diferenciación (Sin cóctel). **d)** Gráficas de incremento relativo en el porcentaje de viabilidad, con respecto a las células *Inhα*^{+/+}. Las gráficas muestran el promedio ± SEM. Análisis estadístico – t de student. *p<0.05, **p<0.01. n= 3

10. DISCUSIÓN

Se ha estudiado el papel que tiene el TGF- β en la respuesta inmune en varios contextos. Esta citocina ha sido catalogada como citocina anti-inflamatoria por excelencia [178], y ha tomado gran relevancia su estudio en el contexto de tolerancia, por ser fundamental para la inducción de linfocitos T reguladores FOXP3⁺ [179]. Incluso, se ha propuesto que la regulación de la expresión y función de esta citocina se puede regular desde varios blancos para el tratamiento de diferentes enfermedades como enfermedades autoinmunes, cáncer, o rechazo al trasplante [180]. Su importancia en el contexto de desarrollo, activación y diferenciación de los linfocitos T, ha sido ampliamente demostrada [33, 46, 181, 182]. Específicamente, en cuanto a la activación de los linfocitos T, se ha observado que el TGF- β inhibe la activación y proliferación de éstos [182]. En cuanto a la diferenciación de linfocitos T, se sabe que es una citocina indispensable, no sólo para la inducción de Tregs, sino también para la diferenciación de subtipos efectores como Th17 y Th9 [53]. Además, que se ha observado que tiene un papel durante los procesos de plasticidad de las células efectoras-reguladoras, como es el caso de Th17-Tregs, Th17-Tr1, Th1-Th17, etc [183-185].

Recientemente, han tomado importancia otros miembros de la superfamilia del TGF- β en la respuesta inmune, tomando en cuenta que no sólo tienen homología estructural, sino que se expresan ampliamente en células de la respuesta inmune y que comparten tanto receptores como vías canónicas de señalización. Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el papel que tiene la superfamilia de las Activinas, específicamente las Inhibinas y su par molecular el T β RIII, durante el

desarrollo tímico [69, 172]. Sin embargo, se desconocía el papel de las inhibinas y el T β RIII en los linfocitos T maduros.

En este trabajo evaluamos por primera vez la expresión del T β RIII en las poblaciones de linfocitos en periferia y observamos que este correceptor se expresa preferentemente en los linfocitos CD4⁺, es la población con mayor porcentaje de células que expresan el receptor y además la que lo expresa en mayores niveles (mayor intensidad media de fluorescencia) en comparación con otras poblaciones de linfocitos. Dentro de esta población de células CD4⁺, el mayor porcentaje de células que expresaron el T β RIII, fueron las células T naïve; sin embargo, al analizar los niveles de expresión de este proteoglicano, se observó que, en ganglios periféricos y mesentéricos, la población con mayores niveles de expresión correspondía a la población de memoria central (**Figura 19**). Debido a su patrón de expresión, podríamos sospechar que pudiera también estar funcionando como un receptor de “*homing*”, se sabe que T β RIII tiene un papel importante durante la metástasis, ya que se ha descrito que varios tipos de cáncer pierden la expresión de este correceptor, lo que favorece la migración de las células cancerígenas [107]. Las células de memoria central se caracterizan por expresar CCR7 y CD62L, dos receptores de *homing*, que se requieren para la extravasación de venulas endoteliales y la migración a órganos linfoides secundarios, por lo que las células de memoria central se encuentran enriquecidas en órganos linfoides, mientras que las células de memoria efectora se encuentran mayoritariamente en pulmón, hígado y mucosas [186].

Otra población importante de células CD4⁺ que se encuentran en circulación, son las células T reguladoras FOXP3 positivas, evaluamos la expresión del T β RIII, y de manera interesante, observamos que esta población expresa significativamente, niveles menores de este correceptor en comparación con las células CD4⁺ que no expresan FOXP3. En un trabajo publicado en el 2007, se observó que las células reguladoras expresaban a la baja el mensajero del T β RIII [175] , sin embargo, no se había evaluado su expresión a nivel proteína. Evaluamos también la población de células T reguladoras tímicas, y observamos que igual que en periferia, las tTregs expresan niveles menores del T β RIII en superficie (**Figura 20**). Estos datos coinciden con lo reportado a nivel transcripcional, en dicho trabajo se propone que es la expresión de FOXP3 la que regula a la baja la transcripción del T β RIII y no el TGF- β , ya que realizando una expresión ectópica de FOXP3, se observa este efecto. Nuestros hallazgos sugieren que podría ser a través de la expresión de FOXP3, ya sea directa o indirectamente, que se regule la expresión del T β RIII ya que se ha reportado que las tTregs no requieren TGF- β para su inducción como las pTregs [187].

Regresando a la evaluación de las subpoblaciones en periferia, observamos de manera interesante que las células CD25⁺, que podrían corresponder a las células activadas, expresan mayores niveles del T β RIII. Tomando también en cuenta un trabajo previo en el laboratorio, donde al evaluar los estadios de diferenciación de los timocitos, se observó que el estadio DN3 era el que mayores niveles de expresión presentaba, y en el estadio DN4 disminuye la expresión del T β RIII sugiriendo una regulación mediada por la señalización del pre-TCR [172]. Otro

indicio importante fue que las células SP presentan mayores niveles de expresión de este correceptor en comparación con las células DP, lo que sugiere que también podría modularse su expresión durante la selección positiva, y finalmente, las células más funcionalmente maduras CD4 y CD8 SP (CD69⁺CD62L^{+/hi}) presentan también niveles incrementados del TβRIII. Estas observaciones nos llevaron a preguntarnos si el TβRIII se modulaba por activación de los linfocitos T. Para lo cual aislamos linfocitos T naive por sorting y evaluamos su activación cada 24 horas por 5 días. Observamos que un comportamiento similar en la expresión del TβRIII con los demás marcadores de activación evaluados, lo cual indica que el TβRIII se induce por la activación de los linfocitos T (**Figura 22**).

Dado que se ha demostrado que las Inhibinas y el TβRIII actúan como par molecular en diferentes procesos celulares [84]; y que en trabajos previos en nuestro grupo de investigación se demostró que las Inhibinas y el TβRIII tienen patrones de expresión similares en los timocitos durante el desarrollo en timo [69, 172], nos preguntamos si la expresión del TβRIII estaba alterada en las células deficientes de Inhibinas. Nuestro primer acercamiento fue comparar la expresión de este receptor en las poblaciones de linfocitos T periféricos en homeostasis, no encontramos diferencias en los niveles de expresión en la población de CD4⁺ totales ni en las subpoblaciones naive, de memoria central y ni de memoria efectora. Sin embargo, al evaluar la expresión del TβRIII durante la activación, observamos que las células Inh $\alpha^{-/-}$ expresaban menores niveles en comparación con su contraparte silvestre (**Figura 29**), de igual forma que los marcadores de activación evaluados (**Figura 30**). El hecho de que la expresión del TβRIII sea menor durante la activación en ausencia

de Inhibinas, nos hace sospechar que se las Inhibinas están involucradas en la expresión de este correceptor, sin embargo, aún quedan varias interrogantes por esclarecer, sobre todo en el contexto de diferenciación y activación de los linfocitos T

Por lo observado en las células T reguladoras periféricas y tímicas, nuestra siguiente interrogante fue, cómo era la expresión de este correceptor durante la diferenciación *in vitro* de las células T reguladoras (iTregs). En una cinética de inducción, evaluamos la expresión de CD25, FOXP3 y T β RIII. De manera interesante, observamos que la expresión del T β RIII disminuía en concordancia con el aumento de FOXP3 (**Figura 23**). Este dato concuerda con que FOXP3 regula a la baja la expresión del T β RIII y no sólo la presencia del TGF- β , como ya se ha reportado anteriormente [175]. El hecho de que se observó una menor expresión del T β RIII tanto en las células T reguladoras tímicas, que no dependen de TGF- β para su diferenciación, como en las periféricas o de las inducidas que si requieren TGF- β , apoya la hipótesis de que FOXP3 regula negativamente al T β RIII de manera independiente a TGF- β .

Recientemente publicamos que en los ratones deficientes de Inhibinas se encuentran disminuidas las células T reguladoras periféricas [166], además se observó que en células T naïve *Inh α ^{-/-}* se favorece la diferenciación de células T reguladoras *in vitro*, en comparación con su contraparte silvestre (Tesis de doctorado, Marisol de la Fuente, 2019). Para evaluar si el T β RIII tenía algún papel durante la inducción de las iTregs, agregamos anti-T β RIII bloqueante a los cultivos de inducción, y como control de inhibición de la inducción, agregamos anti-TGF- β

bloqueante y la fracción soluble del T β RIII, que ya se ha reportado que puede actuar como trampa de ligando [130, 172] bloqueando la señalización mediada por el TGF- β . Observamos que el bloqueo del T β RIII en superficie, disminuye la inducción de iTregs, en comparación con su control de suero pre-inmune; sin embargo, la inducción no se abate a los mismos niveles que con el anti-TGF- β o con el sT β RIII (**Figura 24**) [188] lo cual nos indica que el T β RIII podría tener un papel importante en el inicio de la inducción hacia iTregs, probablemente favoreciendo la señalización mediada por el TGF- β pero posteriormente, disminuye su expresión, probablemente debida a la regulación a la baja por parte del factor de transcripción FOXP3, como se ha sugerido previamente [175].

Debido a que el modelo biológico del ratón deficiente del T β RIII es letal en su etapa embrionaria, se tienen muy pocos indicios del papel de este proteoglicano en la respuesta inmune. Recientemente nuestro grupo de colaboración reportó que en un modelo condicional deficiente del T β RIII (*Tgfb3^{ff}.dLckCre*), se observó un incremento en la diferenciación hacia el subtipo efector Th1 a partir de células T naïve en comparación con células silvestres [173]; sin embargo no se conoce si las Inhibinas podrían también estar involucradas en la diferenciación de células efectoras.

También en trabajos previos en el laboratorio se estudió el papel de las inhibinas en la biología de las células dendríticas [165] y de los linfocitos T [69]. En este contexto, resultados recientemente publicados por nuestro laboratorio, sustentan que las Inhibinas son proteínas importantes durante el desarrollo de los timocitos y para el balance adecuado de las células presentadoras de antígeno en el timo [189].

Además, demostramos que las Inhibinas son necesarias para la completa maduración y función de las células dendríticas, y este fenotipo tolerogénico, favorece la inducción de células T reguladoras tanto *in vivo* como *in vitro* [166]. Datos preliminares indicaron que los linfocitos T naïve al ser activados, eran capaces de secretar Inhibina A, teniendo un pico de secreción a las 96 horas, previo al pico de producción de Activina A (Tesis de doctorado Marisol de la Fuente 2019), lo cual nos llevó a pensar que posiblemente la Inhibina tenía un efecto autocrino sobre los linfocitos T. Estos antecedentes nos llevaron a preguntarnos si las Inhibinas también tenían un papel en la activación y diferenciación de las células T efectoras.

En este trabajo evaluamos el papel de las Inhibinas en la diferenciación Th1 y Th17. Con el modelo murino deficiente de Inhibina, cultivamos células T naïve bajo condiciones de diferenciación Th1 y observamos una disminución en la diferenciación de este subtipo efector, evaluada por la producción de IFN- γ (**Figura 31**). Se ha reportado que varios miembros de la superfamilia de TGF β también inhiben la diferenciación hacia el linaje Th1, incluidos TGF- β y algunas BMPs [190, 191]. Para saber si el efecto observado es debido a un proceso autocrino, se requiere cuantificar la producción de Inhibina en los sobrenadantes de cultivo de las células Inh $\alpha^{+/+}$, además de rescatar en sistema en los cultivos Inh $\alpha^{-/-}$ agregando Inhibina exógena (datos en proceso).

Por otro lado, se ha observado que eliminando el T β RIII específicamente en las células CD4 $^{+}$ en periferia, aumenta la diferenciación Th1 [173]. Siendo T β RIII un

receptor de alta afinidad a la Inhibina, también sería importante evaluar los niveles de este receptor en los linfocitos T diferenciados. Dado que suponemos que la Inhibina y el T β RIII actúan como un par molecular durante la diferenciación de timocitos, podríamos suponer un posible mecanismo dependiente de Inhibina y su receptor para la modulación de la diferenciación Th1. Esto se podría averiguar bloqueando el T β RIII con anticuerpos o bien con la forma soluble de T β RIII, que se ha demostrado que puede actuar como antagonista de las señales de TGF- β en el proceso de conversión de células T reguladoras inducidas (Ortega-Francisco et al. [188])

En cuanto a la diferenciación hacia el subtipo efector Th17, observamos un incremento en la producción de IL-17 en los cultivos de las células deficientes de Inhibina, en comparación con las células suficientes (**Figura 32**). Se ha reportado que la Activina también promueve la diferenciación hacia Th17 [164], por lo que, en primera instancia, podríamos sospechar un incremento de Activina en los cultivos deficientes de inhibina, para lo cual podríamos evaluar dicha producción en los cultivos con condiciones de diferenciación Th17. Sin embargo, en un trabajo previo, se ha evaluado la producción de Activina bajo condiciones de activación subóptima y no se encontró una diferencia significativa (Tesis de doctorado Marisol de la Fuente 2019) entre las células Inh $\alpha^{-/-}$ y las células silvestres. Otra posibilidad de las diferencias encontradas es una mayor respuesta hacia TGF- β en las células Inh $\alpha^{-/-}$, porque la falta de inhibina hiciera más disponible el T β RIII para su función correceptora hacia el TGF- β . Para responder estas interrogantes, sería importante evaluar, tanto los niveles de expresión del T β RIII en la superficie celular durante la

diferenciación Th17, ya que hemos observado una menor expresión de este correceptor bajo condiciones de activación, pero no bajo condiciones de diferenciación; tampoco sabemos si la Inhibina podría estar regulando la proteólisis del T β RIII. Y para conocer si el T β RIII es importante durante este proceso, podríamos bloquear con anticuerpo bloqueante anti-T β RIII y evaluar el papel de este receptor durante la diferenciación Th17.

Otra posibilidad en cuanto a los resultados observados Th1/Th17, es la diferente capacidad de activación de las células deficientes de Inhibina, ya que se ha reportado que se requiere una mayor activación para la diferenciación hacia Th1 y una baja activación para el subtipo Th17 [36]. Debido a lo anterior, evaluamos el papel que tenía la Inhibina durante la activación a través del TCR, y observamos que las células naive activadas policlonalmente con una concentración óptima de anti-CD3 y anti-CD28, no alcanzan los niveles de expresión de los marcadores de activación evaluados (CD25, CD69), en comparación con las células silvestres, sobre todo en las primeras horas de activación (**Figura 30**). Este retraso en la activación de las células deficientes nos lleva a preguntarnos si la falta de producción de Inhibina repercute en la respuesta a través del TCR, por lo que sería interesante reconstituir el sistema con Inhibina recombinante. Otra posibilidad es que las células deficientes de Inhibina tengan ya una cierta afectación desde su desarrollo, sin embargo, en trabajos previos en el laboratorio no se observó que hubiera una deficiente selección de células CD4+ en timo en los ratones *knock-out*., aunque no podemos descartar que el hecho de que la proporción de células cTEC y mTEC se encuentra alterada en ausencia de Inhibinas, pudiera estar modificando

el repertorio de linfocitos T seleccionados en el timo [189]. Tampoco observamos alguna alteración en los porcentajes de células CD4 o células naïve en periferia en nuestro modelo de ratón deficiente (**Figura 28**). Para contestar este interrogante, de deficiente activación en las células $Inh \alpha^{-/-}$, sería necesario evaluar un modelo donde se delete el gen de Inhibina sólo en las células CD4 de periferia, como podría ser bajo el promotor distal de la cinasa LCK.

En un trabajo previo del laboratorio se evaluó el papel de las Inhibinas en la diferenciación hacia el fenotipo regulador FOXP3⁺, utilizando el modelo deficiente de Inhibina (Tesis de doctorado Marisol de la Fuente 2019), y se observó un aumento en el número total de células diferenciadas, en ausencia de células presentadoras de antígeno. Este dato, aunado al incremento en la diferenciación Th17 que observamos, también nos lleva a sospechar que la ausencia de Inhibinas podría incrementar la sensibilidad del linfocito T a la respuesta hacia TGF- β . Para evaluar la posible respuesta diferencial al TGF- β , podríamos evaluar la señalización mediada por SMADs, analizando la fosforilación de SMAD2,3 en respuesta a diferentes dosis de TGF- β en células deficientes de Inhibinas en comparación con células silvestres.

En resumen, nuestros datos demostraron por primera vez que los linfocitos T de periferia expresan T β RIII diferencialmente entre las diferentes poblaciones (naïve, memoria y células T reguladoras). También demostramos que las células T reguladoras, tanto tímicas, de periferia e inducidas *in vitro*, expresan niveles menores de este receptor. Sin embargo, el T β RIII es importante durante la inducción *in vitro* de Tregs, ya que su bloqueo disminuye el porcentaje de inducción. Y que el

T β RIII se induce a través de la activación de las células TCD4⁺ y disminuye su expresión en concordancia con la expresión de FOXP3. Proponemos también que las Inhinas y el T β RIII podrían actuar como par molecular durante la activación de los linfocitos T ya que las Inhibinas también son importantes durante este proceso, ya que las células Inh $\alpha^{-/-}$ tienen defectos en la activación y presentan una disminución en la expresión del T β RIII. Además, demostramos que las Inhibinas promueven la diferenciación Th1 y afectan negativamente la diferenciación Th17 (Figura 33).

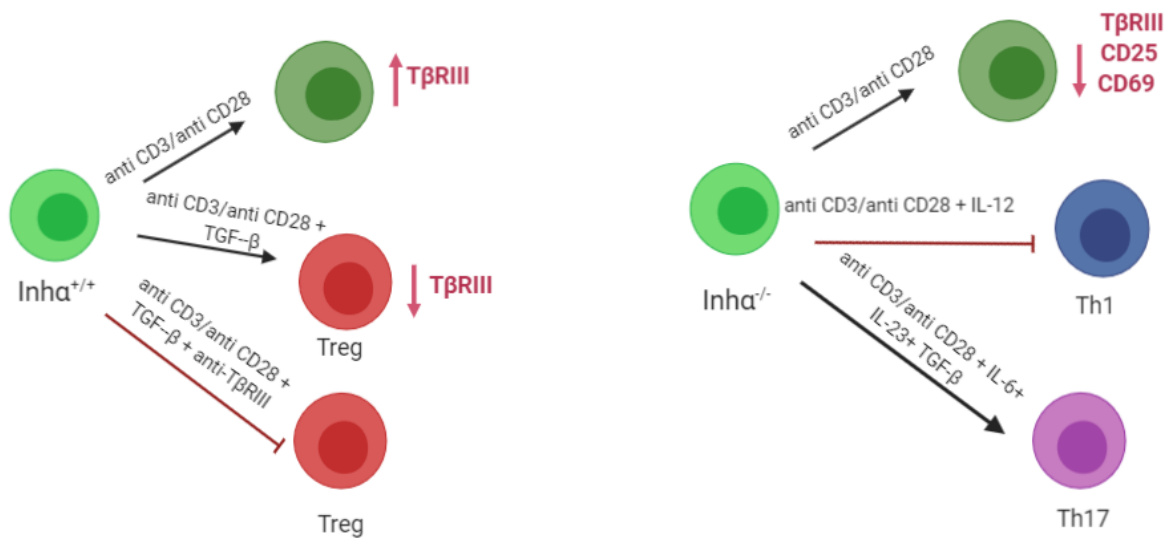


Figura 33. Resumen de resultados. Los linfocitos T silvestres incrementan los niveles del T β RIII tras su activación, pero disminuyen la expresión de este corresponsor bajo condiciones de inducción de células T reguladoras. El bloqueo del T β RIII conlleva a una disminución en el porcentaje de diferenciación de Tregs. Los linfocitos T deficientes de Inhibinas presentan niveles de expresión disminuidos de CD25, CD69 y del T β RIII al activarse. En ausencia de Inhibinas se ve disminuida la diferenciación Th1 e incrementa el porcentaje de diferenciación Th17.

11. CONCLUSIONES

1. El T β RIII se expresa preferentemente en linfocitos T CD4⁺ y principalmente en células T de memoria central.
2. Las células T reguladoras tímicas y periféricas expresan menores niveles del T β RIII que las células T CD4⁺ activadas y CD4SP.
3. La activación del linfocito T induce la expresión de T β RIII de manera concomitante a la expresión de otros marcadores de activación como CD25, CD69 y CD44.
4. Durante la inducción de células iTregs los niveles de expresión del T β RIII disminuyen de manera paralela al incremento en la expresión de FOXP3.
5. El bloqueo de T β RIII y la forma soluble del T β RIII reducen la inducción de iTregs a partir de T “naïve”.
6. Las células T “naïve” deficientes en Inhibina presentan menor activación en respuesta al entrecruzamiento del TCR en comparación con las células silvestres.
7. Las células deficientes de Inhibina expresan menos T β RIII durante su activación.
8. La Inhibina favorece la diferenciación de células Th1 y disminuyen la diferenciación Th17.

12. PERSPECTIVAS

- Analizar los niveles de expresión del T β RIII durante la diferenciación Th1, Th17 y Tregs en las células deficientes de Inhibinas en comparación con las células silvestres.
- Validar el efecto autocrino de las Inhibinas reconstituyendo los cultivos de activación y diferenciación con Inhibina exógena.
- Evaluar el papel antagonista de las Activinas mediado por Inhibinas durante el proceso de activación y diferenciación funcional de los linfocitos T.
- Evaluar la respuesta al TGF- β de las células deficientes de Inhibinas mediante el análisis de la fosforilación de SMAD2,3.
- Evaluar la señalización río abajo del TCR en las células deficientes de Inhibinas (por ejemplo, pZAP70, c-Cbl, Erk, p38, JNK etc).
- Evaluar el papel de TBRIII en la activación y diferenciación funcional utilizando ratones knock-out condicionales para el linaje T CD4+.

13. REFERENCIAS

1. Warrington, R., et al., *An introduction to immunology and immunopathology*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2011. **7 Suppl 1**: p. S1.
2. van der Meer, J.W., et al., *Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence*. Mol Immunol, 2015. **68**(1): p. 40-4.
3. Herwald, H. and A. Egesten, *On PAMPs and DAMPs*. J Innate Immun, 2016. **8**(5): p. 427-8.
4. Riera Romo, M., D. Perez-Martinez, and C. Castillo Ferrer, *Innate immunity in vertebrates: an overview*. Immunology, 2016. **148**(2): p. 125-39.
5. Koenderman, L., W. Buurman, and M.R. Daha, *The innate immune response*. Immunol Lett, 2014. **162**(2 Pt B): p. 95-102.
6. Nicholson, L.B., *The immune system*. Essays Biochem, 2016. **60**(3): p. 275-301.
7. Sadelain, M., I. Riviere, and S. Riddell, *Therapeutic T cell engineering*. Nature, 2017. **545**(7655): p. 423-431.
8. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
9. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 377-91.
10. Dzhagalov, I. and H. Phee, *How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(5): p. 663-82.
11. Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, and R. Berga-Bolanos, *Transcription factors and target genes of pre-TCR signaling*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(12): p. 2305-21.
12. Taniuchi, I., *CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 579-601.
13. James, K.D., W.E. Jenkinson, and G. Anderson, *T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go?* J Leukoc Biol, 2018. **104**(2): p. 275-284.
14. Plitas, G. and A.Y. Rudensky, *Regulatory T Cells: Differentiation and Function*. Cancer Immunol Res, 2016. **4**(9): p. 721-5.
15. Moran, A.E. and K.A. Hogquist, *T-cell receptor affinity in thymic development*. Immunology, 2012. **135**(4): p. 261-7.
16. Love, P.E. and S.M. Hayes, *ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a002485.
17. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 591-619.
18. Gaud, G., R. Lesourne, and P.E. Love, *Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(8): p. 485-497.
19. Liao, W., J.X. Lin, and W.J. Leonard, *Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 13-25.
20. Macian, F., et al., *Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance*. Cell, 2002. **109**(6): p. 719-31.
21. Masopust, D. and J.M. Schenkel, *The integration of T cell migration, differentiation and function*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(5): p. 309-20.
22. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.

23. DuPage, M. and J.A. Bluestone, *Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(3): p. 149-63.
24. Li, P., et al., *Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells*. Immunol Rev, 2014. **261**(1): p. 141-56.
25. Wang, Y., et al., *The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon-gamma-producing T helper 17 cells*. Immunity, 2014. **40**(3): p. 355-66.
26. Lee, Y.K., et al., *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 92-107.
27. Levine, A.G., et al., *Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet*. Nature, 2017. **546**(7658): p. 421-425.
28. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
29. Istomine, R., N. Pavey, and C.A. Piccirillo, *Posttranscriptional and Translational Control of Gene Regulation in CD4+ T Cell Subsets*. J Immunol, 2016. **196**(2): p. 533-40.
30. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 251-76.
31. Swain, S.L., et al., *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3796-806.
32. Agaloti, T., et al., *TH17 cell plasticity: The role of dendritic cells and molecular mechanisms*. J Autoimmun, 2018. **87**: p. 50-60.
33. Schmitt, E. and T. Bopp, *Discovery and initial characterization of Th9 cells: the early years*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(1): p. 5-10.
34. Kanamori, M., et al., *Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 803-811.
35. Roncarolo, M.G., et al., *The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases*. Immunity, 2018. **49**(6): p. 1004-1019.
36. Purvis, H.A., et al., *Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4829-37.
37. Luo, C.T. and M.O. Li, *Transcriptional control of regulatory T cell development and function*. Trends Immunol, 2013. **34**(11): p. 531-9.
38. Liu, K. and M.C. Nussenzweig, *Origin and development of dendritic cells*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 45-54.
39. Lutz, M.B., *Induction of CD4(+) Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells*. Immune Netw, 2016. **16**(1): p. 13-25.
40. Hinck, A.P., T.D. Mueller, and T.A. Springer, *Structural Biology and Evolution of the TGF-beta Family*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(12).
41. Macias, M.J., P. Martin-Malpartida, and J. Massague, *Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(6): p. 296-308.
42. Heldin, C.H. and A. Moustakas, *Signaling Receptors for TGF-beta Family Members*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(8).
43. Akhurst, R.J. and A. Hata, *Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(10): p. 790-811.
44. Feng, X.H. and R. Derynck, *Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 659-93.
45. Derynck, R. and E.H. Budi, *Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling*. Sci Signal, 2019. **12**(570).

46. Travis, M.A. and D. Sheppard, *TGF-beta activation and function in immunity*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 51-82.
47. Chen, W. and P. Ten Dijke, *Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(12): p. 723-740.
48. Zhang, Y.E., *Non-Smad pathways in TGF-beta signaling*. Cell Res, 2009. **19**(1): p. 128-39.
49. Gordon, K.J. and G.C. Blobe, *Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(4): p. 197-228.
50. Salazar, V.S., L.W. Gamer, and V. Rosen, *BMP signalling in skeletal development, disease and repair*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(4): p. 203-21.
51. Findlay, J.K., *An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis*. Biol Reprod, 1993. **48**(1): p. 15-23.
52. Kelly, A., et al., *Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGFbeta*. Adv Immunol, 2017. **134**: p. 137-233.
53. Sanjabi, S., S.A. Oh, and M.O. Li, *Regulation of the Immune Response by TGF-beta: From Conception to Autoimmunity and Infection*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(6).
54. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
55. Seeger, P., T. Musso, and S. Sozzani, *The TGF-beta superfamily in dendritic cell biology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(6): p. 647-57.
56. Tamayo, E., P. Alvarez, and R. Merino, *TGFbeta Superfamily Members as Regulators of B Cell Development and Function-Implications for Autoimmunity*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(12).
57. Fukaya, T., et al., *The role of inhibin on pituitary FSH secretion and maturation of pituitary-gonadal axis in immature female rats*. Tohoku J Exp Med, 1993. **170**(1): p. 1-9.
58. Burger, H.G., *Evidence for a negative feedback role of inhibin in follicle stimulating hormone regulation in women*. Hum Reprod, 1993. **8 Suppl 2**: p. 129-32.
59. Christensen, R.B., et al., *Effects of castration and recombinant human inhibin administration on circulating levels of inhibin and gonadotropins in adult male monkeys*. J Androl, 1994. **15**(2): p. 125-31.
60. Robertson, D.M., et al., *Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG stimulation and gonadectomy*. Mol Cell Endocrinol, 1988. **58**(1): p. 1-8.
61. Findlay, J.K., et al., *Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **180**(1-2): p. 139-44.
62. Pierik, F.H., et al., *Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis*. Ann Med, 2003. **35**(1): p. 12-20.
63. Kumanov, P., et al., *Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications*. Reprod Biomed Online, 2005. **10**(6): p. 786-812.
64. Makanji, Y., et al., *Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review*. Endocr Rev, 2014. **35**(5): p. 747-94.
65. Spencer, S.J., et al., *Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 142-9.
66. Petraglia, F., *Inhibin, activin and follistatin in the human placenta--a new family of regulatory proteins*. Placenta, 1997. **18**(1): p. 3-8.
67. Mylonas, I., et al., *Inhibin/activin subunits alpha, beta-A and beta-B are differentially expressed in normal human endometrium throughout the menstrual cycle*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(5): p. 461-71.
68. Centrella, M., et al., *Transforming growth factor-beta gene family members and bone*. Endocr Rev, 1994. **15**(1): p. 27-39.

69. Licona-Limon, P., et al., *Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **381**(2): p. 229-35.
70. Walton, K.L., et al., *Inhibin Biosynthesis and Activity Are Limited by a Prodomain-Derived Peptide*. *Endocrinology*, 2015. **156**(8): p. 3047-57.
71. Mason, A.J., H.D. Niall, and P.H. Seeburg, *Structure of two human ovarian inhibins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **135**(3): p. 957-64.
72. Barton, D.E., et al., *Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice*. *Genomics*, 1989. **5**(1): p. 91-9.
73. Su, J.G. and A.J. Hsueh, *Characterization of mouse inhibin alpha gene and its promoter*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **186**(1): p. 293-300.
74. Walton, K.L., et al., *The synthesis and secretion of inhibins*. *Vitam Horm*, 2011. **85**: p. 149-84.
75. Ardekani, A.M., J.C. Romanelli, and K.E. Mayo, *Structure of the rat inhibin and activin betaA-subunit gene and regulation in an ovarian granulosa cell line*. *Endocrinology*, 1998. **139**(7): p. 3271-9.
76. Eramaa, M., et al., *Regulation of inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) by activin A and expression of activin receptor mRNAs in cultured human granulosa-luteal cells*. *Endocrinology*, 1995. **136**(10): p. 4382-9.
77. Jaatinen, R., et al., *Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin beta(B)-subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(3): p. 1254-61.
78. Eramaa, M. and O. Ritvos, *Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 induce inhibin and activin beta B-subunit messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells*. *Fertil Steril*, 1996. **65**(5): p. 954-60.
79. Walton, K.L., et al., *A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(14): p. 9311-20.
80. Antenos, M., et al., *An activin/furin regulatory loop modulates the processing and secretion of inhibin alpha- and betaB-subunit dimers in pituitary gonadotrope cells*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(48): p. 33059-68.
81. Shelling, A.N., *Mutations in inhibin and activin genes associated with human disease*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **359**(1-2): p. 113-20.
82. Bloise, E., et al., *Activin A in Mammalian Physiology*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(1): p. 739-780.
83. Wijayarathna, R. and D.M. de Kretser, *Activins in reproductive biology and beyond*. *Hum Reprod Update*, 2016. **22**(3): p. 342-57.
84. Gray, P.C., L.M. Bilezikjian, and W. Vale, *Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **188**(1-2): p. 254-60.
85. Thompson, T.B., et al., *Beta A versus beta B: is it merely a matter of expression?* *Mol Cell Endocrinol*, 2004. **225**(1-2): p. 9-17.
86. Pangas, S.A. and T.K. Woodruff, *Activin signal transduction pathways*. *Trends Endocrinol Metab*, 2000. **11**(8): p. 309-14.
87. Harrison, C.A., et al., *Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications*. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. **16**(2): p. 73-8.
88. Lewis, K.A., et al., *Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling*. *Nature*, 2000. **404**(6776): p. 411-4.
89. Bernard, D.J., S.C. Chapman, and T.K. Woodruff, *Mechanisms of inhibin signal transduction*. *Recent Prog Horm Res*, 2001. **56**: p. 417-50.

90. Lopez-Casillas, F., et al., *Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system*. Cell, 1991. **67**(4): p. 785-95.
91. Lopez-Casillas, F., J.L. Wrana, and J. Massague, *Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor*. Cell, 1993. **73**(7): p. 1435-44.
92. Cheifetz, S., et al., *Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms*. J Biol Chem, 1990. **265**(33): p. 20533-8.
93. Segarini, P.R., D.M. Rosen, and S.M. Seyedin, *Binding of transforming growth factor-beta to cell surface proteins varies with cell type*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(2): p. 261-72.
94. Wang, X.F., et al., *Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor*. Cell, 1991. **67**(4): p. 797-805.
95. Wiater, E., et al., *Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions*. J Biol Chem, 2006. **281**(25): p. 17011-22.
96. Kirkbride, K.C., et al., *Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7628-37.
97. Villarreal, M.M., et al., *Binding Properties of the Transforming Growth Factor-beta Coreceptor Betaglycan: Proposed Mechanism for Potentiation of Receptor Complex Assembly and Signaling*. Biochemistry, 2016. **55**(49): p. 6880-6896.
98. Esparza-Lopez, J., et al., *Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14588-96.
99. Sankar, S., et al., *Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13567-72.
100. Stenvers, K.L., et al., *Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(12): p. 4371-85.
101. Dong, M., et al., *The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 206-17.
102. Copland, J.A., et al., *Genomic profiling identifies alterations in TGFbeta signaling through loss of TGFbeta receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 8053-62.
103. Turley, R.S., et al., *The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1090-8.
104. Hempel, N., et al., *Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion*. Cancer Res, 2007. **67**(11): p. 5231-8.
105. Gordon, K.J., et al., *Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression*. Carcinogenesis, 2008. **29**(2): p. 252-62.
106. Finger, E.C., et al., *TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity*. Carcinogenesis, 2008. **29**(3): p. 528-35.
107. Gatza, C.E., S.Y. Oh, and G.C. Blobe, *Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer*. Cell Signal, 2010. **22**(8): p. 1163-74.
108. Bernabeu, C., J.M. Lopez-Novoa, and M. Quintanilla, *The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(10): p. 954-73.

109. Cheifetz, S., J.L. Andres, and J. Massague, *The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor.* J Biol Chem, 1988. **263**(32): p. 16984-91.
110. Lopez-Casillas, F., et al., *Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites.* J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 557-68.
111. Mythreye, K. and G.C. Blobe, *The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(20): p. 8221-6.
112. Moren, A., H. Ichijo, and K. Miyazono, *Molecular cloning and characterization of the human and porcine transforming growth factor-beta type III receptors.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **189**(1): p. 356-62.
113. Blobe, G.C., et al., *Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling.* J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24627-37.
114. Chen, W., et al., *Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling.* Science, 2003. **301**(5638): p. 1394-7.
115. Finger, E.C., et al., *Endocytosis of the type III transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor through the clathrin-independent/lipid raft pathway regulates TGF-beta signaling and receptor down-regulation.* J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 34808-18.
116. Lee, N.Y., et al., *The transforming growth factor-beta type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK)3 and ALK6 receptors.* Mol Biol Cell, 2009. **20**(20): p. 4362-70.
117. You, H.J., T. How, and G.C. Blobe, *The type III transforming growth factor-beta receptor negatively regulates nuclear factor kappa B signaling through its interaction with beta-arrestin2.* Carcinogenesis, 2009. **30**(8): p. 1281-7.
118. Blobe, G.C., et al., *A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC.* J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39608-17.
119. Lee, J.D., et al., *The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression through GIPC-mediated inhibition of TGF-beta signaling.* Carcinogenesis, 2010. **31**(2): p. 175-83.
120. Hempel, N., et al., *Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta.* Carcinogenesis, 2008. **29**(5): p. 905-12.
121. Ji, C., et al., *Cloning the promoter for transforming growth factor-beta type III receptor. Basal and conditional expression in fetal rat osteoblasts.* J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30487-94.
122. Wickert, L., et al., *Corticosteroids stimulate selectively transforming growth factor (TGF)-beta receptor type III expression in transdifferentiating hepatic stellate cells.* J Hepatol, 2004. **40**(1): p. 69-76.
123. Nakayama, H., et al., *Dexamethasone enhancement of betaglycan (TGF-beta type III receptor) gene expression in osteoblast-like cells.* Exp Cell Res, 1994. **211**(2): p. 301-6.
124. Lopez-Casillas, F., et al., *Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. Cloning of murine betaglycan gene promoter and its modulation by MyoD, retinoic acid, and transforming growth factor-beta.* J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 382-90.

125. Liu, J., et al., *Expression of betaglycan, an inhibin coreceptor, in normal human ovaries and ovarian sex cord-stromal tumors and its regulation in cultured human granulosa-luteal cells.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(10): p. 5002-8.
126. Omori, Y., et al., *Effect of follicle-stimulating hormone and estrogen on the expression of betaglycan messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells.* Endocrinology, 2005. **146**(8): p. 3379-86.
127. Cooper, S.J., et al., *Loss of type III transforming growth factor-beta receptor expression is due to methylation silencing of the transcription factor GATA3 in renal cell carcinoma.* Oncogene, 2010. **29**(20): p. 2905-15.
128. Lamarre, J., J. Vasudevan, and S.L. Gonias, *Plasmin cleaves betaglycan and releases a 60 kDa transforming growth factor-beta complex from the cell surface.* Biochem J, 1994. **302** (Pt 1): p. 199-205.
129. Velasco-Loyden, G., J. Arribas, and F. Lopez-Casillas, *The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1.* J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7721-33.
130. Andres, J.L., et al., *Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta.* J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3137-45.
131. Vilchis-Landeros, M.M., et al., *Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent.* Biochem J, 2001. **355**(Pt 1): p. 215-22.
132. Mendoza, V., et al., *Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor.* Biochemistry, 2009. **48**(49): p. 11755-65.
133. Juarez, P., et al., *Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice.* Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(1): p. F321-9.
134. Hernandez-Pando, R., et al., *A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis.* Clin Exp Immunol, 2006. **144**(2): p. 264-72.
135. Bandyopadhyay, A., et al., *Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft.* Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4690-5.
136. Bandyopadhyay, A., et al., *Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer.* Prostate, 2005. **63**(1): p. 81-90.
137. Bandyopadhyay, A., et al., *Extracellular domain of TGFbeta type III receptor inhibits angiogenesis and tumor growth in human cancer cells.* Oncogene, 2002. **21**(22): p. 3541-51.
138. Jovanovic, B., et al., *TbetaRIII Expression in Human Breast Cancer Stroma and the Role of Soluble TbetaRIII in Breast Cancer Associated Fibroblasts.* Cancers (Basel), 2016. **8**(11).
139. Gatza, C.E., et al., *The balance of cell surface and soluble type III TGF-beta receptor regulates BMP signaling in normal and cancerous mammary epithelial cells.* Neoplasia, 2014. **16**(6): p. 489-500.
140. Elderbroom, J.L., et al., *Ectodomain shedding of TbetaRIII is required for TbetaRIII-mediated suppression of TGF-beta signaling and breast cancer migration and invasion.* Mol Biol Cell, 2014. **25**(16): p. 2320-32.
141. Chapman, S.C., et al., *Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors.* Mol Cell Endocrinol, 2002. **196**(1-2): p. 79-93.

142. Makanji, Y., et al., *Suppression of inhibin A biological activity by alterations in the binding site for betaglycan*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16743-51.
143. Looyenga, B.D., et al., *Inhibin-A antagonizes TGFbeta2 signaling by down-regulating cell surface expression of the TGFbeta coreceptor betaglycan*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(3): p. 608-20.
144. Ethier, J.F., et al., *Transforming growth factor-beta modulates inhibin A bioactivity in the LbetaT2 gonadotrope cell line by competing for binding to betaglycan*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(12): p. 2754-63.
145. Farnworth, P.G., et al., *Transforming growth factor-beta blocks inhibin binding to different target cell types in a context-dependent manner through dual mechanisms involving betaglycan*. Endocrinology, 2007. **148**(11): p. 5355-68.
146. Wiater, E. and W. Vale, *Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7934-41.
147. Makanji, Y., et al., *Inhibin A and B in vitro bioactivities are modified by their degree of glycosylation and their affinities to betaglycan*. Endocrinology, 2007. **148**(5): p. 2309-16.
148. MacConell, L.A., A.M. Leal, and W.W. Vale, *The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions*. Endocrinology, 2002. **143**(3): p. 1066-75.
149. Chapman, S.C. and T.K. Woodruff, *Betaglycan localization in the female rat pituitary: implications for the regulation of follicle-stimulating hormone by inhibin*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5640-9.
150. Makanji, Y., et al., *Inhibin B is a more potent suppressor of rat follicle-stimulating hormone release than inhibin a in vitro and in vivo*. Endocrinology, 2009. **150**(10): p. 4784-93.
151. Escalona, R.M., et al., *Reducing betaglycan expression by RNA interference (RNAi) attenuates inhibin bioactivity in LbetaT2 gonadotropes*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **307**(1-2): p. 149-56.
152. Wiater, E., et al., *Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(7): p. 1033-42.
153. Matzuk, M.M., et al., *Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 313-9.
154. Matzuk, M.M., et al., *Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8817-21.
155. Fuller, P.J. and S. Chu, *Signalling pathways in the molecular pathogenesis of ovarian granulosa cell tumours*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(3): p. 122-8.
156. Bilandzic, M., et al., *Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(4): p. 539-48.
157. Aleman-Muench, G.R. and G. Soldevila, *When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(2): p. 137-48.
158. Musso, T., et al., *Activin A induces Langerhans cell differentiation in vitro and in human skin explants*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3271.
159. Segerer, S.E., et al., *The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation*. Reprod Biol Endocrinol, 2008. **6**: p. 17.
160. Ogawa, K., et al., *Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6787-94.
161. Semitekoulou, M., et al., *Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease*. J Exp Med, 2009. **206**(8): p. 1769-85.

162. Tousa, S., et al., *Activin-A co-opts IRF4 and AhR signaling to induce human regulatory T cells that restrain asthmatic responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(14): p. E2891-e2900.
163. Huber, S., et al., *Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4633-40.
164. Kang, J.O., J.B. Lee, and J. Chang, *Cholera Toxin Promotes Th17 Cell Differentiation by Modulating Expression of Polarizing Cytokines and the Antigen-Presenting Potential of Dendritic Cells*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0157015.
165. Olguín-Alor, R., et al., *A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167813.
166. de la Fuente-Granada, M., et al., *Inhibins regulate peripheral regulatory T cell induction through modulation of dendritic cell function*. FEBS Open Bio, 2019. **9**(1): p. 137-147.
167. Buckham Sporer, K.R., et al., *Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function*. Vet Immunol Immunopathol, 2007. **118**(1-2): p. 19-29.
168. Slimani, H., et al., *Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1617**(1-2): p. 80-8.
169. Brooks, S.P., et al., *Role of transforming growth factor-beta1 in the suppressed allostimulatory function of AIDS patients*. Aids, 1998. **12**(5): p. 481-7.
170. Kadin, M.E., et al., *Loss of receptors for transforming growth factor beta in human T-cell malignancies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 6002-6.
171. Pakula, R., et al., *Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis*. Glycobiology, 2007. **17**(5): p. 492-503.
172. Aleman-Muench, G.R., et al., *Betaglycan (TbetaRIII) is expressed in the thymus and regulates T cell development by protecting thymocytes from apoptosis*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e44217.
173. Raman, C., et al., *TGF-β receptor 3 (betaglycan) regulates Th1 differentiation and T dependent B cell responses*. The Journal of Immunology, 2016. **196**(1 Supplement): p. 189.12-189.12.
174. McGuire, D.J., et al., *CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN-gamma response and RORgammat localization*. Eur J Immunol, 2014. **44**(4): p. 1137-42.
175. Hill, J.A., et al., *Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature*. Immunity, 2007. **27**(5): p. 786-800.
176. Yu, N., et al., *CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood*. Inflammation, 2012. **35**(6): p. 1773-80.
177. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Helios: Still Behind the Clouds*. Immunology, 2019.
178. Fujio, K., et al., *Revisiting the regulatory roles of the TGF-beta family of cytokines*. Autoimmun Rev, 2016. **15**(9): p. 917-22.
179. Toomer, K.H. and T.R. Malek, *Cytokine Signaling in the Development and Homeostasis of Regulatory T cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(3).
180. Akhurst, R.J., *Targeting TGF-beta Signaling for Therapeutic Gain*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(10).
181. Li, M.O. and R.A. Flavell, *TGF-beta: a master of all T cell trades*. Cell, 2008. **134**(3): p. 392-404.
182. Oh, S.A. and M.O. Li, *TGF-beta: guardian of T cell function*. J Immunol, 2013. **191**(8): p. 3973-9.

183. Gagliani, N., et al., *Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation*. *Nature*, 2015. **523**(7559): p. 221-5.
184. Lee, Y.K., et al., *Developmental plasticity of Th17 and Treg cells*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(3): p. 274-80.
185. Liu, H.P., et al., *TGF-beta converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(4): p. 1010-8.
186. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-63.
187. Marie, J.C., D. Liggitt, and A.Y. Rudensky, *Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor*. *Immunity*, 2006. **25**(3): p. 441-54.
188. Ortega-Francisco, S., et al., *TbetaRIII is induced by TCR signaling and downregulated in FoxP3(+) regulatory T cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **494**(1-2): p. 82-87.
189. Carbajal-Franco, E., et al., *Inhibins tune the thymocyte selection process by regulating thymic stromal cell differentiation*. *J Immunol Res*, 2015. **2015**: p. 837859.
190. Park, I.K., J.J. Letterio, and J.D. Gorham, *TGF-beta 1 inhibition of IFN-gamma-induced signaling and Th1 gene expression in CD4+ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent*. *Mol Immunol*, 2007. **44**(13): p. 3283-90.
191. Yoshioka, Y., et al., *Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(3): p. 749-59.