



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PAPEL DE LAS INHIBINAS EN LA INDUCCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T  
REGULADORAS INDUCIDAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Marisol De La Fuente Granada

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ma. Gloria Soldevila Melgarejo  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Bonifaz Alfonso  
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Marzo, 2020



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.

*The organism possesses certain contrivances by means of which the immunity reaction, so easily produced by all kinds of cells, is prevented from working against the organism's own elements.*

*Paul Ehrlich*

Este proyecto fue apoyado por el proyecto de DGAPA PAPIIT UNAM IN209615. MFG fue apoyada con la beca 344606 proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Toda la investigación realizada para esta tesis se llevó a cabo en los laboratorios A107 y A109 del departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Además, MFG fue apoyada con donativos para la asistencia a congresos, tanto nacionales como internacionales, otorgados por el “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)”.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado las herramientas para mi formación académica.

A la Dra. Gloria Soldevila por permitirme formar parte de su grupo de investigación, y darme la oportunidad de realizar el presente trabajo en su laboratorio, así como por todo el apoyo brindado a lo largo de estos años.

A los integrantes de mi comité tutor: Dra. Laura Bonifaz y Dr. Alejandro Zentella por sus comentarios, aportaciones y apoyo durante la elaboración de este proyecto.

A los miembros del jurado evaluador: Dra. Marina Macias Silva, Dr. Fernando López Casillas, Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva, Dr. Ricardo Lascurain Ledesma y Dra. Paula Licona Limón, por su tiempo y observaciones al presente trabajo.

Al LABNALCIT, así como a los técnicos académicos que en él laboran: M. en C. Carlos Castellanos Barba y Dra. Andrea Bedoya López, por brindarme la infraestructura, apoyo y herramientas necesarias para la elaboración de este proyecto.

A los técnicos académicos Biol. Jesús Ramsés Chávez Ríos y M. en C. Oscar Hernández Campos por su invaluable ayuda a lo largo de la realización de este proyecto.

A la Dra. Sandra Ortega Francisco y la Dra. Roxana Olgún Alor por el apoyo que me han brindado y por haber formado un excelente equipo de trabajo.

A los miembros del laboratorio de la Dra. Gloria Soldevila, pasados y presentes, por su apoyo y observaciones al proyecto.

Al CONACYT, al PAPIIT y al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) por los apoyos otorgados para mi formación académica y la realización de este proyecto.

## CONTENIDO

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	4
3. Abstract	6
4. Introducción	7
a. Células T reguladoras	8
i. Células T reguladoras tímicas	9
ii. Células T reguladoras periféricas	12
iii. FoxP3: regulación de su expresión y estabilidad	12
iv. Función de las Treg	17
v. pTreg en intestino	21
b. Células dendríticas	23
i. Maduración y función de DCs	26
ii. Células dendríticas y tolerancia	27
c. Familia de TGF $\beta$	30
i. Inhibinas	32
5. Antecedentes	35
6. Planteamiento del problema	38
7. Hipótesis	40
8. Objetivo General	40
9. Objetivos Particulares	40
10. Materiales y métodos	41
a. Ratones	41
b. Aislamiento de linfocitos T de <i>lamina propria</i> de colon (LP), ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos periféricos o bazo.	41
c. Obtención de células dendríticas de ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios periféricos y bazo.	42
d. Tinción y análisis por citometría de flujo	43
e. Generación de DCs a partir de médula ósea.	44
f. Separación celular por MACS	44

g. Estimulación de DCs obtenidas <i>ex vivo</i> .	45
h. Inducción de células Tregs	45
i. Cuantificación de Inhibina A y Activina A	46
j. Ensayos de supresión de la proliferación	47
k. Análisis estadístico	47
11. Resultados	48
a. Las células T reguladoras periféricas se encuentran incrementadas en ausencia de Inhibina.	48
b. Las células dendríticas convencionales CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y CD103 <sup>+</sup> (cDC1) muestran una expresión alterada de moléculas co-estimuladoras/co-inhibidoras en ganglio linfático mesentérico.	57
c. Las Inhibinas regulan la inducción de células T reguladoras FoxP3 <sup>+</sup> mediada por células dendríticas <i>in vitro</i> .	63
d. Las células dendríticas deficientes de Inhibina aumentan la inducción de células T reguladoras periféricas <i>in vivo</i> .	68
e. Evaluación del papel de las Inhibinas en la inducción de células T reguladoras FoxP3 <sup>+</sup> de manera intrínseca al linfocito T CD4 <sup>+</sup> .	71
f. Función de las células T reguladoras deficientes de Inhibina.	73
12. Discusión	74
13. Conclusiones	89
14. Perspectivas	90
15. Referencias	90
16. Artículo de investigación	102

## 1. Abreviaturas

ACK	Amortiguador de lisis de eritrocitos (amonio clorado de potasio)
ActRII	Receptor tipo dos de Activina
ALK	Activin receptor-like kinase
AMH	Hormona antimulleriana
BAFT3	Factor de transcripción de cierre de leucina básico tipo ATR 3
BMDC	Célula dendrítica derivada de médula ósea
BMP	Proteína morfogenética ósea
cDC	Célula dendrítica convencional
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CLP	Progenitor común linfoide
CLR	Receptores lectina tipo C
CMP	Progenitor común mieloide
CT	Toxina del cólera
CTLA-4	Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico
CTV	Cell trace violet
cTEC	Célula tímica epitelial cortical
DC	Célula dendrítica
dLN	Ganglio linfático drenante
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EE	Error estándar
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FSH	Hormona folículo estimulante
FoxP3	Forkhead box P3
GALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
GDF	Factor de diferenciación de crecimiento
GFP	Proteína verde fluorescente
GITR	Proteína asociada al receptor de TNF inducida por glucocorticoides
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocítica y monocítica
GM-CSFR	Receptor de GM-CSF
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks



iBMDC	BMDC inmadura
ID2	Inhibidor de la proteína de unión a DNA
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IRF	Factor regulador del interferón
Inh $\alpha^{-/-}$	Deficientes de Inhibinas
Inh $\alpha^{+/+}$	Suficientes de Inhibinas
iTreg	T reguladoras inducidas <i>in vitro</i>
DTH	Reacción de hipersensibilidad de tipo retardado
LC	Células de Langerhans
LP	Lámina propia
LPS	Lipopolisacárido
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAPK	Cinasa de proteínas activadas por mitógeno
mDCs	Células dendríticas migratorias
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MLN	Ganglio linfático mesentérico
mTEC	Célula tímica epitelial medular
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NFIL3	Factor nuclear regulado por IL-3
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NLR	Receptor tipo NOD
OVA	Ovoalbúmina
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pDC	Células dendríticas plasmacitoides
PD-L1	Programmed Death-ligand 1
PLN	Ganglio linfático periférico
pTreg	Células T reguladoras periféricas

PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RA	Ácido retinoico
rDC	Células dendríticas residentes
SFB	Suero fetal bovino
TβRIII	Receptor tipo III de TGF
TCR	Receptor de linfocito T
Th	Linfocito T CD4 <sup>+</sup>
TEC	Células tímicas epiteliales
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora
tTreg	Célula T reguladora tímica

## 2. Resumen

El balance entre la inflamación y la tolerancia es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del individuo, por lo cual los mecanismos que regulan la generación de linfocitos T reguladores se encuentran en constante estudio. La interacción entre el linfocito T CD4<sup>+</sup> y la célula dendrítica, en conjunto con las señales del microambiente, proveen las señales necesarias para la diferenciación del primero hacia un fenotipo efector o regulador. El papel del TGFβ en la inducción de Treg en periferia es fundamental, y ha sido ampliamente estudiado. Se ha observado que otros miembros de la misma familia, como las Activinas, pueden sinergizar con el TGFβ para favorecer la inducción a Treg *in vitro*. Además, recientemente hemos reportado que las Inhibinas juegan un papel importante en la maduración y función de las células dendríticas, llevando a una disminución de la activación del linfocito T CD4<sup>+</sup> y disminuyendo la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado a OVA. En el presente trabajo, investigamos el papel de las Inhibinas en la inducción de Treg en periferia *in vitro* e *in vivo*. Nuestros datos muestran un aumento de T reguladoras periféricas en la lámina propia del colon, los ganglios linfáticos mesentéricos y los ganglios linfáticos periféricos en ratones *Inhα*<sup>-/-</sup> en condiciones homeostáticas, en comparación con ratones silvestres. Lo anterior correlacionó con un aumento de la expresión de PD-L1 en las células dendríticas, CD103<sup>+</sup> y CD8α<sup>+</sup>, *Inhα*<sup>-/-</sup>. *In vitro*, las células dendríticas CD11c<sup>+</sup> *Inhα*<sup>-/-</sup> estimuladas con lipopolisacárido, indujeron mayor número de Treg, comparadas con sus contrapartes silvestres. *In vivo* también se observó que las células dendríticas *Inhα*<sup>-/-</sup> son más propensas a inducir respuestas tolerogénicas, al emplear un modelo de direccionamiento de antígeno (ovoalbúmina) a través de anti-DEC205 en ratones con células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> OVA específicas transferidas de forma adoptiva. Por otra parte, observamos que en cultivo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes *Inhα*<sup>-/-</sup> no muestran diferencias en la inducción a Treg, en presencia de un estímulo policlonal y ausencia

de células dendríticas, al compararlos contra su contraparte silvestre. En conclusión, estos datos identifican a las Inhibinas como un regulador negativo clave en la tolerancia periférica de las células T.

### 3. Abstract

The balance between inflammation and tolerance is crucial for the maintenance of an organism homeostasis, therefore the mechanisms that regulate the induction of regulatory T cells (Treg) are in constant study. The interaction between the T CD4<sup>+</sup> lymphocytes and the dendritic cell (DC), along with signals of the microenvironment, provide the necessary signals for T cell differentiation. The key role of TGFβ in Treg induction has been broadly studied; however, other members of this family, such as Activins, can synergize with the TGFβ favouring Treg induction *in vitro*. Moreover, recently we have reported that Inhibins play an important role in DC maturation and function, leading to a decrease in T cell activation and diminishing DTH responses. In this work, we investigated the role of Inhibins in the induction of peripheral regulatory T cells *in vitro* (iTregs) and *in vivo* (pTregs). Our data show an increased percentage of pTregs in colonic lamina propria and mesenteric lymph nodes in Inhibin deficient mice, compared to Inhα wild type mice under homeostatic conditions, which correlated with increased expression of PD-L1 in CD103<sup>+</sup> and CD8α<sup>+</sup> DCs, Inhα<sup>-/-</sup>. *In vitro*, LPS stimulated CD11c<sup>+</sup> Inhα<sup>-/-</sup> DCs induced a higher number of Treg, compared to their wild type counterparts while *in vivo*, anti-DEC205-OVA DC targeting of mice with adoptively transferred OVA-specific T cells showed enhanced induced peripheral Treg numbers in Inhα<sup>-/-</sup> mice, showing that Inhα<sup>-/-</sup> DCs are prone to induce tolerogenic responses *in vivo*. On the other hand, we show that in culture, Inhα<sup>-/-</sup> naïve T lymphocytes do not show an altered Treg induction compared to Inhα<sup>+/+</sup>, in the presence of a polyclonal stimulus and the absence of DCs. Overall, these data identify Inhibins as key regulators of peripheral T cell tolerance.

#### 4. Introducción

La constante interacción entre el organismo humano y el medio ambiente puede llevar al enfrentamiento del primero con diversos agentes que pueden alterar su homeostasis. El sistema inmunológico, formado por una extensa variedad de células y factores solubles, cuenta con mecanismos que permiten mantener la homeostasis del individuo, por un lado, protegiendo del daño causado por patógenos (inmunidad) o bien, manteniendo la tolerancia ya sea hacia lo propio o a antígenos inocuos externos.

El sistema inmunológico, lleva a cabo su función de manera eficiente, ya que es capaz de responder o no a los antígenos reconocidos en diferentes contextos. En este sentido, la tolerancia es el proceso mediante el cual las células del sistema inmunológico son capaces de reconocer las células que forman parte del organismo como propias y por lo tanto, evitar el establecimiento de respuestas inmunológicas contra estas. Los linfocitos T y B sufren un proceso de selección positiva y negativa durante su maduración con la finalidad de impedir que se generen clonas autorreactivas, proceso conocido como tolerancia central; además, algunas células T CD4<sup>+</sup> reciben señales en el timo, que las seleccionan a diferenciarse a células T reguladoras tímicas (tTreg), también conocidas como T reguladoras naturales, las cuales son capaces de suprimir respuestas inmunológicas <sup>1</sup>.

A pesar de que la mayor fuente de células Treg en el organismo son de origen tímico (tTreg), actualmente se sabe que un porcentaje considerable tiene su origen en la periferia (pTreg) <sup>2,3</sup>. Las pTreg pueden representar entre un 15 a 50 % del pool de Tregs, dependiendo del tejido y marcadores empleados <sup>4,5</sup>. En la periferia, la generación de Tregs se da por la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes que reciben estimulación antigénica por parte de una célula presentadora de antígeno (APC), con una combinación apropiada de citocinas, como IL-2 y TGFβ.

Las células Treg producidas de esta manera son conocidas como T reguladoras inducidas (iTreg) cuando se generan *in vitro* o T reguladoras inducidas en periferia (pTreg) cuando se generan *in vivo*<sup>6</sup>. Ambas poblaciones de células Treg, tímicas y periféricas, cooperan en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica<sup>7</sup>.

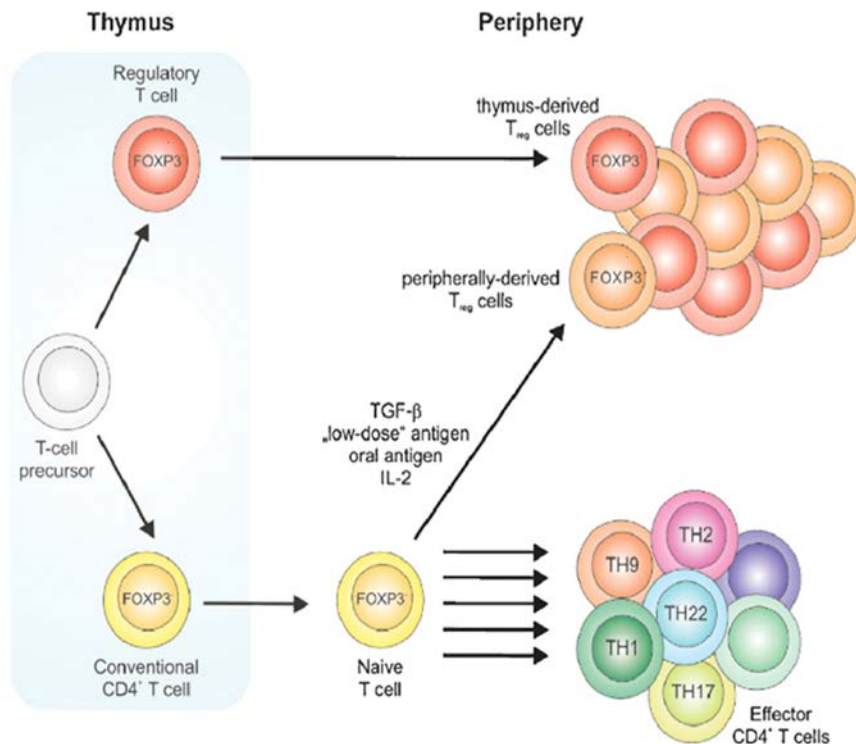
#### **a. Células T reguladoras**

Las células T reguladoras juegan un papel clave en la tolerancia central y periférica previniendo el desarrollo de autoinmidades y restringiendo las respuestas inflamatorias inmunológicas contra patógenos. El balance entre las células T efectoras y reguladoras es crítico para el mantenimiento de la homeostasis<sup>8</sup>.

Las células Treg, descritas en 1999 por Itoh and Sakaguchi *et al*<sup>9</sup>, son una subpoblación de linfocitos T CD4+, caracterizadas por un alto nivel de expresión de CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor a IL-2) y FoxP3, considerado el factor de transcripción maestro en la regulación del desarrollo y función de las Treg<sup>10</sup>. De hecho, mutaciones de pérdida de la función en *FOXP3* resultan en una enfermedad linfoproliferativa autoinmune fatal (síndrome de inmunodesregulación - poliendocrinopatía - enteropatía ligada a X, IPEX) en humano<sup>11</sup>. Por lo tanto, la habilidad de las Tregs para suprimir diversas respuestas de células inmunológicas se ha vuelto relevante para entender enfermedades y respuestas inflamatorias<sup>12</sup>.

Como se mencionó previamente, se han identificado 2 subpoblaciones principales de Treg *in vivo*: células T reguladoras tímicas y células T reguladoras periféricas, dependiendo del lugar donde llevan a cabo su diferenciación (Figura 1). Las tTreg y pTreg expresan el factor de transcripción FoxP3 y comparten la expresión de algunos receptores de superficie como CD25, GITR y CTLA-4<sup>2</sup>, los cuales están asociados a su función y cuya expresión está regulada por Foxp3 en conjunto con Runx1<sup>13</sup>. Otros receptores y factores de transcripción han sido propuestos

como específicos para tTreg, como: Neuropilina y Helios <sup>14,15</sup>. Sin embargo, otros grupos señalan que Helios también puede ser expresado en pTregs u otras poblaciones de células T efectoras <sup>16</sup> y que Neuropilina se puede expresar en pTregs que se desarrollan en un contexto de inflamación crónica <sup>16,17</sup>.



**Figura 1. Desarrollo de las células T reguladoras Foxp3+.** Las Treg FoxP3+ pueden diferenciarse en el timo a partir de precursores, dando lugar a las tTreg o en la periferia, a partir de células T vírgenes Foxp3-, dando lugar a las pTreg <sup>18</sup>.

### Células T reguladoras tímicas

Las células T reguladoras tímicas, a diferencia de las T vírgenes, se diferencian a células funcionalmente competentes en el timo, como su nombre lo indica, y se encuentran en un porcentaje entre 5 y 10% en la periferia (ganglios linfáticos) <sup>19</sup>.



Las células tímicas epiteliales medulares (mTECs) y las células dendríticas (DCs) son las principales células presentadoras que participan en la diferenciación tímica de las Tregs. Las mTECs son capaces de expresar y presentar antígenos tejido-específicos, cuya expresión está controlada por el regulador transcripcional regulador autoinmune (AIRE, por sus siglas en inglés “*Autoimmune regulator*”). Por otro lado, las DCs plasmacitoides, así como las DCs SIRP $\alpha^+$ , migran a timo desde la periferia, por lo que potencialmente pueden presentar antígenos extracelulares capturados del microambiente periférico<sup>20</sup>.

Previamente, se demostró que las Treg se desarrollan a través de un proceso de dos pasos en el timo, en el cual, el primer paso es dirigido por señales fuertes a través del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés “*T cell receptor*”) <sup>21</sup>, lo cual lleva a la regulación positiva de CD25, así como de receptores miembros de la superfamilia de TNF (GITR, OX40, TNFR2) <sup>21,22</sup>; mientras que el segundo paso lleva a la conversión del progenitor CD25<sup>+</sup> a una célula tTreg madura CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> de manera dependiente de IL-2 y del factor de transcripción STAT5<sup>22,23</sup>. Por otro lado, otro progenitor de tTregs ha sido caracterizado en el timo, el cual presenta una baja expresión de Foxp3 y es CD25<sup>-</sup><sup>24</sup>. Este progenitor muestra una alta expresión de GITR y de OX40 y se puede diferenciar a una Treg madura CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> tras la estimulación con IL2<sup>24</sup>.

Recientemente, se ha descrito que ambos progenitores pueden diferenciarse a tTreg maduras (progenitor de Treg CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> y progenitor de Treg CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>lo</sup>) <sup>25</sup>. Owen *et al.* demostraron que ambos progenitores tienen una eficiencia de generación de Tregs comparable, tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, las vías de desarrollo difieren tanto en transcriptomas como en repertorios de TCR. Los progenitores CD25<sup>+</sup> muestran una mayor apoptosis y se desarrollan a Treg madura de manera más rápida, además tienen mayor reactividad a antígenos propios en el timo, comparados con los progenitores Foxp3<sup>lo</sup>. Además, el desarrollo a Treg de estas

dos subpoblaciones de progenitores es controlado por diferentes citocinas (los progenitores Foxp3<sup>lo</sup> dependen de IL-4), vías de señalización (los progenitores Foxp3<sup>lo</sup> son dependientes de la activación de NFκB1 y de la secuencia conservada no codificante 3 (CNS3, por sus siglas en inglés “*Conserved Non coding Sequences*”)) y células estromales. De manera importante, se ha observado que solo las Treg diferenciadas a partir de los progenitores CD25<sup>+</sup> pueden proteger contra la encefalomiелitis autoinmune experimental, mientras que las Treg diferenciadas a partir de los progenitores Foxp3<sup>lo</sup> pueden proveer protección en un modelo de colitis por transferencia de células T<sup>25</sup>, sugiriendo que ambas poblaciones tienen papeles diferentes en la autoinmunidad. Mientras las nTreg que se generan a partir de progenitores CD25<sup>+</sup> se desarrollan a través de un proceso de selección agonista, que comparte similitudes con el proceso de selección negativa, y resulta principalmente en Tregs maduras con TCRs que reconocen con alta afinidad antígenos presentes en el timo, aquellas que se generan a partir de los progenitores Foxp3<sup>lo</sup> se desarrollan a través de un proceso más parecido a la selección positiva, resultando en un repertorio de TCR capaz de reaccionar tanto a antígenos propios como no propios, explicando las diferencias en función e indicando que las Treg provenientes de los progenitores Foxp3<sup>lo</sup> podrían estar complementando la función de las pTreg<sup>25</sup>.

Además, la diferenciación a tTreg es regulada por la disponibilidad de IL-2 y/o IL-7, lo cual se ha evidenciado en el ratón deficiente de la cadena gamma común de receptores de citocinas (γc, CD132), en el cual hay una pérdida completa de Tregs. El factor de transcripción STAT5, es el principal responsable de los efectos de la señalización por el receptor a IL-2<sup>26</sup>. A pesar de su papel esencial, la IL-2 se encuentra en cantidades limitadas en timo, lo que restringe el desarrollo de tTreg<sup>27</sup>. Se ha demostrado que la IL-2 producida por los propios timocitos es necesaria y

suficiente para el desarrollo de las tTreg, posiblemente por las células simples positivas CD4+ que se encuentran diferenciándose a células T CD4+ <sup>28</sup>,

### **Células T reguladoras periféricas**

Los eventos de señalización requeridos para inducir pTreg son diferentes comparados con aquellos necesarios para la diferenciación de tTreg. Para la diferenciación de pTreg se requiere de TGFβ para la inducción de la expresión de FoxP3, así como bajos niveles de activación del TCR y bajas señales co-estimuladoras. La diferencia en estos requerimientos está asociada con la regulación transcripcional del gen de FoxP3 en cada una de estas subpoblaciones <sup>29</sup>.

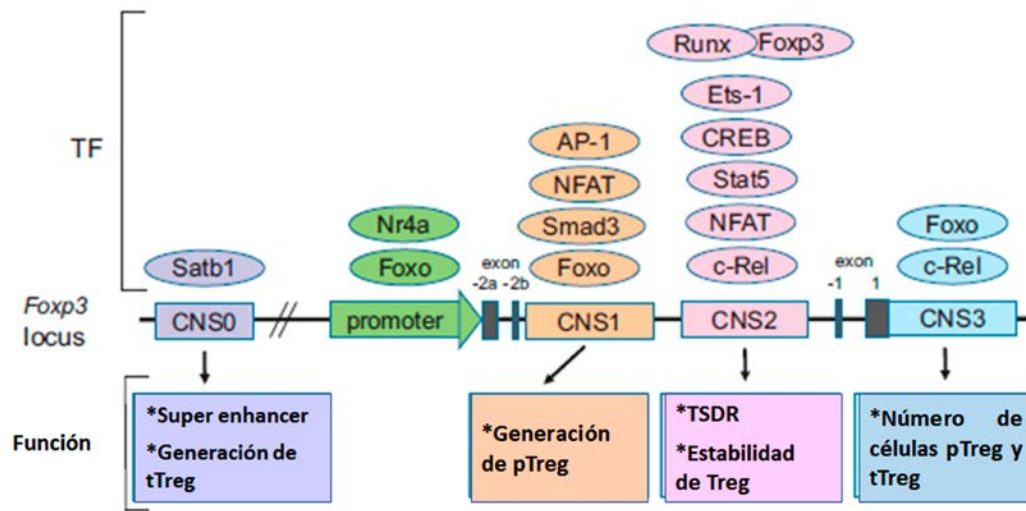
La importancia del TGFβ para el desarrollo de Treg fuera del timo ha sido ampliamente estudiada, desde el descubrimiento, en 2003, de que el TGFβ puede inducir FoxP3 en células T vírgenes <sup>30</sup>. De hecho, el fenotipo de los ratones deficientes de FoxP3 es muy semejante al que presentan los animales deficientes en TGFβ1, ambos ratones desarrollan un síndrome autoinmune linfoproliferativo letal, y mueren debido a la enfermedad a las 3-4 semanas de edad <sup>31,32</sup>. Los ratones deficientes de TGFβ1 muestran un desarrollo normal de tTreg en el timo, pero las pTreg se encuentran reducidas en número de manera significativa <sup>33</sup>. Además, con ratones deficientes para Smad2 y/o Smad3 (factores de transcripción activados por la vía de señalización canónica de TGFβ), específicamente en las células T, se ha demostrado que estos son esenciales para la inducción de FoxP3 <sup>34,35</sup>. Al igual que el ratón deficiente de TGFβ1, los ratones deficientes de Smad2 y Smad3, específicamente en las células T, poseen un número normal de tTreg, pero un número disminuido de Treg en periferia <sup>34</sup>.

### **FoxP3: regulación de su expresión y estabilidad.**

FoxP3 presenta tres dominios principales: un dominio N-terminal, rico en prolina, responsable de la represión transcripcional, el dominio ZL (dedos de zinc y leucina en cremallera)

que facilita la formación de homodímeros o tetrámeros de FoxP3 o su asociación con otros factores de transcripción y el dominio C-terminal, altamente conservado y responsable de su unión al DNA<sup>36</sup>. El dominio N-terminal regula la importación nuclear de FoxP3, la interacción con otros factores de transcripción y la estabilidad de FoxP3 a través de modificaciones post-traduccionales<sup>37</sup>.

En el locus del gen de FoxP3 se han identificado 4 secuencias altamente conservadas no codificantes, designadas como CNSs (por sus siglas en inglés “*Conserved Non coding Sequences*”), además del promotor, y se ha observado que estas secuencias juegan un papel importante en la diferenciación de Tregs<sup>38,39</sup>. Las funciones de estas regiones, denominadas CNS0, CNS1, CNS2, y CNS3 han sido ampliamente estudiadas en Treg, y se ha identificado que pueden modular la diferenciación, función, estabilidad de estas células (Figura 2)<sup>40</sup>. El promotor de Foxp3 se encuentra 6.5 kb río arriba del exon 1 y está definido por una caja TATA, una caja GC, así como múltiples sitios de unión a factores de transcripción en aproximadamente 500 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción<sup>41</sup>. CNS0, que es la región más recientemente descrita, se localiza en un intrón del gen aledaño del locus de Foxp3 en la región 5’<sup>40</sup>. Por su parte, CNS1 se localiza en el primer intrón, aproximadamente 2kb río abajo del promotor<sup>42</sup>. CNS2 también se encuentra en el primer exón, aproximadamente 4kb río abajo del promotor y tiene aproximadamente 1200 bp de largo<sup>43</sup>. Por su parte CNS3 se encuentra en el segundo intrón, inmediatamente después del primer exón codificante, aproximadamente 7 kb río abajo del sitio de inicio de la transcripción<sup>38</sup>.



**Figura 2. Diagrama esquemático de la regulación transcripcional del locus de Foxp3.**

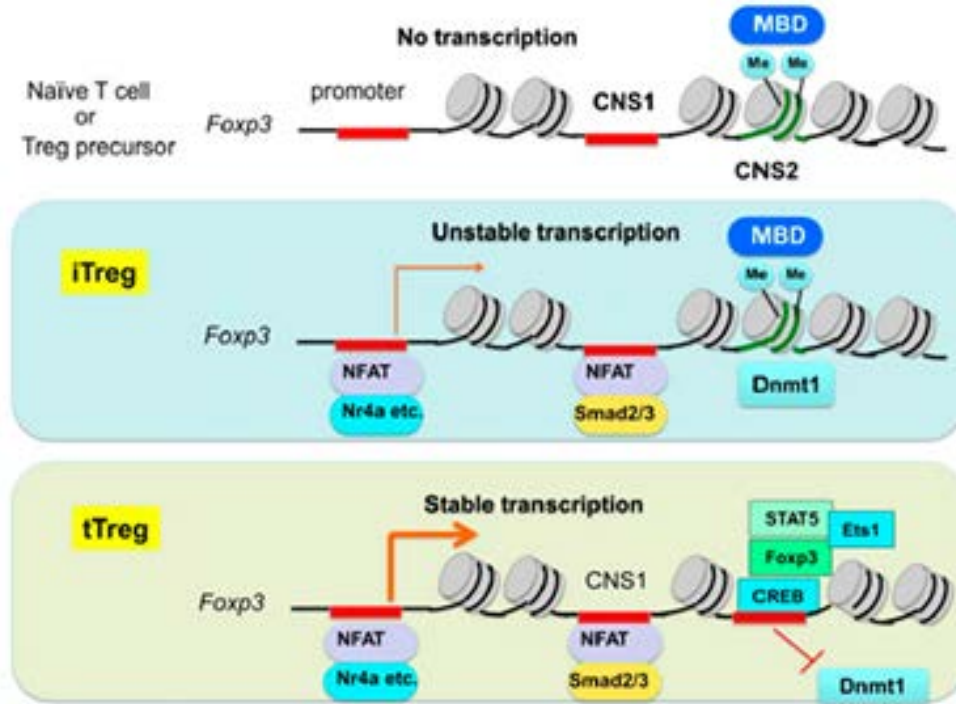
Se muestran las regiones reguladoras del locus de Foxp3, incluyendo el promotor, CNS0, CNS1, CNS2 y CNS3. En la parte superior se observan los factores de transcripción (TFs) que se unen a cada región y en la inferior la función de cada región regulatoria (Tomado de Lee et al.<sup>40</sup>).

De manera importante, CNS1 contiene 2 sitios consecutivos de unión a Smad, y por ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se ha confirmado el reclutamiento de Smad3 a esta región<sup>44</sup>. Los ratones deficientes de la región CNS1 desarrollan inflamación alérgica tipo Th2 de manera espontánea, así como defectos en la diferenciación de pTreg en tejido linfoides asociado a intestino, pero no de tTreg<sup>38,39</sup>, mostrando la importancia de esta región para la generación de iTreg/pTreg.

En cambio, se ha observado que la delección de CNS3, que contiene un sitio de unión a c-Rel, causa una severa reducción en el número de tTreg, lo cual indica la importancia de CNS3 en la generación de tTreg<sup>45,38</sup>.

Por su parte CNS2, también conocida como Treg cell-specific demethylated region (TSDR), contiene islas CpG, las cuales se encuentran altamente desmetiladas en las Treg, lo cual lleva a la estabilización de la expresión de Foxp3<sup>36</sup>. Esto se debe a que la desmetilación de CNS2 lleva al reclutamiento de varios factores de transcripción como STAT5, NFAT, Runx1/Cbfb, CREB y FoxP3<sup>37,46</sup>. De hecho, la delección de CNS2 no cambia la generación tTreg, sino que afecta la estabilidad de la expresión de Foxp3 durante la proliferación<sup>38</sup>. Es por esto que la desmetilación de la región TSDR es considerada como el marcador definitivo del compromiso al linaje de Treg<sup>47</sup>.

Tanto las tTreg como las pTreg tienen la región TSDR desmetilada<sup>48,49</sup>, es por esto que comparten un patrón global de expresión génica, estabilidad y fenotipo. Sin embargo, estudios de metilación en motivos CpG conservados del promotor de FoxP3 han evidenciado diferencias epigenéticas entre tTreg y pTreg, donde las tTreg muestran mayor desmetilación y una expresión más estable de FoxP3<sup>50</sup>. A diferencia de las tTreg y las pTreg, las iTreg presentan la región TSDR metilada, lo cual explica su inestabilidad (Figura 3)<sup>51</sup>.



**Figura 3. Papel de la desmetilación de CNS2 en la expresión estable de Foxp3.** En las células Treg tímicas, los sitios CpG se encuentran totalmente desmetilados, lo cual contribuye a la expresión sostenida de Foxp3. CNS2 contiene sitios de unión para diferentes factores de transcripción, como STA5, NFAT, Runx1/Cbfb, CREB y Foxp3. En cambio, cuando CNS2 se encuentra altamente metilado, como es el caso para las iTreg, los factores de transcripción no se pueden unir, y como resultado la expresión de Foxp3 es muy inestable (Tomado de Ito et al.<sup>51</sup>).

Además de la desmetilación de la región TSDR del gen FoxP3, las Tregs presentan un patrón de hipometilación CpG específica en otros genes como TNF-rs 18, CTLA-4, Ikzf4 e IL2ra. Este patrón de hipometilación está asociado al aumento y estabilización de la expresión de FoxP3<sup>52</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que Foxp1 es esencial para el mantenimiento de la expresión óptima de FoxP3 en pTregs. La delección de Foxp1 lleva a una pérdida gradual de FoxP3 en las pTregs, resultando en una reducción dramática de las Treg Helios-Neuropilina-, así como a un aumento de la inflamación intestinal en ratones viejos<sup>53</sup>.

El mantenimiento de la firma transcripcional de las pTreg depende de la expresión de FoxP3, de forma similar a lo que ocurre en las tTreg<sup>4</sup>. FoxP3 puede regular genes en las células Tregs de 2 maneras: 1) Mediante la amplificación del patrón de genes de tipo Treg y 2) por la represión de sus genes blanco tras la activación de la célula Treg (revisado en<sup>12</sup>). En este sentido, se ha observado que FoxP3 amplifica y estabiliza la expresión de genes que codifican moléculas de superficie o de secreción como Fgl2, CD73, CD39, TRAIL o CTLA-4, y al mismo tiempo FoxP3 refuerza la represión de citocinas producidas en la respuesta inmunológica de manera dependiente a la activación del TCR como son IL-4, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 e IL-21. Además, FoxP3 altera la respuesta de las Treg a señales del microambiente a través de la modulación de moléculas de superficie y de señalización las cuales promueven tanto la homeostasis como el linaje<sup>54</sup>.

### **Función de las Treg**

En cuanto a la función de las subpoblaciones de Treg, se ha demostrado que las tTreg tienen un papel crucial en el control de enfermedades autoinmunes<sup>9, 55</sup>; mientras que las pTreg parecen ser más relevantes en contener inmunopatologías tras una respuesta inmunológica y en el contexto de homeostasis intestinal<sup>56; 55</sup>. Se ha demostrado que las pTregs también tienen una contribución importante en el control de la respuesta autoinmune<sup>57</sup>, ya que la deficiencia de pTregs es suficiente para resultar en condiciones autoinmunes mediadas por células T<sup>58</sup>. En contraste, el enriquecimiento de pTregs disminuye la alergia, contribuye a la tolerancia a órganos transplantados y aumenta la tolerancia materno-fetal<sup>39,59</sup>.

También se ha descrito que los papeles de estas dos subpoblaciones, tTreg y pTreg, son no redundantes, ya que se ha observado que ambas subpoblaciones son necesarias para la prevención total de colitis<sup>60</sup>. Esto fue demostrado por Haribhai *et al.*, quienes evaluaron la función de las pTregs en un modelo de colitis inducido en ratones linfopénicos (*Rag1*<sup>-/-</sup>), por la transferencia de



células T CD45RB<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup>. En este modelo se observó que tanto las tTreg como las pTreg generadas *in situ* tienen la capacidad de suprimir la proliferación de las células T *in vitro*, mientras que *in vivo* la ausencia de estas acelera la enfermedad. Además, se observó que *in vivo* la transferencia combinada de pTregs inducidas *in situ* y tTregs suprime la inflamación en el intestino y reestablece la tolerancia, mientras que si solo se transfieren pTregs los ratones desarrollan una enfermedad crónica y al transferir únicamente nTregs, los ratones muestran ganancia de peso y mejoría clínica, sin embargo la sobrevida no es significativamente diferente de la que se observa en los ratones transferidos solo con pTreg; mostrando con esto que para tener una supresión eficiente de la enfermedad es necesario que ambos compartimentos de Treg estén presentes. En este trabajo, también se demostró que las pTreg, al igual que las nTreg, requieren Foxp3 para su actividad supresora y su estabilidad fenotípica; sin embargo, tienen un perfil de expresión génica distinto al de las nTreg, indicando que tanto su desarrollo como su mecanismo de acción puede ser diferente <sup>4</sup>.

Las células Treg pueden suprimir diversas células del sistema inmunológico, incluyendo linfocitos B, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, NK, NKT, y células presentadoras de antígeno, como las DCs<sup>61</sup>. Se han propuesto varios mecanismos de supresión mediados por Treg (Figura 4), a través de los cuales estas células ejercen su función, estos incluyen de manera general: secreción de citocinas inmunosupresoras, citólisis, disrupción metabólica, modificación del estado de activación de las DCs, entre otros <sup>62</sup>.

Dentro de las citocinas inmunosupresoras que pueden secretar las Treg se han descrito la IL-10, IL-35 y TGFβ. En este sentido, se sabe que la IL-10 tiene un papel importante en la supresión mediada por Treg en la inflamación intestinal <sup>63</sup>, y en la tolerancia materno-fetal <sup>64</sup>. Se ha observado que la delección específica de IL-10 en Treg resulta en un aumento de la inflamación

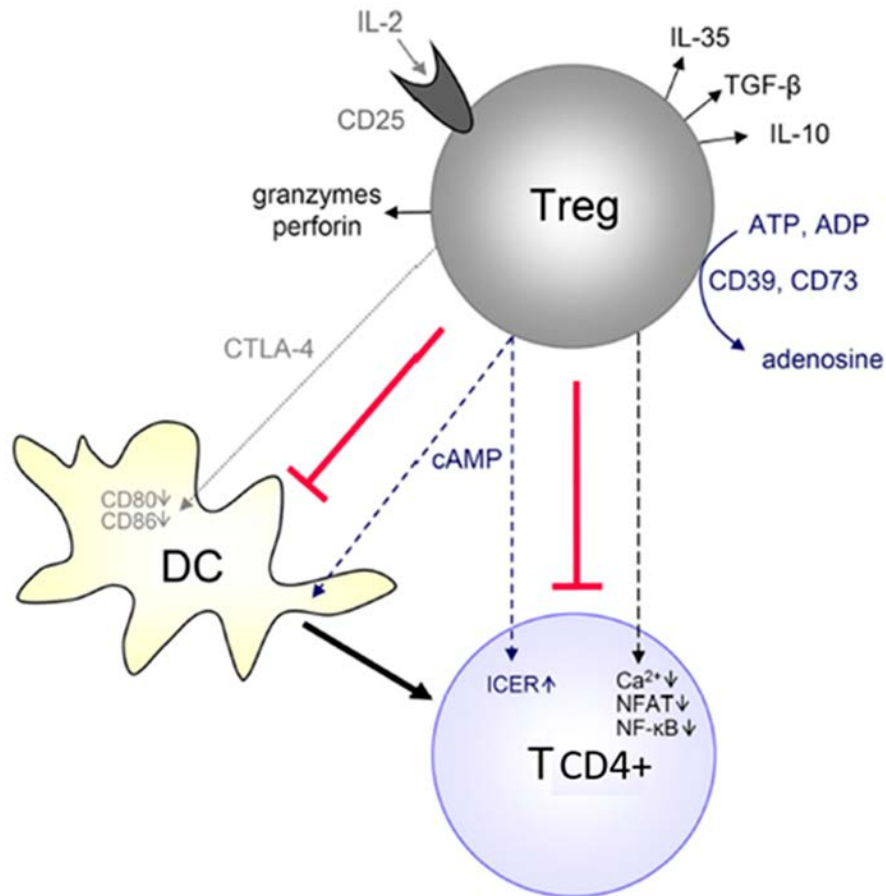
alérgica<sup>65</sup>, mientras que mutaciones en los receptores de esta citocina inducen un desarrollo temprano de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés “*inflammatory bowel disease*”) <sup>66</sup>. Además, recientemente se identificó que la IL-10 controla la producción de IFN $\gamma$  por células T en la piel inflamada, mientras que en el ganglio linfático la IL-10 no es necesaria para controlar la producción de IFN $\gamma$ , mostrando que las Treg emplean diferentes mecanismos dependiendo del sitio y momento de la respuesta, siendo la IL-10 importante en el caso de tejidos inflamados <sup>67</sup>. En cuanto al TGF $\beta$ , ya hemos mencionado que los ratones deficientes de TGF- $\beta$ 1 desarrollan autoinmunidad en semanas tras el nacimiento <sup>32</sup>, al igual que los ratones que carecen de TGF- $\beta$  específicamente en las células T <sup>68</sup>. También se ha demostrado que el TGF $\beta$  en la membrana de las Tregs media la supresión dependiente de contacto en células CD8+infiltrantes de islotes pancreáticos <sup>69</sup>, y se ha observado que la producción de TGF $\beta$ 1 es necesaria para la prevención de colitis <sup>70</sup>. Además, en Tregs humanas el TGF $\beta$  puede conferir actividad supresora a las células T CD4+, de manera contacto dependiente a través de un mecanismo conocido como tolerancia infecciosa <sup>71,72</sup>. IL-35 también es una citocina implicada en la supresión mediada por Treg, de hecho se ha demostrado que puede inhibir directamente la proliferación de las células T CD4+ <sup>73</sup> y que las Treg deficientes en alguna de las cadenas de IL-35 tienen una menor capacidad de supresión *in vitro* e *in vivo* en un modelo de IBD <sup>73</sup>.

Otro de los mecanismos a través de los cuales las Treg pueden llevar a cabo la supresión es la citólisis. Se ha observado que las nTregs humanas activadas expresan granzima A, y que la muerte de células blanco a través de las Treg puede estar mediada por granzima A y perforina <sup>74</sup>. Además en Treg de ratón la expresión de granzima B se encuentra aumentada <sup>75</sup>, y de hecho las células Treg de ratones deficientes de granzima B tienen una disminución en la actividad supresora

*in vitro*<sup>76</sup>. También, se ha demostrado que las Tregs pueden matar células B de manera dependiente de granzima B y perforina, lo cual resulta en supresión de la función de células B<sup>77</sup>.

En cuanto a la disrupción metabólica, las Tregs pueden consumir las citocinas necesarias para que otras subpoblaciones celulares puedan llevar a cabo sus funciones efectoras. Por ejemplo, las Tregs no son capaces de producir IL-2, pero tienen niveles más altos de CD25 que otros linfocitos T, por lo cual son más eficientes para utilizar la IL-2 del microambiente; mediante este mecanismo pueden disminuir la capacidad de activación, proliferación y supervivencia de las células T efectoras<sup>78</sup>. Además, las Tregs tienen una alta expresión de CD39 y CD73, dos ectoenzimas que hidrolizan el ATP/ADP/AMP para generar adenosina pericelular, la cual suprime la respuesta de células T efectoras a través de la activación del receptor a adenosina 2A (A2AR)<sup>79,80</sup>. De manera interesante, la unión de adenosina a A2AR podría promover la generación y/o el mantenimiento de las Tregs al inducir la secreción de TGF- $\beta$  e inhibir la secreción de IL-6<sup>81</sup>.

Además, las Tregs pueden modificar la función de las células presentadoras de antígeno de manera dependiente de contacto<sup>82</sup>, ya que las moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras expresadas en ambas células, Tregs y APCs, juegan un papel esencial en el desarrollo y función supresora de las Tregs en diferentes pasos<sup>83</sup>. Se ha demostrado por ejemplo, que la regulación negativa de la expresión CD80/86 en las APCs por las Tregs<sup>84</sup> es parcialmente dependiente de CTLA-4 y LFA-1, lo cual inhibe la activación de las T CD4+ por las APCs tanto *in vitro*<sup>85</sup> como *in vivo*<sup>86</sup>; esta regulación negativa se lleva a cabo tras la captura de estos ligandos por CTLA-4 en un proceso de transendocitosis<sup>87</sup>.



**Figura 4. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras.** Las células Treg pueden generar adenosina (inmunosupresora) o transferir cAMP a las células T CD4+ . Las Treg también pueden producir citocinas inmunosupresoras como IL-10, TGFβ e IL-35, y pueden suprimir el consumo de IL-2 o inducir la muerte de las células efectoras a través de granzima y perforina. Además, las Tregs pueden suprimir Tcons indirectamente a través de la regulación negativa de moléculas coestimuladoras en las APCs (como en las DCs) a través de CTLA-4 (Tomado de Schmidt *et al* <sup>61</sup>).

### pTreg en intestino

Las pTreg se encuentran enriquecidas en algunos órganos, por ejemplo en mucosas, como ocurre en el tejido linfóide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés “*Gut-Associated Lymphoid Tissue*”), donde tienen un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia de respuestas inmunológicas que se inicien hacia microbiota residente de tejido o antígenos externos derivados de la dieta (tolerancia oral) <sup>88-90</sup>.

Las pTreg se encuentran abundantemente en intestino debido, entre otras cosas, a la expresión abundante de TGF $\beta$  y de ácido retinoico (RA), el cual también promueve la generación de pTregs<sup>91</sup>. Tanto el TGF $\beta$  como el RA pueden ser producidos por las DCs CD103+ en este tejido<sup>92</sup>. El ácido retinoico induce la unión del receptor de ácido retinoico (RAR) y del receptor X a retinoides (RXR) a CNS1, así como al promotor de FoxP3<sup>93</sup>, lo cual lleva a un incremento de acetilación de histonas en los sitios de unión a Smad3 de CNS1, incrementando la unión de Smad3 fosforilada.

Recientemente se ha observado que algunos metabolitos de especies de bacterias residentes de intestino pueden regular a las Treg en intestino. Por ejemplo, el butirato y el propionato (ácidos grasos de cadena sencilla), producidos por bacterias comensales, facilitan la diferenciación de pTregs<sup>89,90</sup>. El butirato inhibe la actividad de la histona deacetilasa y aumenta la acetilación de la histona H3 en el promotor y en las regiones CNS del locus de FoxP3, lo cual aumenta la generación de pTreg<sup>89,90</sup>.

La tolerancia oral es inducida principalmente en ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), ya que se ha observado que la remoción quirúrgica de estos disminuye la inducción de la tolerancia oral<sup>94</sup> lo que es probablemente el sitio de inducción principal de pTreg a antígenos administrados oralmente. Estas pTreg migran al intestino e inducen tolerancia<sup>95</sup>.

Para inducir pTregs específicas a antígenos administrados de manera oral en MLN, las DCs deben obtener los antígenos del intestino, ya sea capturando antígenos lumbinales o a través de las células caliciformes<sup>96,97</sup> y luego migrar al MLN de manera dependiente de CCR7, donde presentan antígenos a las células T, lo cual conlleva la inducción de células T reguladoras específicas<sup>98</sup>.

En este contexto, las células dendríticas CD103+ presentes en el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) o en ganglios linfáticos mesentéricos que drenan el intestino, son capaces de

inducir la expresión de Foxp3 en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, favoreciendo la generación de células pTregs, a través de la producción de TGFβ y RA <sup>7,19,92</sup>. Además, se ha demostrado que específicamente las células dendríticas CD103<sup>+</sup> que expresan niveles altos de PDL- (programmed cell death ligand)-1 inducen Treg de manera eficiente, poniendo de manifiesto la importancia de la interacción entre la célula dendrítica y el linfocito T, a través de sus moléculas co-estimuladoras o co-inhibidoras.

### **b. Células dendríticas**

Las células dendríticas son un grupo heterogéneo de células especializadas en la presentación de antígeno, las cuales son cruciales en la inducción de respuestas inmunológicas innatas y adaptativas efectivas, con lo cual tienen un papel fundamental en la respuesta inmune, así como en el establecimiento de tolerancia. Dentro de la población de células dendríticas existen diversas poblaciones, las cuales tienen características fenotípicas y funciones diferentes, por lo que se han usado diversos parámetros para clasificarlas, como son: fenotipo, ontogenia, perfil de expresión génica y funciones especializadas.

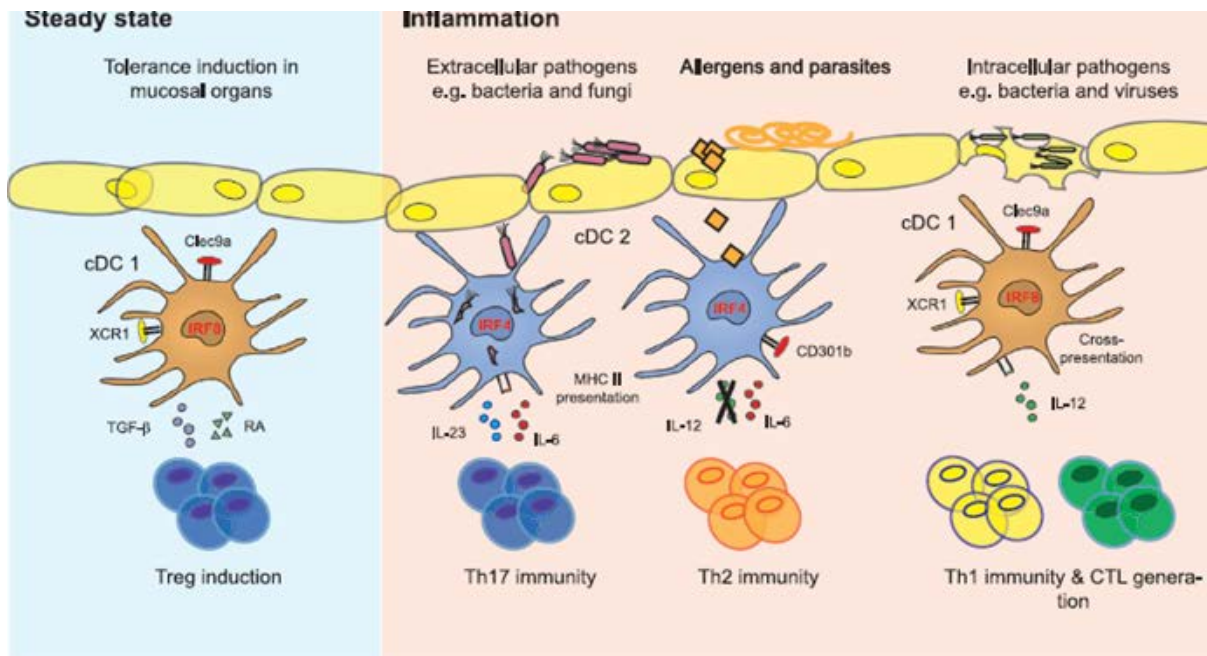
Las DCs tienen su origen en en la médula ósea, a partir del progenitor común linfoide (CLP), así como del progenitor mieloide común (CMP), que se diferencian hasta Pre-DCs. Las Pre-DCs llegan a los tejidos periféricos, donde se diferencian a células dendríticas. De acuerdo al tipo de órgano donde las Pre-DCs llevan a cabo su diferenciación, órganos linfoides u órganos no linfoides, podemos encontrar células dendríticas residentes (rDCs) o migratorias (mDCs) <sup>99,100</sup>. Ambas poblaciones, conocidas como DC convencionales (cDC), pueden identificarse en los ganglios linfáticos de acuerdo al nivel de expresión de MHC-II y CD11c de cada una, siendo CD11c<sup>hi</sup>MHC-II<sup>med</sup> las rDCs y las CD11c<sup>med</sup>MHC-II<sup>hi</sup> mDCs <sup>100</sup>.

En este contexto, las cDC pueden subdividirse en 2 principales subtipos: las tipo 1 (cDC1), que incluyen a las rDCs CD8 $\alpha$ + y a las mDC CD103+; y las tipo 2 (cDC2), las cuales incluyen a las rDCs CD4+/CD11b+ y a las mDCs CD24/CD11b+ <sup>101</sup>. Además, en intestino se ha descrito una población atípica, donde CD103 y CD11b son co-expresados.

Las cDC1 tienen una estricta dependencia a FLT3L para su diferenciación <sup>102</sup> y requieren GM-CSF (Factor estimulante de colonias granulocítica y monocítica) para el mantenimiento de su ciclo celular <sup>103</sup>. Durante su desarrollo estas células requieren el regulador transcripcional ID2 (Inhibidor de la proteína de unión a DNA o DNA-binding protein inhibitor ID2), los factores de transcripción BAFT3 (Factor de transcripción de cierre de leucina básico tipo ATR3), IRF8 (Factor regulador de interferón 8) y NFIL3 (Factor nuclear regulado por IL-3); sin embargo el mecanismo por el cual son regulados estos factores aún no se define <sup>104–106</sup>. Las moléculas de superficie XCR1 y Clec9a, expresadas en estas células, son marcadores conservados en ratón y humano <sup>107–110</sup>. Además, las cDC1 expresan TLR 3, 4, 11 y 13, por lo que pueden reconocer una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) <sup>104,111,112</sup>. Particularmente la expresión de TLR3, la cual se da solo en esta subpoblación de DCs, muestra la relevancia de estas células como sensores primarios en infecciones virales <sup>101</sup> (Figura 5).

Por otro lado, las cDC2, también son dependientes de FLT3, y parcialmente de GM-CSFR (Receptor de GM-CSF) <sup>103,113,114</sup>. Los factores de transcripción que orquestan la diferenciación de las DCs CD11b<sup>+</sup> no han sido descritos a detalle como en el caso de las cDC1. Sin embargo, se ha observado que las DCs CD11b<sup>+</sup>ESAM<sup>+</sup> de bazo dependen de Notch 2 (Neurogenic locus notch homolog protein 2) <sup>113,115</sup>, Relb (V-rel reticuloendoteliosis viral oncogene homolog B) <sup>116</sup> y de Ltr (Receptor de linfotoxina) <sup>117</sup>. Mientras que en la población intestinal CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> se requiere de IRF4 para su desarrollo y mantenimiento <sup>113,115,118</sup>. Las DCs CD11b<sup>+</sup> expresan TLR 5,

6, 7, 9 y 13, y RIG-1. Se ha identificado que estas subpoblación de células pueden inducir respuestas de T tipo Th2 y Th17<sup>113,115,118; 119-121</sup> (Figura 5).



**Figura 5. Propiedades funcionales de las DCs durante condiciones homeostáticas y en inflamación.** Representación esquemática de las diferentes propiedades funcionales de las subpoblaciones de DCs en relación a sus propiedades de activación de las células T. Modificado de Schlitzer *et al*<sup>101</sup>.

Las subpoblaciones de cDCs expresan repertorios únicos de receptores lectina tipo C (CLRs), los cuales están involucrados en la internalización de antígeno y en encaminar a estos hacia los compartimentos de MHC-I y MHC-II, influenciando por lo tanto las respuestas de células T<sup>122</sup>. En el estado estable u homeostático, DEC-205 (Clec13B) y Clec9A se encuentran expresadas predominantemente en las DCs CD8<sup>+</sup><sup>123</sup>. En cambio, las cDCs CD8<sup>-</sup> expresan específicamente Clec4A (DCIR2)<sup>123</sup>.

Además de las poblaciones de cDC, otras poblaciones de DCs han sido descritas, las cuales se conocen como DCs no convencionales, ya que, aunque también tienen su origen en médula ósea, no comparten los mismos progenitores con las cDCs. Dentro de las DCs no convencionales, podemos distinguir a las DCs plasmacitoides (pDCs), las cuales se caracterizan por su capacidad



de producir grandes cantidades de IFN-tipo I en respuesta a la estimulación por virus, y a las DCs inflamatorias, las cuales se diferencian a partir de monocitos en condiciones de inflamación (MoDCs) en tejido, ya sea debido a infección por patógenos o bien, durante enfermedades autoinmunes <sup>124</sup>.

Las células de Langerhans (LC), descritas como una población de DCs presentes en la epidermis, tienen de hecho una ontogenia embriónica única <sup>125,126</sup>, su diferenciación es independiente de FLT3Lc<sup>104</sup> y requieren de CSF-1R y de TGFβ <sup>125,127</sup>.

### **Maduración y función de las células dendríticas.**

Una vez que las DCs se han diferenciado, estas se encuentran en un estado inmaduro (iDC), en el cual son poco eficientes presentando complejos péptido/MHC sobre su superficie, ya que, por ejemplo, su actividad lisosomal se encuentra atenuada <sup>128</sup>. Las iDCs se caracterizan por tener una alta capacidad de endocitosis y procesamiento de antígenos, además de tener baja expresión de MHC-II y de moléculas co-estimuladoras como: CD40, CD80 y CD86. Las iDCs censan continuamente la presencia de antígenos en los tejidos, y expresan diversos receptores de quimiocinas, dependiendo del tejido donde se encuentren. Además, la expresión de receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 y CXCR1 facilitan el reclutamiento de las DCs hacia el sitio de inflamación <sup>129</sup>.

Tras el reconocimiento de señales de daño o peligro a través de los PRRs (Receptores de reconocimiento de patrones) presentes en su superficie, como TLRs o CLR, las iDCs capturan y procesan antígenos en presencia de citocinas proinflamatorias, sufriendo cambios funcionales conocidos como "maduración" <sup>130</sup>. Durante su maduración las DCs incrementan su habilidad de presentar antígenos a través de MHC en su superficie <sup>122</sup>. Una de las características del proceso de maduración es la regulación positiva de la expresión de los receptores de quimiocinas CCR7 y

CXCR4, los cuales permiten a las DCs maduras migrar hacia el dLN, donde se puede dar la activación de las células T<sup>131,132</sup>. Además, las DCs incrementan la expresión de MHC-II, CD40, CD80 y CD86 para que, en conjunto con la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, presenten antígenos y activen linfocitos T y se inicie por tanto una respuesta inmunológica adaptativa<sup>133,134</sup>.

La maduración de las DCs, es un paso esencial para que posteriormente se de la inducción de respuestas de linfocitos T. La activación del linfocito T es un proceso que depende de 3 señales, las cuales son provistas por la célula presentadora de antígeno (APC), como las DCs, y por el microambiente en el cual se lleva a cabo la respuesta. La primera señal, resulta de la unión del TCR al MHC cargado con péptidos derivados de patógenos u otros antígenos. Aunque esta señal es importante ya que asegura la respuesta antígeno específica, por sí sola no es suficiente para iniciar la respuesta inmunológica<sup>135,136</sup>. La segunda señal, está dada por moléculas co-estimuladoras, que promueven la proliferación de los linfocitos T, o co-inhibidoras, que atenúan las respuestas de T. Esta segunda señal, es vital para determinar el tipo de respuesta de células T que tendrá lugar, y que es definida con una tercera señal. Esta tercera señal, dada por citocinas derivadas de las DCs, promueve la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia alguno de los tipos de linfocitos T efectores o reguladores descritos. Es por esto que las DCs controlan el delicado balance entre la inmunidad y tolerancia, a través de las señales que le dan a las células T<sup>137</sup>.

### **Células dendríticas y tolerancia**

En el timo las DCs establecen la tolerancia a lo propio (tolerancia central), a través de la presentación de antígenos propios a las células T en desarrollo, lo cual induce la selección negativa de células T o la diferenciación de Treg<sup>138</sup>. Las células dendríticas juegan un papel importante en

la tolerancia periférica a través de diversos mecanismos, los cuales incluyen inducción de anergia y apoptosis de células T, atenuación de respuestas efectoras y de memoria de células T, y generación y activación de células Treg<sup>139-141</sup>.

La inducción de tolerancia por DCs es atribuida a la baja expresión de MHC y moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) en la superficie de la DC, ya que la presentación de antígenos a bajos niveles, sin co-estimulación lleva a anergia<sup>142</sup> y con bajos niveles de co-estimulación promueve la diferenciación a Treg *in vitro*<sup>143,144</sup>. A diferencia de esto, las DCs maduras expresan altos niveles de MHC y moléculas co-estimuladoras y llevan a la activación de células T efectoras. La inducción de tolerancia depende tanto del desarrollo y activación de las DCs, como del microambiente (citocinas, factores de crecimiento).

En el linfocito la señalización por el TCR en combinación con las moléculas co-estimuladoras, resultan en la activación de los factores de transcripción NFAT (nuclear factor of activated T cells), AP-1 (activator protein-1) y NF- $\kappa$ B (nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer”), lo cual lleva a inducir un perfil transcripcional que resulta en la activación de las células T<sup>145</sup>. En cambio, en ausencia o con baja coestimulación se favorece un perfil transcripcional que favorece la inducción de Treg, debido a la ausencia de AP-1 y N-FAT, posiblemente en conjunto con otros factores de transcripción<sup>146</sup>.

La secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , y la expresión de citocinas pro-inflamatorias disminuida en DCs también contribuye de manera importante a la inducción de tolerancia. En el caso de TGF- $\beta$  se ha observado que la eliminación específica en DCs de la integrina activadora de TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ v $\beta$ 8 (*Itgb8*), resulta en autoinmunidad y colitis, lo cual fue demostrado en un ratón transgénico CD11c-Cre/*Itgb8*<sup>fl/fl</sup><sup>147</sup>. Además, TGF- $\beta$  modula la

presentación de antígeno en las DCs, regulando negativamente MHC y moléculas co-estimuladoras, mientras que regula positivamente PDL-1<sup>148,149</sup>.

Las DCs tolerogénicas pueden expresar varios tipos de receptores inhibitorios como PDL-1, PDL-2<sup>150</sup>, ILT (inhibitory Ig-like transcripts)<sup>151</sup> y CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)<sup>152</sup>, los cuales actúan sobre las células T, modulando la señalización a través del TCR y compitiendo con CD28.

La modulación metabólica por parte de las DCs, también puede alterar la respuesta de T. Por ejemplo, la producción deIDO lleva a una disminución de la proliferación de células T<sup>153</sup>, mientras que HO-1 (hemo oxigenasa-1) lleva a una disminución en la inmunogenicidad<sup>154</sup>. Además, como se mencionó previamente, las DCs tolerogénicas son capaces de producir RA<sup>155</sup> e inducir diferenciación de Treg<sup>156</sup>.

Por otro lado, se ha observado que las células dendríticas maduras tienen un alto grado de plasticidad, es decir, pueden fácilmente convertirse a DCs tolerogénicas; esto se ha puesto de manifiesto, por ejemplo, en una subpoblación de DCs activadas, estimuladas con IFN $\gamma$ , el cual promueve la expresión deIDO (indolamina 2,3-dioxigenasa), llevando a la adquisición del potencial tolerogénico de las DCs<sup>157</sup>.

*In vivo* se han evidenciado diferentes poblaciones de DCs con la capacidad de inducir pTreg. Por ejemplo, en intestino DCs que expresan CD103 (integrina  $\alpha$ E $\beta$ 7) están especializadas en la inducción de Treg FoxP3<sup>+</sup> y participan en el mantenimiento de la tolerancia oral. Estas DCs CD103<sup>+</sup> de MLN o de tejido asociado a mucosas, usan TGF $\beta$  endógeno y RA para inducir Tregs<sup>92,158</sup>; además, recientemente Shiokawa *et al.* demostraron que dentro de las DCs de MLN, hay una subpoblación caracterizada como CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>PD-L1<sup>hi</sup>, la cual induce de manera muy eficiente Treg FoxP3<sup>+</sup>. Esta subpoblación expresa *Aldh1a2* e *Itgb8*, involucrados en el metabolismo de RA

y activación de TGF $\beta$ , tiene un fenotipo migratorio y puede incorporar y presentar antígenos administrados oralmente <sup>159</sup>.

Además, de su papel en la tolerancia oral, las DCs también tienen un papel en la tolerancia sistémica, tejido específica, en la periferia. En este sentido, se ha reportado que las rDCs de bazo también han mostrado potencial tolerogénico *in vitro* e *in vivo*, en presencia de TGF $\beta$ , ya sea producido endógenamente como es el caso de las DCs CD8<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup> o bien con la adición de TGF $\beta$  exógeno (CD8<sup>+</sup>DCIR-2<sup>+</sup>) <sup>160</sup>. También se ha reportado que las DCs CD8<sup>+</sup> de bazo expresan preferencialmente PDL-1 y que este es esencial para inducir Treg FoxP3<sup>+</sup> en presencia de TGF $\beta$  exógeno <sup>161</sup>. DCs CD8<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup> de bazo pueden capturar células apoptóticas e inducir Treg a antígenos presentes en las células apoptóticas <sup>161,162</sup>, las cuales inducen la producción de TGF $\beta$  <sup>163</sup>, y esto puede ser un mecanismo a través del cual se mantiene la tolerancia en condiciones homeostáticas. Aunado a eso, usando una estrategia de direccionamiento del antígeno *in vivo*, se ha observado que las DCs CD8<sup>+</sup> inducen más células FoxP3<sup>+</sup>, cuando se direcciona el antígeno a través de DEC205; en comparación con el direccionamiento de antígeno empleando DCIR2 <sup>160</sup>. Además, el direccionamiento de antígeno a través de DEC205 también puede llevar a delección clonal <sup>164,165</sup>.

### **c. Familia de TGF $\beta$**

La superfamilia de TGF $\beta$  incluye diversas proteínas relacionadas estructuralmente, las cuales están involucradas en la regulación de muchos procesos celulares, incluyendo diferenciación, proliferación, organización del citoesqueleto, adhesión, y apoptosis. Más de 30 moléculas son miembros de esta familia, incluyendo TGF $\beta$  (3 isoformas), Activinas e Inhibinas, BMPs (bone morphogenetic proteins), GDFs (growth differentiation factors), NODAL y AMH

(anti-Müllerian Hormone) <sup>166</sup>. Las citocinas maduras de esta superfamilia en general son homo o heterodímeros unidos por puentes disulfuro <sup>167</sup>.

Los miembros de la familia de TGF $\beta$  son expresados como proteínas precursoras, las cuales tienen un pro-dominio, el cual es escindido del extremo carboxilo-terminal por convertasas pro-proteínas <sup>167,168</sup>. Los pro-dominios son esenciales, ya que son requeridos para el plegamiento correcto de la proteína. Usualmente, los prodominios permanecen unidos de manera no-covalente a las proteínas maduras, aún tras su secreción; y en algunos casos la afinidad de esta unión es suficiente para suprimir su actividad biológica, por ejemplo: TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, miostatina, y BMP10 <sup>168</sup>.

Los miembros de la familia de TGF $\beta$  señalizan a través de un sistema de receptores de cinasas serina/treonina, los cuales incluyen receptores tipo I (Activin like kinase, ALK) y tipo II. Diversas combinaciones de estos receptores son usadas por diferentes ligandos de la familia de TGF $\beta$ . Tras la unión del ligando, el receptor tipo I correspondiente se fosforila por el receptor tipo II, constitutivamente activo, y las serinas y treoninas fosforiladas proveen un sitio de unión para las Smads reguladas por receptor (R-Smads). La R-Smad (Smad 2/3 y Smad1/5/8) y la Smad común (Co-Smad), Smad4, forman un complejo heterotrimérico, el cual transloca al núcleo, donde regulan la transcripción de genes, por la unión directa al DNA o por la interacción con otros factores de transcripción <sup>167,168; 169</sup>. Además, las Smads inhibitorias (I-Smads), Smad 6 y 7, regulan negativamente la señalización por TGF $\beta$ . La transducción de señales dependiente de Smad corresponde a la vía de señalización de TGF $\beta$  mejor estudiada, y es conocida como la vía de señalización “canónica” de TGF $\beta$ . Sin embargo, otras moléculas de señalización, como GSK3b (Glycogen Synthase Kinase 3b), ciclinas dependientes de cinasas (CDKs) o GTPasas pequeñas, y MAPKs (mitogen-activated protein kinases), son conocidas por interactuar con Smads (vías

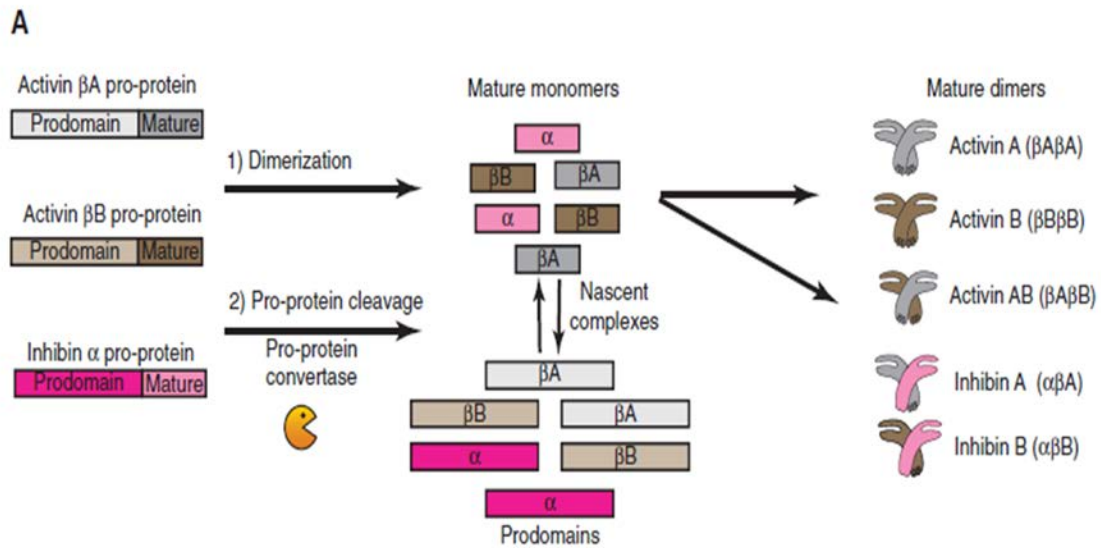
parcialmente dependientes o parcialmente canónicas) o por ser activadas directamente por la interacción con los receptores <sup>169, 170</sup>.

### **Inhibinas**

Las Inhibinas, descritas por primera vez en 1932 <sup>171</sup>, fueron caracterizadas originalmente como hormonas peptídicas producidas por las gónadas, por células de Sertoli en los testículos y por las células de la granulosa en los ovarios. Las Inhibinas regulan negativamente la síntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), con lo cual forman parte del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas <sup>172, 173</sup>. Por su parte las Activinas (proteínas homólogas a las Inhibinas) regulan positivamente la secreción de FSH. Actualmente se sabe que las Inhibinas y Activinas están involucradas en diferentes procesos biológicos, desde los estadios de desarrollo embrionario temprano, hasta funciones altamente especializadas en células terminalmente diferenciadas, incluyendo varios procesos inmunológicos <sup>174,175</sup>.

Las Inhibinas son heterodímeros formados por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , unidas por un puente disulfuro. Mientras que las Activinas están compuestas de 2 subunidades  $\beta$ . Estas subunidades  $\beta$  son compartidas entre ambas proteínas, por lo que sus funciones están altamente relacionadas <sup>176</sup>. Existen 3 isoformas de Activina y 2 de Inhibina dadas por las combinaciones de las subunidades  $\beta$ , como se observa en la Figura 6. Dado que los dímeros de Activinas e Inhibinas usan un pool común de subunidades  $\beta$ , la producción de uno u otro ligando depende de la disponibilidad de subunidades  $\alpha$  <sup>177</sup>. Las subunidades  $\beta$ A,  $\beta$ B y  $\alpha$  son sintetizadas como pro-proteínas que contienen un pro-dominio y un dominio maduro (al igual que otros miembros de la familia de TGF $\beta$ ). Las pro-proteínas se asocian para formar homo o heterodímeros, los cuales son procesados para dar lugar a Activina A, B o AB e Inhibina A y B. Los prodominios son importantes, ya que ayudan al correcto plegamiento y ensamblaje de los dímeros <sup>178,179</sup>. El

prodominio de Inhibina contiene 3 aminoácidos (Leu30, Phe37, Leu41) que forman una interfase hidrofóbica con el péptido maduro, y esto es requerido para el ensamblaje y secreción del heterodímero <sup>178,179</sup>, mutaciones en estos aminoácidos llevan a una producción disminuida de Inhibina A, debida a fallas en su dimerización. Diferencias en la glicosilación post-traducciona de la subunidad alpha de Inhibina también pueden afectar sustancialmente la producción y secreción de Inhibina, así como su afinidad por betaglicano <sup>180-182</sup>. Las uniones del pro-dominio y el dominio maduro son escindidas por convertasas, lo cual resulta en dímeros que mantienen unidos sus prodominios a través de fuerzas no-covalentes <sup>183</sup>. Tanto las Activinas como las Inhibinas son secretadas de esta manera, lo cual protege a los dímeros maduros de degradación extracelular <sup>178</sup>. Además, una vez fuera de la célula, los prodominios interactúan con componentes específicos de la matriz extracelular, como perlecan y agrina, a través de la unión a sus cadenas de heparán sulfato, protegiéndolos de proteólisis y posiblemente presentándolos a mayor concentración a sus receptores <sup>184</sup>. La unión de los dímeros maduros a sus receptores desplaza a los prodominios <sup>178,179</sup>.



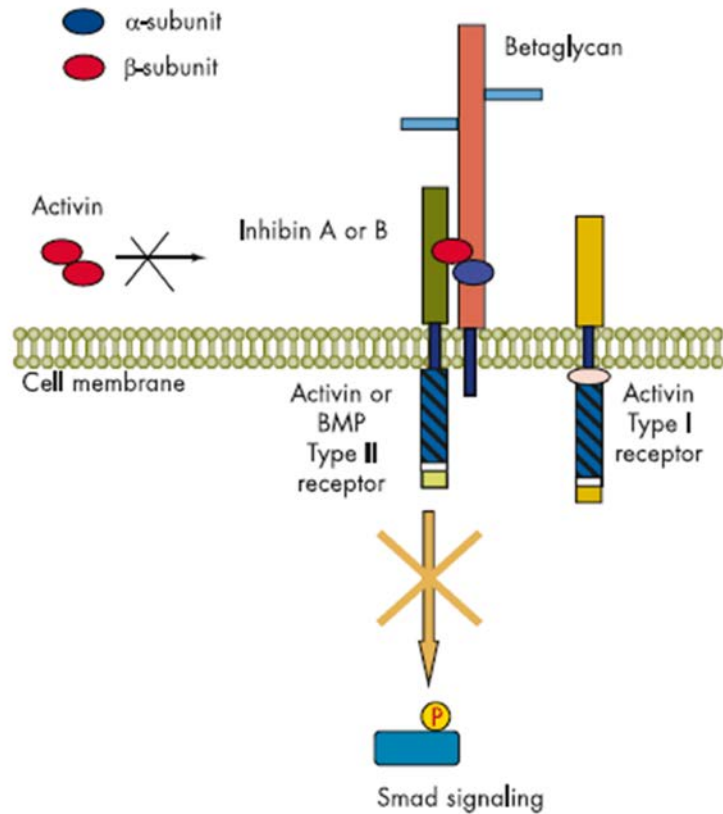
**Figura 6. Inhibinas y Activinas.** Las subunidades  $\beta$ A,  $\beta$ B y  $\alpha$  son sintetizadas como pro-proteínas que contienen un pro-dominio y un dominio maduro. Las pro-proteínas se asocian para formar homo o heterodímeros, los cuales son posteriormente procesados a Activinas A, B, AB e Inhibinas A y B. Las uniones del dominio maduro y el pro-dominio son escindidas por convertasas,



resultando en complejos diméricos que mantienen unidos sus pro-dominios por uniones no covalentes <sup>174,175</sup>.

Activina A comparte la vía de señalización canónica SMAD2/3 con TGF $\beta$  y otros miembros de la superfamilia de TGF $\beta$ . Las Activinas se unen a los receptores de Activina tipo II (ActRIIA o ActRIIB), y posteriormente se recluta al receptor tipo I (activin receptor-like kinase-4 o ALK4) para formar un receptor heterodimérico activo <sup>177</sup>. Por otro lado, los mecanismos a través de los cuales señalizan las Inhibinas y como antagonizan las funciones de las Activinas aún se encuentran en estudio.

Se ha observado que las Inhibinas se unen a betaglicano (receptor tipo III para TGF $\beta$ ) con alta afinidad, a través de su subunidad  $\alpha$ , y esto aumenta la unión de la subunidad  $\beta$  de Inhibina a los receptores tipo II <sup>185</sup>, formando como resultado complejos terciarios con estos receptores, y excluyendo así a los receptores tipo I del complejo, evitando que la cascada de señalización (SMAD2/3) se active <sup>173,186</sup> (Figura 7). Es por esto que las Inhibinas han sido consideradas como moléculas que no señalizan, sin embargo, varios reportes sugieren la posibilidad de que las Inhibinas señalizan a través de un receptor diferente, el cual no ha sido identificado hasta la fecha <sup>187</sup>. Esto está justificado por evidencias que muestran que las Inhibinas no siempre antagonizan las funciones de las Activinas. Por ejemplo, Licona-Limón *et al.* evaluaron la participación de la Inhibina A y Activina A durante el desarrollo de los linfocitos T, donde observaron que ambas promueven el paso del estadio doble negativo (DN)3 a DN4 <sup>188</sup>. Además, resultados no publicados de nuestro laboratorio indican que las Inhibinas son capaces de inducir la fosforilación de Smad2/3 en timocitos, lo cual sugiere que las Inhibinas pueden unirse a un receptor tipo I (ActRI) e inducir señalización <sup>189</sup>.



**Figura 7. Mecanismo de acción de la Inhibina.** Inhibina antagoniza la acción de la Activina a través de su unión a los receptores tipo II y betaglicano. La Inhibina se une con alta afinidad al complejo ActRII/betaglicano y bloquea a la Activina de mediar la señalización por Smads <sup>186</sup>.

## 5. Antecedentes

Se ha observado que las Activinas e Inhibinas pueden regular la diferenciación de varios tipos de células del sistema inmunológico, incluyendo macrófagos, DCs y linfocitos T <sup>174,176</sup>.

En timo, se ha observado que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Inhibinas y Activinas) se expresan en el estroma tímico <sup>188</sup>. Además, los receptores ALK4, ACTRIIA y ACTRIIB, así como las proteínas SMAD 2, 3, y 4, son expresadas principalmente en el estroma tímico, aunque también se expresan en los timocitos (en mayor cantidad en los timocitos DN) <sup>188</sup>. De hecho, se ha observado que tanto Activina A como Inhibina A promueven la transición del estadio de linfocitos DN3 a DN4, lo cual sugiere un rol positivo durante el proceso de la selección  $\beta$ . Por otro lado, Activina A induce la

acumulación de un intermediario simple positivo (CD8+, HSAhi TCR $\alpha$ ), mientras que la Inhibina A promueve la transición de DN4 a DP<sup>188</sup>. De manera interesante, en el estadio DN3, los timocitos expresan un TCR inmaduro (pre-TCR) y sufren un proceso conocido como selección  $\beta$ , el cual lleva a señales de sobrevida, proliferación, exclusión alélica, iniciación del rearreglo de la cadena alfa del TCR y a la expresión de los co-receptores CD4 y CD8<sup>174</sup>.

Dentro del estroma tímico podemos encontrar células tímicas epiteliales (TEC) y DCs. Usando el modelo de ratón deficiente de Inhibina  $\alpha$ , se observó que las TEC tienen una diferenciación alterada, mostrando una mayor diferenciación hacia mTEC comparado con TEC corticales (cTEC). Además, también se observó que las cDCs tímicas deficientes de Inhibina muestran una expresión de MHCII y CD86 disminuida; mientras que las pDCs muestran niveles normales de MHC II. Estas alteraciones sugieren que las Inhibinas pueden regular la maduración de las DCs tímicas. Además, estas alteraciones correlacionan con la disminución de la selección de linfocitos T CD4+, y un incremento en la generación de tTreg<sup>190</sup>.

Las Activinas e Inhibinas pueden regular las funciones de las DCs en condiciones homeostáticas e inflamatorias a través de diversos mecanismos<sup>174,176</sup>. Por ejemplo, se ha observado que la Activina A, liberada por mo-DC (células dendríticas derivadas de monocitos) durante la maduración mediada por CD40L, actúa en una manera autocrina disminuyendo las propiedades funcionales de las DCs, tales como la inducción de mediadores proinflamatorios<sup>191</sup>. Además, Sereger *et al.*, observaron que tanto la Activina A como la Inhibina A pueden regular negativamente la maduración de células DC humanas inducida por señales proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , y PGE2). Las DCs estimuladas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , y PGE2) en presencia de Activina A o Inhibina A presentan una menor expresión de HLA-DR, aumento del número de

células con podosomas y disminución de la proliferación de linfocitos T en cultivos alogénicos comparando con mDCs <sup>192</sup>.

En trabajos recientes del laboratorio hemos demostrado que la ausencia de Inhibinas en DCs resulta en una maduración alterada. *In vitro*, en cultivos de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) deficientes de Inhibina comparadas con sus contrapartes silvestres, se observó que, al ser estimuladas con LPS, muestran bajos niveles de expresión de MHC-II y CD86, y un incremento en la expresión de PD-L1; además, al evaluar la secreción de citocinas, se observó un ligero incremento de IL-10, acompañado de una ligera disminución en la secreción de IL-6. Estos hallazgos correlacionaron con una habilidad disminuida para activar linfocitos T alogénicos. Además, *in vivo* se observó que las cDCs  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  muestran una disminución en la expresión de CD86 tras el estímulo con LPS, mientras que las células de Langerhans ( $\text{CD}207^{+}\text{CD}11\text{b}^{+}\text{CD}103^{-}$ )  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ , muestran una disminución de la expresión de MHC-II y CD86 en las mismas condiciones, lo cual resulta en una disminución de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), debida tanto a la falta de maduración, como a las alteraciones en la migración de las DCs al ganglio drenante <sup>193</sup>.

## 6. Planteamiento del problema

El mantenimiento del balance de la respuesta inmunológica es crucial para mantener la homeostasis en el individuo, evitando enfermedades que pudieran resultar de una respuesta inmunológica descontrolada. Las células Treg tienen un papel vital en la prevención de autoinmunidad y patologías derivadas de respuestas inmunológicas descontroladas a infecciones. La generación de células Treg puede darse en periferia, partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes. Esta diferenciación depende de las señales que recibe el linfocito por parte de la célula presentadora de antígeno y del microambiente en el que se encuentre. Se ha observado que las células dendríticas, células presentadoras de antígeno profesionales, pueden modular la respuesta, ya sea potenciando la inmunidad o promoviendo la tolerancia. Entender los mediadores a través de los cuales la célula dendrítica desarrolla un potencial inmunogénico o tolerogénico es crucial en el desarrollo de terapias inmunológicas basadas en la modulación de éstas.

El papel de TGFβ en la regulación de la respuesta inmunológica ha sido ampliamente estudiado durante los últimos años. Sin embargo, el papel de otros miembros de la familia de TGFβ, tales como son las Activinas e Inhibinas, en la respuesta inmunológica ha sido poco estudiado. Durante los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha dedicado al estudio del papel de las Inhibinas en la modulación de las respuestas inmunológicas.

En el timo se ha observado que tanto las subunidades de Inhibinas y Activinas, como las de sus receptores pueden ser expresadas a nivel de mRNA y de proteína por los timocitos y, en mayor cantidad por las células del estroma tímico. De hecho, se ha demostrado que las Activinas e Inhibinas regulan y afectan la diferenciación de las células T, ya que ambas promueven la transición de DN3 a DN4, mientras que la Inhibina A promueve la diferenciación de DN4 a DP. Además, se ha observado que las cTECs muestran niveles disminuidos de MHC-II y CD86 en

ausencia de Inhibinas, además de que la diferenciación de las mTECs se ve favorecida en estas condiciones. Estos cambios están relacionados con una disminución de la selección de timocitos CD4<sup>+</sup> y un incremento en las Treg tímicas, indicando que las Inhibinas pueden participar en la regulación de la tolerancia.

Por otro lado, las cDCs del estroma tímico, donde se expresan tanto las Inhibinas, Activinas y sus receptores, tienen una reducción en la expresión de las moléculas de MHC-II y CD86, demostrando que el fenotipo de las DCs tímicas está alterado en ausencia de Inhibinas. Además, recientemente reportamos que las DCs derivadas de médula ósea tienen un fenotipo alterado tras un estímulo de maduración, caracterizado por la expresión disminuida de MHC-II y CD86 y un incremento en la expresión de PD-L1, además de cambios discretos en el perfil de citocinas (incremento de IL-10 y disminución de IL-6). Este fenotipo resulta en una disminución de la capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> alogénicos *in vitro*. Estos datos correlacionan con una maduración alterada de las células de Langerhans (CD207<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>) deficientes de Inhibina *in vivo*, tras la maduración con LPS, lo cual conlleva una disminución de la respuesta inflamatoria en ensayos de DTH.

Nuestros hallazgos previos, indican que las Inhibinas participan en la maduración de las DCs, lo cual puede llevar a una regulación de las respuestas inmunológicas. Sin embargo, se desconoce si las Inhibinas pueden tener algún papel en la modulación de la tolerancia periférica. Particularmente, se desconoce si los efectos observados en las DCs en ausencia de Inhibinas pueden repercutir en la interacción entre la DC y el linfocito T CD4<sup>+</sup>, de manera que la inducción de células T reguladoras periféricas se vea afectada.

Por otro lado, el hecho que las inhibinas pueden ser producidas por linfocitos en desarrollo (timocitos), plantea la posibilidad de que los linfocitos T maduros puedan producir su propia

inhibina y funcionar de manera autocrina, modulando el proceso de conversión hacia Treg de manera intrínseca.

## **7. Hipótesis**

Las inhibinas regulan negativamente la generación de células T reguladoras inducidas en periferia.

## **8. Objetivo General**

Evaluar la participación de las Inhibinas en la generación de células T reguladoras periféricas/inducidas.

## **9. Objetivos Particulares**

- Determinar si la ausencia de Inhibinas afecta a las poblaciones de células Treg (tTreg y pTreg) en condiciones homeostáticas en órganos linfoides secundarios y mucosa (LP).
- Evaluar si las poblaciones de cDC en MLN se ven afectadas, en frecuencia o estado de activación, en ausencia de Inhibinas en condiciones homeostáticas.
- Evaluar la capacidad de inducción de Tregs, a partir de T vírgenes, de DCs en ausencia de Inhibinas.
- Evaluar la capacidad de diferenciación de linfocitos T vírgenes a iTreg en ausencia de Inhibina.
- Evaluar *in vitro* la función de las Treg deficientes de Inhibina.

## 10. Materiales y Métodos

### a. Ratones

Los ratones heterocigotos para Inhibina  $\alpha$  ( $\text{Inh}\alpha^{+/-}$ ) en fondo C57BL/6 fueron donados por el Dr. Martin Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston TX), y han sido descritos previamente<sup>194</sup>. Los ratones *knock in* (KI)  $\text{FoxP3}^{\text{EGFP}}$  (B6.Cg-Foxp3tm2Tch/J), así como los ratones transgénicos OT-II y CD45.1 en fondo C57BL/6 fueron comprados de The Jackson Laboratory. Los ratones fueron entrecruzados para generar ratones  $\text{Inh}\alpha^{+/+}\text{FoxP3}^{\text{EGFP}}$ ,  $\text{Inh}\alpha^{-/-}\text{FoxP3}^{\text{EGFP}}$  y  $\text{CD45.1}^+\text{OT-II}^+$ . Todos los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB, UNAM, México), de acuerdo a las normas de ética y salud animal. Este estudio fue aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), del IIB.

### b. Aislamiento de linfocitos T de lámina propia de colon (LP), ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos periféricos o bazo.

El aislamiento de linfocitos de la LP de colon se realizó empleando métodos previamente descritos<sup>195</sup>. Brevemente, el intestino fue lavado con PBS, abierto longitudinalmente, y el colon se cortó en piezas de 5mm aproximadamente. El tejido fue incubado en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) libre de calcio y magnesio, la cual contenía EDTA 2 mM y ditiotreitól 1 mM (Sigma), por 30 minutos a 37°C en agitación. El tejido remanente fue lavado con PBS, e incubado 30 minutos a 37°C en RPMI suplementado con 100 U/ml de colagenasa IV (GIBCO). Las suspensiones celulares fueron filtradas a través de una malla de nylon de 50 $\mu\text{m}$ .



Los ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios periféricos (axilares, inguinales y cervicales) y el bazo fueron colectados y disgregados mecánicamente. En el caso del bazo, los eritrocitos fueron lisados en 1 ml amortiguador ACK por 2 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente, las suspensiones celulares fueron lavadas con PBS y filtradas en una malla de nylon de 50µm.

Las células fueron resuspendidas en amortiguados para FACS para el análisis fenotípico o en PBS para la separación de las células T vírgenes por citometría de flujo.

*c. Obtención de células dendríticas de ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios periféricos y bazo.*

Se obtuvieron los ganglios linfáticos mesentéricos, periféricos (inguinales, axilares y cervicales), y el bazo de ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  e  $Inh\alpha^{-/-}$  de 4 semanas de edad. Los órganos fueron cortados en pedazos de aproximadamente 5 mm con la ayuda de navaja para bisturí, y se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con 5 mg/ml de colagenasa IV (GIBCO), 25 U/ml de DNAsa (Roche) y 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, durante 1h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, el tejido restante se disgregó mecánicamente con la ayuda de un émbolo. En el caso del bazo, los eritrocitos fueron lisados en 1 ml de amortiguador ACK por 2 minutos a temperatura ambiente. Las suspensiones celulares se filtraron a través de una malla de nylon de 50µm y se lavaron con PBS. Las células fueron resuspendidas en amortiguador para e FACS para el análisis fenotípico, o en amortiguador para MACs para la separación celular con anticuerpos acoplados a perlas magnéticas.

***d. Análisis fenotípico por citometría de flujo.***

De manera general, para el análisis fenotípico, las suspensiones celulares fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes, posteriormente se lavaron 2 veces con amortiguador para FACS. En los casos necesarios se llevó a cabo una segunda incubación, con estreptavidina acoplada a fluorocromo durante 20 minutos a 4°C y se lavaron las células con amortiguador para FACs. Por último, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS.

Para el análisis de las células Tregs *ex vivo*, las células se tiñeron con los anticuerpos anti-CD25-PECy5, anti-Helios-FITC, anti-CD8-PE de Biolegend (San Diego, CA); anti-CD4-APC-AF750 de Invitrogen (Eugene, OR), y anti-FoxP3-APC de eBiosciences (San Diego, CA). Para el análisis de las Treg inducidas *in vitro* se empleó el marcador de viabilidad Zombie Aqua fixable dye (ZA), y los anticuerpos: anti-CD4-APC y anti-CD25-PECy5 de Biolegend.

Para el análisis de las DCs *ex vivo*, las células fueron bloqueadas con anti-CD16/32 puro, y posteriormente se tiñeron con ZA, anti-I-A/I-E-AF488, anti-CD11c-AF700, anti-CD80-PECy5, de Biolegend; anti-CD3-PE, anti-TER119-PE, anti-CD11b-VF450, anti-CD86-APC, anti-CD8-PECy7 de Tonbo Biosciences (San Diego, CA); anti-CD19-PE, anti-CD49b-PE, Streptavidin-APC-Cy7 de BD Biosciences (San Jose, CA); anti-CD103-biotina y anti-PD-L1-PerCP-eFluor710 de eBiosciences.

Para los experimentos de transferencia *in vivo*, se emplearon anti-CD45.1-AF700, anti-CD4-FITC, anti-CD25-PECy5, estreptavidina-BV605 de Biolegend, anti-Vβ5-biotina de BD Biosciences, y anti-FoxP3-APC de eBiosciences para identificar las células T específicas para ovoalbúmina (OVA).

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies) y se analizaron con el software FlowJo 10.0 (Tree Star Inc.).

***e. Generación de DCs a partir de médula ósea.***

Las células de médula ósea se obtuvieron de las tibias y fémures de ratones hembra silvestres o deficientes de Inhibinas, de 9 semanas de edad, con la ayuda de una jeringa con aguja de 27G. Las médulas óseas fueron drenadas con medio RPMI suplementado con 10% SFB, 100 U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina. La suspensión celular fue homogenizada y filtrada a través de una malla de 50µm. Las células se centrifugaron a 300 x g por 5 minutos, y posteriormente resuspendidas en medio de cultivo. Para realizar el conteo celular, se obtuvo una alícuota, donde los eritrocitos fueron lisados con amortiguador ACK durante 2 min.

Para llevar a cabo la diferenciación de las DCs *in vitro*, se sembraron  $5 \times 10^6$  células en 10 ml de RPMI 1640, suplementado con 10% SFB y 5% de sobrenadante de células CHO productoras de GM-CSF en cajas bacteriológicas. Tras 3 días de incubación a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, se añadieron 8ml de medio fresco. Al quinto día de cultivo, se agregó 1µg/ml de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Aldrich) por 24h, para inducir la maduración de las BMDCs. Al día 6 de cultivo, las células no adherentes fueron colectadas, y resuspendidas en medio, amortiguador para FACs o amortiguador para MACS para posteriores ensayos.

***f. Separación celular por MACS***

Células CD11c<sup>+</sup> fueron separadas a partir de BMDCs obtenidas *in vitro*, o bien a partir de las suspensiones celulares de ganglios periféricos y bazo, obtenidas como se describió previamente. Para llevar a cabo la separación, las células fueron resuspendidas en amortiguador para MACS, e incubadas en presencia de anti-CD11c acoplado a perlas magnéticas (Miltenyi

Biotec, UK) por 10 minutos. Posteriormente, se realizó 1 lavado, para lo cual se añadió amortiguador para MACS y se centrifugó a 300 x g por 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 500ml de amortiguador para MACs y se pasaron por una columna colocada en un campo magnético, previamente preparada e hidratada (Miltenyi Biotec, UK), y se realizaron 3 lavados de la columna con amortiguador para MACS para eluir toda la fracción negativa. Una vez realizado esto, se retiró la columna del campo magnético y se procedió a eluir la fracción CD11c+ con amortiguador para MACS y la ayuda de un émbolo. Las células recuperadas fueron lavadas y resuspendidas en amortiguador para FACs o medio de cultivo, para usarlas en ensayos subsecuentes.

***g. Estimulación in vitro de DCs obtenidas de ganglios periféricos y bazo (ex vivo)***

Las DCs CD11c+ fueron obtenidas de ganglios periféricos y bazo, y separadas por MACS, como se explicó anteriormente. Posteriormente las DCs CD11c+ fueron sembradas a una densidad de 100,000 células/pozo (iCD11c+), y en algunos se estimularon con 100 ng/ml de LPS *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Aldrich) por 24h, para inducir la maduración (mCD11c+).

***h. Inducción de células Treg***

La inducción de células Treg *in vitro* se llevó a cabo a partir de células T vírgenes (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>hi</sup>FoxP3-GFP<sup>-</sup>), las cuales fueron obtenidas por separación celular por citometría de flujo usando un citómetro FACS Aria I (BD Biosciences, San Jose, CA), a partir de bazo y ganglios linfáticos periféricos de ratones FoxP3<sup>EGFP</sup>.

Para llevar a cabo la inducción de Tregs en presencia de DCs, las células T vírgenes fueron co-cultivadas con BMDC CD11c+ o con DCs CD11c+ de bazo y ganglios linfáticos periféricos, maduras o inmaduras, en diferentes proporciones DC:T vírgen (1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20). Los

cultivos fueron estimulados con 0.1µg/ml de anti-CD3 (Tonbo) y 0.25ng/ml de TGFβ (R&D systems) e incubados a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> por 5 días. El porcentaje de inducción de Tregs fue evaluado a través de la expresión de FoxP3 y CD25.

Para la inducción de células Treg en ausencia de DCs, las células T vírgenes fueron cultivadas en presencia de 1µg/ml anti-CD3 puro (Tonbo), previamente pegado a la placa, 2µg/ml de anti-CD28 puro (Tonbo) y diferentes concentraciones de TGFβ (R&D systems). El porcentaje de inducción de Tregs fue evaluado a través de la expresión de FoxP3 y CD25, a 5 días después por citometría de flujo.

Para la inducción de Tregs *in vivo*, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> fueron separadas por FACS a partir del bazo y los ganglios periféricos de ratones OT-II x CD45.1. 4x10<sup>6</sup> células fueron transferidas por vía intravenosa a ratones CD45.2 Inhα<sup>+/+</sup> or Inhα<sup>-/-</sup>. 24h después de la transferencia, los ratones fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja, con anti-DEC205-OVA, anti-DEC205-OVA mas toxina del cólera (CT), OVA o OVA mas CT. 7 días después de la inmunización, se analizó la inducción de pTregs evaluando la expresión de CD25 y FoxP3 dentro de la población de células OT-II transferidas (CD4<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>Vβ5<sup>+</sup>), en suspensiones celulares obtenidas a partir de los ganglios linfáticos drenantes.

#### ***i. Cuantificación de Inhibina A y Activina A***

La concentración de Inhibina A presente en los sobrenadantes de cultivo fue evaluada utilizando el kit “Mouse Inh A” (Elabscience, Houston, TX), siguiendo las indicaciones del fabricante. Por otro lado, la concentración de Activina A en el suero de los ratones fue evaluada usando el kit de ELISA “Human/Mouse/Rat Activin A” (R&D systems), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

***j. Ensayos de supresión de la proliferación.***

Células T CD4<sup>+</sup> (respondedoras) fueron obtenidas del bazo de ratones silvestres C57BL/6 a través de separación celular por MACS, y posteriormente teñidas con cell trace violet (CTV, Invitrogen, Eugene, OR). Para llevar a cabo la tinción las células fueron lavadas y resuspendidas en 500µl de una solución 7.5µM CTV en PBS, por cada 5x10<sup>6</sup> células, e incubadas en oscuridad durante 20 min a 37°C, posteriormente se añadieron 5 volúmenes de RPMI con 10% SFB, y se centrifugaron las células a 2000 rpm por 5 min. Las células se resuspendieron en 1 ml de RPMI + 10%SFB y se incubaron por 10 min a 37°C en oscuridad, y se lavaron nuevamente. Se sembraron 25,000 células respondedoras (Tresp) por condición.

Las células Treg fueron purificadas en base a su expresión de CD4, CD25 y FoxP3 (GFP), a partir de ratones FoxP3<sup>EGFG</sup>. Las células Treg purificadas fueron co-cultivadas con las células respondedoras a diferentes proporciones Treg:T respondedora (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32), en presencia de 0.25µg/ml de anti-CD3 puro, 0.25ug/ml de anti CD28 puro y 0.5µg/ml de anti-syrian hamster e incubadas por 5 días a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 5 días la proliferación de las células respondedoras fue evaluada a través de la dilución de CTV, y el porcentaje de supresión fue calculado en base a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Supresión} = (\% \text{ Proliferación de T resp con Treg} \times 100) / \% \text{ Proliferación de Tresp sin Treg.}$$

***k. Análisis estadístico.***

Los datos son presentados como media ± EE (Error estándar). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de t de Student, para comparar las medias entre los grupos evaluados. Se empleó el programa estadístico GraphPad Prism 6. Valores de P>0.05 fueron considerados significativos (\*p≥0.05, \*\*p≥0.01, \*\*\*p≥0.001).

## 11. Resultados

### a. Las células T reguladoras periféricas incrementan en ausencia de Inhibina.

Para investigar si las Inhibinas tienen un papel en la inducción de Treg en la periferia, evaluamos en primer lugar el número de células totales de los órganos linfoides secundarios (Tabla 1), así como la frecuencia y números totales de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los ratones silvestres y deficientes de Inhibinas (Inh $\alpha^{-/-}$ ), a diferentes semanas de edad (2, 4, 6 y 9). La estrategia de análisis de estas subpoblaciones se observa en la Figura 8A. Como se puede observar en la tabla 1, el número de células totales disminuye de manera significativa en timo en los ratones deficientes de Inhibina las 9 semanas de edad, mientras que de los órganos linfoides secundarios evaluados, en bazo y ganglios linfáticos periféricos (PLN) se observa una tendencia a incrementar, la cual es más evidente en PLN. Por su parte, en los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) se observa una disminución en el número de células.

Además, podemos observar en la tabla 2, que el número de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se incrementan significativamente en los ratones deficientes de Inhibinas a las 9 semanas de edad en PLN, mientras que en MLN los linfocitos CD8<sup>+</sup> se encuentran disminuidos. Al evaluar las frecuencias de estas subpoblaciones de linfocitos T, sólo encontramos diferencias a las 9 semanas de edad en bazo, disminución del porcentaje de células CD4<sup>+</sup>, y en MLN, disminución del porcentaje de células CD8<sup>+</sup>, en los ratones deficientes de Inhibina (Tabla 3). Estas diferencias en el número de células totales, así como en el número y frecuencia de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> puede relacionarse con la aparición de tumores en las gónadas de los ratones deficientes de Inhibinas, así como a la pérdida de peso y caquexia que estos animales presentan. En el caso de los tumores se ha observado que estos se presentan principalmente a las 10 semanas de edad mientras que la caquexia se puede observar desde las 6 semanas<sup>194, 196</sup>.

**Tabla 1. Número de células totales por órgano en ratones silvestres ( $Inh\alpha^{+/+}$ ) o deficientes de Inhibina ( $Inh\alpha^{-/-}$ ).**

Órgano	Edad <sup>a</sup>	$Inh\alpha^{+/+}$		$Inh\alpha^{-/-}$		p
		Media	EE <sup>b</sup>	Media	EE <sup>b</sup>	
Timo	2	207.10	22.14	231.25	17.31	
	4	158.60	31.00	207.50	61.50	
	6	214.80	117.03	97.20	34.78	
	9	158.75	25.47	81.00	21.31	*
Bazo	4	27.12	3.23	28.16	8.15	
	6	27.20	1.74	37.20	11.21	
	9	59.10	12.44	79.67	6.71	
PLN <sup>c</sup>	2	9.55	0.80	10.08	1.97	
	4	10.00	1.47	11.88	1.90	
	6	17.00	4.76	10.26	1.65	
	9	17.18	4.79	44.93	9.84	0.06
MLN <sup>d</sup>	2	2.87	0.56	2.45	0.38	
	4	12.00	1.62	11.98	1.98	
	6	14.86	3.24	10.87	1.95	
	9	22.04	1.52	14.79	3.06	0.07

El número de células es expresado como la media de cada grupo (Células  $\times 10^6$ ). <sup>a</sup> Edad en semanas. <sup>b</sup> EE: Error estándar. <sup>c</sup> PLN: Ganglios linfáticos periféricos. <sup>d</sup> MLN: Ganglios linfáticos mesentéricos. p: valor de p, \* $p \leq 0.05$ . Datos de 4 experimentos independientes.



**Tabla 2. Número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en ratones silvestres (Inh $\alpha$ <sup>+/+</sup>) o deficientes de Inhibina (Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>).**

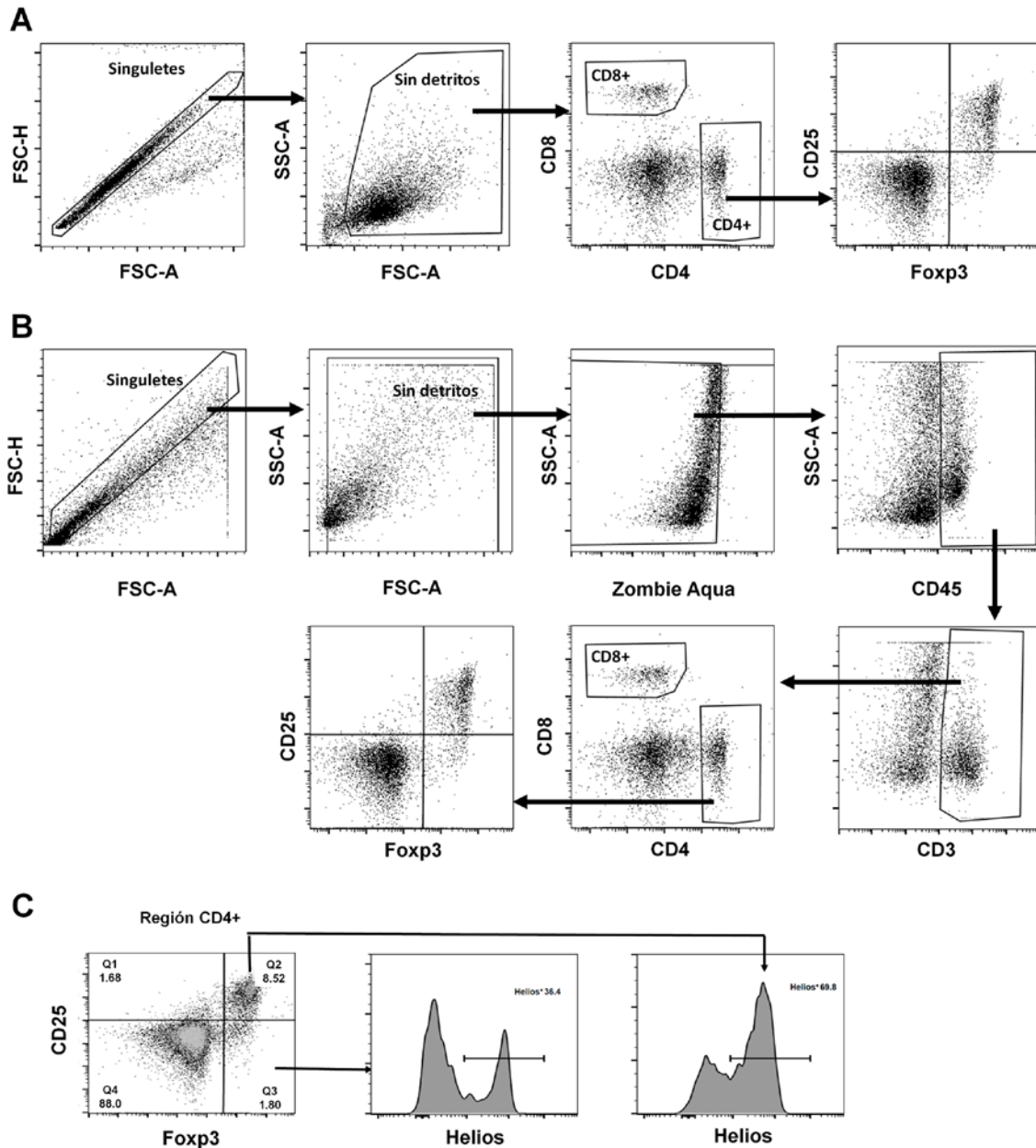
Órgano		Edad <sup>a</sup>	Inh $\alpha$ <sup>+/+</sup>		Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>		p
			Media	EE <sup>b</sup>	Media	EE <sup>b</sup>	
Bazo	CD4	4	3.59	0.38	3.99	1.24	
		6	4.67	0.90	5.73	1.76	
		9	12.20	2.58	13.70	1.07	
	CD8	4	2.19	0.13	3.60	1.00	
		6	3.51	0.18	4.11	1.10	
		9	8.32	1.33	9.24	0.66	
PLN <sup>c</sup>	CD4	2	3.72	0.38	4.21	0.95	
		4	3.97	0.88	5.02	0.37	
		6	5.04	1.14	3.33	0.88	
		9	5.80	1.51	13.70	2.31	*
	CD8	2	2.18	0.27	2.13	0.46	
		4	1.68	0.17	2.94	0.66	
		6	5.04	1.14	3.33	0.88	
		9	4.51	0.92	9.86	1.59	*
MLN <sup>d</sup>	CD4	2	0.886	0.16	0.87	0.17	
		4	3.52	0.56	3.97	0.91	
		6	4.48	1.50	3.38	0.68	
		9	7.27	0.65	4.96	1.04	
	CD8	2	0.64	0.14	0.47	0.08	
		4	2.09	0.003	2.03	0.15	
		6	3.67	0.64	2.38	0.50	
		9	5.76	0.76	3.24	0.75	*

El número de células es expresado como la media de cada grupo (Células x10<sup>6</sup>). <sup>a</sup> Edad en semanas. <sup>b</sup> EE: Error estándar. <sup>c</sup> PLN: Ganglios linfáticos periféricos. <sup>d</sup> MLN: Ganglios linfáticos mesentéricos. p: valor de p, \*p $\leq$ 0.05. Datos de 4 experimentos independientes.

**Tabla 3. Frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en ratones silvestres (Inh $\alpha$ <sup>+/+</sup>) o deficientes de Inhibina (Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>).**

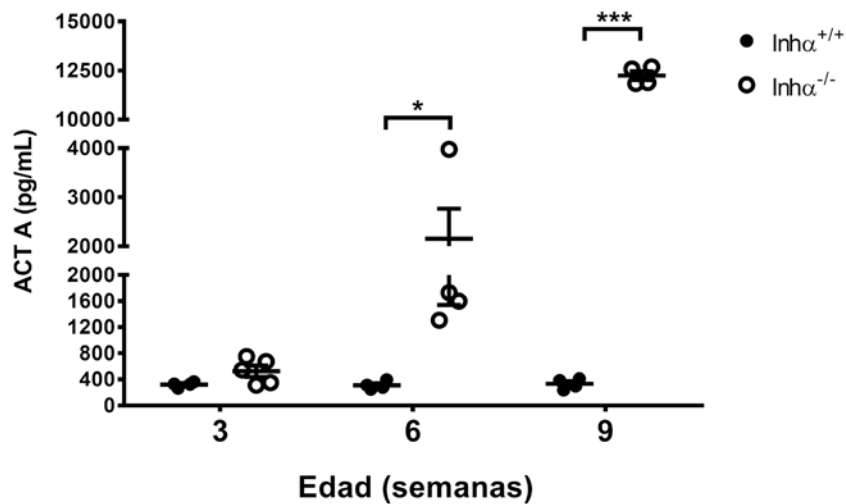
Órgano		Edad <sup>a</sup>	Inh $\alpha$ <sup>+/+</sup>		Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>		p		
			Media	EE <sup>b</sup>	Media	EE <sup>b</sup>			
Bazo	CD4	4	13.42	1.027	14.14	1.16			
		6	16.93	2.28	15.67	1.15			
		9	20.60	1.00	17.23	0.47	*		
	CD8	4	6.40	0.19	7.55	0.71			
		6	12.97	0.58	11.37	0.69			
		9	14.50	0.71	11.74	0.52			
PLN <sup>c</sup>	CD4	2	39.40	2.26	39.84	2.35			
		4	38.4	2.32	42.16	0.40			
		6	30.60	3.69	31.43	3.18			
		9	34.20	0.63	32.88	2.45			
	CD8	2	22.81	1.35	20.71	1.05			
		4	19.05	1.05	22.85	1.75			
		6	24.67	1.22	22.40	2.04			
		9	27.53	1.70	23.80	1.85			
		MLN <sup>d</sup>	CD4	2	34.57	2.88	34.83	2.36	
				4	29.18	2.48	32.06	1.91	
6	28.93			3.49	31.20	2.95			
9	32.90			1.34	33.97	1.41			
CD8	2		21.58	0.98	18.59	1.35			
	4		21.60	0.70	18.25	0.55			
	6		25.27	1.72	21.67	0.91			
	9		25.76	1.50	22.39	1.97	*		

La frecuencia de células es expresada como la media de cada grupo (%). <sup>a</sup> Edad en semanas. <sup>b</sup> EE: Error estándar. <sup>c</sup> PLN: Ganglios linfáticos periféricos. <sup>d</sup> MLN: Ganglios linfáticos mesentéricos. p: valor de p, \*p $\leq$ 0.05. Datos de 4 experimentos independientes.



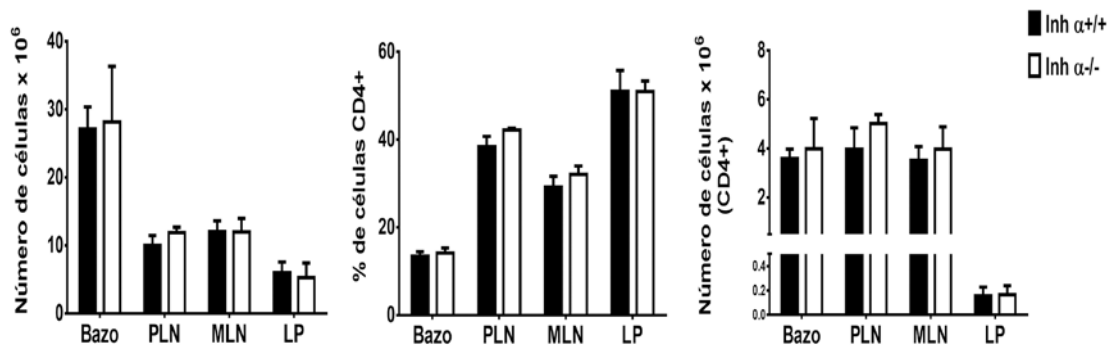
**Figura 8. Estrategia de análisis para definir las subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y Tregs.** (A) Dentro de las suspensiones celulares de bazo, PLN o MLN se realizó una selección de singletes (FSC-H vs FSC-A), seguida de una selección de la región de células sin presencia de detritos (FSC-A vs SSC-A). Posteriormente se identificaron las células positivas para CD4 o CD8. Por último, a partir de la región de células CD4<sup>+</sup> se seleccionaron diferentes poblaciones de Treg, en base a su expresión de CD25 y Foxp3. (B) Para el caso de las suspensiones de LP también se realizó la selección de singletes, células sin detritos, vivas (Zombie Aqua-), y CD45<sup>+</sup>. A partir de esta población se identificaron las células CD3<sup>+</sup>, a partir de las cuales se siguió el mismo análisis que en A. (C) Para identificar las subpoblaciones de Treg se empleó la expresión de Helios además de Foxp3 y CD25.

Además de las poblaciones de linfocitos decidimos evaluar los niveles de Activina A en el suero de los ratones deficientes de Inhibina, en primer lugar debido a la relación estructural de las Activinas con las Inhibinas (comparten la subunidad beta), y en segundo lugar a los reportes previos del incremento de Activina en suero, en los ratones deficientes de Inhibina<sup>196</sup>. En la figura 9 se presentan los niveles de Activina A encontrados en el suero de ratones a las 3, 6 y 9 semanas de edad, en los cuales se observa que a partir de las 6 semanas de edad hay un incremento significativo de la concentración de Activina A en suero en los ratones  $Inh\alpha^{-/-}$ . Dado que previamente se ha reportado que el incremento de Activina A en suero puede resultar en un incremento de las frecuencias de Treg en órganos linfoides secundarios<sup>197</sup>, se decidió emplear ratones de 4 semanas de edad para los experimentos subsecuentes para poder discernir un efecto atribuible únicamente a la ausencia de Inhibinas y no a cambios dados por alteraciones en los niveles de Activina.



**Figura 9. La concentración de Activina A en suero de ratones deficientes de Inhibina aumenta con la edad.** La Activina A se cuantificó en el suero de ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  e  $Inh\alpha^{-/-}$ , a las 3, 6 y 9 semanas de edad por ELISA. Media  $\pm$  EE, n=3–5 ratones. \* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.0001$ . Datos de 3 experimentos independientes. Los datos de 3 y 9 semanas fueron reportados por Olguín-Alor *et al*<sup>193</sup>.

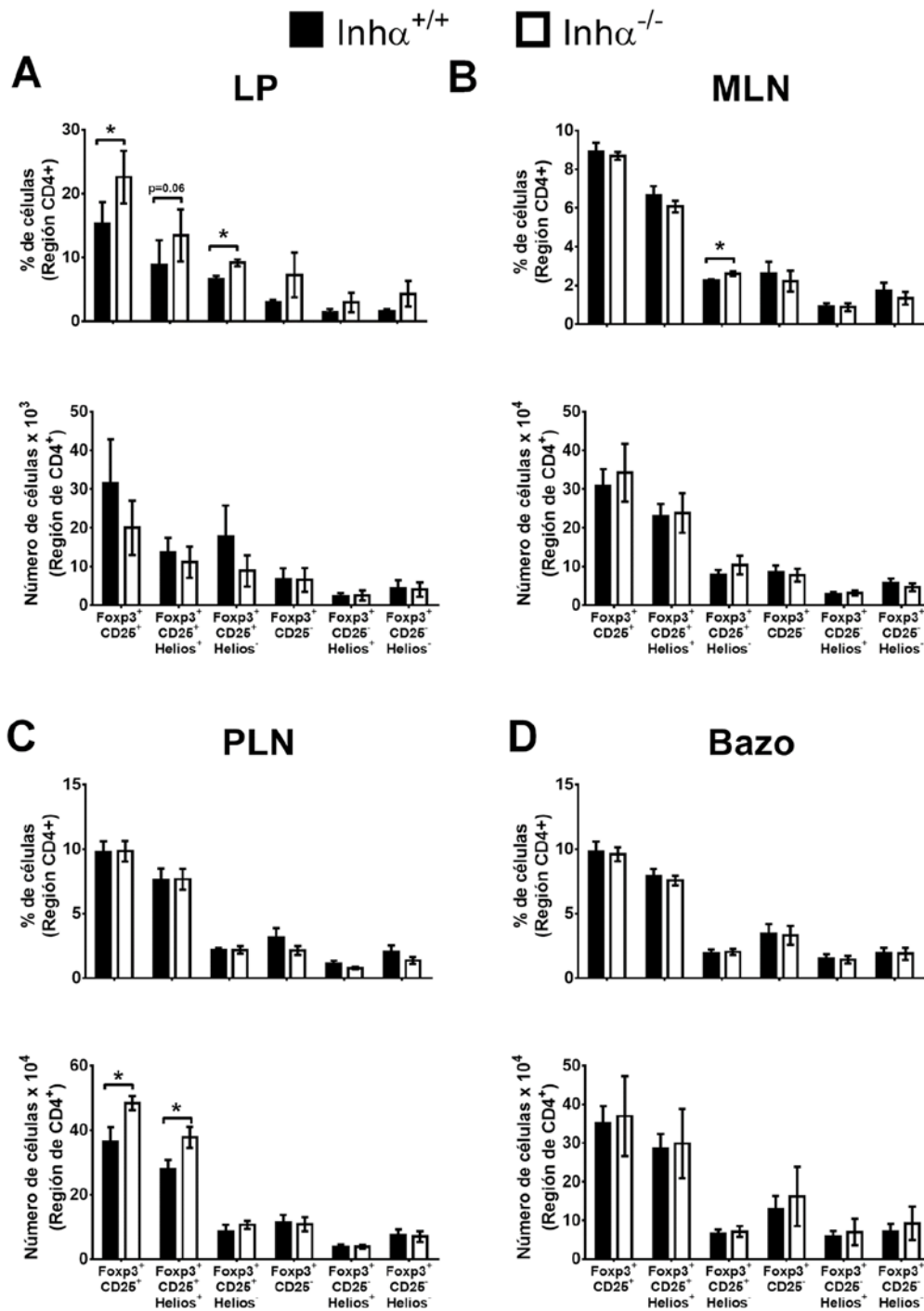
A manera de resumen, en la Figura 10, podemos observar que, al evaluar el número de células totales de los órganos linfoides secundarios, así como el porcentaje y el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, no se encontraron diferencias, sugiriendo que a esta edad no hay alteraciones debidas a la presencia de tumores en los ratones deficientes de Inhibinas, ni por cambios en las concentraciones de Activina A en estos. Por lo que posteriormente se decidió evaluar las subpoblaciones de Treg dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La estrategia de análisis para la evaluación de las subpoblaciones de Treg se puede observar en la figura 8.



**Figura 10. La celularidad de los órganos linfoides secundarios y número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> no se altera en los ratones *Inhα<sup>-/-</sup> ex vivo*, a las 4 semanas de edad, bajo condiciones homeostáticas.** Ratones hembra *Inhα<sup>+/+</sup>* o *Inhα<sup>-/-</sup>* fueron analizados a las 4 semanas de edad para evaluar el porcentaje y números de Linfocitos T CD4<sup>+</sup> en bazo, ganglios linfáticos periféricos (PLN), ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y lámina propia de colon (LP) por citometría de flujo. En las gráficas se puede observar el número absoluto de células por órgano (izquierda), porcentaje de células CD4<sup>+</sup> por órgano (centro) y el número absoluto de células CD4<sup>+</sup> por órgano (derecha). n=5. Media ± EE. Datos de 4 experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 11, en ausencia de Inhibinas, los números de Treg CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> aumentan significativamente en los ganglios linfáticos periféricos, específicamente las células Treg Helios<sup>+</sup>, lo cual correlaciona con nuestro reporte previo, en el cual se observó un incremento en el desarrollo de tTreg en los ratones *Inhα<sup>-/-</sup>*<sup>190</sup>. Adicionalmente, cuando evaluamos las subpoblaciones de Treg en MLN y lámina propia de colon, encontramos un incremento en el

porcentaje de Tregs CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>, las cuales bajo condiciones homeostáticas son consideradas pTreg<sup>7</sup>. En LP se observa una tendencia a un incremento en las células Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, dentro de la cual tenemos células Helios<sup>+</sup>, las cuales también muestran una tendencia a incrementar. A pesar de que la expresión de Helios en condiciones de homeostasis esta asociada a las tTreg, se ha demostrado que la expresión de Helios puede reflejar una activación reciente tanto en células T Foxp3<sup>-</sup> como en Tregs Foxp3<sup>+</sup><sup>16</sup>, y que de hecho las Treg inducidas *in vitro* o *in vivo* pueden expresar Helios dependiendo del contexto en el que hayan sido activadas<sup>198</sup>. Además, las Treg Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> no secretan citocinas efectoras<sup>199</sup>, y se ha reportado que las Treg Helios<sup>+</sup> expresan mayores niveles de TGFβ, proliferan más *in vivo* y la expresión de Helios correlaciona con la capacidad supresora<sup>199,200</sup> y con la estabilidad de Foxp3<sup>201</sup>, por lo que se ha sugerido que las Treg Foxp3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> son una subpoblación con más características supresoras. Por estas razones resultaría interesante evaluar si la función de las pTreg se ve alterada en ausencia de Inhibina.

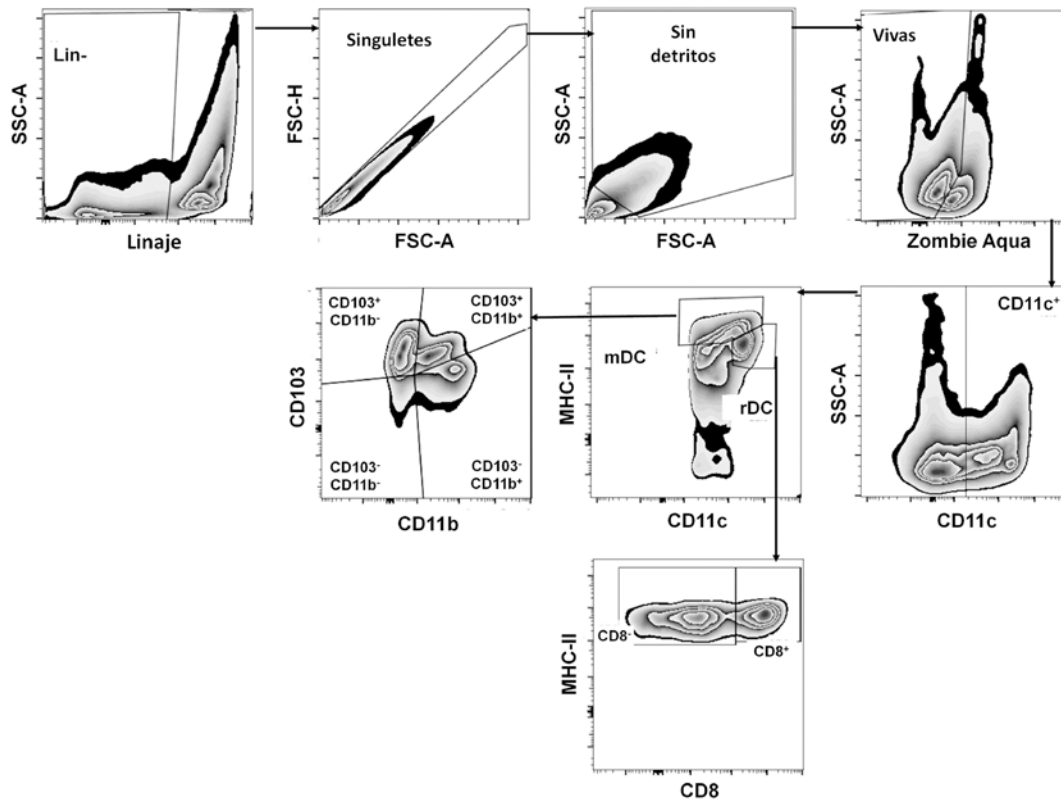


**Figura 11. Las células T reguladoras periféricas incrementan en ausencia de Inhibina en lámina propia, y ganglios linfáticos mesentéricos.** Las subpoblaciones de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), Helios<sup>+</sup> o Helios<sup>-</sup> se analizaron *ex vivo*. Frecuencia (arriba) y números (abajo) de Treg en (A) lámina propia de colon (LP), (B) ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), (C) ganglios linfáticos periféricos (PLN) y (D) bazo. Media  $\pm$  EE, n=5 ratones. \* $p \leq 0.05$ . Datos de 4 experimentos independientes

**b. Las células dendríticas convencionales CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y CD103<sup>+</sup> (cDC1) muestran una expresión alterada de moléculas co-estimuladoras/co-inhibidoras en ganglio linfático mesentérico.**

En hallazgos previos del laboratorio, demostramos que las BMDCs deficientes de Inhibina muestran una maduración alterada tras la estimulación con LPS <sup>193</sup>. Este fenotipo “semi-maduro” podría estar asociado con la habilidad de las DCs de promover respuestas tolerogénicas, como la inducción de Treg <sup>202</sup>. Para entender si el incremento de pTreg observado en MLN y LP en el ratón *Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>* está relacionado a cambios en las subpoblaciones de DC en MLN, analizamos la frecuencia y el fenotipo de las DCs. Para discriminar las diferentes subpoblaciones, primero se separaron las poblaciones de rDCs y mDCs, con base a su expresión de MHC-II y CD11c. Además, empleamos la expresión de CD8 $\alpha$  para discriminar las subpoblaciones de DCs residentes, mientras que para las DC migratorias se empleó la expresión de CD11b y CD103, como se ha reportado previamente <sup>203</sup> (Figura 12).

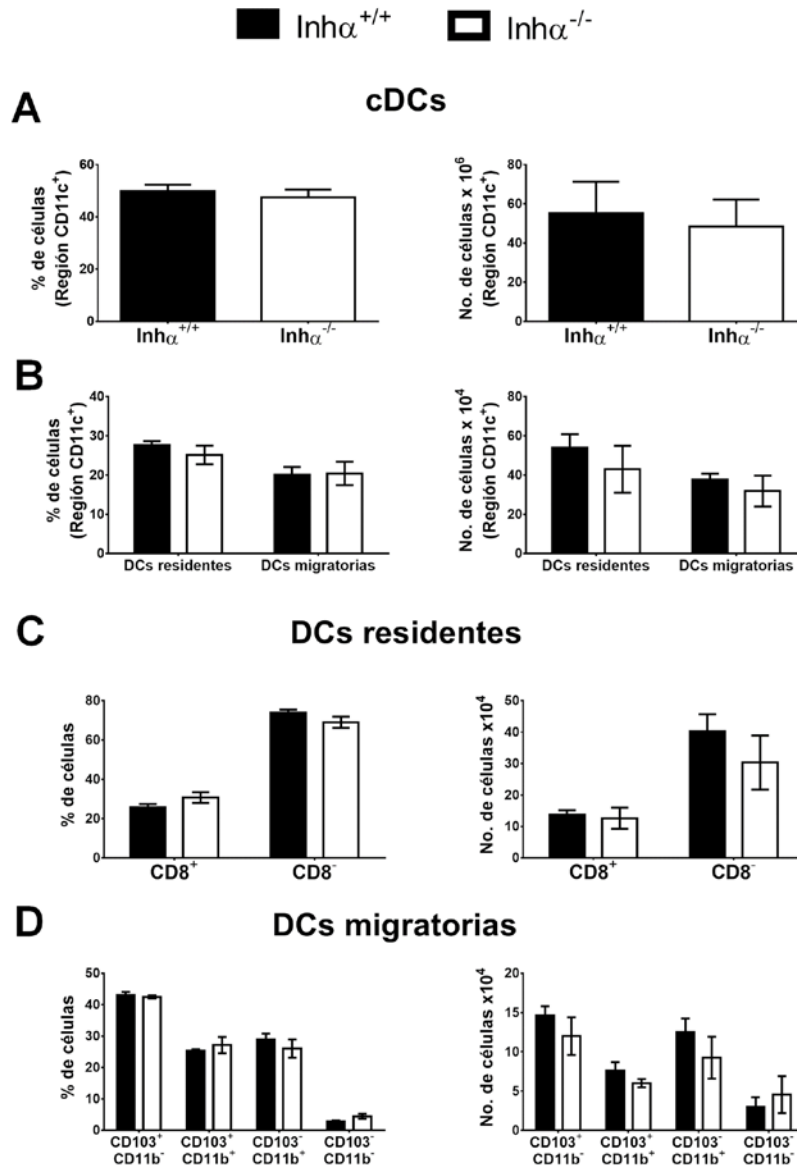




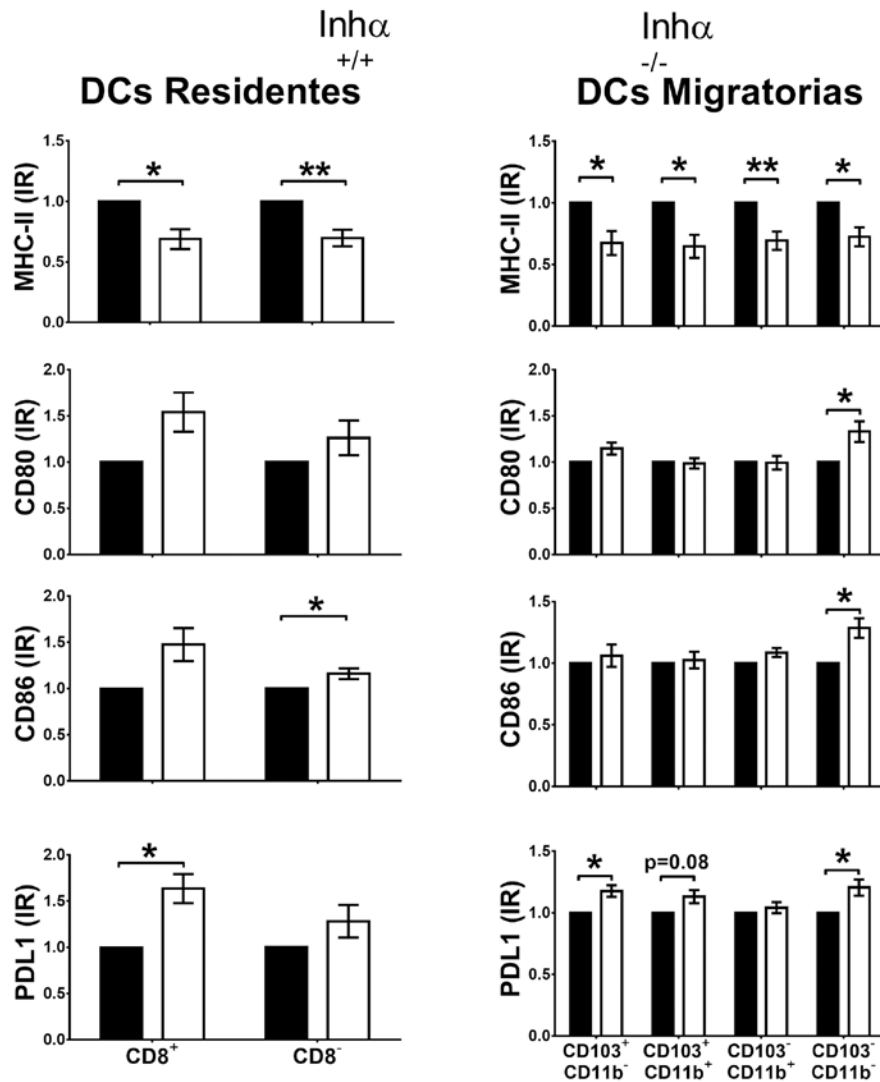
**Figura 12. Estrategia de análisis para definir las subpoblaciones de DCs en MLN.** Dentro de las suspensiones celulares de MLN, las células CD19<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> (Lin<sup>-</sup>), singuletes y vivas, fueron seleccionadas. Posteriormente se seleccionó la población CD11c<sup>hi</sup> MHC-II<sup>int</sup> que representa las DC residentes y puede ser dividida en CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>. Por otro lado, la población CD11c<sup>int</sup> MHC-II<sup>hi</sup> representa a las DCs migratorias y puede ser subdividida en CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> y CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup>.

Los porcentajes y números de las subpoblaciones de DCs en MLN analizados *ex vivo* no se alteran en ausencia de Inhibinas (Figura 13). Sin embargo, las DCs de MLN de los ratones *Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mostraron una disminución de la expresión de MHC-II en todas las subpoblaciones evaluadas (Figura 14), similar a lo encontrado previamente en las células de Langerhans de estos ratones<sup>193</sup>. Además, cuando evaluamos la expresión de las moléculas co-estimuladoras/co-inhibidoras en las diferentes poblaciones de DCs, encontramos un incremento significativo en la expresión de PD-L1 en las rDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y en las mDCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, así como tendencia a un incremento en las

DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> en los ratones *Inhα*<sup>-/-</sup> (Figura 14). A pesar de la baja expresión de MHC-II, se observó un incremento de CD80 y CD86 en las rDC CD8α<sup>+</sup> y en las mDCs CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>.

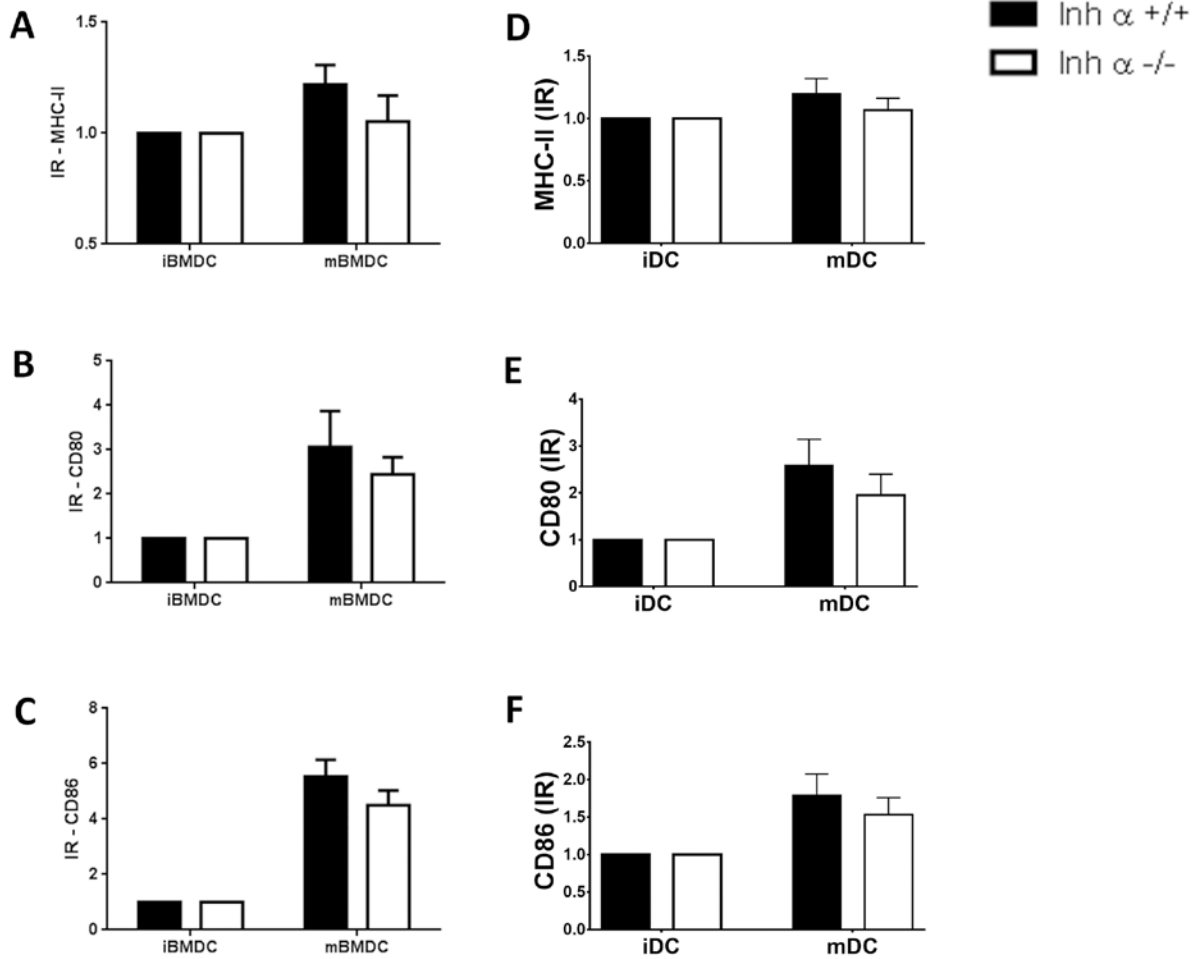


**Figura 13.** Las frecuencias y números de las subpoblaciones de células dendríticas convencionales (residentes y migratorias) no se alteran en los ganglios linfáticos mesentéricos de los ratones *Inhα*<sup>-/-</sup>. Las subpoblaciones de DCs se analizaron *ex vivo* en MLN. Se presentan los porcentajes (izquierda) y número de células (derecha) de: DCs convencionales (cDC) (A), DCs residentes (CD11c<sup>hi</sup>MHC-II<sup>+</sup>) y migratorias (CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>hi</sup>) (B), CD8α<sup>+</sup> y CD8α<sup>-</sup> dentro de la región de DCs residentes (C), y CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> y CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> dentro de la región de DCs migratorias (D). Media ± EE, n=5 ratones. Datos de 3 experimentos independientes.



**Figura 14.** Las subpoblaciones de DCs  $Inh\alpha^{-/-}$  tienen una expresión diferencial de MHC-II, CD80 y PD-L1 en MLN comparadas a las  $Inh\alpha^{+/+}$ . Las poblaciones de cDCs fueron analizadas en ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$ . Expresión de MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1 en las DCs residentes ( $Lin^{-}CD11c^{hi}MHC-II^{+}CD8^{+}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{hi}MHC-II^{+}CD8^{-}$ ) (izquierda) y en las DCs migratorias ( $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{+}CD11b^{-}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{+}CD11b^{+}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{-}CD11b^{+}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{-}CD11b^{-}$ ) (derecha). La intensidad de fluorescencia está reportada como incremento relativo (IR), con respecto a las células del ratón silvestre. Media $\pm$ EE, n=5 ratones. \* $p\leq 0.05$ , \*\* $p\leq 0.01$ . Datos de 3 experimentos independientes.

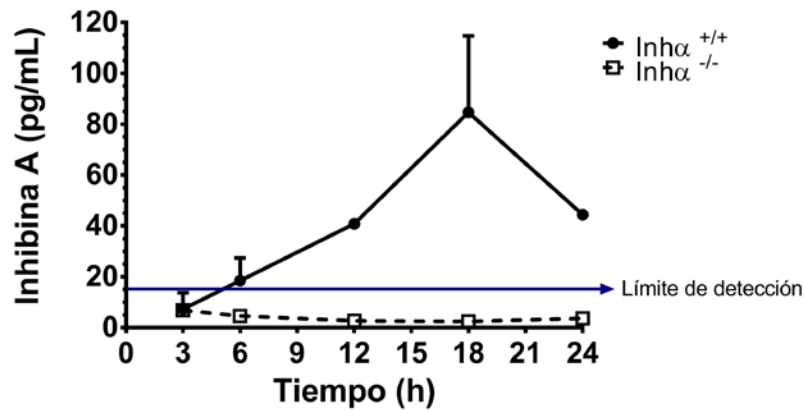
Dado que el fenotipo de las DCs observado *in vivo* en MLN de los ratones  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  podría corresponder a un fenotipo tolerogénico (DC semimaduro / tolerogénico), similar a lo que reportamos previamente para las BMDCs al ser estimuladas con LPS<sup>193</sup> y que corroboramos durante este trabajo (Figura 15 A, B y C), decidimos evaluar si las DCs provenientes de otros órganos secundarios de estos ratones muestran alteraciones en su fenotipo al ser estimuladas con LPS. En diversos trabajos se ha demostrado la regulación positiva de la expresión en superficie de las moléculas de MHC-II; y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, tanto en las BMDCs como en las DCs obtenidas *ex vivo*, tras el estímulo con LPS<sup>204</sup>. En la Figura 15 (D, E y F) podemos observar que las DCs esplénicas ( $\text{CD11c}^+$ ) obtenidas *ex vivo* de ratones  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ , muestran una disminución en la regulación positiva de MHC-II y CD80 tras la estimulación con LPS en comparación con sus contrapartes silvestres. En resumen, el fenotipo semimaduro/tolerogénico de las DCs deficientes de Inhibinas podría explicar el incremento de pTreg en MLN, sugiriendo que dicho incremento puede deberse a una mayor generación de Treg a partir de T vírgenes en órganos linfoides secundarios.



**Figura 15. La maduración de las DCs deficientes de Inhibina se encuentra afectada tras la estimulación con LPS.** BMDC (A, B,C) y DCs de bazo (D, E, F) fueron estimuladas con 1 $\mu$ g/ml p 100ng/ml de LPS, respectivamente. Al cabo de 24h se analizó la expresión de MHC-II (A, D), CD80 (B, E) y CD86 (C, F). Media $\pm$ EE, Datos de 2 (BMDC) o 3 (DCs de bazo) experimentos independientes. La intensidad de fluorescencia está reportada como incremento relativo (IR), con respecto a las células del ratón silvestre.

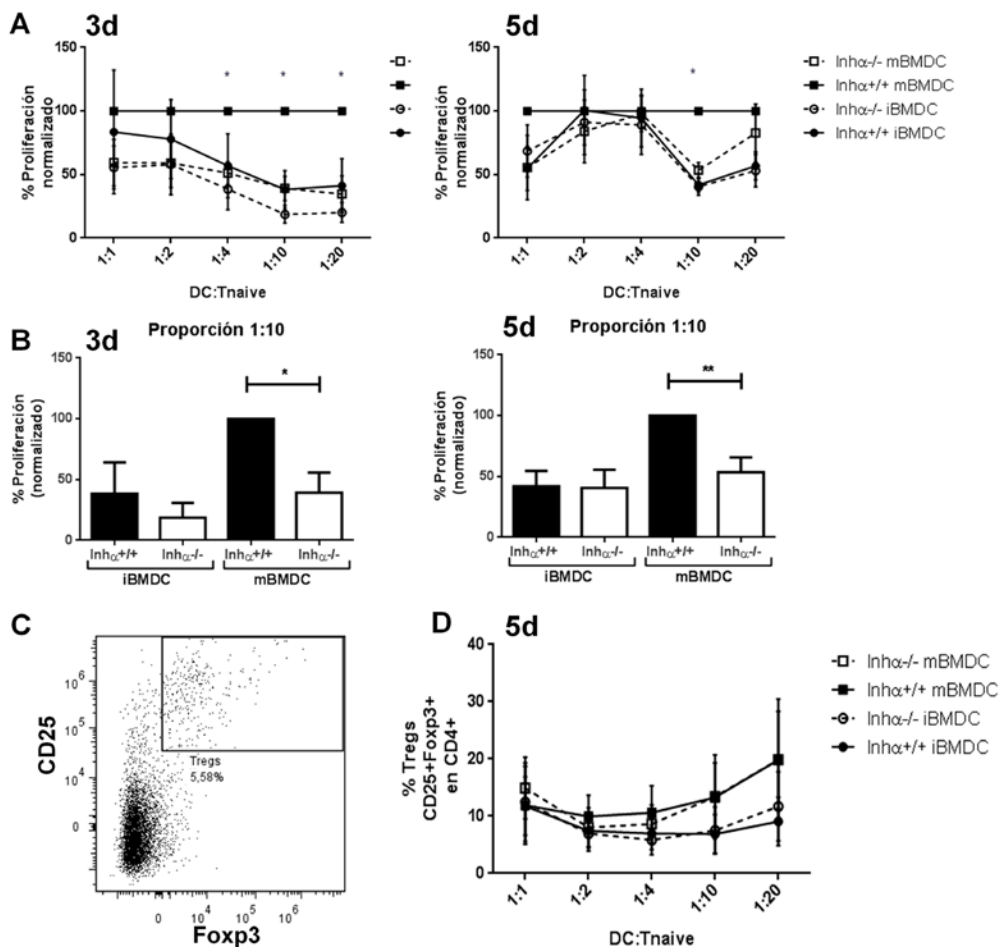
**c. Las Inhibinas regulan la inducción de células T reguladoras FoxP3<sup>+</sup> mediada por células dendríticas *in vitro*.**

La diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a los diversos fenotipos efectores o reguladores requiere de varias señales derivadas de la interacción entre la célula T y la célula presentadora de antígeno. Estas señales incluyen la interacción entre el TCR-MHC-II, las señales mediadas por las moléculas co-estimuladoras/co-inhibidoras y aquellas mediadas por citocinas <sup>129</sup>. Dado que la expresión de MHC-II, CD80 y PD-L1 se encuentran modificadas en las DCs deficientes de Inhibinas, decidimos investigar si la producción de Inhibinas por la DC puede impactar la inducción de células Treg *in vitro*. Para esto, se diferenciaron células dendríticas silvestres o deficientes de Inhibinas a partir de células de médula ósea (BMDC), usando GM-CSF, y se estimularon con LPS para su maduración. De hecho, en la Figura 16 podemos observar que las BMDCs tienen la capacidad de producir Inhibina en respuesta al estímulo de LPS, corroborando previas observaciones de nuestro grupo <sup>193</sup>.



**Figura 16 Inhibina A es producida por DCs silvestres tras la estimulación con LPS, pero no por DCs deficientes de Inhibina.** Curso temporal de la producción de Inhibina A, evaluada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de BMDCs silvestres (Inhα<sup>+/+</sup>) o deficientes de Inhibina (Inhα<sup>-/-</sup>). El límite de detección del ensayo se encuentra representado por una línea azul. Media±EE. Datos de 3 experimentos independientes.

Una vez obtenidas, las BMDCs maduras e inmaduras fueron co-cultivadas con linfocitos T vírgenes alogénicos a diferentes proporciones, y se evaluó tanto la proliferación a los días 3 y 5 de cultivo, como la inducción de Treg al día 5, para entender si el fenotipo encontrado previamente en las DCs era suficiente para impactar estas características. En la Figura 17A y B, se muestra que las mBMDCs deficientes de Inhibinas tienen una menor capacidad para inducir proliferación de linfocitos T, tanto a los 3 como a los 5 días, particularmente cuando se emplea una proporción de 1 DC por 10 linfocitos T (DC:T=1:10), lo cual correlaciona con su reducida capacidad de inducir una respuesta de tipo DTH *in vivo*<sup>193</sup>. Sin embargo, al evaluar la inducción de Treg a través de la expresión de Foxp3-GFP, no se observan diferencia en el porcentaje (Figura 17D) ni en el número (datos no mostrados) entre las BMDCs provenientes de los ratones silvestres y aquellos deficientes de Inhibinas, además, se puede observar que el porcentaje de inducción de Tregs en este sistema es muy variable, al igual que el número de Treg inducidas. Como se mencionó previamente, está bien establecido que el TGFβ es una citocina esencial para la inducción de pTreg, por lo que decidimos evaluar los niveles de TGFβ en el sobrenadante de cultivo de las BMDCs, sin embargo, esta citocina no fue detectada (datos no mostrados). Es por esto que decidimos evaluar la inducción de Tregs en presencia de BMDCs silvestres o deficientes de Inhibinas adicionando TGFβ exógeno al momento de la inducción.

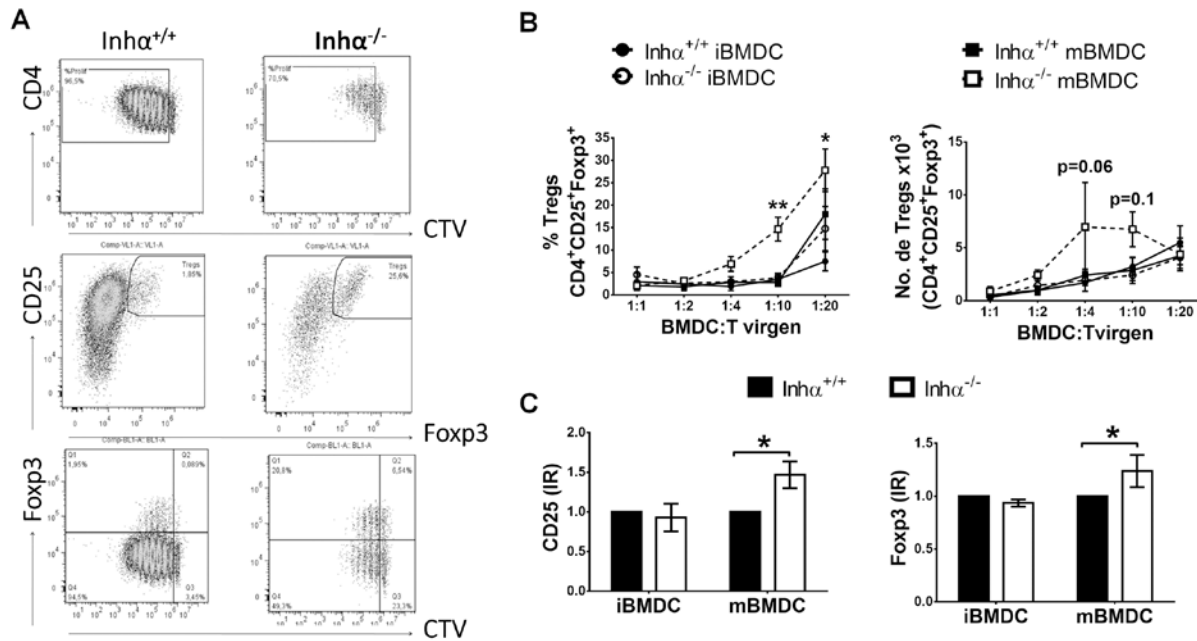


**Figura 17. BMDC maduras de ratones deficientes de Inhibina muestra una menor capacidad para inducir proliferación de las células T CD4<sup>+</sup>.** Células CD11c<sup>+</sup> diferenciadas *in vitro* fueron sorteadas al día 6 de cultivo y co-cultivadas con células T CD4<sup>+</sup> vírgenes alogénicas a diferentes proporciones. Al día 3 y 5 la proliferación de las células T fue evaluada a través de la dilución de Cell Trace Violet (CTV). (A) La proliferación a diferentes proporciones de células DC:T fue evaluada. (B) Gráficas de barras representando la proliferación normalizada de las células T con respecto a aquella obtenida en presencia de las BMDC maduras del ratón silvestre, a la proporción 1:10. (C) Al día 5 la inducción de Tregs fue evaluada en base a la expresión de FoxP3 (GFP). Se muestra una gráfica de puntos representativa (izquierda), así como el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> (derecha). Media  $\pm$  EE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Datos de 4 experimentos independientes.

Como se puede observar en la Figura 18, se encontró un mayor porcentaje de células Treg CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en la inducción llevada a cabo en presencia de mBMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  (proporción 1:10 DC:Th vírgenes) comparadas con las mBMDC  $Inh\alpha^{+/+}$ , en presencia de TGF $\beta$  exógeno y



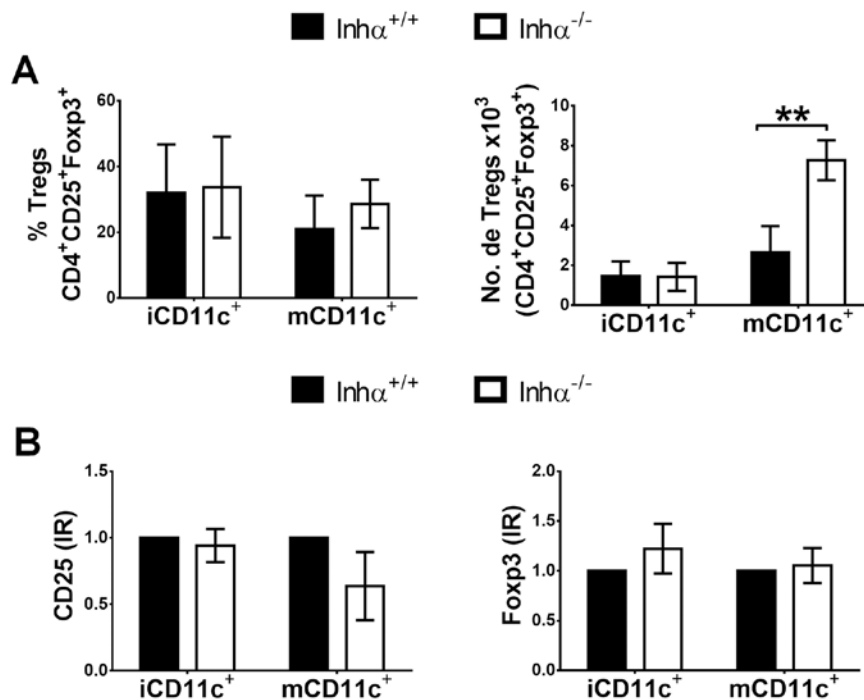
anticuerpos anti-CD3. Además, el incremento de inducción de Treg, estuvo acompañado de un incremento en la expresión de CD25 y FoxP3 (Figura 18C), sugiriendo que las Treg inducidas pueden presentar un incremento de la función supresora<sup>205</sup>.



**Figura 18. Las Inhibinas controlan la inducción de células Treg en presencia de BMDCs *in vitro*.** BMDC fueron co-cultivadas con células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, en presencia de anti-CD3 (0.1 $\mu$ g/ml) y TGF $\beta$  (0.25ng/ml). Después de 5 días, se evaluó la inducción de Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). (A) Gráficas de puntos representativas de la inducción de Tregs en ratones silvestres (Inh $\alpha^{+/+}$ ) o deficientes de Inhibina (Inh $\alpha^{-/-}$ ). (B) Porcentaje de Treg inducidas en presencia de iBMDC (inmaduras) o mBMDC (estimuladas con LPS), silvestres o deficientes de Inhibina, a diferentes proporciones. Las gráficas representan el porcentaje (izquierda) y los números totales (derecha) de la población de Tregs. (C) Expresión de CD25 (izquierda) y FoxP3 (derecha) en la población de células Treg inducidas *in vitro*. La intensidad de fluorescencia está reportada como incremento relativo (IR), con respecto a las células del ratón silvestre. Media $\pm$ EE. \*p $\leq$ 0.05, \*\*p $\leq$ 0.01. Datos de 4 experimentos independientes.

Puesto que se evidenciaron alteraciones en la expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras en DC deficientes de Inhibina obtenidas *ex vivo*, a continuación, analizamos la capacidad de inducir Tregs de las DCs CD11c<sup>+</sup> obtenidas *ex vivo* de bazo y ganglios linfáticos periféricos de ratones deficientes de Inhibinas, co-cultivados con linfocitos T vírgenes,

en presencia de anticuerpos anti-CD3 y TGF $\beta$ . En este caso también se observó un incremento significativo en la generación de Tregs cuando se usaron DCs  $Inh\alpha^{-/-}$ , comparadas con las DCs  $Inh\alpha^{+/+}$  (Figura 19A); aunque en este caso, las Treg inducidas no mostraron un incremento en los niveles de expresión de FoxP3 y CD25 (Figura 19B). Estos datos en conjunto nos indican que las DCs deficientes de Inhibinas tienen una mayor capacidad para promover la tolerancia periférica de las células T.



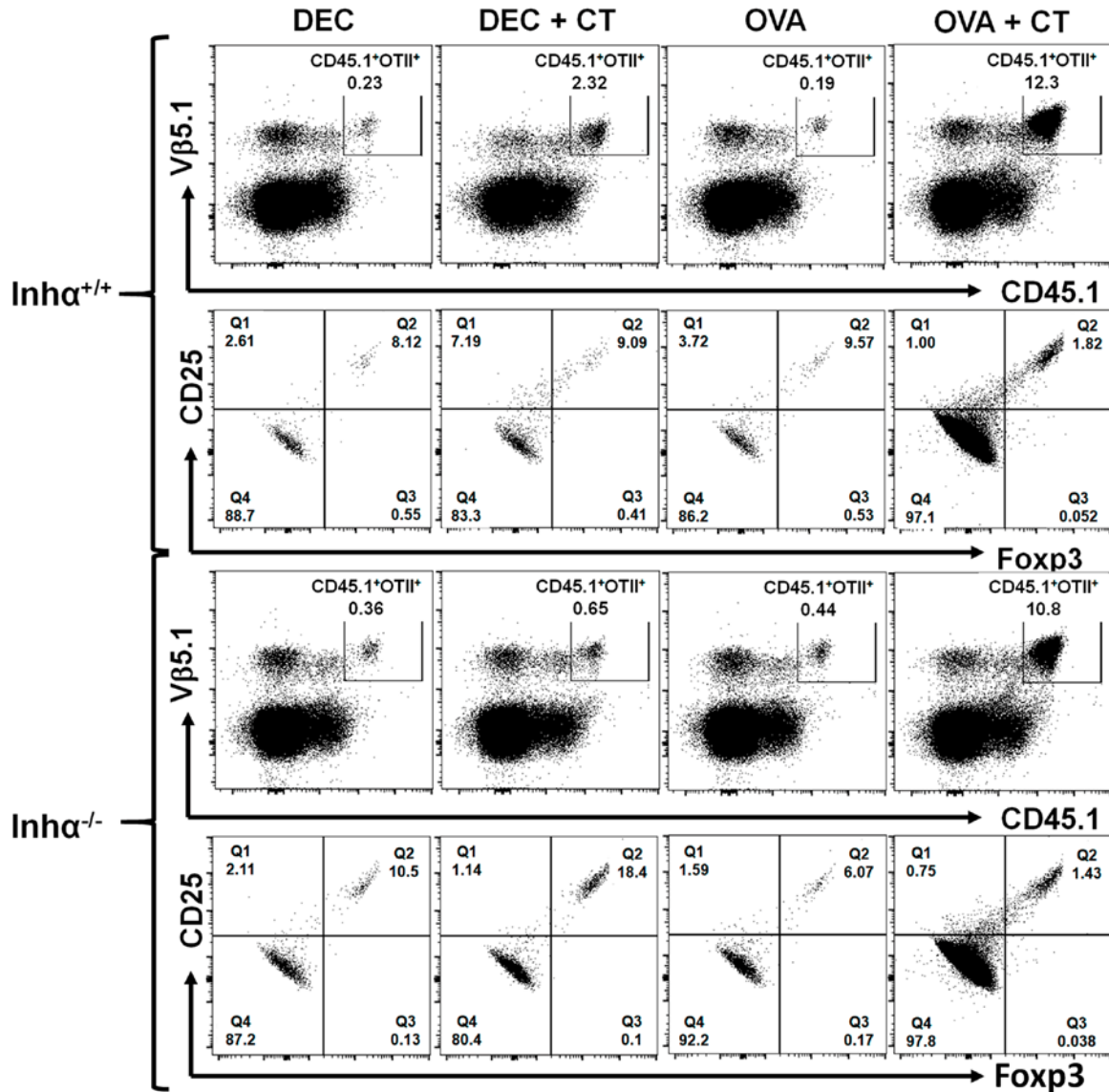
**Figura 19. Las Inhibinas controlan la inducción de células Treg en presencia de DCs CD11c<sup>+</sup>, *in vitro*.** DCs CD11c<sup>+</sup>, obtenidas de bazo y ganglios linfáticos periféricos, fueron co-cultivadas con células Th vírgenes (proporción DC:T, 1:10), en presencia de anticuerpos anti-CD3 (0.1 $\mu$ g/ml) y TGF $\beta$  (0.25ng/ml). Después de 5 días, se evaluó la inducción de Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). (A) Porcentaje de Treg inducidas en presencia de DCs CD11c<sup>+</sup> silvestres o deficientes de Inhibina. Las gráficas representan el porcentaje (izquierda) y los números totales (derecha) de la población de Tregs. (B) Expresión de CD25 (izquierda) y FoxP3 (derecha) en la población de células Treg inducidas. La intensidad de fluorescencia está reportada como incremento relativo (IR), con respecto a las células del ratón silvestre. Media $\pm$ EE. \*\*p $\leq$ 0.01. Datos de 3 experimentos independientes.

**d. Las células dendríticas deficientes de Inhibina aumentan la inducción de células T reguladoras periféricas *in vivo*.**

Para analizar la relevancia de nuestros hallazgos *in vivo*, decidimos evaluar la inducción de Treg durante una respuesta inmunológica a un antígeno, en la cual pudiéramos rastrear la generación de pTregs. Para esto se empleó como antígeno ovoalbúmina (OVA), para inmunizar ratones silvestres o deficientes de Inhibinas (CD45.2), a los cuales previamente se transfirieron linfocitos T transgénicos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Vβ5.1<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> (OVA-específicos). Además, para analizar selectivamente la contribución de las células dendríticas, empleamos un sistema de direccionamiento del antígeno, usando un anticuerpo anti-DEC205 fusionado a OVA α-DEC-OVA)<sup>165,206</sup>.

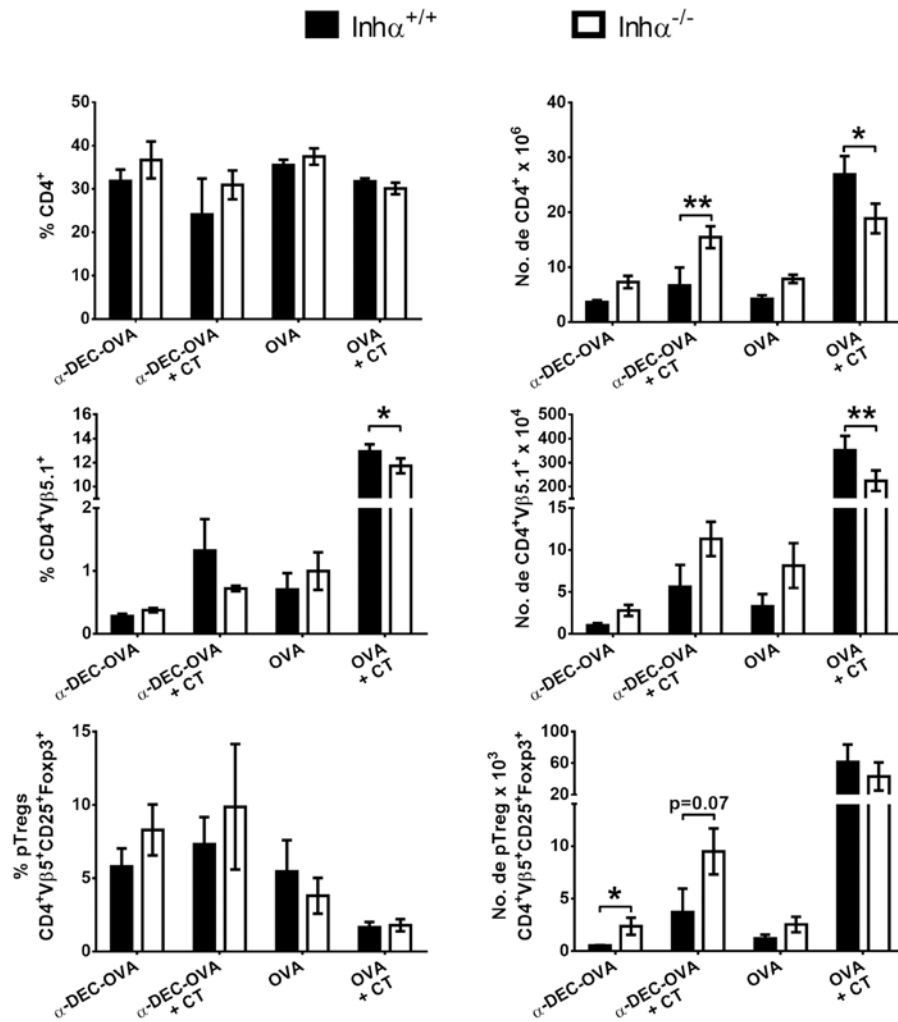
Brevemente, células T vírgenes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Vβ5.1<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> fueron transferidas de manera intravenosa a ratones CD45.2 *Inh*α<sup>-/-</sup> o *Inh*α<sup>+/+</sup> y 24 horas después, los ratones receptores fueron inmunizados intradermicamente en la oreja con OVA o α-DEC-OVA, en presencia o ausencia de CT como adyuvante. Siete días después de la inmunización, se analizó la respuesta de las células T en el ganglio linfático drenante. Como se puede observar en las Figuras 20 y 21, la inmunización con OVA+CT resultó en un menor porcentaje y número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> OVA-específicos (Vβ5.1<sup>+</sup>) en los ratones receptores deficientes de Inhibinas, comparados con los silvestres, sugiriendo que las Inhibinas pueden regular la expansión de células T CD4<sup>+</sup>, a través de la modulación del MHC-II y las moléculas co-estimuladoras/co-inhibidoras, o bien la migración de estas células (T CD4<sup>+</sup>) al sitio de inflamación. Además, encontramos un mayor número de pTreg (OT-II<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) en los ratones *Inh*α<sup>-/-</sup> inmunizados con α-DEC-OVA, comparados con los silvestres; mientras que en los ratones inmunizados con α-DEC-OVA+CT se observa un

incremento en el número de pTreg en los ratones  $Inh\alpha^{-/-}$ , comparados con los  $Inh\alpha^{+/+}$ , aunque este no es estadísticamente significativo. Estos datos en conjunto indican que las DCs deficientes de Inhibinas, son más propensas a inducir respuestas tolerogénicas *in vivo*, incluso en presencia de adyuvante.



**Figura 20.** Análisis representativo del experimento de direccionamiento del antígeno a DCs  $Inh\alpha^{+/+}$  o  $Inh\alpha^{-/-}$  a través de  $\alpha$ -DEC205-OVA, para la inducción de pTregs. Células T CD4<sup>+</sup> vírgenes OT-II<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> fueron transferidas a ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  o  $Inh\alpha^{-/-}$ , 24h después, los ratones fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja, con  $\alpha$ -DEC-OVA u OVA, en presencia o ausencia

de toxina del cólera (CT) como adyuvante. La evaluación de pTreg fue hecha 7 días después de la inmunización, en el ganglio linfático drenante. Se presentan las gráficas de puntos representativas de las células transferidas (CD45.1<sup>+</sup>Vβ5.1<sup>+</sup>) (arriba) y pTreg (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) (abajo); tanto para los ratones receptores *Inhα*<sup>+/+</sup> como *Inhα*<sup>-/-</sup>.



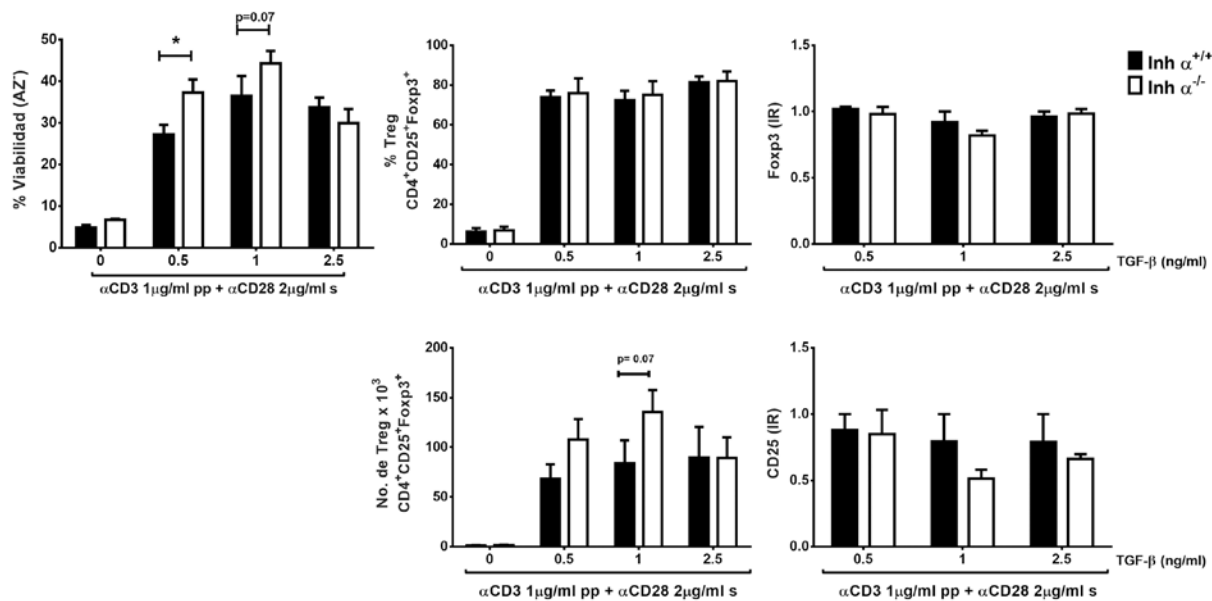
**Figura 21.** El direccionamiento del antígeno a DCs *Inhα*<sup>-/-</sup> a través de DEC205, induce un mayor número de células T reguladoras periféricas (pTreg) *in vivo*. Se muestra la cuantificación del experimento descrito en la Figura 20. Las gráficas de barras representan el porcentaje (izquierda), y el número (derecha) de las células T CD4<sup>+</sup> totales (panel superior), células transferidas (panel intermedio) y pTregs (panel inferior). Media ± EE. \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01. Datos de 3 experimentos independientes.

**e. Evaluación del papel de las Inhibinas en la inducción de células T reguladoras FoxP3<sup>+</sup> de manera intrínseca al linfocito T CD4<sup>+</sup>.**

A pesar de que el fenotipo tolerogénico de las DCs deficientes de Inhibina podría explicar el incremento en la generación de pTreg en MLN, y en los sistemas *in vitro* e *in vivo* realizados, no podemos descartar que la Inhibina por un mecanismo autocrino pudiera modular la activación y/o diferenciación funcional de los linfocitos T, incluida la conversión de Tregs.

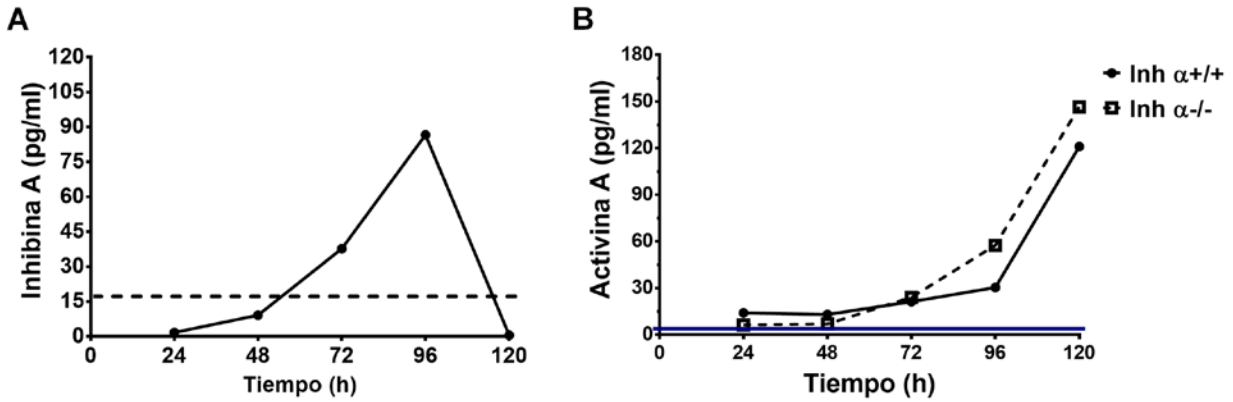
Para esto empleamos un modelo de inducción de Tregs en ausencia de DCs, en el cual se activó a los linfocitos T CD4 con un estímulo policlonal (anticuerpos anti-CD3/ anti-CD28) en presencia de diferentes concentraciones de TGFβ. Como se puede observar en la Figura 22, al incrementar la dosis de TGFβ en el cultivo se incrementa la viabilidad de las células, la cual es muy baja inicialmente probablemente debido a la falta de IL-2 en el cultivo. De manera interesante, la viabilidad de las células deficientes de Inhibina se incrementa significativamente, con respecto a las células silvestres, a bajas dosis de TGFβ (0.5ng/ml). Por otro lado, no observamos diferencias en el porcentaje ni en el número de Tregs inducidas, a ninguna de las dosis estudiadas, en los cultivos de células deficientes de Inhibina.

Para tratar de entender si las diferencias en el modelo de inducción policlonal pueden deberse a la presencia o ausencia de Inhibinas, y tomando en cuenta datos previos del laboratorio, donde se ha demostrado que los timocitos pueden expresar las subunidades de las Inhibinas en el timo<sup>189</sup>, decidimos evaluar si los linfocitos T CD4<sup>+</sup> al ser activados tienen la capacidad de producir Inhibina A.



**Figura 22. La inducción de células T reguladoras *in vitro* a partir de células T vírgenes deficientes de Inhibinas no se altera en comparación a las células silvestres.** Células T CD4<sup>+</sup> vírgenes se cultivaron en presencia de anticuerpos anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml, pegado a placa) y anti-CD28 (2  $\mu$ g/ml, soluble) y diferentes concentraciones de TGF $\beta$  (0.5, 1, 2.5 ng/ml). Tras 5 días de diferenciación, la inducción de células Treg fue evaluada a través de la expresión de FoxP3 y CD25. Las gráficas representan: viabilidad (A), porcentaje y número de células Treg (B) e incremento relativo (IR) de la expresión de FoxP3 y CD25 (C). La intensidad de fluorescencia está reportada como incremento relativo (IR), con respecto a las células del ratón silvestre. Media  $\pm$  EE. \*p $\leq$ 0.05. Datos de 3 experimentos independientes.

Como se puede observar en la Figura 23, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> muestran un pico de producción de Inhibina, tras la activación a través de CD3 y CD28 a las 96 h; mientras que para la Activina la concentración máxima se alcanzó a las 120h. Sin embargo, estos resultados son preliminares puesto que es necesario incrementar el número de experimentos para confirmar este dato.

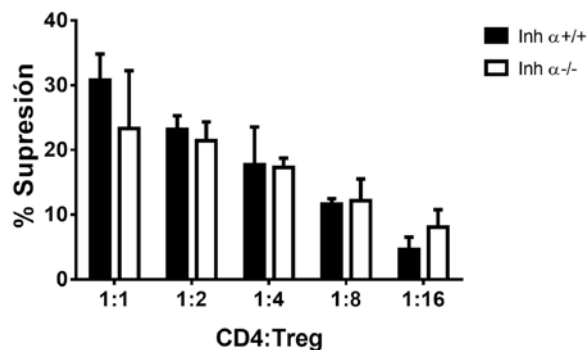


**Figura 23. La Inhibina A es producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes tras su activación.** Células T CD4<sup>+</sup> vírgenes fueron cultivados en presencia de anticuerpos anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml, pegado a placa) y anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml, soluble). Secreción de Inhibina A (panel izquierdo) y Activina A (panel derecho), fue evaluada, a través de ELISA, en los sobrenadantes de cultivo, cada 24h hasta el día 5. Datos de 1 experimento.

#### f. Función de las células T reguladoras deficientes de Inhibina.

Con el propósito de evaluar la función de las Tregs, y debido a que se encontraron diferencias en la expresión de Foxp3 en las Treg inducidas *in vitro* en presencia de BMDCs, se empleó un modelo de supresión de la proliferación *in vitro*. En la Figura 24 se puede observar que las Tregs obtenidas *ex vivo* de ratones deficientes de Inhibina no muestran diferencias en su capacidad supresora con respecto a las Tregs de ratones silvestres, a diferentes proporciones T CD4<sup>+</sup>: Treg. Es necesario evaluar la función supresora de las tTreg y pTreg por separado, para concluir si las Treg deficientes de Inhibina tienen o no una capacidad supresora diferente de aquellas silvestres.





**Figura 24. La capacidad supresora de la proliferación de las células Treg  $Inh\alpha^{-/-}$ , obtenidas *ex vivo* es similar a la de las Treg silvestres.** Células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+Foxp3/GFP^+$ ) fueron obtenidas de órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos periféricos) de ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  and  $Inh\alpha^{-/-}$ , y se co-cultivaron con células respondedoras T  $CD4^+$  previamente marcadas con CTV (cell trace violet) a diferentes proporciones. Después de 5 días, se evaluó la proliferación de las células respondedoras a través de la dilución de CTV. Media  $\pm$  EE. datos de 4 experimentos independientes.

## 12. Discusión

Para evaluar el papel de las Inhibinas en la inducción de pTreg decidimos emplear como unidad experimental los ratones deficientes de Inhibinas ( $Inh\alpha^{-/-}$ ). Sin embargo, los ratones  $Inh\alpha^{-/-}$  pueden presentar tumores en las gónadas, tan temprano como a las 4 semanas de edad, aunque en la mayoría de los casos los tumores se presentan alrededor de las 10 semanas de edad <sup>194</sup>. Además, se ha reportado que como resultado de la presencia de tumores estos ratones pueden presentar pérdida de peso y caquexia a partir de las 7 semanas de edad <sup>196</sup>. Tanto la presencia de tumores como de caquexia pueden afectar las subpoblaciones linfocitarias en el ratón, por lo que decidimos evaluar estas subpoblaciones a diferentes semanas de edad, para determinar a qué edad llevar a cabo la evaluación de las subpoblaciones de Treg.

Como podemos observar en la tabla 1, se muestra que a las 9 semanas hay alteraciones de número de células. En timo se observa una disminución estadísticamente significativa del número de células, mientras que en los órganos linfoides secundarios (particularmente bazo y PLN)

podemos observar un incremento (no significativo estadísticamente) y en MLN una disminución no significativa en el número de células. Por su parte los números de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> muestran un incremento a las 9 semanas de edad en PLN en los animales deficientes de Inhibina, mientras que en MLN se observa una disminución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En cuanto al porcentaje de estas subpoblaciones de linfocitos T observamos tanto en bazo como en MLN una disminución de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a las 9 semanas de edad en los ratones deficientes de Inhibina. La disminución tanto de células totales como de las subpoblaciones de linfocitos T en MLN correlaciona con lo reportado previamente por Matzuk et al<sup>196</sup>, donde se observó que los ratones deficientes de Inhibina muestran una pérdida de peso a partir de la 7 semanas de edad, asociada con atrofia de la mucosa de la región glandular del estómago, lo cual puede resultar también en alteraciones en intestino y MLN.

Por otra parte, se ha reportado que los niveles de Activina en ratones macho deficientes de Inhibina pueden incrementar a partir de las 7 semanas y en hembras a partir de las 10 semanas de edad <sup>196</sup>. Además se ha reportado que dependiendo del contexto las Activinas pueden inhibir o promover la proliferación de timocitos<sup>207,208</sup>, por ejemplo, en presencia de IL-6 exógena las activinas pueden promover la proliferación de timocitos de rata<sup>196,209</sup>; lo cual podría explicar los efectos de aumento y/o disminución de subpoblaciones observados a las 9 semanas de edad en los diferentes órganos evaluados. Por lo tanto, se decidió evaluar los niveles de activina en suero a diferentes semanas de edad.

Como podemos ver en los datos de la Figura 9, los niveles de Activina en suero aumentan significativamente a partir de las 6 semanas de edad en los ratones deficientes de Inhibina, explicando particularmente las alteraciones encontradas a las 9 semanas de edad en estos. Se ha sugerido que la disminución de la secreción de la subunidad  $\alpha$  de Inhibina, favorece la producción

de Activinas (revisado en <sup>175</sup>), lo cual puede explicar el incremento de los niveles de Activina en el suero de los ratones deficientes de Inhibina.

Se ha reportado que, *in vitro*, la Activina A puede inducir Treg CD4+CD25+FoxP3+ a partir de células T vírgenes tras la estimulación con anticuerpos anti- CD3 y anti-CD28 de manera dosis dependiente y actúa de manera sinérgica con TGFβ, induciendo mayor número de células Treg<sup>197</sup>. Además, *in vivo* la frecuencia de las Treg en periferia se encuentra incrementada en ratones transgénicos (K14-activin β A) con niveles altos de Activina A en suero y la tasa de conversión de T vírgenes a Treg en estos ratones fue mayor comparada con el los ratones silvestres <sup>197,210</sup>. Por lo tanto, se decidió realizar la evaluación de las subpoblaciones de Treg a las 4 semanas de edad de los ratones deficientes de Inhibina, ya que el incremento de Activina A en el suero de los ratones deficientes de Inhibina observado a las 6 y 9 semanas podría alterar las poblaciones de Treg, enmascarando los efectos de la ausencia de Inhibina en estas poblaciones.

En las Tablas 1, 2 y 3, y en la Figura 10 se puede observar que el número de células totales, los números de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y las frecuencias de los mismos no muestran alteraciones en los ratones deficientes de Inhibina con respecto a los silvestres a las 4 semanas de edad. Se decidió evaluar lámina propia de colon, además de los órganos linfoides secundarios descritos previamente (bazo, PLN y MLN), ya que como se mencionó previamente el intestino es un sitio enriquecido en pTregs donde además estas juegan un papel muy importante en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia <sup>88,89</sup>.

Previamente reportamos que en ratones *Inhα*<sup>-/-</sup> de 2 semanas de edad hay un incremento en el porcentaje de células Treg en timo (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), comparado con ratones silvestres, en conjunto con una disminución del porcentaje de CD4SP, lo cual indica que la inducción de tTreg se ve favorecida en estos ratones <sup>190</sup>. Esto probablemente está dado por la disminución de las

interacciones de alta avididad en el ratón deficiente de Inhibina, ya que se observó una disminución de la expresión de MHC-II en las cTECs y cDCs en estos ratones, disminuyendo así el umbral de selección de los linfocitos T, y desplazando el balance de selección negativa a desarrollo de Treg<sup>190</sup>. Está bien establecido que las tTreg migran hacia los órganos linfoides secundarios. Por lo tanto, el incremento en los números de células tTreg en PLN en los ratones deficientes de Inhibina, puede ser atribuido a los hallazgos previamente descritos en el timo de estos ratones <sup>190</sup>.

De manera interesante, en MLN y lámina propia de colón, encontramos un incremento significativo en el porcentaje de Tregs CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>, las cuales podemos definir como pTreg en condiciones de homeostasis <sup>7</sup>. El microambiente intestinal provee una estimulación continua de bacterias comensales y antígenos de la dieta, esta mucosa está particularmente predispuesta a la inducción de tolerancia a través de la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGFβ), las cuales promueven la conversión de Th vírgenes a Tr1 y pTreg, mientras que la producción de ácido retinoico por las DCs CD103<sup>+</sup> inducen la expresión de FoxP3 y moléculas de “homing” a intestino CCR9 e integrinas α4β7 que retienen a las Treg en la mucosa intestinal <sup>55</sup>. De hecho, experimentos usando eliminación de células Treg (ratón DEREg), revelaron que la presencia constitutiva de las Treg es requerida para la prevención de inflamación autoinmune y colitis <sup>211</sup>. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que las Inhibinas regulan la generación *de novo*, el mantenimiento o el reclutamiento de Treg en la mucosa intestinal bajo condiciones homeostáticas.

Como se observa en los resultados, las poblaciones de DCs en MLN no muestran diferencias en porcentajes y números (Figura 13), sin embargo, el fenotipo de estas se encuentra alterado, encontrando una disminución de la expresión en superficie de MHC-II en las todas las poblaciones de cDC, tanto residentes como migratorias (Figura 14). Cabe mencionar, que previamente en el laboratorio se habían evaluado las frecuencias y números totales de DCs

residentes y migratorias en bazo y PLN de los ratones deficientes de Inhibina sin encontrar diferencias en relación a los animales silvestres <sup>193</sup>, lo que correlaciona con nuestros hallazgos, sugiriendo que la diferenciación de las poblaciones de DCs y su llegada a estos nichos no se encuentra afectada en los ratones deficientes de Inhibina. En ese trabajo, al evaluar la expresión de MHC-II en las poblaciones de DCs en bazo y MLN no se encontraron diferencias, sin embargo al evaluar la expresión de esta moléculas en las células de Langerhans en epidermis de piel se encontró disminuida<sup>193</sup>, correlacionando con lo observado en las subpoblaciones de MLN en el presente trabajo. Dado que las alteraciones fenotípicas se observan en poblaciones de DCs que se encuentran en sitios de constante interacción con antígenos y PRRs estos corroboran que las Inhibinas están involucradas en el proceso de maduración de las DCs.

Además, al evaluar las moléculas co-estimuladoras/inhibidoras en las poblaciones de DCs en MLN, también observamos un incremento en PD-L1 en las rDCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y en las mDCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (Figura 14). En este sentido, previamente se ha reportado que las DCs CD103<sup>+</sup> juegan un papel clave en la inducción de tolerancia en el intestino, ya que producen altos niveles de RA y TGF $\beta$ , los cuales son mediadores clave de la inducción de FoxP3 en el microambiente intestinal <sup>212,213</sup>. De hecho, se ha demostrado que las DC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>PD-L1<sup>hi</sup> son potentes inductores de pTregs <sup>159</sup>. Además *in vitro* se ha observado que la expresión de PD-L1 en DCs, diferenciadas en presencia de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D3, es crucial para la adquisición de la función de Treg, mientras que el bloqueo de PD-L1 en estas células resulta en la generación de células T tipo Th1 <sup>214</sup>. PD-L1 promueve la diferenciación y el mantenimiento de la función de las Treg inducidas, manteniendo y aumentando la expresión de FoxP3. PD-L1 induce Treg a través de la inhibición de la cascada de señalización Akt/mTOR, cambiando el “switch molecular” de las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia el desarrollo de Treg <sup>210</sup>.

Además, en nuestros datos se observó un aumento de la expresión en superficie de CD80 y CD86 en las rDCs CD8<sup>+</sup> y en las mDCs CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> (Figura 14), en relación a esto es importante mencionar que las moléculas CD80 y CD86 no actúan únicamente como moléculas co-estimuladoras, ya que pueden unirse a receptores co-inhibidores en las células T, tales como CTL4 y PD-L1, con alta afinidad, lo cual puede favorecer la inducción de tolerancia, a través de la competencia con receptores como CD28, importantes para la activación del linfocito T, e inhibiendo su proliferación <sup>215,216</sup>. Además, se ha reportado que PD-L1 se puede unir *in cis* sobre la misma célula, bloqueando la unión de CD80 a sus ligandos <sup>217</sup>. Por lo tanto, la co-expresión de estas moléculas (PD-L1, CD80, CD86), *in vivo*, podría promover una respuesta tolerogénica.

El hecho de que la expresión de PD-L1 se encuentra aumentada en las DCs en ausencia de Inhibinas, sugiere que las Inhibinas pueden ser un blanco para prevenir la inducción de tolerancia en patologías en las cuales se requiere aumentar la respuesta inmune como el cáncer, dado que, como sabemos se ha demostrado que el bloqueo de PD-1 ha sido efectivo en la terapia anti-tumoral <sup>218</sup>. Por otro lado, la activación de la vía co-inhibitoria de PD-L1/PD-1 es importante en el control de enfermedades autoinmunes <sup>219</sup>. Por lo tanto, entender el mecanismo por el cual se regula la expresión de esta molécula es crucial para futuros enfoques clínicos.

Los cambios en el fenotipo en las DCs obtenidas *ex vivo* de MLN, se conservan al menos parcialmente en BMDCs y en cDCs obtenidas de bazo deficientes de Inhibina, al ser maduras en presencia de LPS (Figura 15). Este fenotipo correlaciona con la disminución de la capacidad de inducir proliferación de linfocitos T alogénicos de las BMDC *Inhα<sup>-/-</sup>*, tanto al día 3 como al día 5 (Figura 17 y reportado en <sup>193</sup>). PD-L1 puede disminuir la señalización del receptor de linfocitos T por medio de SHP-2 <sup>220</sup>, y en consecuencia puede promover la anergia de los linfocitos T y/o la inducción de Treg <sup>221</sup>, por lo que se evaluó la inducción de Tregs en presencia de BMDCs *Inhα<sup>-/-</sup>*.

Al analizar el porcentaje y número de inducción de Treg en los co-cultivos de BMDCs  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  y linfocitos T vírgenes, en comparación con aquellos donde se emplearon BMDCs silvestres, no encontramos diferencias en el porcentaje (Figura 17) ni en el número (datos no mostrados) de Treg inducidas en el cultivo. Existen reportes donde se ha observado que las BMDCs diferenciadas y estimuladas en presencia de SFB producen muy bajas concentraciones de  $\text{TGF}\beta$  comparadas con aquellas que se diferencian en ausencia de SFB <sup>222</sup>, similar a lo observado por nosotros, ya que no pudimos detectar  $\text{TGF}\beta$  en los sobrenadantes de las BMDCs (datos no mostrados); por lo que se decidió añadir al sistema  $\text{TGF}\beta$ .

Como se mencionó previamente, al añadir  $\text{TGF}\beta$  exógeno al co-cultivo de DCs y linfocitos T, además de anti-CD3 a concentraciones bajas, observamos que las mBMDCs deficientes de Inhibina muestran una mayor capacidad de inducir Treg (Figura 18B), al emplear una proporción de 1 DC por cada 10 linfocitos T vírgenes. Sin embargo, al evaluar los números totales podemos observar que hay una tendencia a incrementar los números de Treg en la misma proporción sin embargo esta no es estadísticamente significativa, esto puede deberse a la disminución de la capacidad de inducción de proliferación de linfocitos T alogénicos de las DCs deficientes de Inhibina (Figura 17). Observaciones similares se obtuvieron al usar DCs  $\text{CD11c}^+$  maduras obtenidas *ex vivo*. Estas diferencias pueden ser explicadas parcialmente por la regulación positiva de PD-L1 y el fenotipo semimaduro, previamente reportado, de las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  estimuladas con LPS <sup>193</sup>, así como por las diferencias encontradas tras la maduración de las DCs obtenidas *ex vivo*, señalando la importancia de la regulación de la segunda señal (moléculas co-estimuladoras/ co-inhibidoras) por la Inhibina en las células dendríticas.

Es importante señalar que en el sistema de inducción empleado, al agregar  $\text{TGF}\beta$  al cultivo, podemos alterar el fenotipo de las DCs, ya que se ha reportado que las DCs adquieren un fenotipo

tolerogénico en presencia de TGF $\beta$ , caracterizado por baja expresión de los marcadores de maduración CD83, CD80 y CD86, así como MHC-II y por una disminución de la expresión de citocinas pro-inflamatorias y un aumento de la secreción de citocinas anti-inflamatorias<sup>223</sup>. Por lo que nuestros resultados podrían deberse a una respuesta diferencial de las DCs al TGF $\beta$ ; la cual podría estar regulada diferencialmente debido a la presencia del betaglicano, al cual como ya se mencionó se unen las Inhibinas con alta afinidad a través de su subunidad alfa<sup>185</sup>, además de a otros ligandos de la superfamilia entre ellos al TGF $\beta$ <sup>224</sup>, por lo que en ausencia de Inhibinas podría favorecerse la unión de TGF $\beta$  y por tanto modificar el fenotipo de las DCs deficientes de Inhibina hacia características tolerogénicas. Para evaluar esto sería importante evaluar el fenotipo de las DCs a diferentes tiempos tras la estimulación con TGF $\beta$ , además de evaluar los niveles de betaglicano en las DCs y los niveles de fosforilación de Smad2 tras el estímulo con TGF $\beta$  de las DCs deficientes de Inhibina en comparación con las silvestres.

*In vivo*, el direccionamiento de antígenos a DCs ya sea CD8<sup>+</sup> o CD103<sup>+</sup> a través del uso de anticuerpos anti-DEC205, CLEC9A y langerina resulta en inducción de pTregs<sup>100,225,226</sup>; de hecho la inducción de pTreg está afectada en los ratones deficientes de BAFT3 o IRF8 (ambos necesarios para el desarrollo de las DCs CD8<sup>+</sup> o CD103<sup>+</sup> (cDC1))<sup>227</sup>, mientras que en los ratones donde IRF4 se encuentra deficiente (importante para el desarrollo de DCs CD11b<sup>+</sup> o cDC2), se restaura la inducción de pTregs. Además, se ha reportado que empleando el sistema de direccionamiento del antígeno a través de anti-DEC205 se pueden generar respuestas inmunogénicas o tolerogénicas, dependiendo del adyuvante usado durante la inmunización<sup>165</sup>. Específicamente, el uso de la toxina del cólera (CT) como adyuvante, induce respuestas Th1 y Th17 efectivas tras la inmunización intradérmica<sup>165</sup>, mientras que en ausencia de adyuvante, se ha observado que se promueve una respuesta tolerogénica, a través de un mecanismo que involucra la generación de Treg<sup>225</sup>.



Al evaluar la inducción de pTreg en el modelo de direccionamiento de antígeno *in vivo* a través de anti-DEC205, observamos que en el ganglio drenante de los ratones deficientes de Inhibina se encontró un número mayor de pTreg en ausencia de adyuvante y una tendencia a incrementar incluso en presencia de adyuvante lo que indica que en los ratones receptores, la deficiencia de Inhibina y su efecto en el fenotipo de las DCs, resulta en un fenotipo tolerogénico. Sin embargo, con los datos obtenidos, no podemos diferenciar si el incremento en pTreg encontrado se debe únicamente a un incremento en la inducción de Treg, a una mayor expansión de esta población, o bien a cambios en la migración de esta. Por lo que además de la evaluación realizada en el ganglio drenante, sería relevante evaluar cómo se encuentran las poblaciones tanto de DCs como de pTreg y linfocitos T efectores en el sitio de inmunización (oreja), para definir si la respuesta en el sitio de inflamación es predominantemente tolerogénica, efectora o bien si es modulada diferencialmente en los ratones deficientes de Inhibina. Previamente, Olguín-Alor *et al* demostraron que al realizar un ensayo de tipo DTH en la oreja de los ratones deficientes de Inhibina, estos muestran una menor cantidad de infiltrado leucocitario en el sitio del reto con el antígeno (OVA)<sup>193</sup>. Estos resultados muestran correlación con el fenotipo tolerogénico favorecido en las DCs deficientes de Inhibina. Sin embargo, en el trabajo antes mencionado, también se encontró que en el dLN de estos ratones hay un menor número de cDCs, al realizar el reto en los animales deficientes de Inhibina, y particularmente se encontró que la población CD8<sup>+</sup>CD07<sup>+</sup> (LC) es la que muestra una mayor disminución en números en los ratones deficientes de Inhibina<sup>193</sup>, por lo que no podemos descartar que los datos obtenidos se deban a alteraciones en la migración de las subpoblaciones de DCs además de los cambios en su fenotipo. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo un análisis más profundo de las subpoblaciones de Treg y DCs tanto en el sitio del

reto antigénico como en el dLN, de manera temporal, para poder atribuir específicamente los hallazgos encontrados los cambios en fenotipo, maduración y/o migración de las DCs.

En intestino la población de DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> está considerada como la población con la mayor capacidad de inducción de pTregs<sup>228</sup>. Además, se ha observado que el direccionamiento de antígeno a través de DEC-205 (expresado en cDC1) puede llevar a la inducción de tolerancia por la diferenciación a pTregs en mucosas (intestino), aún en un estado de inflamación<sup>229</sup>. Considerando nuestros hallazgos respecto al fenotipo de las DCs en MLN, podemos hipotetizar que al direccionar el antígeno con DEC-205 en mucosa, específicamente en intestino (de manera intraperitoneal) en el ratón deficiente de Inhibinas, obtendremos una mayor inducción de pTreg comparada con aquella obtenida en los ratones silvestres, similar a lo obtenido en la piel de estos ratones.

Por otra parte, al evaluar los linfocitos T vírgenes silvestres o deficiente de Inhibina, se observó que la viabilidad de las células deficientes de Inhibina se incrementa significativamente, con respecto a las células silvestres, en cultivos de inducción de Treg a bajas dosis de TGFβ (0.5ng/ml), lo cual podría implicar una mayor resistencia a muerte, probablemente relacionada a un incremento en la respuesta a TGFβ, el cual está relacionado con la sobrevida de células activadas, así como con la inducción de Tregs. Nuestros datos mostraron que, en ausencia de Inhibina, la inducción a Treg a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> no se modifica, sin embargo, es necesario llevar a cabo ensayos en otras condiciones que nos permitan corroborar este dato. Por ejemplo, llevar a cabo la inducción de Treg en presencia de IL-2 o RA podría favorecer la diferenciación y sobrevida de las células en cultivo ya que, en estos ensayos, en las condiciones de diferenciación la sobrevida fue de alrededor del 40%, lo cual podría estar enmascarando el rol de las Inhibinas.

En la figura 23 podemos observar los niveles de activina en el sobrenadante del cultivo de linfocitos T activados silvestres o deficientes de Inhibina, a pesar de que no se observan grandes diferencias estos datos son preliminares (n=1), por lo que es necesario incrementar la n para evaluar los niveles de Activina en los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos T activados y además también evaluar dichos niveles en condiciones de diferenciación, ya que como se mencionó previamente, la falta de la subunidad alfa de la inhibina favorece la “unión” de subunidades beta que podrían llevar a una mayor concentración de activina. Esto es importante ya que como se mencionó previamente se ha demostrado que las Activinas pueden sinergizar con el TGF $\beta$  para favorecer la inducción de Tregs<sup>197</sup>.

Se ha reportado que los timocitos CD4 SP expresan tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta$ A<sup>189</sup>. Además, se ha reportado previamente que la estimulación a través del TCR y moléculas co-estimuladoras (anti-CD3 y anti-CD28) puede inducir la secreción de Activina A en los linfocitos T CD4+<sup>230</sup>; sin embargo, no existe ningún reporte a la fecha en el cual se haya evaluado la secreción de Inhibina. Como se esperaba, linfocitos T CD4+ son capaces de producir Inhibina A tras el estímulo mencionado, donde además el pico de producción de Inhibina se da a las 96h (datos preliminares), antes que aquel de la Activina.

Cabe mencionar que en datos no publicados del laboratorio, se ha observado que en ausencia de Inhibinas se favorece la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes a Th17<sup>231</sup>. El linaje Th17, al igual que las Treg, requieren TGF $\beta$  para su diferenciación<sup>232</sup>, lo que nos indica que la respuesta de los linfocitos T deficientes de Inhibina al TGF $\beta$  puede estar alterado. Sería interesante evaluar también otros linajes dependientes de TGF $\beta$  cómo son las células Th9<sup>233</sup>.

Como se mencionó previamente, las Inhibinas se pueden unir con alta afinidad al T $\beta$ RIII, el cual actúa como un co-receptor que puede potenciar las señales mediadas por TGF $\beta$ <sup>234</sup> y de

manera reciente, hemos demostrado que T $\beta$ RIII promueve la inducción de Treg *in vitro* <sup>235</sup>. Por otro lado se ha observado que la Inhibina A puede modular la expresión de T $\beta$ RIII, lo cual puede antagonizar las señales dadas por TGF $\beta$ 2 <sup>236</sup>, por lo que en cultivos de diferenciación de linfocitos T a diferentes linajes (Treg, Th17), las Inhibinas podría contribuir a la regulación de la señal dada por TGF $\beta$ ; por lo anterior sería relevante poder probar diferentes condiciones de inducción.

Al observar los niveles de expresión de Foxp3 en nuestros sistemas de inducción de pTreg *in vitro*, observamos que las pTreg inducidas con mBMDCs deficientes de Inhibina mostraron un incremento en la expresión de este factor de transcripción. Como se mencionó previamente la expresión de Foxp3 está relacionada tanto a la función supresora como a la estabilidad de estas células, por lo que surge la pregunta de si las Inhibinas juegan un papel importante en la regulación de la función de las Treg. Como primera aproximación para evaluar si las Inhibinas juegan un papel importante en la función de las Treg, se realizaron ensayos de supresión empleando Tregs obtenidas *ex vivo* de ratones silvestres o deficientes. Como mencionamos antes, no observamos diferencias en la capacidad supresora de las células, sin embargo no podemos descartar que haya diferencias en la función de estas células, ya que como se mencionó en la introducción las células Treg tienen una variedad de mecanismos a través de los cuales ejercen su función regulatoria, por lo que sería importante realizar diversos tipos de ensayo. Además, en el caso del ensayo realizado aquí se empleó una mezcla de tTreg y pTreg, ya que en estos ratones no es posible separar ambos tipos celulares, por lo que sería importante hacer ensayos separando cada una de estas subpoblaciones. Para lo cual se podrían inducir *in vitro* o *in vivo* pTreg en un sistema que permita su identificación. Además se podrían emplear ensayos donde se puedan co-transferir células tTreg y pTreg en cantidades conocidas, como en el caso de los experimentos de Haribhai *et al.* en un

modelo de colitis inducido en ratones linfopénicos <sup>4</sup>, o bien en un modelo de colitis inducida por dextran.

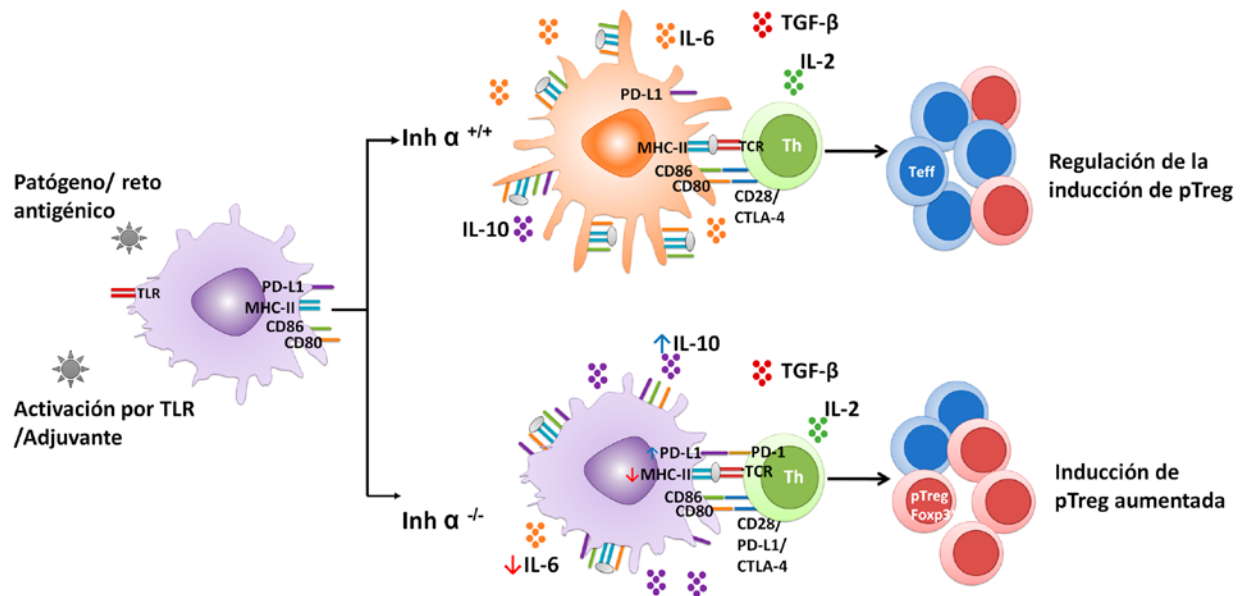
El mecanismo molecular por el cual las Inhibinas pueden modular la respuesta de linfocitos T efectoros o reguladores aún necesita ser estudiado. Particularmente es importante entender si los efectos observados en nuestro modelo están dados por la Inhibina A o la Inhibina B, las cuales se ha observado que se pueden unir a correceptores diferentes. Está bien descrito que la Inhibina A puede unirse a betaglicano con mayor afinidad que la Inhibina B <sup>237</sup>; sin embargo, los efectos mediados por Inhibina B en cuanto a inhibición de la FSH no parecen estar mediados por este receptor <sup>238</sup>. Es por esto que se ha sugerido que Inhibina B tenga un coreceptor diferente de betaglicano, el cual aún no ha sido caracterizado. Por esto un primer paso para entender cuál Inhibina es la responsable de nuestros efectos sería emplear modelos de células silvestres en los cuales se bloqueara ya sea Inhibina A o Inhibina B de manera específica o bien el dominio de unión a Inhibina A en el betaglicano, para entender si la señalización río abajo de este receptor es importante para los efectos observados. Sería interesante también evaluar los niveles de betaglicano en las DCs deficientes de Inhibina, para entender si la ausencia de esta puede llevar a una modulación de su correceptor, lo cual pudiera impactar en la respuesta al TGF $\beta$  de estas células.

Como podemos observar en nuestros datos las BMDCs pueden producir Inhibina A en respuesta al estímulo de LPS, lo que sugiere que esta citocina podría actuar de manera autocrina sobre las DCs. *In vitro* hemos reportado que la adición de Inhibina A recombinante a cultivos de BMDCs deficientes de Inhibina en presencia de LPS puede llevar a una recuperación de la expresión de MHC-II<sup>193</sup>, sugiriendo que esta es la responsable de los efectos observados en la

expresión de esta molécula. Es necesario evaluar si la adición de Inhibina A recombinante también es capaz de restaurar el fenotipo de las DCs en cuanto a la expresión de PD-L1, CD80 y CD86 durante la maduración en células deficientes de Inh  $\alpha$ .

Por otra parte las observaciones previas en cuanto a las alteraciones en secreción de citocinas por las mBMDCs deficientes de Inhibina (incremento IL-10, disminución IL-6) no se recuperan tras la adición de Inhibina A recombinante<sup>193</sup>, por lo que es necesario evaluar cual es el posible mecanismo por el que se modulan estas, ya sea que estos efectos estén mediados por Inhibina B o bien que en las DCs deficientes de Inhibina las vías de señalización dependientes de TLRs se activen diferencialmente comparadas con los ratones silvestres. Estas preguntas necesitan ser evaluadas en futuros trabajos.

En resumen, nuestros datos muestran un incremento en las Treg de LP, MLN y PLN en los ratones deficientes de Inhibina, que correlacionan con un cambio en el fenotipo de las DCs, caracterizado por la disminución de la expresión de MHC-II, y específicamente en las cDC1 (CD103+ y CD8+) por un incremento de la expresión de PD-L1. Nuestros datos sugieren que las Inhibinas modulan negativamente el fenotipo tolerogénico de las DCs (moléculas de superficie), por lo que las DCs deficientes de Inhibina tienen una mayor capacidad para inducir pTreg tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 25). Además, las Inhibinas pueden modular la secreción de citocinas y la migración de las DCs<sup>193</sup>, lo cual también puede afectar su capacidad de inducción de pTregs.



**Figura 25. Papel de las Inhibinas en la inducción de T reguladoras periféricas.** Las células dendríticas juegan un papel clave en la inducción de pTregs, tanto en condiciones homeostáticas como inflamatorias. Las inhibinas modulan negativamente la inducción de Tregs a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Th) vírgenes en la periferia a través de la promoción de la maduración de las DCs. En los ratones deficientes de Inhibina las DCs muestran una disminución de los niveles de MHC-II, e incremento en los niveles de PD-L1, lo cual correlaciona con un aumento en la inducción de Tregs *in vitro* e *in vivo*.

### 13. Conclusiones

- Las células T reguladoras periféricas se encuentran incrementadas en ausencia de Inhibinas.
- Las células dendríticas, tanto residentes como migratorias, muestran una disminución de la expresión de MHC-II, aunado a un incremento de PD-L1 en las cDCs1 en el ganglio mesentérico de los ratones  $Inh\alpha^{-/-}$ .
- Las células dendríticas  $Inh\alpha^{-/-}$  obtenidas *ex vivo*, estimuladas con LPS, muestran una disminución en la expresión de CD80 y CD86, comparadas con las DCs silvestres.
- Las Inhibinas controlan la inducción de células T reguladoras, dependiente de DCs, *in vitro*.
- Las DCs  $Inh\alpha^{-/-}$  aumentan la inducción de células T reguladoras *in vivo*.
- La función supresora de las células T reguladoras (tTreg+pTreg)  $Inh\alpha^{-/-}$  no se encuentra alterada en comparación con células Treg  $Inh\alpha^{+/+}$ , en ensayos de supresión *in vitro*.

#### CONCLUSION GENERAL

Nuestros datos demuestran que las Inhibinas regulan negativamente la tolerancia periférica de las células T, frenando la generación de pTreg debido a la modulación negativa del fenotipo y función tolerogénica de las DCs.



## 14. Perspectivas

- ❖ Analizar si la modulación de la inducción de Treg por inhibinas se debe únicamente a la interacción entre moléculas co/estimuladoras o co/inhibidoras entre la DC y el linfocito T virgen, o bien si otros ligandos (por ejemplo: citocinas) contribuyen al efecto observado.
- ❖ Identificar las vías de señalización activadas o moduladas por Inhibinas involucradas en la obtención del fenotipo tolerogénico obtenido en ausencia de estas moléculas.
- ❖ Determinar si las Inhibinas juegan un papel en la función de las pTreg, para lo cual es necesario evaluar la función de las pTregs purificadas silvestres o deficientes de Inhibinas a través de ensayos de función supresora *in vitro* o bien en ensayos *in vivo* en un modelo de colitis o en un modelo de melanoma.

## 15. Referencias

1. Pavón-Romero, L., Jiménez-Martínez, M. C. & Garcés-Alvarez, M. E. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. (Wolters Kluwer, 2010).
2. Bilate, A. M. & Lafaille, J. J. Induced CD4 Foxp3 Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annual Review of Immunology* vol. 30 733–758 (2012).
3. Shevach, E. M. & Thornton, A. M. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.* **259**, 88–102 (2014).
4. Haribhai, D. *et al.* A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J. Immunol.* **182**, 3461–3468 (2009).
5. Shevach, E. M. Foxp3 T Regulatory Cells: Still Many Unanswered Questions—A Perspective After 20 Years of Study. *Frontiers in Immunology* vol. 9 (2018).
6. Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q. & Yoshimura, A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* **37**, 803–811 (2016).
7. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**, 626–635 (2009).
8. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485–498 (2009).
9. Itoh, M. *et al.* Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* **162**, 5317–5326 (1999).
10. Zheng, Y. & Rudensky, A. Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* **8**, 457–462 (2007).

11. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics* vol. 27 20–21 (2001).
12. Kitagawa, Y. & Sakaguchi, S. Molecular control of regulatory T cell development and function. *Curr. Opin. Immunol.* **49**, 64–70 (2017).
13. Ono, M. *et al.* Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* vol. 446 685–689 (2007).
14. Lin, X. *et al.* Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 116–123 (2013).
15. Thornton, A. M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **184**, 3433–3441 (2010).
16. Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H. & Hancock, W. W. Helios Expression Is a Marker of T Cell Activation and Proliferation. *PLoS ONE* vol. 6 e24226 (2011).
17. Weiss, J. M. *et al.* Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J. Exp. Med.* **209**, 1723–42, S1 (2012).
18. Huehn, J. & Beyer, M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **27**, 10–18 (2015).
19. Josefowicz, S. Z. & Rudensky, A. Control of Regulatory T Cell Lineage Commitment and Maintenance. *Immunity* vol. 30 616–625 (2009).
20. Li, J., Park, J., Foss, D. & Goldschneider, I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* **206**, 607–622 (2009).
21. Lio, C.-W. J. & Hsieh, C.-S. A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* vol. 28 100–111 (2008).
22. Mahmud, S. A. *et al.* Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 473–481 (2014).
23. Burchill, M. A. *et al.* Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. *Immunity* vol. 28 112–121 (2008).
24. Tai, X. *et al.* Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* **38**, 1116–1128 (2013).
25. Owen, D. L. *et al.* Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat. Immunol.* **20**, 195–205 (2019).
26. Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R. & Farrar, M. A. IL-2 Receptor - Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3 Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* vol. 178 280–290 (2007).
27. Sakaguchi, S. *et al.* T Cell-Mediated Maintenance of Natural Self-Tolerance: its Breakdown as a Possible Cause of Various Autoimmune Diseases. *Journal of Autoimmunity* vol. 9 211–220 (1996).
28. Owen, D. L. *et al.* Identification of Cellular Sources of IL-2 Needed for Regulatory T Cell Development and Homeostasis. *J. Immunol.* **200**, 3926–3933 (2018).
29. Luo, C. T. & Li, M. O. Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.* **34**, 531–539 (2013).
30. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886 (2003).

31. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4 CD25 regulatory T cells. *Nature Immunology* vol. 4 330–336 (2003).
32. Shull, M. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* vol. 359 693–699 (1992).
33. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. TGF- $\beta$ 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4 CD25 regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 201 1061–1067 (2005).
34. Takimoto, T. *et al.* Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J. Immunol.* **185**, 842–855 (2010).
35. Tamiya, T. *et al.* Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction. *J. Immunol.* **191**, 2360–2371 (2013).
36. Zhou, Z., Song, X., Li, B. & Greene, M. I. FOXP3 and its partners: structural and biochemical insights into the regulation of FOXP3 activity. *Immunologic Research* vol. 42 19–28 (2008).
37. Deng, G. *et al.* Molecular and biological role of the FOXP3 N-terminal domain in immune regulation by T regulatory/suppressor cells. *Experimental and Molecular Pathology* vol. 93 334–338 (2012).
38. Zheng, Y. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* vol. 463 808–812 (2010).
39. Josefowicz, S. Z. *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* vol. 482 395–399 (2012).
40. Lee, W. & Lee, G. R. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Experimental & Molecular Medicine* vol. 50 e456–e456 (2018).
41. Mantel, P.-Y. *et al.* Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells. *The Journal of Immunology* vol. 176 3593–3602 (2006).
42. Tone, Y. *et al.* Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature Immunology* vol. 9 194–202 (2008).
43. Floess, S. *et al.* Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* **5**, e38 (2007).
44. Schlenner, S. M., Weigmann, B., Ruan, Q., Chen, Y. & von Boehmer, H. Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *J. Exp. Med.* **209**, 1529–1535 (2012).
45. Hill, J. A. *et al.* Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* **27**, 786–800 (2007).
46. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061. *J. Immunol.* **198**, 981–985 (2017).
47. Wieczorek, G. *et al.* Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.* **69**, 599–608 (2009).
48. Miyao, T. *et al.* Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* **36**, 262–275 (2012).
49. Polansky, J. K. *et al.* DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European Journal of Immunology* vol. 38 1654–1663 (2008).
50. Selvaraj, R. K. & Geiger, T. L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J. Immunol.* **179**, 11 p following 1390 (2007).

51. Ito, M., Iizuka-Koga, M., Ando, M. & Yoshimura, A. Development and Functional Modulation of Regulatory T Cells by Transcription Factors and Epigenetics. *Cornea* **37 Suppl 1**, S42–S49 (2018).
52. Ohkura, N. *et al.* T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity* vol. 37 785–799 (2012).
53. Ghosh, S., Roy-Chowdhuri, S., Kang, K., Im, S.-H. & Rudra, D. The transcription factor Foxp1 preserves integrity of an active Foxp3 locus in extrathymic Treg cells. *Nat. Commun.* **9**, 4473 (2018).
54. Gavin, M. A. *et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**, 771–775 (2007).
55. Tanoue, T., Atarashi, K. & Honda, K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 295–309 (2016).
56. Curotto de Lafaille, M. A. *et al.* Adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* **29**, 114–126 (2008).
57. Haribhai, D. *et al.* A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* **35**, 109–122 (2011).
58. Yadav, M., Stephan, S. & Bluestone, J. A. Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front. Immunol.* **4**, 232 (2013).
59. Chai, J.-G. *et al.* Regulatory T cells, derived from naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation* **79**, 1310–1316 (2005).
60. Haribhai, D. *et al.* A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J. Immunol.* **182**, 3461–3468 (2009).
61. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Frontiers in Immunology* vol. 3 (2012).
62. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
63. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **190**, 995–1004 (1999).
64. Schumacher, A. *et al.* Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **110**, 1137–1145 (2007).
65. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* vol. 28 546–558 (2008).
66. Glocker, E.-O. *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2033–2045 (2009).
67. Sojka, D. K. & Fowell, D. J. Regulatory T cells inhibit acute IFN- $\gamma$  synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18336–18341 (2011).
68. Gorelik, L. & Flavell, R. A. Abrogation of TGF $\beta$  Signaling in T Cells Leads to Spontaneous T Cell Differentiation and Autoimmune Disease. *Immunity* vol. 12 171–181 (2000).
69. Green, E. A., Gorelik, L., McGregor, C. M., Tran, E. H. & Flavell, R. A. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells control anti-islet CD8<sup>+</sup> T cells through TGF- $\beta$  receptor interactions in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 100 10878–10883 (2003).
70. Izcue, A., Coombes, J. L. & Powrie, F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal

- immune activation to control intestinal inflammation. *Immunological Reviews* vol. 212 256–271 (2006).
71. Jonuleit, H. *et al.* Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**, 255–260 (2002).
  72. Andersson, J. *et al.* CD4 FoxP3 regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- $\beta$ -dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 205 1975–1981 (2008).
  73. Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–569 (2007).
  74. Grossman, W. J. *et al.* Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* vol. 104 2840–2848 (2004).
  75. McHugh, R. S. *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311–323 (2002).
  76. Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* **174**, 1783–1786 (2005).
  77. Zhao, D.-M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J. & Shevach, E. M. Activated CD4 CD25 T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* vol. 107 3925–3932 (2006).
  78. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).
  79. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 204 1257–1265 (2007).
  80. Kobie, J. J. *et al.* T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* **177**, 6780–6786 (2006).
  81. Zarek, P. E. *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **111**, 251–259 (2008).
  82. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10113–10118 (2008).
  83. Bour-Jordan, H. & Bluestone, J. A. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **229**, 41–66 (2009).
  84. Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate costimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1538–1543 (2000).
  85. Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M. & Ivars, F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4 CD25 regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* vol. 118 240–249 (2006).
  86. Wing, K. *et al.* CTLA-4 Control over Foxp3 Regulatory T Cell Function. *Science* vol. 322 271–275 (2008).
  87. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).
  88. Kim, K. S. *et al.* Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* vol. 351 858–863 (2016).
  89. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of

- colonic regulatory T cells. *Nature* vol. 504 446–450 (2013).
90. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* vol. 504 451–455 (2013).
  91. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 1757–1764 (2007).
  92. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 1757–1764 (2007).
  93. Xu, L. *et al.* Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity* **33**, 313–325 (2010).
  94. Worbs, T. *et al.* Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 519–527 (2006).
  95. Hadis, U. *et al.* Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3 Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity* vol. 34 237–246 (2011).
  96. Farache, J. *et al.* Luminal bacteria recruit CD103<sup>+</sup> dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* **38**, 581–595 (2013).
  97. McDole, J. R. *et al.* Goblet cells deliver luminal antigen to CD103<sup>+</sup> dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483**, 345–349 (2012).
  98. Cerovic, V. *et al.* Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol.* **6**, 104–113 (2013).
  99. Liu, K. & Nussenzweig, M. C. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* **234**, 45–54 (2010).
  100. Idoyaga, J. *et al.* Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J. Clin. Invest.* **123**, 844–854 (2013).
  101. Schlitzer, A., McGovern, N. & Ginhoux, F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**, 9–22 (2015).
  102. Liu, K. *et al.* In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science* (2009) doi:10.1126/science.1170540.
  103. Greter, M. *et al.* GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* vol. 36 1031–1046 (2012).
  104. Ginhoux, F. *et al.* The origin and development of nonlymphoid tissue CD103 DCs. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 206 3115–3130 (2009).
  105. Kashiwada, M., Pham, N.-L. L., Pewe, L. L., Harty, J. T. & Rothman, P. B. NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 dendritic cell development. *Blood* vol. 117 6193–6197 (2011).
  106. Edelson, B. T. *et al.* CD8 $\alpha$ (<sup>+</sup>) dendritic cells are an obligate cellular entry point for productive infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity* **35**, 236–248 (2011).
  107. Dorner, B. G. *et al.* Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* **31**, 823–833 (2009).
  108. Crozat, K. *et al.* The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 $\alpha$  dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 207 1283–1292 (2010).
  109. Bachem, A. *et al.* Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c<sup>+</sup> CD141<sup>+</sup> cells as homologues of mouse CD8 dendritic cells. *The Journal of*

- Experimental Medicine* vol. 207 1273–1281 (2010).
110. Huysamen, C., Willment, J. A., Dennehy, K. M. & Brown, G. D. CLEC9A Is a Novel Activation C-type Lectin-like Receptor Expressed on BDCA3 Dendritic Cells and a Subset of Monocytes. *Journal of Biological Chemistry* vol. 283 16693–16701 (2008).
  111. Edelson, B. T. *et al.* Peripheral CD103 dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$  conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 207 823–836 (2010).
  112. Hildner, K. *et al.* Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* vol. 322 1097–1100 (2008).
  113. Schlitzer, A. *et al.* IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* vol. 38 970–983 (2013).
  114. King, I. L., Kroenke, M. A. & Segal, B. M. GM-CSF-dependent, CD103 dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 207 953–961 (2010).
  115. Lewis, K. L. *et al.* Notch2 Receptor Signaling Controls Functional Differentiation of Dendritic Cells in the Spleen and Intestine. *Immunity* vol. 35 780–791 (2011).
  116. Wu, L. *et al.* RelB Is Essential for the Development of Myeloid-Related CD8 $\alpha$ - Dendritic Cells but Not of Lymphoid-Related CD8 $\alpha$  Dendritic Cells. *Immunity* vol. 9 839–847 (1998).
  117. Kabashima, K. *et al.* Intrinsic Lymphotoxin- $\beta$  Receptor Requirement for Homeostasis of Lymphoid Tissue Dendritic Cells. *Immunity* vol. 22 439–450 (2005).
  118. Persson, E. K. *et al.* IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* **38**, 958–969 (2013).
  119. Kumamoto, Y. *et al.* CD301b Dermal Dendritic Cells Drive T Helper 2 Cell-Mediated Immunity. *Immunity* vol. 39 733–743 (2013).
  120. Murakami, R. *et al.* A Unique Dermal Dendritic Cell Subset That Skews the Immune Response toward Th2. *PLoS ONE* vol. 8 e73270 (2013).
  121. Gao, Y. *et al.* Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells. *Immunity* vol. 39 722–732 (2013).
  122. Drutman, S. B. & Trombetta, E. S. Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. *J. Immunol.* **185**, 2140–2146 (2010).
  123. Idoyaga, J. *et al.* Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 108 2384–2389 (2011).
  124. León, B., López-Bravo, M. & Ardavín, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* **26**, 519–531 (2007).
  125. Hoeffel, G. *et al.* Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* **209**, 1167–1181 (2012).
  126. Ginhoux, F. & Merad, M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and Cell Biology* vol. 88 387–392 (2010).
  127. Borkowski, T. A. *et al.* A role for TGF $\beta$ 1 in langerhans cell biology. Further characterization of the epidermal Langerhans cell defect in TGF $\beta$ 1 null mice. *J. Clin. Invest.* **100**, 575–581 (1997).
  128. Zanoni, I. & Granucci, F. Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. *J. Mol. Med.* **88**, 873–880 (2010).

129. Domogalla, M. P., Rostan, P. V., Raker, V. K. & Steinbrink, K. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front. Immunol.* **8**, 1764 (2017).
130. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* vol. 18 767–811 (2000).
131. Dieu, M. C. *et al.* Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**, 373–386 (1998).
132. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. & Mackay, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* **19**, 568–574 (1998).
133. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449 (2002).
134. Villadangos, J. A. & Heath, W. R. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin. Immunol.* **17**, 262–272 (2005).
135. Talmage, D. W., Woolnough, J. A., Hemmingsen, H., Lopez, L. & Lafferty, K. J. Activation of cytotoxic T cells by nonstimulating tumor cells and spleen cell factor(s). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4610–4614 (1977).
136. Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Pillars article: antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 1987. 165: 302-319. *J. Immunol.* **183**, 4150–4167 (2009).
137. Bakdash, G., Sittig, S. P., van Dijk, T., Figdor, C. G. & de Vries, I. J. M. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.* **4**, 53 (2013).
138. Perry, J. S. A. *et al.* Distinct Contributions of Aire and Antigen-Presenting-Cell Subsets to the Generation of Self-Tolerance in the Thymus. *Immunity* vol. 41 414–426 (2014).
139. Kryczanowsky, F., Raker, V., Graulich, E., Domogalla, M. P. & Steinbrink, K. IL-10-Modulated Human Dendritic Cells for Clinical Use: Identification of a Stable and Migratory Subset with Improved Tolerogenic Activity. *The Journal of Immunology* vol. 197 3607–3617 (2016).
140. Raker, V. K., Domogalla, M. P. & Steinbrink, K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front. Immunol.* **6**, 569 (2015).
141. Li, H. & Shi, B. Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cellular & Molecular Immunology* vol. 12 24–30 (2015).
142. Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J. & Enk, A. H. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468–2476 (2002).
143. Kretschmer, K. *et al.* Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* **6**, 1219–1227 (2005).
144. Apostolou, I. & von Boehmer, H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* **199**, 1401–1408 (2004).
145. Hogan, P. G., Lewis, R. S. & Rao, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 491–533 (2010).
146. Baine, I., Abe, B. T. & Macian, F. Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling. *Immunol. Rev.* **231**, 225–240 (2009).
147. Travis, M. A. *et al.* Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* **449**, 361–365 (2007).
148. Speck, S. *et al.* TGF- $\beta$  signaling initiated in dendritic cells instructs suppressive effects on Th17 differentiation at the site of neuroinflammation. *PLoS One* **9**, e102390 (2014).



149. Worthington, J. J., Fenton, T. M., Czajkowska, B. I., Klementowicz, J. E. & Travis, M. A. Regulation of TGF $\beta$  in the immune system: An emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology* vol. 217 1259–1265 (2012).
150. Keir, M. E., Francisco, L. M. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 309–314 (2007).
151. Wu, J. & Horuzsko, A. Expression and function of immunoglobulin-like transcripts on tolerogenic dendritic cells. *Hum. Immunol.* **70**, 353–356 (2009).
152. Laurent, S. *et al.* CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and regulates their functions. *Hum. Immunol.* **71**, 934–941 (2010).
153. Mellor, A. L. & Munn, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 762–774 (2004).
154. Chora, A. A. *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Invest.* **117**, 438–447 (2007).
155. Iwata, M. *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21**, 527–538 (2004).
156. Hill, J. A. *et al.* Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> Cells. *Immunity* **29**, 758–770 (2008).
157. Munn, D. H. *et al.* Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**, 1867–1870 (2002).
158. Sun, C.-M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 204 1775–1785 (2007).
159. Shiokawa, A., Kotaki, R., Takano, T., Nakajima-Adachi, H. & Hachimura, S. Mesenteric lymph node CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> PD-L1<sup>+</sup> dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology* **152**, 52–64 (2017).
160. Yamazaki, S. *et al.* CD8<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup> splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* **181**, 6923–6933 (2008).
161. Wang, L. *et al.* Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9331–9336 (2008).
162. Wang, Z. *et al.* Use of the inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival via T-cell deletion and regulatory T cells. *Am. J. Transplant* **6**, 1297–1311 (2006).
163. Perruche, S. *et al.* CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor- $\beta$  from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nature Medicine* vol. 14 528–535 (2008).
164. Yamazaki, S. & Steinman, R. M. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Dermatol. Sci.* **54**, 69–75 (2009).
165. Bonifaz, L. *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **196**, 1627–1638 (2002).
166. Massagué, J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630 (2012).
167. Wakefield, L. M. & Hill, C. S. Beyond TGF $\beta$ : roles of other TGF $\beta$  superfamily members in cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 13 328–341 (2013).
168. Harrison, C. A., Al-Musawi, S. L. & Walton, K. L. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- $\beta$  superfamily ligands. *Growth Factors* vol. 29 174–186 (2011).
169. Weiss, A. & Attisano, L. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley*

- Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* vol. 2 47–63 (2013).
170. Moustakas, A. Non-Smad TGF- signals. *Journal of Cell Science* vol. 118 3573–3584 (2005).
  171. McCullagh, D. R. DUAL ENDOCRINE ACTIVITY OF THE TESTES. *Science* vol. 76 19–20 (1932).
  172. Bilezikjian, L. M. *et al.* Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **225**, 29–36 (2004).
  173. Stenvers, K. L. & Findlay, J. K. Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends in Endocrinology & Metabolism* vol. 21 174–180 (2010).
  174. Aleman-Muench, G. R. & Soldevila, G. When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 137–148 (2012).
  175. Namwanje, M. & Brown, C. W. Activins and Inhibins: Roles in Development, Physiology, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
  176. Hedger, M. P., Winnall, W. R., Phillips, D. J. & de Kretser, D. M. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitam. Horm.* **85**, 255–297 (2011).
  177. Phillips, D. J. & Woodruff, T. K. Inhibin: actions and signalling. *Growth Factors* **22**, 13–18 (2004).
  178. Gray, A. M. & Mason, A. J. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247**, 1328–1330 (1990).
  179. 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.* **284**, 9311–9320 (2009).
  180. Mason, A. J., Farnworth, P. G. & Sullivan, J. Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1055–1065 (1996).
  181. Antenos, M., Stemler, M., Boime, I. & Woodruff, T. K. N-linked oligosaccharides direct the differential assembly and secretion of inhibin alpha- and betaA-subunit dimers. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1670–1684 (2007).
  182. Makanji, Y., Harrison, C. A., Stanton, P. G., Krishna, R. & Robertson, D. M. Inhibin A and B in vitro bioactivities are modified by their degree of glycosylation and their affinities to betaglycan. *Endocrinology* **148**, 2309–2316 (2007).
  183. Antenos, M., Zhu, J., Jetly, N. M. & Woodruff, T. K. An activin/furin regulatory loop modulates the processing and secretion of inhibin alpha- and betaB-subunit dimers in pituitary gonadotrope cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 33059–33068 (2008).
  184. Li, S. *et al.* Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate binding activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 36645–36655 (2010).
  185. Lewis, K. A. *et al.* Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**, 411–414 (2000).
  186. Makanji, Y. *et al.* Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. *Endocr. Rev.* **35**, 747–794 (2014).
  187. Walton, K. L., Makanji, Y. & Harrison, C. A. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* **359**, 2–12 (2012).
  188. Licona-Limón, P. *et al.* Activins and inhibins: Novel regulators of thymocyte development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 229–235 (2009).
  189. Licona-Limón, P. Participación de activinas en el desarrollo del linfocito T. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2008).

190. Carbajal-Franco, E., de la Fuente-Granada, M., Alemán-Muench, G. R., García-Zepeda, E. A. & Soldevila, G. Inhibins tune the thymocyte selection process by regulating thymic stromal cell differentiation. *J Immunol Res* **2015**, 837859 (2015).
191. Robson, N. C. *et al.* Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* vol. 111 2733–2743 (2008).
192. Segerer, S. E. *et al.* The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **6**, 17 (2008).
193. Olguín-Alor, R. *et al.* A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function. *PLoS One* **11**, e0167813 (2016).
194. Matzuk, M. M., Finegold, M. J., Su, J. G., Hsueh, A. J. & Bradley, A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* **360**, 313–319 (1992).
195. Asigbetse, K. E., Eigenmann, P. A. & Frossard, C. P. Intestinal lamina propria TcR $\gamma$ delta $^{+}$  lymphocytes selectively express IL-10 and IL-17. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **20**, 391–401 (2010).
196. 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.* **91**, 8817–8821 (1994).
197. 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.* **182**, 4633–4640 (2009).
198. Gottschalk, R. A., Corse, E. & Allison, J. P. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3 $^{+}$  regulatory T cells. *J. Immunol.* **188**, 976–980 (2012).
199. Kim, Y. C. *et al.* Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3 human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood* vol. 119 2810–2818 (2012).
200. Zabransky, D. J. *et al.* Phenotypic and Functional Properties of Helios Regulatory T Cells. *PLoS ONE* vol. 7 e34547 (2012).
201. Thornton, A. M. *et al.* Helios and Helios Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *Eur. J. Immunol.* **49**, 398–412 (2019).
202. Sabado, R. L., Balan, S. & Bhardwaj, N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* **27**, 74–95 (2017).
203. Bain, C. C. *et al.* TGF $\beta$ R signalling controls CD103CD11b dendritic cell development in the intestine. *Nat. Commun.* **8**, 620 (2017).
204. Dixon, G. L. J. *et al.* Dendritic Cell Activation and Cytokine Production Induced by Group B *Neisseria meningitidis*: Interleukin-12 Production Depends on Lipopolysaccharide Expression in Intact Bacteria. *Infection and Immunity* vol. 69 4351–4357 (2001).
205. Wang, K. *et al.* CD25 signaling regulates the function and stability of peripheral Foxp3 $^{+}$  regulatory T cells derived from the spleen and lymph nodes of mice. *Mol. Immunol.* **76**, 35–40 (2016).
206. Bonifaz, L. C. *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* **199**, 815–824 (2004).
207. Tompkins, A. B., Hutchinson, P., de Kretser, D. M. & Hedger, M. P. Characterization of Lymphocytes in the Adult Rat Testis by Flow Cytometry: Effects Of Activin and Transforming Growth Factor  $\beta$  on Lymphocyte Subsets in Vitro1. *Biology of Reproduction* vol. 58 943–951 (1998).
208. Hedger, M. P., Drummond, A. E., Robertson, D. M., Risbridger, G. P. & de Kretser, D. M. Inhibin and activin regulate [ $^3$ H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* **61**, 133–138 (1989).

209. Hedger, M. P., Phillips, D. J. & de Kretser, D. M. DIVERGENT CELL-SPECIFIC EFFECTS OF ACTIVIN-A ON THYMOCYTE PROLIFERATION STIMULATED BY PHYTOHEMAGGLUTININ, AND INTERLEUKIN 1 $\beta$  OR INTERLEUKIN 6 IN VITRO. *Cytokine* vol. 12 595–602 (2000).
210. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–3029 (2009).
211. Lahl, K. *et al.* Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* **204**, 57–63 (2007).
212. Annacker, O. *et al.* Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.* **202**, 1051–1061 (2005).
213. Bakdash, G., Vogelpoel, L. T. C., van Capel, T. M. M., Kapsenberg, M. L. & de Jong, E. C. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal Immunol.* **8**, 265–278 (2015).
214. Unger, W. W. J., Laban, S., Kleijwegt, F. S., van der Slik, A. R. & Roep, B. O. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3147–3159 (2009).
215. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**, 111–122 (2007).
216. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
217. Chaudhri, A. *et al.* PD-L1 Binds to B7-1 Only on the Same Cell Surface. *Cancer Immunol Res* **6**, 921–929 (2018).
218. Vasaturo, A. *et al.* Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Front. Immunol.* **4**, 417 (2013).
219. Zhang, Q. & Vignali, D. A. A. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity* **44**, 1034–1051 (2016).
220. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–1217 (2012).
221. Ramos, R. N., de Moraes, C. J., Zelante, B. & Barbuto, J. A. M. What Are the Molecules Involved in Regulatory T-Cells Induction by Dendritic Cells in Cancer? *Clinical and Developmental Immunology* vol. 2013 1–10 (2013).
222. Looney, B. M., Chernatynskaya, A. V., Clare-Salzler, M. J. & Xia, C.-Q. Characterization of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Developed in Serum-Free Media and their Ability to Prevent Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J Blood Disord Transfus* **5**, (2014).
223. Seeger, P., Musso, T. & Sozzani, S. The TGF- $\beta$  superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 647–657 (2015).
224. Wiater, E., Harrison, C. A., Lewis, K. A., Gray, P. C. & Vale, W. W. Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J. Biol. Chem.* **281**, 17011–17022 (2006).
225. Ring, S., Maas, M., Nettelbeck, D. M., Enk, A. H. & Mahnke, K. Targeting of autoantigens to DEC205<sup>+</sup> dendritic cells in vivo suppresses experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J. Immunol.* **191**, 2938–2947 (2013).
226. Joffre, O. P., Sancho, D., Zelenay, S., Keller, A. M. & Reis e Sousa, C. Efficient and versatile

- manipulation of the peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1255–1265 (2010).
227. Hasegawa, H. & Matsumoto, T. Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. *Frontiers in Immunology* vol. 9 (2018).
228. Esterházy, D. *et al.* Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral Treg cells and tolerance. *Nature Immunology* vol. 17 545–555 (2016).
229. Wadwa, M., Klopfleisch, R., Buer, J. & Westendorf, A. M. Targeting Antigens to Dec-205 on Dendritic Cells Induces Immune Protection in Experimental Colitis in Mice. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **6**, 1–8 (2016).
230. Ogawa, K., Funaba, M., Chen, Y. & Tsujimoto, M. Activin A Functions as a Th2 Cytokine in the Promotion of the Alternative Activation of Macrophages. *The Journal of Immunology* **177**, 6787–6794 (2006).
231. Ortega-Francisco, S. A. Papel de las Inhibinas y el  $\beta$ -Glicano en la activación y diferenciación de los linfocitos T. (Universidad Nacional Autónoma de México).
232. Oh, S. A. & Li, M. O. TGF- $\beta$ : guardian of T cell function. *J. Immunol.* **191**, 3973–3979 (2013).
233. DuPage, M. & Bluestone, J. A. Harnessing the plasticity of CD4 T cells to treat immune-mediated disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 16 149–163 (2016).
234. López-Casillas, F., Wrana, J. L. & Massagué, J. Betaglycan presents ligand to the TGF $\beta$  signaling receptor. *Cell* **73**, 1435–1444 (1993).
235. Ortega-Francisco, S. *et al.* T $\beta$ RIII is induced by TCR signaling and downregulated in FoxP3 regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **494**, 82–87 (2017).
236. Looyenga, B. D., Wiater, E., Vale, W. & Hammer, G. D. Inhibin-A Antagonizes TGF $\beta$ 2 Signaling by Down-Regulating Cell Surface Expression of the TGF $\beta$  Coreceptor Betaglycan. *Molecular Endocrinology* vol. 24 608–620 (2010).
237. Makanji, Y., Temple-Smith, P. D., Walton, K. L., Harrison, C. A. & Robertson, D. M. Inhibin B Is a More Potent Suppressor of Rat Follicle-Stimulating Hormone Release than Inhibin A in Vitro and in Vivo. *Endocrinology* vol. 150 4784–4793 (2009).
238. Bernard, D. J., Smith, C. L. & Brûlé, E. A Tale of Two Proteins: Betaglycan, IGSF1, and the Continuing Search for the Inhibin B Receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* **31**, 37–45 (2020).

## 16. Artículo de Investigación

El desarrollo del proyecto de investigación derivó en la publicación de un artículo científico:

# Inhibins regulate peripheral regulatory T cell induction through modulation of dendritic cell function

Marisol de la Fuente-Granada<sup>1</sup>, Roxana Olguín-Alor<sup>1,2</sup>, Sandra Ortega-Francisco<sup>1</sup>, Laura C. Bonifaz<sup>3</sup> and Gloria Soldevila<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico

## Keywords

dendritic cells; inhibins; peripheral tolerance; Tregs

## Correspondence

G. Soldevila, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, Ciudad de México CP-04510, México  
Tel: +52 55 5622 3847  
E-mail: soldevi@unam.mx

(Received 11 October 2018, revised 13 November 2018, accepted 16 November 2018)

doi:10.1002/2211-5463.12555

We have previously reported that the absence of inhibins results in impaired dendritic cell (DC) maturation and function, leading to decreased T cell activation and diminished delayed-type hypersensitivity responses. Here, we investigated the role of inhibins in peripheral regulatory T cell (Treg) induction *in vitro* and *in vivo*. Inhibin deficient ( $Inh\alpha^{-/-}$ ) mice showed an increased percentage of peripherally induced Tregs in colonic lamina propria and mesenteric lymph nodes, compared to  $Inh\alpha^{+/+}$  mice, which correlated with increased expression of PD-L1 in  $CD103^+$  and  $CD8\alpha^+$  DCs. Lipopolysaccharide-stimulated bone marrow-derived and *ex vivo* spleen- and lymph node-purified  $CD11c^+$   $Inh\alpha^{-/-}$  DCs induced higher Tregs *in vitro*. Moreover, *in vivo* anti-DEC205-ovalbumin (OVA) DC targeting of mice with adoptively transferred OVA-specific T cells showed enhanced induced peripheral Treg conversion in  $Inh\alpha^{-/-}$  mice. These data identify inhibins as key regulators of peripheral T cell tolerance.

Regulatory T cells (Tregs) play a key role in central and peripheral T cell tolerance by preventing the development of autoimmunity and restraining inflammatory immune responses to pathogens that may result in immunopathology. The balance between effector and regulatory T cells is critical for the maintenance of homeostasis (reviewed in [1]).

Tregs are a subset of  $CD4^+$  T cells characterized by a high expression level of CD25 (interleukin (IL)-2 $\alpha$  chain receptor) and forkhead box P3 (FoxP3), a

transcription factor considered the master regulator of Treg development and function [2]. Their ability to suppress several immune cell responses has become increasingly relevant to understanding and treating several diseases and inflammatory responses [3]. Two major Treg subsets have been identified, those originating in the thymus, referred to as thymic Tregs (tTregs), and those induced in peripheral tissues from naïve T cells, referred to as peripheral Tregs (pTregs) (reviewed in [4]). Both populations share some

## Abbreviations

BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; BMP, bone morphogenetic protein; cDC, conventional dendritic cell; CT, cholera toxin; DC, dendritic cell; dLN, draining lymph node; FoxP3, forkhead box P3; FACS, fluorescence-activated cell sorting; IL, interleukin; LP, lamina propria; LPS, lipopolysaccharide; mDC, migratory dendritic cell; MFI, mean fluorescence intensity; MHC-II, major histocompatibility complex class II; MLN, mesenteric lymph node; OVA, ovalbumin; PLN, peripheral lymph node; pTreg, peripherally induced Treg; RA, retinoic acid; rDC, resident dendritic cell; TCR, T cell receptor; TGF $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; Th3, T helper 3; Tr1, type 1 regulatory T; Treg, regulatory T cell; tTreg, thymic regulatory T cell; WT, wild-type.

phenotypic markers including FoxP3, CD25, GITR and CTLA-4, although other markers, such as neuropilin 1, CD73 and Helios, have been proposed as specific for tTregs [5,6]. In addition, the signaling events needed to induce pTregs are different from those required for tTreg differentiation; transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) is a required cytokine for FoxP3 induction in pTregs, as well as low levels of T cell receptor (TCR) activation and low costimulatory signals. In contrast, tTregs require strong TCR and costimulatory signals and the presence of  $\gamma$  chain cytokines, such as IL-2 and/or IL-7. These different requirements are associated with the transcriptional regulation of the FoxP3 gene in tTregs *versus* pTregs [7]. Concerning the functional relevance of Treg subpopulations, tTregs have been shown to play a crucial role in the control of autoimmune diseases [8], while pTregs appear to be more relevant in restraining immunopathology after an immune response and in the context of intestinal homeostasis [9] (reviewed in [10]). However, both tTregs and pTregs have been shown to be necessary to prevent colitis, showing a non-redundant role in the maintenance of peripheral tolerance [11].

In addition to FoxP3<sup>+</sup> Tregs, other regulatory T cell subsets can be induced from naïve T cells, such as type 1 regulatory T (Tr1) cells and T helper 3 (Th3) cells (reviewed in [12]). Compared with Tregs, Tr1 and Th3 cells normally do not express CD25 or FoxP3 [13,14]. Tr1 cells are characterized by the expression of CD49b, LAG3 and the production of IL-10; their differentiation is favored under suboptimal antigen stimulation in the presence of IL-10 [15,16]. On the other hand, Th3 cells are characterized by the production of TGF $\beta$ 1 and the expression of CD69<sup>+</sup> and LAP<sup>+</sup> [14,17].

Dendritic cells (DCs) are a heterogeneous group of professional antigen presenting cells that originate in the bone marrow, principally from myeloid progenitors that differentiate into Pre-DCs. Pre-DCs seed peripheral tissues, where they complete their differentiation to DCs, in the lymph node, where they are known as resident DCs (rDCs), or in non-lymphoid tissues, where they are known as migratory DCs (mDCs) [18,19]. Both conventional DC (cDC) subsets can be identified in lymph nodes as CD11c<sup>hi</sup>MHC-II<sup>med</sup> and CD11c<sup>med</sup>MHC-II<sup>hi</sup> for rDCs or mDCs, respectively [19]. DCs play an important role in peripheral tolerance through several mechanisms including clonal deletion, anergy and regulation. In homeostasis, DCs capture self-antigens and present them to naïve T cells, preventing the activation of self-reactive clones and favoring the induction of Tregs and T cell anergy. In this context, murine cDCs can be

subdivided into two main subtypes that are considered independent cDC lineages: type 1 DCs (cDC1) for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> rDCs and CD103<sup>+</sup> mDCs, and type 2 DCs (cDC2) for CD4<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> rDCs and CD11b<sup>+</sup> mDCs (reviewed in [20]). CD103<sup>+</sup> mDCs in mesenteric lymph node (MLN) are considered as tolerogenic DCs due to their low levels of costimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86), high levels of coinhibitory molecules (PD-L1 and PD-L2) and the expression of IL-10, retinoic acid (RA) and TGF $\beta$ , which can lead to Tr1 and FoxP3<sup>+</sup> pTreg induction [21,22]. In addition, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> rDCs have also shown tolerogenic potential through TGF $\beta$  production, and targeting antigen to CD205 (DEC205), leading to clonal deletion [23] and Treg differentiation [24].

The TGF $\beta$  family comprises several structurally related proteins, including TGF $\beta$ , bone morphogenetic proteins (BMPs), activins and inhibins [25]. Inhibins and activins were first characterized as hormones [26] and are currently known to be involved in several immunological processes [27]. The canonical signaling pathway of this family is highly conserved and is shared among TGF $\beta$ , BMPs and activins. Briefly, dimeric ligands bind their serine/threonine kinase receptors (type I and II) and lead to phosphorylation of receptor SMADs, which heterodimerize with the common SMAD and translocate to the nucleus thereby regulating gene expression [28]. Several mechanisms have been proposed to explain the antagonistic effect of inhibins on activin-mediated functions (reviewed in [29]); inhibins are known to bind type II receptors through their  $\beta$  subunit and TGF $\beta$  type III coreceptor (T $\beta$ RIII) through their  $\alpha$  subunit, thus inhibiting the recruitment of type I receptor to the tertiary complex, interfering with SMAD-dependent signaling. Consequently, inhibins were considered non-signaling molecules; however, several reports support the possibility that inhibins may signal through a different receptor, which has not been identified to date (reviewed in [30]). This is supported by evidence showing that inhibins do not always antagonize activin functions. Specifically, inhibins and activins were shown to similarly control specific checkpoints during T cell development [31]; in addition, our group has shown that inhibins can regulate tTreg cell differentiation by controlling medullary/cortical thymic epithelial cell differentiation and DC maturation within the thymus [32]. Moreover, in recent work, we have demonstrated that the absence of inhibins in DCs results in an impaired maturation, characterized by low expression of major histocompatibility complex class II (MHC-II) and costimulatory molecules, as well as alterations in migration and, more importantly,

diminished ability to initiate T cell responses, such as *in vitro* proliferation of allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells and delayed-type hypersensitivity responses [33].

## Materials and methods

### Mice

Inhibin  $\alpha$  heterozygous mice (Inh $\alpha$ <sup>+/-</sup>) in C57BL/6 background were donated by M. Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) and have been previously described [34]. FoxP3<sup>EGFP</sup> knock-in mice (B6.Cg-Foxp3tm2Tch/J), CD45.1 and OT-II transgenic mice in C57BL/6 background were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mice were intercrossed to generate Inh $\alpha$ <sup>+/+</sup> FoxP3<sup>EGFP</sup>, Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup> FoxP3<sup>EGFP</sup> and CD45.1<sup>+</sup> OT-II<sup>+</sup> mice. Mice were bred and maintained in the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB, UNAM, México), in specific pathogen free conditions, according to ethics guidelines. The study was approved by the Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) of the IIB. For all experiments, 4-week-old female mice were used.

### Preparation of lymphocyte suspensions from colonic lamina propria, mesenteric lymph node, peripheral lymph nodes or spleen

Lymphocytes from colonic lamina propria (LP) were isolated using modified methods previously described [35]. Briefly, the gut was flushed with PBS, opened longitudinally and colon was cut into 5 mm pieces. The tissue was incubated in calcium- and magnesium-free HBSS containing 2 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 37 °C in a shaking incubator. The remaining tissue was washed with PBS, and incubated for 30 min more at 37 °C in RPMI supplemented with 100 U·mL<sup>-1</sup> collagenase IV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cell suspensions were filtered with 150  $\mu$ m nylon mesh. MLNs, peripheral lymph node (PLN) and spleen were harvested, mechanically disaggregated, and filtered to obtain a cell suspension. In the case of spleen, erythrocytes were lysed with Ammonium-Chloride-Potassium lysing buffer. Cells were resuspended in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer for phenotype analysis or PBS for FACS of naïve T cells.

### Preparation of DCs from MLN, PLN or spleen

DCs were obtained after collagenase digestion from MLN, PLN and spleen, as previously described [33]. Cells were resuspended in FACS buffer for phenotype analysis. CD11c<sup>+</sup> magnetic-activated cell sorting-enriched DCs, lipopolysaccharide (LPS)-stimulated (mCD11c<sup>+</sup>) or not (iCD11c<sup>+</sup>), were used in the functional assays.

### Flow cytometry

For phenotypic analysis, single cell suspensions were stained as previously described [36]. For *ex vivo* Treg cell analysis, anti-CD25-PECy5, anti-Helios-FITC, anti-CD8-PE (from Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-CD4-APC-AF750 (from Thermo Fisher Scientific), and anti-FoxP3-APC (from eBiosciences, San Diego, CA, USA) were used. For *in vitro* induced Treg analysis, Zombie Aqua fixable dye, anti-CD4-APC and anti-CD25-PECy5 from Biolegend were used. For *ex vivo* DC analysis, cells were blocked with purified anti-CD16/32, followed by staining with Zombie Aqua, anti-I-A/I-E-AF488, anti-CD11c-AF700, anti-CD80-PECy5 (from Biolegend), anti-CD3-PE, anti-TER119-PE, anti-CD11b-VF450, anti-CD86-APC, anti-CD8-PECy7 (from Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD19-PE, anti-CD49b-PE, streptavidin-APCCy7 (from BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD103-biotin and anti-PD-L1-PerCP-eFluor710 (from eBiosciences) were used.

For *in vivo* transfer experiments, anti-CD45.1-AF700, anti-CD4-FITC, anti-CD25-PECy5, streptavidin-BV605 (from Biolegend), anti-V $\beta$ 5-biotin (from BD Biosciences), and anti-FoxP3-APC (from eBiosciences) were used for staining ovalbumin (OVA)-specific T cells.

Samples were acquired in an Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) and analyzed using FLOWJO 10.0 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### Generation of bone marrow-derived DCs

Bone marrow derived DCs (BMDCs) were obtained from femurs and tibias of mice, as previously described [33]. Cells were resuspended in RPMI supplemented with 10% FBS, 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin and 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> streptomycin, and differentiated with granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. After 5 days of culture, mature BMDCs (mBMDCs) were obtained after stimulation with 1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> *Escherichia coli* 0111:B4 LPS for 24 h. At day 6, non-adherent cells were harvested, and CD11c<sup>+</sup> cells were purified by magnetic-activated cell sorting and used for further experiments.

### Treg cell induction

For *in vitro* cultures, naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>hi</sup> FoxP3-GFP<sup>-</sup> T cells were sorted from spleen and PLN from FoxP3<sup>EGFP</sup> mice and cocultured with either CD11c<sup>+</sup> BMDCs or spleen and PLN CD11c<sup>+</sup> DCs, at different DC : T naïve ratios (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 10, 1 : 20). Cultures were stimulated with 0.1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> anti-CD3 (Tonbo) and 0.25 ng·mL<sup>-1</sup> TGF $\beta$  (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Expression of FoxP3 and CD25 was evaluated after 5 days by flow cytometry.

For *in vivo* peripheral Treg induction, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were sorted from PLN and spleen of OT-II  $\times$  CD45.1



mice;  $4 \times 10^6$  cells were transferred intravenously to CD45.2  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  or  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice. After 24 h, intradermal immunization with anti-DEC205-OVA, anti-DEC205-OVA+cholera toxin (CT), OVA or OVA+CT was performed in the mouse ears. Seven days after immunization, pTregs were analyzed as  $\text{CD}25^+\text{FoxP}3^+$  within the population of transferred OT-II cells ( $\text{CD}4^+\text{CD}45.1^+\text{V}\beta 5^+$ ) in single cell suspensions obtained from draining lymph nodes (dLN).

### Statistical analysis

Data are presented as means  $\pm$  SEM. The significance of results was calculated by paired or unpaired, one or two-tailed Student's *t* test, utilizing PRISM 6 statistical software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) *P* values  $< 0.05$  were considered as statistically significant. *P* values  $> 0.05$  and  $< 0.1$  were considered as trends.

## Results and discussion

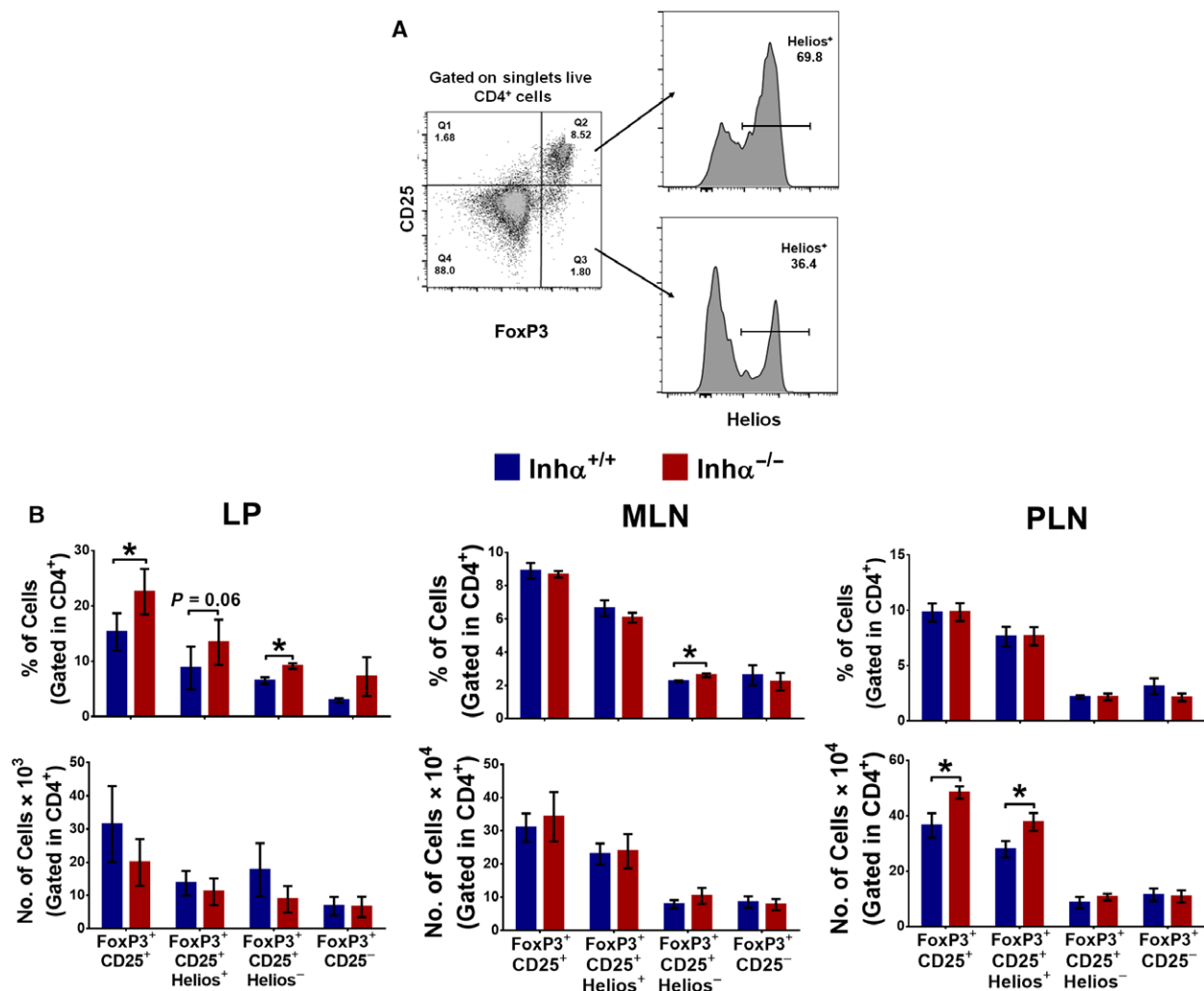
### Peripheral Tregs are increased in the absence of inhibins

To investigate whether inhibins play a role in the induction of Tregs in the periphery, we first evaluated Treg cell subpopulations from the  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  or  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice.  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  is an  $\alpha$  subunit null mouse where neither inhibin A nor inhibin B can be synthesized [34]. As shown in Fig. 1, in the absence of inhibins, the numbers of  $\text{CD}25^+\text{FoxP}3^+$  Tregs were significantly increased in PLN, specifically those Tregs expressing Helios, which correlates with our previous report showing enhanced tTreg development in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice [32]. However, when we evaluated Treg subpopulations in MLN and colonic LP, we found an increased frequency of  $\text{CD}25^+\text{FoxP}3^+\text{Helios}^-$  Tregs which, under homeostatic conditions, are considered pTregs [37]. These data suggest that inhibins regulate *de novo* generation, maintenance or recruitment of pTregs in the gut mucosa under homeostatic conditions. As the gut microenvironment provides a continuous stimulation from commensal bacteria and dietary antigens, this mucosa is particularly prone to tolerance induction by means of production of anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF $\beta$ ), which promote Tr1 and pTreg conversion, while the production of RA by  $\text{CD}103^+$  DCs induced FoxP3 expression and gut homing molecules CCR9 and  $\alpha 4\beta 7$  integrins, which retain Tregs in the intestinal mucosa [10]. Indeed, experiments using 'depletion of regulatory T cell' (DEREG) mice revealed that the constitutive presence of Tregs is required for the prevention of autoimmune inflammation and colitis [38].

### Mesenteric $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ $\text{CD}103^+$ DC display increased levels of PD-L1

We have recently reported that, in the absence of inhibins, DCs showed impaired maturation after *in vitro* LPS stimulation, which correlated with reduced capacity to induce  $\text{CD}4^+$  T cell proliferation *in vitro* and lower delayed-type hypersensitivity responses *in vivo* [33]. This 'semi-mature' phenotype has been associated with the ability of DCs to promote tolerogenic responses including FoxP3 $^+$  Treg generation [39]. To understand whether the increased pTregs observed in MLN and LP of  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice were related to differences in MLN DC subpopulations, we analyzed the frequency and phenotype of DC subpopulations as shown in Fig. S1. We analyzed resident and mDCs, based on their expression of MHC-II and CD11c, as  $\text{CD}11c^{\text{hi}}\text{MHC-II}^{\text{lo}}$  and  $\text{CD}11c^{\text{lo}}\text{MHC-II}^{\text{hi}}$ , respectively. To further analyze DC subsets, we used CD8 $\alpha$  to discriminate  $\text{CD}8\alpha^+$  and  $\text{CD}8\alpha^-$  rDCs, and for mDCs we used CD11b and CD103 to discriminate the following subpopulations:  $\text{CD}103^+\text{CD}11b^-$ ,  $\text{CD}103^+\text{CD}11b^+$  and  $\text{CD}11b^+\text{CD}103^-$ . A minor subpopulation,  $\text{CD}11b^-\text{CD}103^-$ , can also be observed; however, this subset has not been further characterized [40]. Frequency and numbers of DC subsets analyzed were not altered in the absence of inhibins (not shown); however,  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  DCs in MLN showed a diminished expression of MHC-II in all DC subsets (Fig. 2A, upper graphs), similarly to our previous report showing lower MHC-II expression on  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  epidermal Langerhans cells [33]. Interestingly, when we evaluated the expression of costimulatory/inhibitory molecules in MLN DC subsets we found a significantly increased expression of the coinhibitory molecule PD-L1 in  $\text{CD}8\alpha^+$  rDCs and in  $\text{CD}103^+\text{CD}11b^-$  mDCs and a trend towards an increase of PD-L1 in  $\text{CD}103^+\text{CD}11b^+$  mDCs from  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice. These  $\text{CD}103^+$  DC subpopulations have been reported to play a key role in tolerance induction in the gut, as they produce high levels of RA and TGF $\beta$ , which are key mediators of FoxP3 induction in the intestinal microenvironment [41,42]. In fact, it has been previously shown that  $\text{CD}103^+\text{CD}11b^-\text{PD-L1}^{\text{hi}}$  DC are high inducers of pTregs [43], in agreement with the reported effect of PD-L1 during Treg conversion from naïve T cells by immature DCs *in vitro* [44].

Despite the lower expression of MHC-II, we observed an increase in CD80 and CD86 in  $\text{CD}8\alpha^+$  rDCs and  $\text{CD}103^-\text{CD}11b^-$  mDCs. In this context, CD80 and CD86 do not exclusively act as costimulatory molecules, as they can bind coinhibitory receptors such as CTLA-4 and PD-L1 with high affinity,

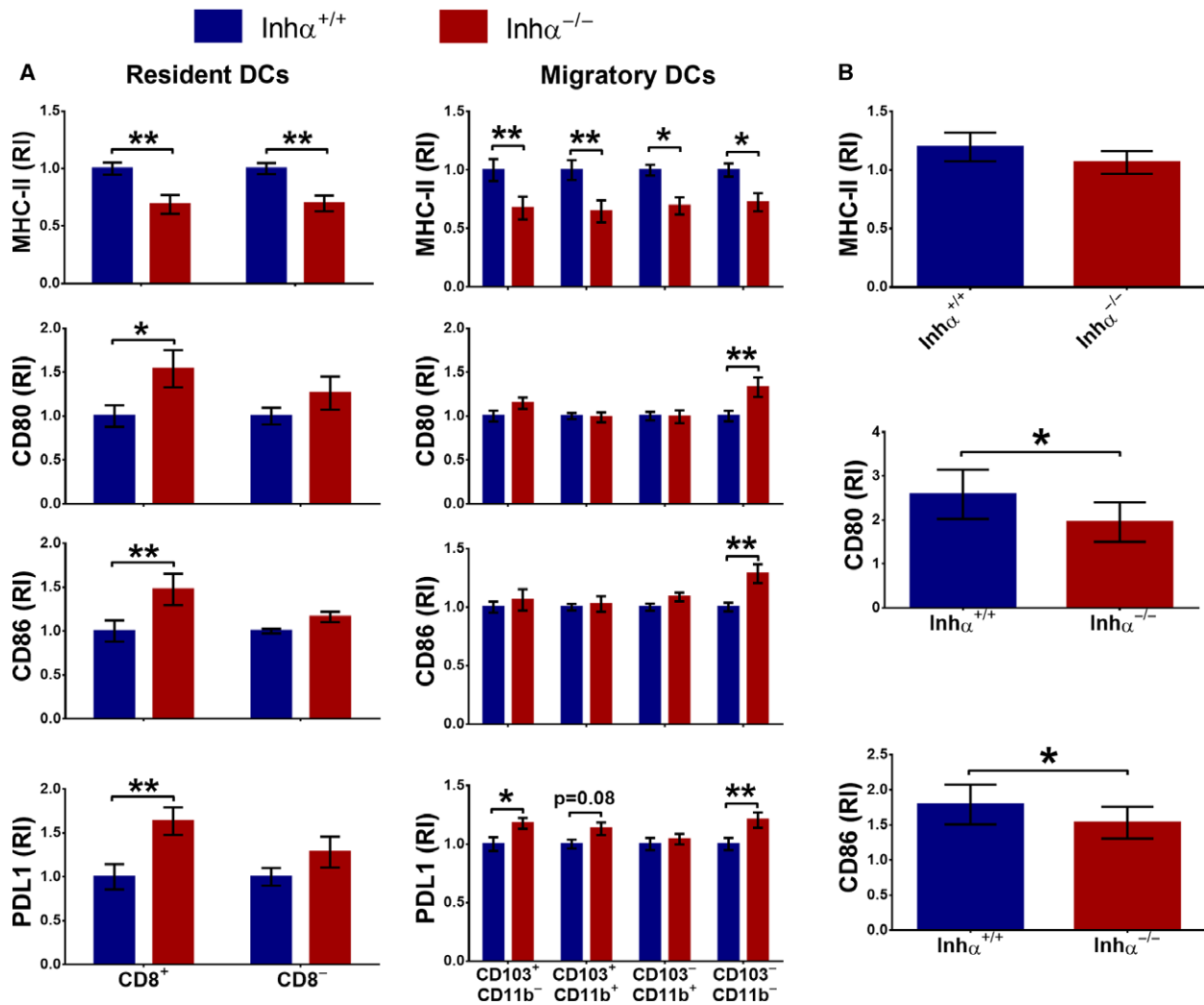


**Fig. 1.** Tregs are incremented in the periphery in the absence of inhibin. *Inhα*<sup>+/+</sup> and *Inhα*<sup>-/-</sup> mice were analyzed for Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), thymic (Helios<sup>+</sup>) or peripheral (Helios<sup>-</sup>). (A) Gate strategy for Treg analysis. (B) Frequency (top) and number (bottom) in colonic lamina propria (LP) (left), mesenteric lymph node (MLN) (center), and peripheral lymph node (PLN) (right). Mean ± SEM, *n* = 3–5 mice. Statistical significance was determined by two-tailed unpaired Student's *t* test. \**P* ≤ 0.05.

favoring tolerance induction, by competing with costimulatory receptors (CD28) for T cell activation and inhibiting T cell proliferation [45,46]. Interestingly, a recent report has shown that expression of PD-L1 can bind CD80 *in cis* on the same cell, blocking the binding of CD80 to its ligand [47]. Therefore, coexpression of these molecules *in vivo* could promote a tolerogenic response.

As we observed an increase in 'tolerogenic' DCs in MLN of *Inhα*<sup>-/-</sup> mice, we next evaluated whether spleen DCs were prone to differentiate into tolerogenic DCs in the absence of inhibins. As shown in Fig. 2B, LPS-stimulated *ex vivo* *Inhα*<sup>-/-</sup> CD11c<sup>+</sup> splenic DCs showed decreased upregulation of

MHC-II and CD80 in comparison with *Inhα*<sup>-/-</sup> counterparts (Fig. 2B). In summary, the tolerogenic phenotype of *Inhα*<sup>-/-</sup> DCs may explain the enhanced pTreg generation in MLN. Alternatively, we cannot exclude an intrinsic effect of inhibins on T cells, since *Inhα*<sup>-/-</sup> T cells appear to express different levels of TβRIII compared to *Inhα*<sup>+/+</sup> T cells in response to TCR stimulation (S. Ortega-Francisco, M. de la Fuente-Granada, R. Olguín-Alor, L. C. Bonifaz & G. Soldevila, manuscript in preparation). In this context, TβRIII acts as a coreceptor that potentiates TGFβ-mediated signals [48] and most recently, our group has shown that it promotes Treg induction *in vitro* [36].

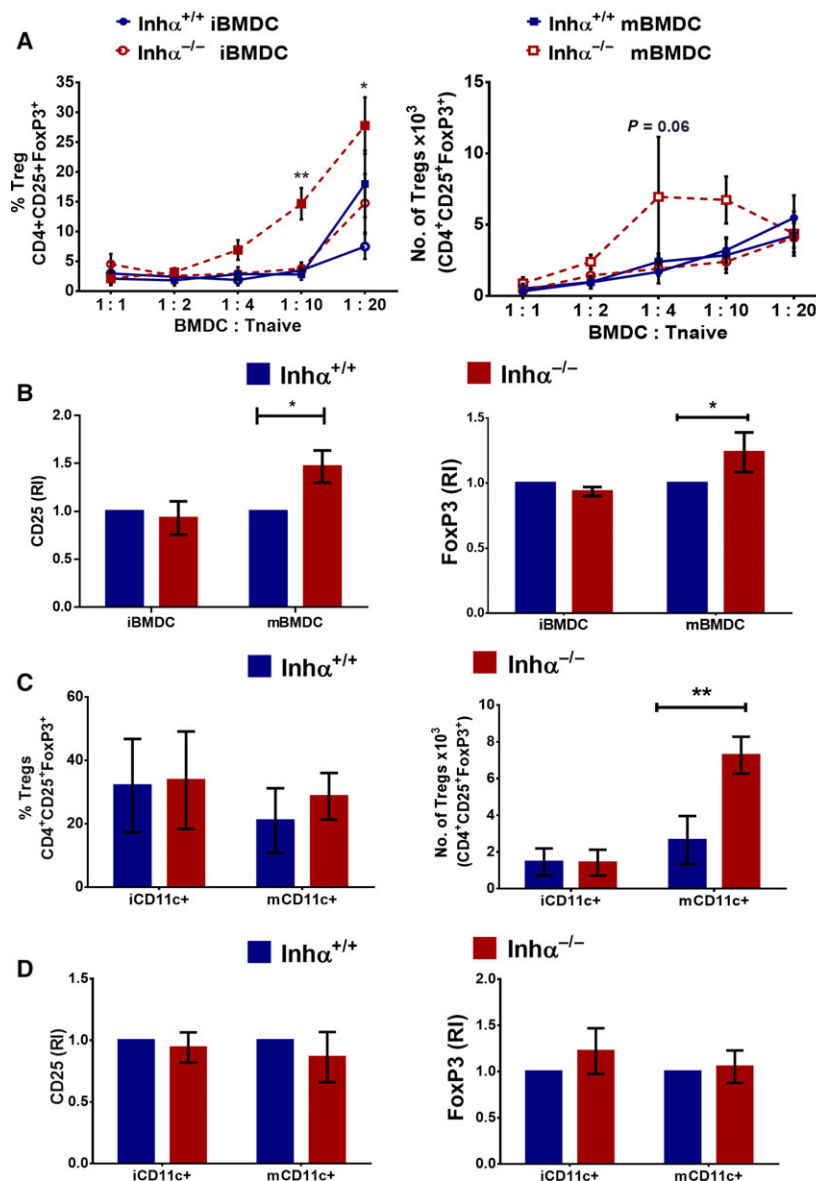


**Fig. 2.**  $Inh\alpha^{-/-}$  DC subsets have differential expression of MHC-II, CD80 and PD-L1 in MLN compared to  $Inh\alpha^{+/+}$ .  $Inh\alpha^{+/+}$  and  $Inh\alpha^{-/-}$  mice were analyzed for cDC subpopulations in MLN. (A) MHC-II, CD80, CD86 and PD-L1 expression within the resident DC ( $Lin^{-}CD11c^{hi}MHC-II^{+}CD8^{+}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{hi}MHC-II^{+}CD8^{-}$ ) (left) and migratory DC ( $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{+}CD11b^{-}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{+}CD11b^{+}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{-}CD11b^{+}$ ,  $Lin^{-}CD11c^{+}MHC-II^{hi}CD103^{-}CD11b^{-}$ ) (right) subpopulations. (B) Analysis of MHC-II, CD80 and CD86 in LPS-stimulated splenic  $CD11c^{+}$  DC. Bar graphs represent relative expression of mean fluorescence intensity (MFI) compared to unstimulated splenic  $CD11c^{+}$   $Inh\alpha^{+/+}$  DCs. Relative expression was calculated as the ratio: MFI of LPS-stimulated DCs/MFI of unstimulated DCs, for both  $Inh\alpha^{+/+}$  and  $Inh\alpha^{-/-}$  DCs. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$  mice. Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired Student's  $t$  test. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ .

### Inhibins regulate DC-mediated induction of Tregs *in vitro*

Naïve T cell differentiation towards an effector or regulatory phenotype requires several signals derived from the interaction between the T cell and the antigen presenting cell, including TCR–MHC, costimulation/co-inhibition and cytokine mediated signals (reviewed in [21]). Since MHC-II, CD80 and PD-L1 are altered in  $Inh\alpha^{-/-}$  DCs, we next investigated whether inhibin expression by DCs could impact *in vitro* Treg

conversion. In respect to this, we have previously reported that BMDCs express significant levels of inhibin A in response to LPS stimulation [33]. As expected,  $Inh\alpha^{-/-}$  did not produce detectable levels of inhibin A (Fig. S2). LPS-stimulated  $Inh\alpha^{-/-}$  BMDCs (mBMDCs) or non-stimulated BMDCs (iBMDCs) were cocultured with naïve T cells in the presence of suboptimal concentrations of anti-CD3 and TGF $\beta$ . We found that  $Inh\alpha^{-/-}$  mBMDCs induced a higher percentage of  $CD25^{+}FoxP3^{+}$  Tregs compared to  $Inh\alpha^{+/+}$  mBMDCs (1 : 10 DC : T naïve ratio) (Fig. 3A).



**Fig. 3.** Inhibin controls DC-dependent Treg cell induction *in vitro*. BMDC (A,B) or splenic and PLN CD11c<sup>+</sup> DCs (C,D) were cocultivated with naïve T cells in presence of anti-CD3 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and TGF $\beta$  (0.25  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). After 5 days, induction of Tre (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) was evaluated. (A) Treg conversion from naïve T cells in the presence of wild-type (WT) or Inh $\alpha^{-/-}$  iBMDCs or mBMDCs at different ratios. Graphs represent frequency (left) and total numbers (right) of Treg population. (B) CD25 (left) and FoxP3 (right) expression at induced Treg population are shown. (C) Treg conversion from naïve T cells in the presence of splenic and PLN iCD11c<sup>+</sup> or mCD11c<sup>+</sup> DCs, WT or Inh $\alpha^{-/-}$ , at 1 : 5 ratio. Graphs represent frequencies (left) and total numbers (right) of Treg population. (D) CD25 (left) and FoxP3 (right) expression at induced Treg population as in (B). Bar graphs of CD25 and FoxP3 represent relative expression of MFI compared to Inh $\alpha^{+/+}$  mice. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Statistical significance was determined by the two-tailed paired Student's *t* test. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ .

These differences may be in part explained by the upregulation of PD-L1 and the 'semi-mature' phenotype found in LPS-stimulated Inh $\alpha^{-/-}$  BMDCs [33]. The enhanced Treg conversion was accompanied by an increased CD25 and FoxP3 expression (Fig. 3B), suggesting that these induced Tregs might present an increased suppressive function [49]. In this context, we have observed that total FoxP3<sup>+</sup> Tregs purified from Inh $\alpha^{-/-}$  mice show increased suppressive activity towards polyclonally activated CD4<sup>+</sup> T cells, in correlation with higher CD25 expression (data not shown). Moreover, LPS-stimulated CD11c<sup>+</sup> DCs (mCD11c<sup>+</sup>) from spleen and PLN of Inh $\alpha^{-/-}$  mice cocultured with naïve T cells, in the presence of suboptimal anti-CD3 crosslinking and TGF $\beta$ , also induced a significantly

higher generation of Tregs *in vitro* compared to their Inh $\alpha^{+/+}$  counterparts, indicating that Inh $\alpha^{-/-}$  DCs have an intrinsic enhanced capacity to promote peripheral T cell tolerance (Fig. 3C). No differences in the expression levels of CD25 or FoxP3 were observed between *in vitro* induced FoxP3<sup>+</sup> Tregs in the presence of Inh $\alpha^{-/-}$  DCs compared to WT DCs (Fig. 3D).

### Inh $\alpha^{-/-}$ DCs enhance the induction of pTregs *in vivo*

To analyze the relevance of these findings *in vivo*, we used a strategy to directly deliver antigen to DCs, using anti-DEC205-OVA ( $\alpha$ -DEC-OVA) DC targeting

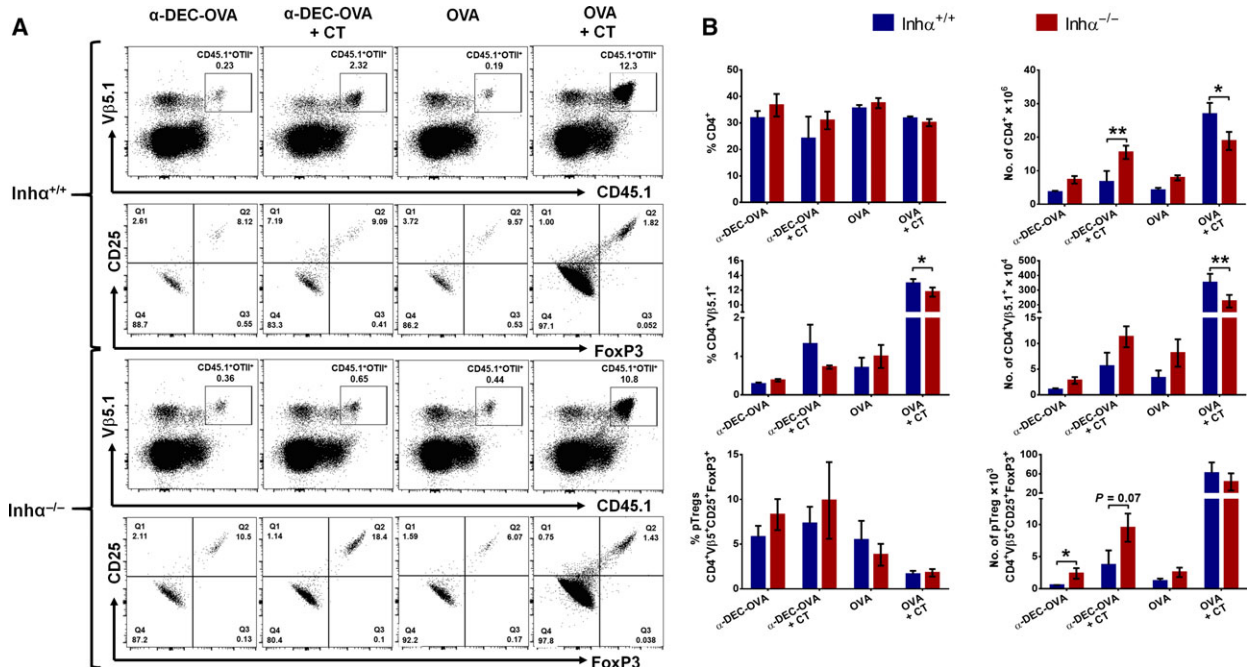
[23,50] and evaluated the response of adoptively transferred OT-II (OVA specific) TCR transgenic T cells. This system has been reported to generate either tolerogenic or immunogenic responses, depending on the adjuvant used during the  $\alpha$ -DEC205 targeting [23]. Specifically, the use of CT as adjuvant induces effective Th1 and Th17 responses after intradermal immunization [23], while in the absence of adjuvant,  $\alpha$ -DEC205 antigen targeting promotes a tolerogenic response, by a mechanism that involves FoxP3<sup>+</sup> Treg generation [51].

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>OT-II<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> naïve T cells were transferred intravenously to *Inh* $\alpha^{-/-}$  or *Inh* $\alpha^{+/+}$  CD45.2<sup>+</sup> mice, and 24 h later they were immunized in the ear with soluble OVA or OVA-targeted to DC through DEC205 ( $\alpha$ -DEC-OVA), either with or without CT as adjuvant. Analysis of T cell responses in the dLN showed that immunization with OVA+CT resulted in a lower percentage and total numbers of transferred OVA-specific (V $\beta$ 5<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells in *Inh* $\alpha^{-/-}$  recipient mice compared to *Inh* $\alpha^{+/+}$  (Fig. 4A,B), suggesting that inhibins may regulate CD4<sup>+</sup> T cell expansion, through the modulation of MHC-II and costimulatory/co-inhibitory molecules. Furthermore, we found a significant

increase in the number of OT-II<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> pTregs in *Inh* $\alpha^{-/-}$  mice immunized with  $\alpha$ -DEC-OVA compared to *Inh* $\alpha^{+/+}$ , while *Inh* $\alpha^{-/-}$  mice immunized with  $\alpha$ -DEC-OVA+CT showed a trend towards an increase in the number of pTregs compared to the *Inh* $\alpha^{+/+}$  counterparts, indicating that *Inh* $\alpha^{-/-}$  DCs are more prone to induce a tolerogenic response *in vivo* even in the presence of adjuvant.

The fact that PD-L1 is upregulated in the absence of inhibins suggests that they could be a target to prevent tolerance induction in clinical protocols destined to boost the immune response, as PD-1 blockage had been shown effective in anti-tumor immunotherapy (reviewed in [52]). In contrast, engagement of the PD-L1/PD-1 coinhibitory pathway is important for controlling several autoimmune diseases (reviewed in [53]). Therefore, to understand how the expression of this coinhibitory molecule can be regulated is crucial for future clinical approaches.

In summary, our data demonstrate that inhibins regulate peripheral T cell tolerance by directly restraining pTreg generation *in vivo* through modulation of DC function. Our results are relevant for immunotherapy, identifying inhibins as new potential targets



**Fig. 4.** Antigen target of *Inh* $\alpha^{-/-}$  DCs through anti-DEC205-OVA induces an increased number of peripherally induced Tregs (pTregs) *in vivo*. OT-II<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> naïve T cells were transferred into *Inh* $\alpha^{+/+}$  or *Inh* $\alpha^{-/-}$  mice, and 24 h later mice were immunized intradermally in the ear, with anti-DEC205-OVA ( $\alpha$ -DEC-OVA) or OVA, either with or without CT as adjuvant. Evaluation of pTregs was performed 7 days after immunization. (A) Representative dot plots of transferred cells (CD45.1<sup>+</sup>V $\beta$ 5.1<sup>+</sup>; top) and pTregs (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>; bottom) are shown for *Inh* $\alpha^{+/+}$  and *Inh* $\alpha^{-/-}$  receptor mice. (B) Percentage (left) and number (right) of CD4<sup>+</sup> T cells (top), transferred cells (middle), and pTregs (bottom). Mean  $\pm$  SEM, *n* = 3. Statistical significance was determined by two-tailed unpaired Student's *t* test. \**P*  $\leq$  0.05, \*\**P*  $\leq$  0.01.

for immune intervention. By enhancing or blocking their effects, it would be possible promote immunogenic or tolerogenic responses in different pathological settings.

## Acknowledgements

We thank Dr Juliana Idoyaga (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA) for providing the  $\alpha$ -DEC-OVA antibody. We also thank Oscar Hernandez and Luis Daniel Ferrer for technical assistance in mice genotyping. Finally, we would like to thank Carlos Castellanos, Erick Espindola and Dr Andrea Bedoya from the LABNALCIT-UNAM (CONACYT) for the technical support in the sorting of flow cytometry samples. This work was supported by DGAPA PAPIIT UNAM (IN209615). MF-G, RO-A and SO-F were students of the PhD program 'Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas' UNAM, and supported by fellowships #344606, #339206 and #389761, respectively.

## Author contributions

GS conceived and designed the project. MF-G, RO-A and SO-F performed the experiments. GS, LCB and MFG interpreted the data. GS and MFG wrote the paper. LB provided reagents. RO, SOF and LB critically reviewed the manuscript.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Ivanov I, Zhou L, Huh J, Santori F, Manel N, Chong M, Umesaki Y, Brodie E, Honda K and Littman DR (2009) Role of microbiota and transcription factors in control of Th17 cell differentiation. *Cytokine* **48**, 18.
- Zheng Y and Rudensky AY (2007) Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* **8**, 457–462.
- Kitagawa Y and Sakaguchi S (2017) Molecular control of regulatory T cell development and function. *Curr Opin Immunol* **49**, 64–70.
- Shevach EM and Thornton AM (2014) tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* **259**, 88–102.
- Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D and Zheng SG (2013) Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol* **6**, 116–123.
- Thornton AM and Shevach EM (2010) Response to comment on "Expression of helios, an ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3 T regulatory cells". *J Immunol* **185**, 7130.
- Luo CT and Li MO (2013) Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol* **34**, 531–539.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F and Sakaguchi S (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* **162**, 5317–5326.
- Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H and Lafaille JJ (2008) Adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* **29**, 114–126.
- Tanoue T, Atarashi K and Honda K (2016) Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* **16**, 295–309.
- Haribhai D, Lin W, Edwards B, Ziegelbauer J, Salzman NH, Carlson MR, Li S-H, Simpson PM, Chatila TA and Williams CB (2009) A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol* **182**, 3461–3468.
- Chien C-H and Chiang B-L (2017) Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells. *J Biomed Sci* **24**, 86.
- Roncarolo M-G, Gregori S, Lucarelli B, Ciceri F and Bacchetta R (2011) Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Rev* **241**, 145–163.
- Han Y, Guo Q, Zhang M, Chen Z and Cao X (2008) CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-1. *J Immunol* **182**, 111–120.
- Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, Herbert DR, Bulfone A, Trentini F *et al.* (2013) Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* **19**, 739–746.
- Wu HY, Quintana FJ, da Cunha AP, Dake BT, Koeglsperger T, Starossom SC and Weiner HL (2011) In vivo induction of Tr1 cells via mucosal dendritic cells and AHR signaling. *PLoS One* **6**, e23618.
- Gandhi R, Farez MF, Wang Y, Kozoriz D, Quintana FJ and Weiner HL (2010) Cutting edge: human latency-associated peptide T cells: a novel regulatory T cell subset. *J Immunol* **184**, 4620–4624.
- Liu K and Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* **234**, 45–54.
- Idoyaga J, Fiorese C, Zbytniuk L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, Mucida D, Merad M and Steinman RM (2013) Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest* **123**, 844–854.

- 20 Schlitzer A, McGovern N and Ginhoux F (2015) Dendritic cells and monocyte-derived cells: two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* **41**, 9–22.
- 21 Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK and Steinbrink K (2017) Tolerance through education: how tolerogenic dendritic cells shape immunity. *Front Immunol* **8**, 1764.
- 22 Yamazaki S and Steinman RM (2009) Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Dermatol Sci* **54**, 69–75.
- 23 Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC and Steinman RM (2002) Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627–1638.
- 24 Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, Nussenzweig MC and Steinman RM (2008) CD8<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup> splenic dendritic cells are specialized to induce FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* **181**, 6923–6933.
- 25 Massagué J (2012) TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 616–630.
- 26 Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AMO, Donaldson CJ, Fischer WH and Vale WW (2004) Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* **225**, 29–36.
- 27 Aleman-Muench GR and Soldevila G (2012) When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity. *Immunol Cell Biol* **90**, 137–148.
- 28 Massague J (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783–2810.
- 29 Stenvers KL and Findlay JK (2010) Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrinol Metab* **21**, 174–180.
- 30 Walton KL, Makanji Y and Harrison CA (2012) New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Mol Cell Endocrinol* **359**, 2–12.
- 31 Licona-Limón P, Alemán-Muench G, Chimal-Monroy J, Macías-Silva M, García-Zepeda EA, Matzuk MM, Fortoul TI and Soldevila G (2009) Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* **381**, 229–235.
- 32 Carbajal-Franco E, de la Fuente-Granada M, Alemán-Muench GR, García-Zepeda EA and Soldevila G (2015) Inhibins tune the thymocyte selection process by regulating thymic stromal cell differentiation. *J Immunol Res* **2015**, 837859.
- 33 Olguín-Alor R, de la Fuente-Granada M, Bonifaz LC, Antonio-Herrera L, García-Zepeda EA and Soldevila G (2016) A key role for inhibins in dendritic cell maturation and function. *PLoS One* **11**, e0167813.
- 34 Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ and Bradley A (1992) Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* **360**, 313–319.
- 35 Asigbetse KE, Eigenmann PA and Frossard CP (2010) Intestinal lamina propria TcRγδ<sup>+</sup> lymphocytes selectively express IL-10 and IL-17. *J Invest Allergol Clin Immunol* **20**, 391–401.
- 36 Ortega-Francisco S, de la Fuente-Granada M, Alvarez Salazar EK, Bolaños-Castro LA, Fonseca-Camarillo G, Olguin-Alor R, Alemán-Muench GR, López-Casillas F, Raman C, García-Zepeda EA *et al.* (2017) TβRIII is induced by TCR signaling and downregulated in FoxP3 regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **494**, 82–87.
- 37 Curotto de Lafaille MA and Lafaille JJ (2009) Natural and adaptive FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**, 626–635.
- 38 Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J and Sparwasser T (2007) Selective depletion of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* **204**, 57–63.
- 39 Sabado RL, Balan S and Bhardwaj N (2017) Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res* **27**, 74–95.
- 40 Bain CC, Montgomery J, Scott CL, Kel JM, Girard-Madoux MJH, Martens L, Zangerle-Murray TFP, Ober-Blobbaum J, Lindenbergh-Kortleve D, Samsom JN *et al.* (2017) TGFβR signalling controls CD103CD11b dendritic cell development in the intestine. *Nat Commun* **8**, 620.
- 41 Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, Agace WW, Parker CM and Powrie F (2005) Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* **202**, 1051–1061.
- 42 Bakdash G, Vogelpoel LTC, van Capel TMM, Kapsenberg ML and de Jong EC (2015) Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal Immunol* **8**, 265–278.
- 43 Shiokawa A, Kotaki R, Takano T, Nakajima-Adachi H and Hachimura S (2017) Mesenteric lymph node CD11b CD103 PD-L1 dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology* **152**, 52–64.
- 44 Unger WWJ, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR and Roep BO (2009) Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol* **39**, 3147–3159.
- 45 Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH and Freeman GJ (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**, 111–122.

- 46 Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ and Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **26**, 677–704.
- 47 Chaudhri A, Xiao Y, Klee AN, Wang X, Zhu B and Freeman GJ (2018) PD-L1 binds to B7-1 only on the same cell surface. *Cancer Immunol Res* **6**, 921–929.
- 48 López-Casillas F, Wrana JL and Massagué J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF $\beta$  signaling receptor. *Cell* **73**, 1435–1444.
- 49 Wang K, Gu J, Ni X, Ding Z, Wang Q, Zhou H, Zheng S, Li B and Lu L (2016) CD25 signaling regulates the function and stability of peripheral FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells derived from the spleen and lymph nodes of mice. *Mol Immunol* **76**, 35–40.
- 50 Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S-I, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM and Steinman RM (2004) In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* **199**, 815–824.
- 51 Ring S, Maas M, Nettelbeck DM, Enk AH and Mahnke K (2013) Targeting of autoantigens to DEC205<sup>+</sup> dendritic cells in vivo suppresses experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Immunol* **191**, 2938–2947.
- 52 Vasaturo A, Di Blasio S, Peeters DGA, de Koning CCH, de Vries JM, Figdor CG and Hato SV (2013) Clinical implications of co-inhibitory molecule expression in the tumor microenvironment for DC vaccination: a game of stop and go. *Front Immunol* **4**, 417.
- 53 Zhang Q and Vignali DAA (2016) Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in autoimmunity. *Immunity* **44**, 1034–1051.

## Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Fig. S1.** *Ex vivo* analysis of DC subpopulations in MLN. Gating strategy to define DC subsets in MLN. Within the cells suspensions, CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup> single live cells were selected for further analysis. The CD11c<sup>hi</sup>MHC-II<sup>Int</sup> population represents lymphoid rDCs and can be further divided into CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DCs. CD11c<sup>Int</sup>MHC-II<sup>hi</sup> population represents mDCs, which can be further divided into CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> and CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup>.

**Fig. S2.** Inhibin A is produced by wild-type DCs upon LPS stimulation but not by inhibin-deficient (Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>) DCs. Time course of inhibin A from supernatants of wild-type (Inh $\alpha$ <sup>+/+</sup>) or Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup> BMDC cultures were quantified by ELISA. Detection limit of the ELISA kit is represented by a blue line.