



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis del efecto autocrino de las inhibinas en la
diferenciación de células Th1 y Th17**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ALEXANDRA MORALES CRUZ



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos

1. Datos del alumno

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Teléfono

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera

Número de cuenta

1. Datos del alumno

Morales

Cruz

Alexandra

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

313318225

2. Datos del tutor

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

2. Datos del tutor

Dra

María Gloria

Soldevila

Melgarejo

3. Datos del sinodal 1

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

D en C

Sandra Amyris

Ortega

Francisco

4. Datos del sinodal 2

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

D en C

Roxana

Olguín

Alor

5. Datos del sinodal 3

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

D en C

Marina

Macías

Silva

6. Datos del sinodal 4

Grado

Nombre(s)

Apellido paterno

Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

D en C

Fernando

López

Casillas

7. Datos del trabajo escrito.

Título

Número de páginas

Año

7. Datos del trabajo escrito

Análisis del efecto autocrino de las inhibinas en la diferenciación de células Th1 y Th17

95 p

2020

La investigación realizada en esta tesis, se llevó a cabo en el laboratorio A019 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los experimentos realizados con ratones están incluidos en el protocolo número 176, autorizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas. El proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) **#IN213319**.

Dedicatoria

Esta tesis la dedico de manera especial a mis padres y hermanos, por el gran apoyo, motivación y amor que siempre me han dado.

Y a Adhemar Liquitaya, por compartir conmigo su amor por la inmunología, por motivarme a quedarme y buscar mis sueños y sobretodo, enseñarme que en la ciencia la mejor forma de agradecer es compartir el conocimiento.

Agradecimientos

Agradezco ampliamente a la Dra. Gloria Soldevila, por dejarse perseguir (diría ella) y abrir el taller de biología para permitirme estar en mi primer laboratorio de investigación. Sin duda, eso fue importante para que yo pudiera llegar hasta aquí. Le agradezco por su apoyo incondicional, tanto académico como personal, por siempre brindarme su ayuda y confianza, además de compartir conmigo su pasión por la investigación y la inmuno. ¡Muchas Gracias!

Sin duda, otra persona que fue elemento clave en el desarrollo de este trabajo es la Dra. Sandra Ortega, a quien le agradezco profundamente por todo el tiempo y conocimiento que me brindó. San, gracias por asesorarme en cada parte de esta tesis, por tus consejos y siempre estar dispuesta a transmitirme tus conocimientos; por tu apoyo como compañera y amiga (*Pika Pika*). ¡Gracias infinitas por todo!

También quiero agradecer a la Dra. Roxana Olgún, por brindarme su conocimiento y ayuda cuando fue necesario en los sorting, y por ser parte de mis sinodales.

Agradezco a la Dra. Marina Macías y al Dr. Fernando Casillas por aceptar ser parte de mi jurado y tomarse el tiempo de revisar mi trabajo.

Gracias al grupo de inhibinas, a los que me recibieron cuando llegue: Luis, Gaby y Liz, de todos pude aprender un poco aunque estuviéramos juntos solo 2 semanas. Y a los nuevos, Selina, gracias por tu apoyo, palabras de motivación, por escucharme y apoyarme en mis decisiones, te quiero; Adrián, gracias por siempre buscar la forma de que el equipo se interesara por aprender nuevas cosas y por transmitirme tus conocimientos en técnicas. Marisol, te quedas en un equipo de mucho trabajo pero del que podrás aprender mucho y aprovechar.

Gracias a mis compañeros de laboratorio (Soldelab), porque de todos pude aprender. Gracias al Team humanos: Ari, gracias por tus consejos, por escucharme y brindarme tu orientación y apoyo; Saúl, gracias por tus tips, tu compañerismo, siempre tener una actitud positiva y hacer más ameno el trabajo. Gracias al Team Exosomas: Flor, Aleida, Nara, Cynthia, Jacobo y Beto, por su apoyo y darme sus consejos y experiencias. Al Team Cd5: Dinora, Miguel, Samuel y Frida. Así mismo, agradezco el trabajo del M. en C. Oscar Hernández, Marco y Alicia.

Agradezco a los miembros del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, por brindar la infraestructura y capacitación para el uso de los equipos. Especialmente agradezco a la M. en C. Anahí Fuentes por su tiempo y asesoría en los sorting. ¡Gracias Anahí!

Gracias a mis mejores amigos: Kat, por estar conmigo a lo largo de la carrera, en las buenas y malas experiencias, por escucharme y apoyarme incondicionalmente, por nuestras locuras y

siempre apoyar y respetar mis decisiones, gracias por motivarme a siempre seguir a pesar de lo malo, te quiero montones; Jessi, gracias por tu apoyo, amistad, motivación y creer en mí; Allis, gracias por estar a mi lado en cada etapa de mi vida, celebrar mis éxitos y ayudarme en mis malos momentos; chinita, gracias por estar a mi lado y compartir conmigo la experiencia de vivir juntas, por escucharme y siempre decirme cuando voy por el camino equivocado: Fernando, te adoro! Gracias por creer en mí y apoyarme, por tus palabras de motivación y tu sentido del humor. Gracias a mis amigos de la carrera y compañeros de la sección, Ari, Ra, Ro, Marisol, Juan, Itzel, Ed, Nat, Samu, compartir clases, prácticas de campo y mucho más con ustedes, ha sido de lo mejor.

Y principalmente, gracias a Dios y a mi familia por estar a mi lado, por su tiempo, paciencia, apoyo y respeto con cada una de mis decisiones. Gracias a mis padres por su amor y motivación, por preocuparse y siempre querer lo mejor para mí. Gracias a mis hermanos por su ayuda a lo largo de mi vida, por creer en mí, enseñarme y motivarme a seguir mis sueños y luchar por mis metas. Los amo.

CONTENIDO

I. ABREVIATURAS	10
II. RESUMEN	13
III. INTRODUCCIÓN	15
III.I Respuesta inmune	15
III.I.I Respuesta inmune innata	15
III.I.II Respuesta inmune adaptativa	17
III.II Linfocitos T	19
III.II.I Desarrollo tímico	19
III.II.II Procesamiento y presentación de antígenos	22
III.II.III Activación del linfocito T; señalización a través del TCR	23
III.III. Diferenciación funcional de linfocitos T	26
III.III.I Señalización mediada por citocinas	27
III.III.II Factores de transcripción	28
III.III.III Funciones efectoras de los linfocitos T.	29
III.III.IV Adaptación inmunológica y plasticidad.	30
III.IV. Superfamilia del TGF-β	32
III.IV.I Activinas e Inhibinas	40
<i>a) Ligandos y receptores</i>	40
<i>b) Señalización</i>	43
<i>c) Funciones</i>	45
IV. ANTECEDENTES	46
IV.I Antecedentes directos	51
V. JUSTIFICACIÓN	54
VI. HIPÓTESIS	54

VII. OBJETIVO GENERAL	54
VII.I Objetivos particulares	54
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	55
VIII.I Ratones	55
VIII.II Ensayos de activación	55
VIII.III ELISA	56
VIII.IV Ensayos de diferenciación Th1 y Th17 <i>in vitro</i>	57
VIII.V Citometría de flujo	58
VIII.VI Análisis estadístico	60
IX. RESULTADOS	61
IX.I Genotipificación de ratones deficientes en inhibina	61
IX.II Activación de linfocitos T	62
IX.III Producción de inhibina y activina	66
IX.IV Diferenciación de células Th1	68
IX.IV.I Las inhibinas regulan negativamente la diferenciación de células Th1.	68
IX.V Diferenciación de células Th17	73
IX.V.I Las inhibinas disminuyen la diferenciación de células Th17	73
X. DISCUSIÓN	77
XI. CONCLUSIONES	85
XI.I CONCLUSIÓN FINAL	85
XII. PERSPECTIVAS	87
XIII. REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RESPUESTA INMUNE INNATA Y RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	17
FIGURA 2. ESTADIOS Y PROCESOS DE SELECCIÓN DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS LINFOCITOS T	20
FIGURA 3. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR TCR.....	25
FIGURA 4. LINAJES EFECTORES Y REGULADORES DE LINFOCITOS T.	27
FIGURA 5. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T.....	29
FIGURA 6. PLASTICIDAD DE LOS LINFOCITOS T CD4 ⁺	32
FIGURA 7. VÍA DE SEÑALIZACIÓN CANÓNICA DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-B.	35
FIGURA 8. SEÑALIZACIÓN NO CANÓNICA DEL TGF-B.	38
FIGURA 9, ESTRUCTURA DE INHIBINA.....	40
FIGURA 10. SÍNTESIS DE INHIBINA Y ACTIVINA.	42
FIGURA 11. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INHIBINA.....	44
FIGURA 12. PAPEL DE LAS INHIBINAS Y ACTIVINAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T.	48
FIGURA 13. PAPEL DE LAS ACTIVINAS EN LA RESPUESTA Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T. .	51
FIGURA 14. GENOTIPO DE RATONES SILVESTRES Y KNOCK-OUT.....	62
FIGURA 15. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS PARA CD25 Y CD44.....	63
FIGURA 16. . EXPRESIÓN DE CD25 Y CD44 EN LINFOCITOS T CD4 ⁺ ACTIVADOS DE RATONES SILVESTRES (INHA ^{+/+}).....	66
FIGURA 17. . PRODUCCIÓN DE INHIBINA.....	67
FIGURA 18. PRODUCCIÓN DE ACTIVINA A.	68
FIGURA 19. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS PARA DETERMINAR LA POBLACIÓN TH1.	70
FIGURA 20. DIFERENCIACIÓN HACIA LINFOCITOS TH1 EN PRESENCIA DE INHIBINA RECOMBINANTE EXÓGENA.....	72
FIGURA 21. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS PARA LA EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN HACIA TH17.	74
FIGURA 22. DIFERENCIACIÓN HACIA LINFOCITOS TH17.....	76
FIGURA 23, RESUMEN DE RESULTADOS.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPONENTES DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-B.....	34
TABLA 2. CITOCINAS Y CONDICIONES UTILIZADAS PARA LA DIFERENCIACIÓN HACIA CÉLULAS T EFECTORAS.....	58
TABLA 3. ANTICUERPOS MONOCLONALES.	59

I. ABREVIATURAS

ACK:	Ammonium-Chloride-Potassium.
ACTRII:	Activin Type II Receptor.
AhR:	Aryl hydrocarbon receptor.
ALK:	Acivin receptor-Like Kinase.
AMH:	Anti-Müllerian hormone.
APC:	Antigen Presenting Cells.
BATF:	B cell-activating transcription factor
BCR:	B Cell Receptor.
Bcl6:	B-Cell Lymphoma 6.
Blimp1:	B lymphocyte-induced maturation protein-1.
BMP:	Bone Morphogenetic Proteins.
BMPR:	Bone Morphogenetic Protein Receptor.
CDK:	Cyclin-dependent kinases.
CIITA:	Class II transactivator.
cTEC:	Cortical Thymic Epithelial Cells.
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4.
DAMPs:	Damage-associated molecular pattern.
DCs:	Dendritic Cells.
DN:	Double Negatives.
DP:	Double Positive.
ECM:	Extracellular matrix remodelling.
EGF-CFC:	Epidermal growth factor-CFC.
EGR2:	Early Growth Response 2.
ELF:	Embryonic liver fodrine.
EMT:	Epithelial–mesenchymal transition.
EOMES:	Eomesodermin.
ERK:	Extracellular signal–regulated kinases.
FOXO:	Forkhead box O.
FOXP3:	Forkhead box P3.
FSH:	Follicle-Stimulating Hormone.
FTOC:	Fetal thymus organ culture.
GATA3:	GATA-binding protein 3
GDFs:	Growth Differentiation Factor.
GDNF:	Glial cell-derived neurotrophic factor.
GFI1:	Growth-factor independent 1
GnRH:	Gonadotropin-releasing hormone.
GRB2:	Growth factor Receptor-Bound protein 2.

HIF1α:	Hypoxia-inducible factor 1 α .
HSC:	Hematopoietic stem cells.
ICOS:	Inducible T cell co-stimulator.
IFN-γ:	Interferon Gamma.
ILC:	Innate Lymphocyte Cells.
IMID:	Immune-mediated inflammatory disease.
IRF4:	Interferon Regulatory Factor 4.
ITAM:	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif.
ITK:	Tyrosine-protein <i>kinase</i> .
LAP:	Latency-associated peptide.
LAT:	Linker for Activation of T cells.
LCK:	Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase.
LH:	Luteinizing Hormone.
LFA-1:	Lymphocyte function-associated antigen 1.
LLC:	<i>Large Latent Complex</i> .
LPS:	Lipopolysaccharide.
LTBP:	Latent TGF β binding protein.
MAF:	Macrophage-activating factor.
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> .
MFI:	Mean Fluorescenc Intensity.
MHC:	Molecule Histocompatibility Complex.
MPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase.
mTECs:	Medular Thymic Epithelial Cells.
mTOR:	Mammalian Target of Rapamycin.
NFAT:	Nuclear Factor of Activated T cells.
NF-κB:	Nuclear Factor Kappa B.
NKs:	Natural Killer.
NR4A	Nuclear receptor 4A.
PAMPs:	Pathogen-Associated Molecular Patterns.
PD1:	Programmed cell death 1.
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase.
PIP2:	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate.
PKA:	Protein Kinase A.
PKC:	<i>Protein kinase C</i> .
PLCγ1:	Phospholipase C gamma 1.
PRRs:	Pattern-Recognition Receptors.
RAR:	Retinoic acid receptor.
RasGRP:	RAS guanyl-releasing protein.
RORγt:	RAR-related orphan receptor gamma.
Runx:	Runt-related transcription factor.

SARA:	Smad anchor <i>for</i> receptor activation.
SFB:	Fetal bovine serum.
SH2:	Src Homology 2.
SHM:	Somatic hypermutation.
SMURF:	Smad ubiquitin regulatory factors.
SP:	Simple Positives.
STAT:	Signal transducer and activator of transcription.
SYK:	Tyrosine-protein kinase <i>SYK</i> .
TAP:	Transporter associated with antigen processing.
TCR:	T cell receptor.
TGF-β:	Transforming Growth Factor β .
Th:	T helper.
Thf:	T Follicular Helper Cells.
Tr1:	Type 1 Regulatory T cell.
TRAF:	Receptor-Associated Factor.
Tregs:	T Regulatory cells.
TRM:	<i>Tissue</i> -resident memory T cells.
Tsg:	Twisted Gastrulation.
TSLP:	Thymic Stromal Lymphopoietin.
TβRIII:	Type III TGF- β coreceptor.
ZAP70:	Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70.

II. RESUMEN

Las inhibinas son ligandos de la superfamilia del TGF- β , descritas inicialmente como hormonas por su función antagonista sobre las activinas. Sin embargo, recientemente nuestro grupo ha estudiado su participación en el sistema inmunológico, reportando por primera vez su expresión en timo y su participación en la maduración de los timocitos y las células dendríticas. Datos preliminares de nuestro laboratorio muestran, que la deficiencia de inhibina, causa alteraciones en los linfocitos T maduros de periferia; particularmente, se ha observado una menor activación y diferencias en la polarización hacia células efectoras *in vitro*. Sin embargo, se desconoce si este efecto podría ser causado por la falta de producción de inhibina en los linfocitos T, que podría actuar de manera autocrina regulando su activación y diferenciación funcional. En el presente trabajo se evaluó el efecto autocrino de las inhibinas durante la diferenciación hacia Th1 y Th17 en ratones silvestres ($Inh\alpha^{+/+}$) y en deficientes de inhibina ($Inh\alpha^{-/-}$). Primero, se determinó la producción de inhibina y activina a través de ELISA, y mediante citometría de flujo se aislaron linfocitos T “naive” para inducir la diferenciación hacia Th1 y Th17 *in vitro*, utilizando condiciones polarizantes en presencia o ausencia de inhibina recombinante (rInh α) exógena, para reconstituir la producción en el caso de las células deficientes. Por primera vez, se demostró que los linfocitos T de ratones $Inh\alpha^{+/+}$ tiene un pico de producción de inhibina a las 24 h después de la activación, previo al de activina. Los resultados obtenidos muestran que los linfocitos T $Inh\alpha^{+/+}$ bajo una activación policlonal tienen un pico de producción de activina a las 96 h, mientras que los linfocitos T $Inh\alpha^{-/-}$ se presenta a las 48 h.

En lo referente a la diferenciación, en linfocitos $Inh\alpha^{-/-}$ se observó una disminución significativa hacia el linaje Th1 y un incremento hacia el linaje Th17, en comparación con las células $Inh\alpha^{+/+}$; sin embargo, al agregar rInh α , las células T $Inh\alpha^{-/-}$ cultivadas en condiciones Th1 incrementan la producción de IFN- γ en comparación con aquellas que no se cultivaron en presencia de rInh α , alcanzando casi los niveles de producción de células T $Inh\alpha^{+/+}$. De manera opuesta, las células T $Inh\alpha^{-/-}$ cultivadas en condiciones Th17, disminuyeron la producción de IL-17 en comparación con las

células T en ausencia de rInh α , alcanzando niveles similares al de células T Inh α ^{+/+}. Nuestros datos sugieren que las inhibinas modulan de manera autocrina la diferenciación de los linfocitos Th efectores favoreciendo un perfil Th1 *versus* Th17.

III. INTRODUCCIÓN

III.I Respuesta inmune

El sistema inmunológico es fundamental para la supervivencia, ya que protege al hospedero de microorganismos patógenos, como virus, bacterias y parásitos que pueden causar diversas enfermedades; además de mantener la homeostasis ante otro tipo de alteraciones o daño como el cáncer, entre otros [1]. De ahí que el término *inmune*, que inicialmente se asociaba a la protección de senadores romanos mientras desarrollaban su cargo, posteriormente se utilizó para referirse a las personas que después de haber padecido una enfermedad infecciosa (por ejemplo, viruela) quedaban libres de infección ante una segunda exposición con el agente patógeno [2]. Esta defensa es posible gracias a la organización de moléculas, células y tejidos que forman al sistema inmunológico [3] y actúan en conjunto para llevar a cabo diversos mecanismos de defensa que reconocen y protegen al hospedero [1]. Esta integración de funciones se conoce como la respuesta inmune [2]. Dicha respuesta puede verse en dos vertientes o líneas de defensa: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa; ambas en correcta conexión para efectuar una adecuada respuesta inmune, debido a que no son mecanismos mutuamente excluyentes, sino que se complementan, de manera que una falla en cualquiera resulta en vulnerabilidad del huésped o respuestas inapropiadas [4].

III.I.I Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa, pues está conformada por barreras físicas, mecánicas y químicas, como piel, mucosas, temperatura, pH, etc. Consiste en el reconocimiento de estructuras que conforman a ciertos patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), entre los que se encuentran lipopolisacáridos (LPS), flagelina o ácidos nucleicos. Así mismo, la respuesta inmune innata reconoce patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que pueden ser moléculas liberadas por las células del huésped, o por los patógenos.

El reconocimiento de PAMPs y DAMPs se da a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) [4]. Los PRRs se encuentran tanto fuera como

dentro de las células y les permiten continuamente censar el entorno en busca de algún agente patógeno o dañino. Este reconocimiento desencadena una señal para distintas células que fungen como mediadores, y limitan la propagación de la infección en una etapa temprana, y de ser necesario, dar tiempo para que se desarrolle la respuesta inmune adaptativa (**Figura 1**) [5]. Las células que participan en la respuesta innata son variadas en su origen y morfología, y desempeñan distintas funciones, por ejemplo, células importantes por la liberación de mediadores inflamatorios son basófilos, mastocitos y eosinófilos. Así mismo, están las células linfoides innatas (ILC), que son de gran interés por su participación como reguladores de la inmunidad, en inflamación y homeostasis a través de su rápida producción de citocinas efectoras, y por su similitud biológica y funcional con las células T CD8⁺ y T CD4⁺. Otro grupo celular son las células fagocíticas como neutrófilos, monocitos y macrófagos, que se encargan de engullir a microorganismos. El sistema del complemento es un mecanismo característico de la inmunidad innata, el cual a través de una cascada de proteínas, permite que ciertos patógenos sean susceptibles a la fagocitosis, también promueve la eliminación de células muertas o sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa; además, puede favorecer la activación de la respuesta inmune adaptativa mediante la movilización y activación de células presentadoras de antígenos (APC), incluyendo las células dendríticas y los macrófagos. Por otro lado, las citocinas, mediadores solubles leucocitarios, también son un mecanismo para controlar o eliminar una infección, al permitir el reclutamiento de las células innatas y adaptativas al sitio de daño y así activar las respuestas celulares locales a la lesión [3, 4, 6].

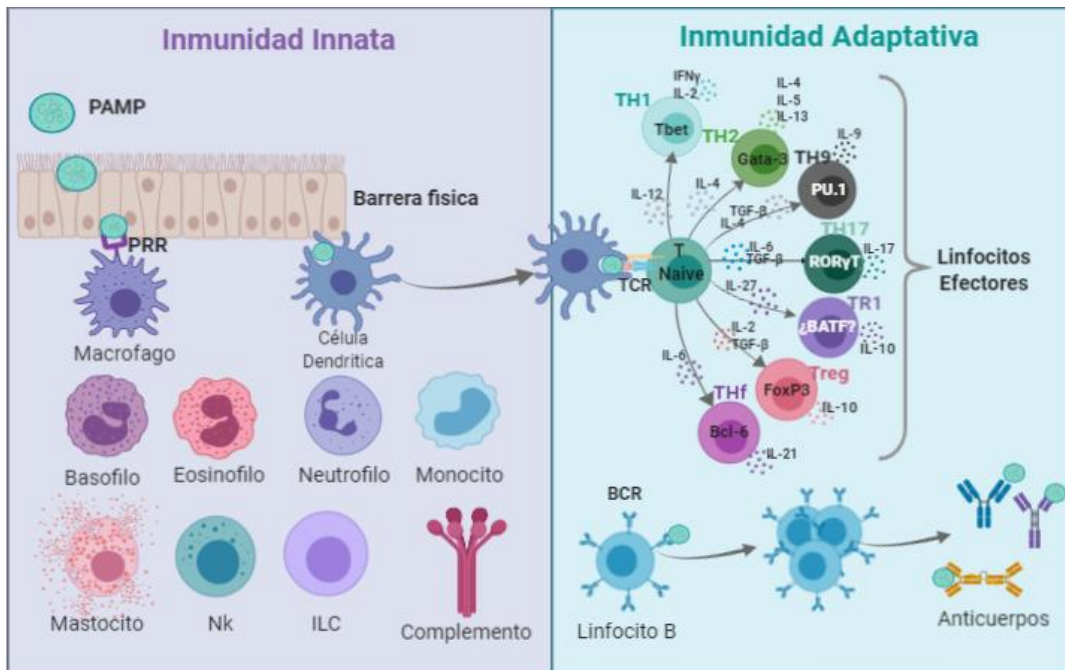


Figura 1. Respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan la defensa inicial, mediante sus componentes como epitelio, células fagocíticas, células dendríticas, mastocitos y otras células linfocíticas, proteínas del complemento y mediadores de la inflamación. Las respuestas de la inmunidad adaptativa tienen dos ramas: la inmunidad celular y la humoral. La primera está mediada por la activación de los linfocitos T por una APC, como las células dendríticas, que una vez en contacto con los antígenos migran a los ganglios linfáticos para presentar los antígenos al receptor de los linfocitos T “naive”, lo que lleva a la polarización de diferentes subconjuntos de células T y secreción de citoquinas. En cambio, los linfocitos B reconocen el antígeno sin requerimiento de procesamiento o presentación por parte de una APC y se diferencian a células plasmáticas que secretan distintos tipos de anticuerpos. PAMP, patrón molecular asociado a patógeno; PRR, receptor de reconocimiento de patrones; NK, célula natural killer; ILC, célula linfoide innata; TCR, receptor de célula T; BCR, receptor de célula B; T-bet, proteína T-box expresada en células T; GATA-3, proteína de unión a gata 3; ROR γ T, receptor huérfano gamma relacionado con RAR; BATF, factor de transcripción activador de células B; FoxP3, caja de horquilla P3; Bcl-6, proteína 6 del linfoma de células B; IFN- γ , interferón gamma; TGF- β , factor de crecimiento transformante β .

III.I.II Respuesta inmune adaptativa

Las células del sistema inmune adaptativo son de dos tipos, linfocitos T y linfocitos B, ambas células se originan a partir de células madre hematopoyéticas (HSC). Órganos linfoides primarios, como la médula ósea y el timo, proporcionan los

microambientes necesarios para su generación y desarrollo. Particularmente ambas se desarrollan en el hígado fetal y en la médula ósea, las células B salen de médula ósea como células maduras, pero; las células T deben viajar al timo para completar su desarrollo. Las respuestas adaptativas se generan en los órganos linfoides secundarios, como ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosa, los cuales permiten organizar espacialmente las células inmunes permitiendo la interacción entre las APC y los linfocitos T, de manera que estos últimos se activan y proliferan después de reconocer péptidos antigénicos presentados por las APC (**Figura 1**). Los receptores de los linfocitos T se denominan TCR, por su parte los receptores de los linfocitos B se denominan BCR, ambos son heterodímeros. Los genes de los receptores no están codificados en línea germinal, por lo que se forman en los linfocitos en desarrollo mediante un proceso de recombinación V(D)J, es por esto que es una respuesta tardía, porque los receptores pasan por procesos de rearreglo génico dando lugar a una gran diversidad de receptores, los cuales deberán pasar por procesos de selección positiva y negativa. Después del reconocimiento del antígeno, se da una expansión clonal y, en el caso de los linfocitos B se da hipermutación somática y una maduración de la afinidad en el centro germinal, para aumentar la especificidad en el reconocimiento hacia los antígenos. La unión del antígeno al receptor de linfocito induce diversas funciones, en los linfocitos B es la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas), mientras que los linfocitos T CD4⁺ cooperadores (*Th* por sus siglas en inglés) pueden diferenciarse en algún subtipo efector y secretar citocinas para resolver el daño o la infección, y finalmente regresar a la homeostasis. Otra propiedad del sistema adaptativo es el desarrollo de una memoria inmunológica, de manera que las células efectoras alcanzan un estado funcional que les permite generar respuestas más rápidas y eficaces durante encuentros secundarios con el mismo antígeno [2-4, 7-9].

III.II Linfocitos T

III.II.I Desarrollo tímico

El timo es un órgano bilobulado esencial para la generación de un repertorio de células T. Consta de dos compartimentos principales: la corteza y la médula [10-14].

Las células que representan el epitelio del timo son corticales (cTEC) y medulares (mTEC); además de éstas, se incluyen fibroblastos, células de tejido conectivo formadoras de cápsulas y septos [10, 13]. Otros componentes celulares importantes son los macrófagos, células dendríticas (DC), convencionales y plasmacitoides, y las células B [15].

El desarrollo de los linfocitos T consta de varios procesos, el primero es la entrada al timo de células progenitoras, éstas entran por el área cercana a la unión cortico-medular, y se reubican hacia la región subcapsular de la corteza tímica, mediante receptores de quimiocinas (**Figura 2**) [16]. Los timocitos más inmaduros se denominan dobles negativos (DN) debido a que no expresan TCR (sólo contienen los genes para la configuración), tampoco expresan CD3, ni los correceptores CD4 y CD8. Los timocitos comienzan su maduración a través de la vía de desarrollo que comúnmente se identifica por la expresión superficial de CD44 y CD25, de manera que pueden subdividirse en cuatro etapas secuenciales de diferenciación: DN1 (o ETP, Early Thymic Progenitor), CD44⁺CD25⁻; DN2, CD44⁺CD25⁺; DN3, CD44⁻CD25⁺; y DN4, CD44⁻CD25⁻ [17]. En el estadio DN3 se rearregla el gen de la cadena β ; si es adecuado, las células comienzan a ensamblar en la superficie celular la cadena β , asociada a una proteína pre-TCR α (pT α) junto al complejo CD3, para formar el pre-TCR. La expresión exitosa del pre-TCR en la superficie celular inicia las señales para la recombinación en el locus de la cadena α del TCR y el desarrollo de timocitos dobles positivos (DP) que expresan receptores de antígeno TCR $\alpha\beta$ [16, 17].

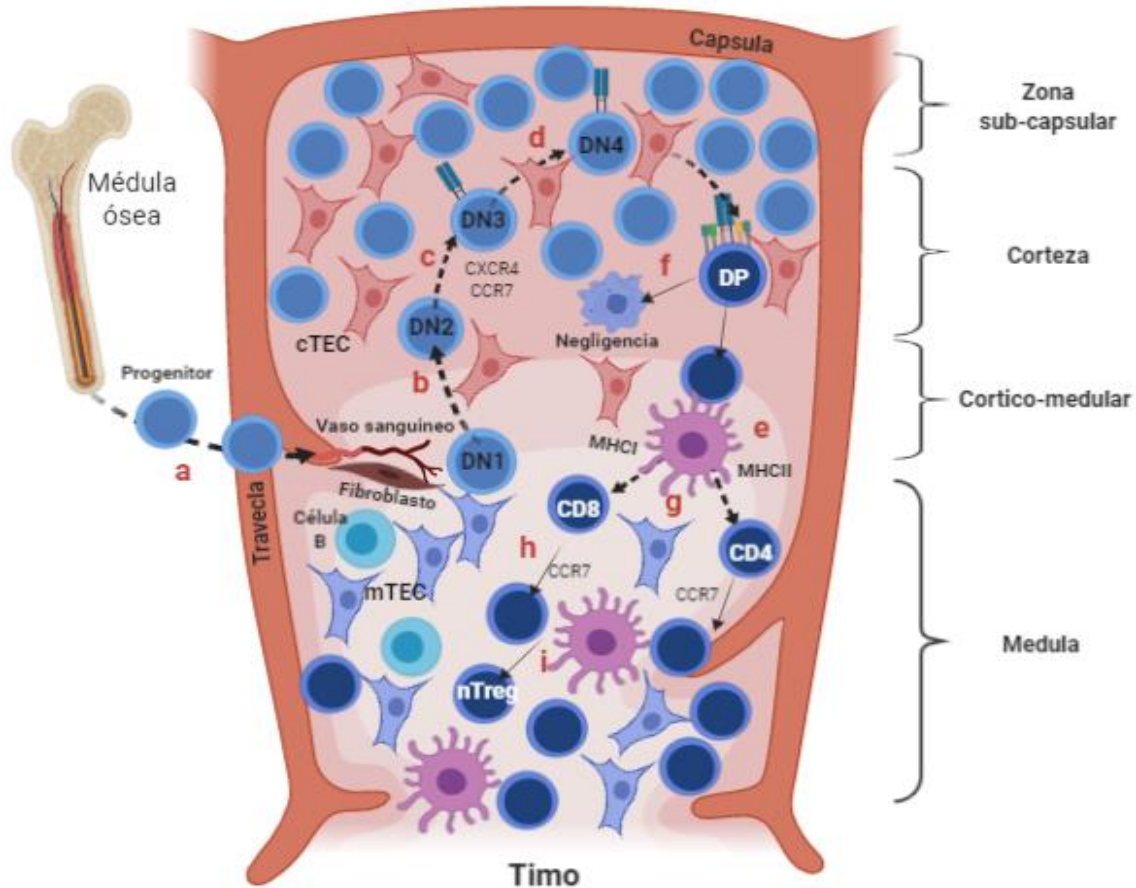


Figura 2. Estadios y procesos de selección durante la maduración de los linfocitos T. **a)** Células progenitoras linfoides ingresan al timo a través de los vasos sanguíneos cerca de la unión cortico-medular. **b)** Migran hacia el parénquima tímico, a través de las vasculaturas que se enriquecen alrededor de la unión cortico-medular. **c)** La migración de los timocitos DN hacia la zona subcapsular está regulada por las señales de quimiocinas (CXCR4, CCR7, CCR9). **d)** A medida que las células progresan a través de las etapas DN2 a DN4, expresan el pre-TCR, que está compuesto por la cadena pre-T α invariante (no reordenada) y una cadena β TCR reordenada. **e)** Los timocitos DP se dirigen a través de la corteza externa, interactuando con las cTEC que expresan una alta densidad de moléculas de MHC I y II asociadas con péptidos propios para la selección positiva y negativa. **f)** Muy poca señalización induce la muerte por negligencia. **g)** El nivel apropiado (bajo/intermedio) de señalización del TCR inicia la selección positiva. **h)** Los timocitos DP seleccionados positivamente obtienen la capacidad de sobrevivir y diferenciarse en timocitos SP, muestran un aumento en la expresión superficial de CCR7, a través del cual se reubican en la médula. **i)** En la médula interactúan con células dendríticas y mTEC, para la eliminación de células T autorreactivas y la generación de células T reguladoras. cTEC, células epiteliales tímicas corticales; mTEC, células epiteliales tímicas medulares; DP,

dobles positivos; DN, dobles negativos; MHC, complejo principal de histocompatibilidad. Modificado de Klein, L., *et al.*, (2014) y Takahama, Y., (2006) [15, 16].

Posteriormente, se convierten en timocitos dobles positivos (DP, CD4⁺ CD8⁺), que pasan por un proceso de selección positiva y negativa en la corteza externa del timo. Los timocitos se seleccionan positivamente si expresan un TCR $\alpha\beta$ capaz de unirse con baja avidéz a los complejos péptido-MHC (complejo principal de histocompatibilidad) propios de las cTECs [3]. Sin embargo, más del 90% de los timocitos expresan un TCR $\alpha\beta$ y no son capaces de reconocer un péptido propio en moléculas de MHC propias y mueren por “negligencia” [15, 16]. Los timocitos seleccionados positivamente se dirigen hacia la médula guiados por quimiocinas y se convierten en simples positivos (SP), de manera que los timocitos con TCR que reconoce MHC I se convierten en CD8⁺CD4⁻ y los que reconocen MHC II se convierten en CD4⁺CD8⁻ (**Figura 2**). La diferenciación de los timocitos de DP a SP es posible a través del silenciamiento de la transcripción del locus de uno de los co-receptores, el silenciamiento junto con otros eventos genéticos determinan que la célula T sea cooperadora o citotóxica [17]. Una vez que los timocitos entran en la médula tímica serán sujetos a un proceso de selección negativa, al interactuar con células dendríticas o mTECs que permitirá la eliminación de la mayoría de timocitos con TCR autorreactivos [16].

El proceso de selección negativa en la médula es un mecanismo de tolerancia, que asegura la eliminación de los timocitos autorreactivos que han escapado a la selección en la corteza; las mTEC expresan antígenos específicos de los tejidos, cuya expresión depende del regulador autoinmunitario AIRE, que facilita la expresión ectópica de genes que sólo se expresan en órganos periféricos o antígenos restringidos a tejidos. Por otro lado, los timocitos que expresan TCRs con gran avidéz por su ligando no siempre mueren por apoptosis, también pueden diferenciarse a una población de linfocitos T reguladores CD4⁺. Por tanto, el reconocimiento de péptidos propios puede sesgar las células hacia destinos alternativos; posiblemente, señales débiles favorecen selección positiva, señales

fuertes una selección negativa y señales intermedias la diferenciación a Treg [15, 16].

III.II.II Procesamiento y presentación de antígenos

Un linfocito T virgen o *naïve* es aquel linfocito que no se ha encontrado con su antígeno para ser activado y diferenciarse a otros subtipos de células efectoras. Los linfocitos T necesitan a una célula presentadora de antígeno (APC) que le presente el antígeno a su TCR; linfocitos T con TCR $\alpha\beta$ reconocen péptidos cortos lineales, derivados de la degradación intracelular por parte de la APC; a diferencia de los linfocitos B, los cuales pueden reconocer el antígeno en su estado nativo y sin la intervención de una APC [3, 18].

Son células presentadoras de antígeno macrófagos, células B, células dendríticas (DC), células epiteliales tímicas y otras células nucleadas, expresan en su superficie un grupo de proteínas denominado complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las moléculas del MHC se dividen en dos clases: las de clase I, se expresan en todas las células nucleadas y presentan principalmente péptidos endógenos, pero también participan en la presentación cruzada; las de clase II a diferencia de la clase I, sólo se expresan en macrófagos, células dendríticas y células B, y células tímicas epiteliales y presentan péptidos exógenos [3, 4].

El órgano linfoide en el que comienza la respuesta de las células T, se determina por la migración al área de células T de órganos linfoides secundarios y la visualización del complejo pMHC [19]. Las células T tienen mayor probabilidad de encontrar a una APC con un complejo pMHC afín a su receptor, mediante su circulación en todo el cuerpo [4]. Los linfocitos T expresan constitutivamente moléculas de adhesión como la L-selectina, que se une a otras moléculas de adhesión en las vénulas endoteliales altas, lo que induce la expresión en los linfocitos del antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1), permitiendo la adhesión de las células para su migración hacia el tejido linfoide a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo, cruzando a través de vénulas endoteliales altas [18]. A su vez, la activación de las células dendríticas permite que migren hacia los

ganglios linfáticos y expresen moléculas coestimuladoras en su superficie, como CD80 y CD86 cuyo ligando es CD28, CD154 que se une a CD40 y CD58 que se une a CD2; para regular la magnitud de la respuesta del linfocito T. Además de señales coestimuladoras, son necesarios mediadores solubles como las citocinas IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), estas moléculas junto con las señales del TCR contribuyen a la activación de los linfocitos T [3, 18]. Las células T CD4 se une a una parte invariante de la molécula MHC de clase II, el reconocimiento del péptido-MHC estimula su activación y diferenciación en subconjuntos de células T cooperadoras y de memoria, a diferencia de las células T CD8 que al reconocer complejos péptido-MHC de clase I se diferencia en células T citotóxicas [3, 20].

III.II.III Activación del linfocito T; señalización a través del TCR

El TCR se encuentra asociado con un complejo de moléculas CD3 (CD3 γ , CD3 δ , dos moléculas CD3 ϵ y cadena ζ), el cual da las señales necesarias para la activación de células T (**Figura 3**). La señalización comienza una vez que el TCR se une al complejo pMHC, causando la activación de la tirosina cinasa Lck, la cual se recluta en el complejo TCR-CD3 / ζ mediante la co-localización de CD4 o CD8 a moléculas de pMHC, esto es porque CD4 y CD8 se unen a través de sus dominios extracelulares a regiones no polimórficas de las moléculas MHC II y I, respectivamente, y a Lck a través de sus colas citoplasmáticas. Las moléculas CD3 y ζ tienen en sus dominios citoplasmáticos, motivos ITAM (por sus siglas en inglés "*Immunoreceptor tyrosine based activation motif*"), que al ser fosforilados por Lck crean una estructura de unión para los dominios SH2 de la familia de la cinasa SYK, ZAP70 (**Figura 3**). ZAP70 se encuentra en el citoplasma de forma inactiva, posteriormente se recluta a la cadena ζ del TCR y se rompe la conformación autoinhibida, una vez activado, fosforila a LAT, que es una proteína adaptadora con cuatro sitios de fosforilación Y132, Y171, Y191 y Y226, y además, sirve como conector para la activación de las células T.

La proteína LAT fosforilada se une a PLC γ 1 y coordina el reclutamiento de otras proteínas adaptadoras como SLP-76, GADS y Grb-2. El sitio Y132 de LAT recluta a

PLC γ 1 para activar la vía de calcio y Ras-MAPK; dicho proceso ocurre junto con el TCR y CD28, que inician activando a PI3K para fosforilar a PIP2 y así producir PIP3, PIP3 recluta y se une a la cinasa ITK a través de su dominio PH, el dominio SH3 localiza a ITK en la membrana plasmática causando su activación. Una vez activada, fosforila a PLC γ 1, que es responsable de hidrolizar a PIP2 para generar inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 se difunde en el citoplasma y se une a su receptor (IP3R) en el retículo endoplásmico (ER), provocando la liberación de Ca $^{2+}$ desde el ER; el incremento de calcio citoplasmático activa a los canales de la membrana plasmática dependientes de Ca $^{++}$ (CRAC) provocando la entrada de calcio extracelular, lo que conduce a un aumento en la concentración de Ca $^{2+}$ citosólico, promoviendo la translocación nuclear del factor de transcripción NFAT y la activación de una o más vías de MAPK. NFAT es un factor de transcripción necesario para la expresión de genes que codifican IL-2, IL-4, TNF, entre otras citocinas; después de su translocación al núcleo, las isoformas de NFAT pueden formar complejos o unirse a regiones reguladoras de los genes IL-2, IL-4, asociados a otros factores como AP-1, y así integrar las vías de señalización, y resultados funcionales, dependiendo de la señal TCR. Los sitios de fosforilación Y171, Y191 y Y226 de LAT permiten el reclutamiento de SOS a través de su unión con el adaptador Grb2 y, por tanto, la activación de la vía Ras. Ras media la activación de Raf, lo que lleva a la activación de MEK y, de MAP cinasas como ERK, que responden a diversas señales para iniciar la activación transcripcional de secuencias de genes, que culminan en la activación de las células T. Las proteínas cinasas activadas por MAP, a su vez, activan factores de transcripción como Jun y Fos componentes de AP-1. AP-1 es un factor de transcripción, que se activa por las señales inducidas del TCR, causando la síntesis de Fos y fosforilación de Jun. También se asocia con NFAT (NFAT / AP-1), dicha asociación integra las señales de Ca $^{2+}$ y Ras, generando la expresión de genes importantes para la activación de las células T, como IL-2. Por el contrario, la actividad de NFAT en ausencia de AP-1, induce un patrón de expresión génica que produce anergia de células T y una falta de producción de IL-2. Por su parte, DAG permanece en la membrana plasmática para activar a PKC y RasGRP; PKC puede contribuir a la activación de

NF- κ B. NF- κ B en las células en reposo está asociado con el inhibidor I κ B, para evitar su translocación al núcleo. Tras la activación de PKC, I κ B es fosforilada por el complejo I κ B cinasa (IKK), y la degradada, permitiendo que NF- κ B se transloque al núcleo, y así activar los genes involucrados en la función, supervivencia y homeostasis de las células T [17, 21, 22].

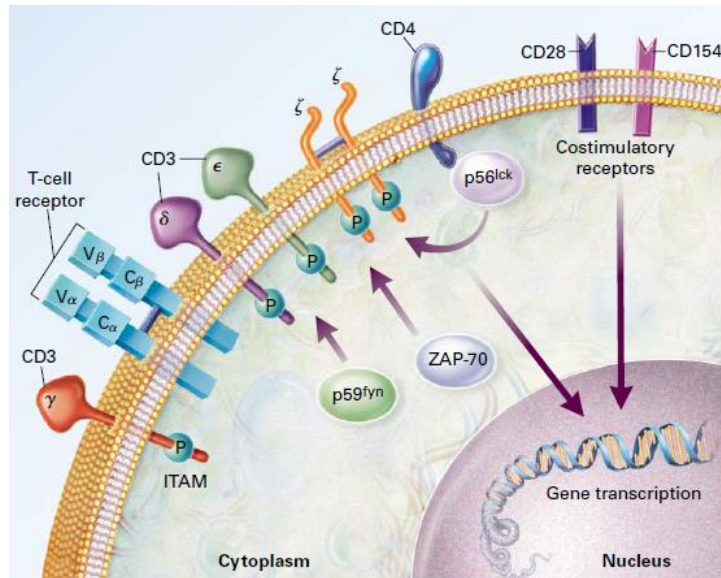


Figura 3. Señalización mediada por TCR. La activación de las células T implica un conjunto de eventos integrados que resultan del entrecruzamiento (cross-linking) y cambio conformacional del TCR. Los TCR tienen colas citoplasmáticas cortas, asociadas con moléculas CD3 y ζ , que llevan motivos ITAM, y están sujetas a fosforilación (P) por proteína cinasas como p56 Lck, p59 Fyn y ZAP-70. Las etapas iniciales de activación implican la unión de p56 Lck a la cola citoplasmática de CD4 o CD8, permitiendo la señalización río abajo, lo que implica diferentes vías bioquímicas y, en última instancia, la activación transcripcional de genes involucrados en la proliferación y diferenciación celular [18].

Las respuestas de los linfocitos T estimulados por el antígeno abarcan cambios en la expresión de moléculas de superficie, receptores de citocinas, proliferación y diferenciación en células cooperadoras y de memoria. Algunas moléculas de superficie y coestimuladoras inducidas después del reconocimiento del antígeno son integrinas como LFA-1 y VLA-4, que sirven como moléculas de adhesión. Así mismo, la activación de las células T puede verse limitada por la acción de los receptores inhibitorios, como el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4,

CD152) que se expresa de las 24 a 48 h después del reconocimiento, al reclutar SHP2 y SHP1 y bloquear la fosforilación de Akt, inhibe la activación de las células T [23]. Otro receptor es CD25, también conocido como IL-2R α , las células T expresan altos niveles de IL-2R, dicha expresión está regulada por la estimulación de TCR y también por contacto con IL-2, que es una citocina importante en la proliferación de los linfocitos T activados [24]. Los linfocitos T también aumentan la expresión de CD69, tras la activación de PKC. CD69 es considerado como un marcador temprano de activación, debido a su rápida aparición en superficie después de la estimulación. Regula algunas funciones, al reducir la expresión de S1PR1 determina la retención de los linfocitos en los ganglios el tiempo necesario para recibir señales de proliferación, así como la adquisición de fenotipos efectores o reguladores. También regula la diferenciación de Tregs, así como la secreción de IFN- γ e IL-17, citocinas principales de los subtipos Th1 y Th17, respectivamente. Para evitar una activación continua, las respuestas disminuyen después de la eliminación del antígeno por distintos mecanismos que permiten alcanzar un estado de homeostasis [25].

III.III. Diferenciación funcional de linfocitos T

El proceso de reconocimiento del complejo pMHC de una APC por parte del TCR de una célula T, estimula a las células T *naïve* a diferenciarse en células T CD4⁺ cooperadoras secretoras de citocinas (**Figura 4**); dicho proceso es mediado por factores de transcripción maestros y por señales de citocinas producidas por APCs, de manera que una APC puede inducir varios tipos de respuestas de células T cooperadoras, como son Th1, Th2, Th9, Th17 y T foliculares (Tfh), que al estar activadas liberarán diferentes citocinas para mediar la respuesta inmune contra diferentes patógenos [1, 4, 18]. Sin embargo, otros tipos de células como Treg Foxp3⁺ y Tr1, caracterizadas por secretar TGF- β e interleucina 10 (IL-10), respectivamente, se encargan de la resolución de la respuesta inmune, evitando el desarrollo de enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune (IMID) [26].

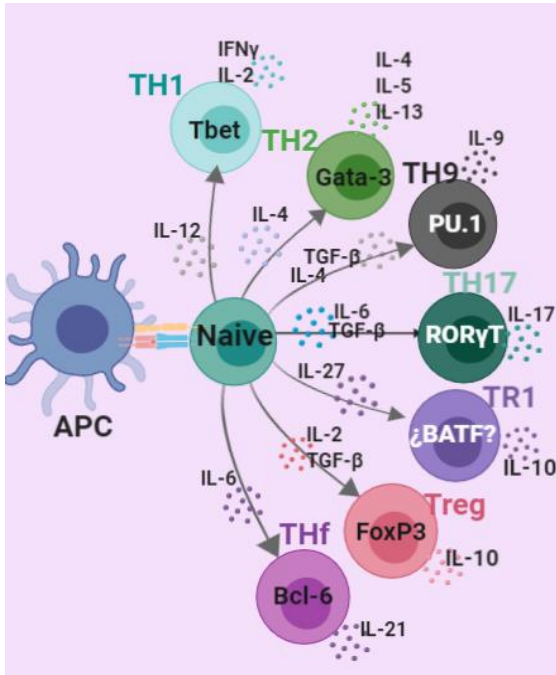


Figura 4. Linajes efectores y reguladores de linfocitos T.

Después de que una célula presentadora de antígeno captura un péptido antigénico y lo procesa por la vía MHC clase II, el péptido sale a la superficie para ser presentado a un linfocito T *naïve*, éste reconocerá el péptido a través de su TCR. Dependiendo del péptido y las citocinas del microambiente, el linfocito T *naïve* se diferenciará hacia el linaje efector necesario para mediar la respuesta inmunológica. APC, célula presentadora de antígeno; TCR, receptor de célula T; Th, célula T cooperadora; Treg, célula T reguladora; Thf, célula T folicular; T-bet,

proteína T-box expresada en células T; GATA-3, proteína de unión a gata 3; RORγT, receptor huérfano gamma relacionado con RAR; BATF, factor de transcripción activador de células B; FoxP3, caja de horquilla P3; Bcl-6, proteína 6 del linfoma de células B; IFN-γ, interferón gamma; TGF-β, factor de crecimiento transformante β.

III.III.I Señalización mediada por citocinas

Las citocinas que promueven la diferenciación de las células cooperadoras se unen a receptores que son miembros de la superfamilia de receptores de citocinas tipo I y II, y señalizan por la vía JAK / STAT. Es así que, STAT4 se activa río abajo de IL-12, citocina que promueve la diferenciación hacia el subtipo Th1; en cambio, para impulsar la diferenciación hacia células Th2 se requiere de la señalización de IL-4, a través de STAT6. Así mismo, mediante la señalización de STAT3 y a través de citocinas como IL-6 y TGF-β o IL-21 e IL-6, se promueve la diferenciación hacia células Th17 y Tfh, respectivamente. Para los subtipos reguladores Foxp3⁺, se

requiere de la expresión elevada de CD25, señalización fuerte de IL-2 a través de STAT5 y la participación de TGF- β [27, 28].

III.III.II Factores de transcripción

Los factores de transcripción maestros son capaces de mediar el destino celular de los linfocitos T a través de su unión a las regiones promotoras y potenciadoras para inducir la expresión de genes específicos del linaje, reprimiendo la expresión de los genes asociados a otros linajes (**Figura 5**) [29]. Por ejemplo, el factor de transcripción GATA-3 promueve la diferenciación hacia células Th2 río abajo de IL-4 - STAT6, pero también reprime la expresión de genes asociados a Th1 [30]; por su parte, T-bet suprime la expresión génica asociada a Th2 para favorecer la diferenciación hacia Th1, incluso T-bet se puede unir a GATA-3 para mediar su supresión de Th2 [31]; así mismo, las células Th9 se caracterizan por expresar Ets2 y PU.1 como factores de transcripción, aunque no han sido reconocidos como factores de transcripción maestros para el linaje Th9. El factor de transcripción de las células Th17 es ROR γ t, el cual regula la expresión de IL-17A e IL-17F, junto con otros genes específicos de Th17. Es de destacar que los factores relacionados a Th17 pueden suprimir la expresión de Foxp3, factor de transcripción maestro de las Treg, a través de la unión de ROR γ t o la señalización de STAT3 [32]. Además de los factores de transcripción mencionados, son necesarios reguladores adicionales como Runx3, IRF4 y Blimp-1, para promover o reprimir la expresión génica y regular la diferenciación de los linfocitos T [26, 29].

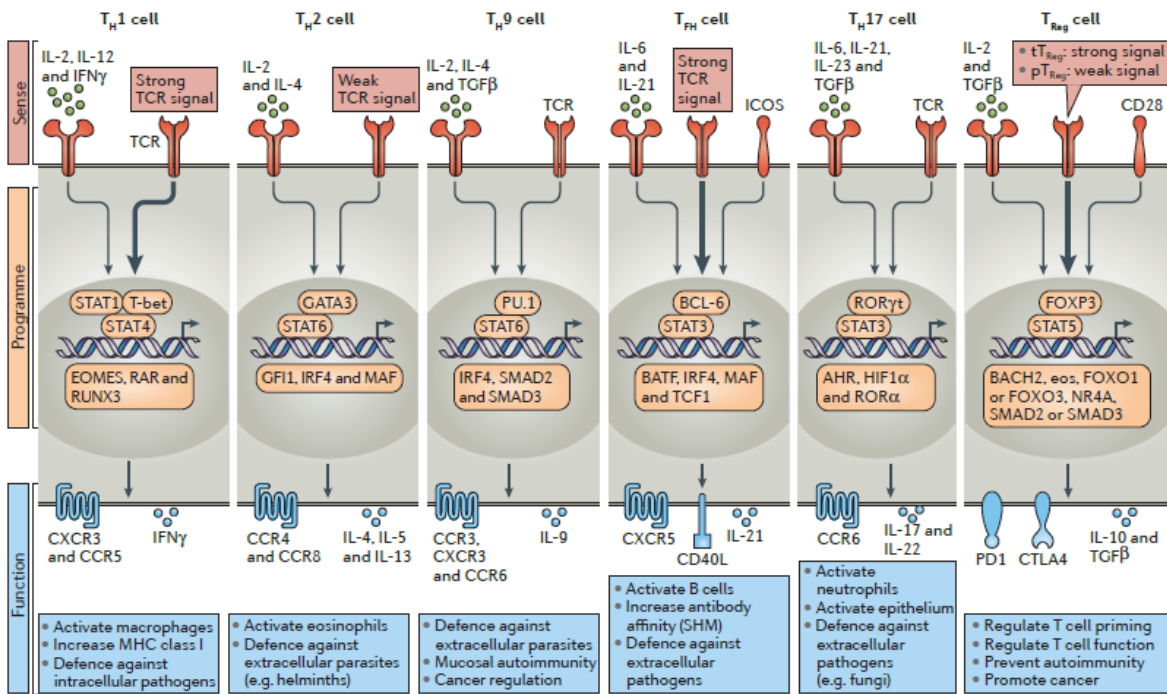


Figura 5. Regulación transcripcional en la diferenciación de linfocitos T. Células T CD4⁺ pueden diferenciarse en distintos subtipos de linfocitos T, éstos pueden definirse por su capacidad para responder a diferentes citocinas inductivas (rojo), programar la expresión de distintos factores de transcripción (naranja) y producir citocinas que les permiten llevar a cabo su función para controlar la respuesta inmunológica (azul). Th, célula T cooperadora; IFN γ , interferón gamma; TCR, receptor de células T; STAT, transductor de señal y activador de transcripción; T-bet, proteína T-box expresada en células T; GATA-3, proteína de unión a gata 3; ROR γ T, receptor huérfano gamma relacionado con RAR; BATF, factor de transcripción activador de células B; FoxP3, caja de horquilla P3; Bcl-6, proteína 6 del linfoma de células B; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; IRF4, factor regulador de interferón 4; CTLA4, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos [28].

III.III.III Funciones efectoras de los linfocitos T.

Las citocinas producidas por el subtipo de linfocito T, son importantes para mediar el tipo de respuesta inmune necesaria contra distintos agentes infecciosos. Es así que, células Th1 producen IFN- γ que mejora la eficiencia de células fagocíticas, particularmente en macrófagos sus actividades bactericidas y mejora la inmunidad contra infecciones intracelulares. Las células Th2 pueden mediar la respuesta contra parásitos como helmintos y respuestas inflamatorias como alergias, al

reclutar mastocitos y eosinófilos a través de la producción de IL-4, IL-5 e IL-13; así mismo, favorece el desarrollo de células B productoras de anticuerpos de clase IgE, involucrados con reacciones alérgicas. Por su parte, las células Th17 producen principalmente citocinas de la familia IL-17 (IL-17A, IL-17F) asociadas con respuestas inflamatorias durante infecciones así como en respuestas autoinmunes. Las células T foliculares producen IL-21 e IL-4, citocinas importantes para la estimulación de células B a producir anticuerpos y cambio de isotipo. Las células Treg se caracterizan por producir IL-10 y TGF- β para controlar las respuestas inmunes y ayudar a la resolución, así como participar en el desarrollo de tolerancia evitando el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Después de una respuesta inflamatoria mediada por células T efectoras, seguida de la resolución por las células T reguladoras, la mayoría de las células T mueren, pero otras se quedan como células de T memoria que pueden diferenciarse rápidamente en células efectoras ante una infección posterior con el mismo antígeno [4, 26, 27].

III.III.IV Adaptación inmunológica y plasticidad.

El proceso por el cual los linfocitos expuestos a estímulos ambientales modifican sus propiedades y, por tanto, futuras respuestas a los mismos u otros estímulos, se denomina adaptación inmunológica. Dicho estado de adaptación es reversible porque puede resolverse cuando las condiciones ambientales vuelven al estado inicial, aunque también es dinámico, puesto que puede modificarse en respuesta a cambios microambientales posteriores. La memoria y la adaptación inmunológica se diferencian por el grado de reversibilidad y la especificidad de la respuesta; la memoria además de ser específica, es una propiedad de los linfocitos (linfocitos de memoria se activan selectivamente por antígenos afines); en cambio la adaptación inmunológica puede ser un proceso con diferentes grados de estabilidad. La estabilidad depende de la intensidad de la estimulación, una estimulación transitoria o en dosis bajas genera adaptaciones reversibles en tiempos cortos (horas a días) o tiempos largos (semanas a meses), mientras que una estimulación persistente o

con alta dosis genera adaptaciones persistentes que pueden no revertirse fácilmente [9].

Los linfocitos muestran respuestas adaptativas conocidas como plasticidad, es decir, pueden adaptar sus respuestas efectoras a un entorno cambiante [9]. La plasticidad se puede definir como la capacidad de una célula T CD4⁺ de expresar simultáneamente o en diferentes momentos durante el transcurso de su ciclo de vida, factores de transcripción y citocinas características de distintas subpoblaciones de linfocitos T [26].

El proceso de plasticidad puede ocurrir a distintos niveles en la célula. Primero, las señales extracelulares como citocinas (**Figura 6**), las señales de TCR y las señales de coestimulación pueden polarizar a las células para que expresen distintas citocinas o que se activen distintas vías mediadas por STATs específicos. Por ejemplo, las células Th1 que se pueden repolarizar para producir IL-4 en condiciones de inflamación como procesos de alergia; las células Th1, ante una infección por helmintos pueden tener un fenotipo GATA3⁺Bcl6⁺ [33]; las células Th2 pueden reprogramarse para adoptar un fenotipo GATA-3⁺T-bet⁺ e IL-4⁺ IFN- γ ⁺ ante una infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) [34]; en condiciones inflamatorias las células Th17 adoptan un fenotipo similar a Th1 mediante la cooperación del factor de transcripción T-bet, Runx1 y Runx3 y, en consecuencia, comienzan a producir IFN- γ [35]; las células Tregs en respuesta a IL-12 *in vitro* o en el contexto de una infección pueden producir IFN- γ [36]; incluso en pacientes con diabetes tipo I las células Tregs Foxp3⁺ regulan a la alza el factor de transcripción T-bet, en respuesta a IFN- γ [37].

Segundo, éstas señales extracelulares son descifradas por cascadas de señalización citosólica. Por ejemplo, en la vía PI3K – AKT – mTOR convergen los programas de células T efectoras y reguladoras, por lo que la activación de esta vía es necesaria para la polarización de los linfocitos T cooperadores. Finalmente, estas señales citosólicas se imprimen en el núcleo al generar nuevos programas de expresión génica, dicha regulación génica incluye la expresión de STAT específicos, factores de transcripción maestros y factores de transcripción adicionales [28]. En este último nivel, se incluyen las modificaciones de histonas como acetilación,

metilación y fosforilación, que están asociadas con la regulación de la expresión génica condensando o relajando la estructura de la cromatina para reprimir o activar la transcripción, respectivamente; dichas modificaciones epigenéticas son factores importantes para regular la diferenciación de células T cooperadoras [27].

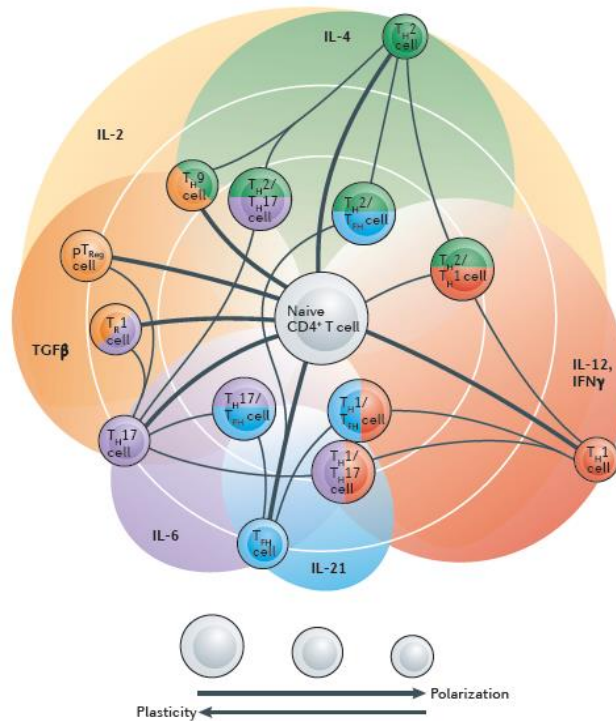


Figura 6. Plasticidad de los linfocitos T CD4+. Las citocinas del microambiente tienen un papel en la diferenciación hacia los subconjuntos de células T CD4+, así mismo, participan en la conducción de la plasticidad [28].


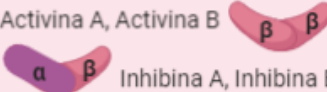



















III.IV. Superfamilia del TGF-β

La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF-β) comprende un amplio grupo de ligandos pleiotrópicos que se agrupan en tres subfamilias: la subfamilia del TGF-β, la subfamilia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) que también incluye a los factores de crecimiento y diferenciación (GDF), y la subfamilia de las activinas (Act), que incluye a las inhibinas (Inha) [38-40]. Los miembros de esta superfamilia se encuentran ampliamente distribuidos en organismos multicelulares, principalmente en vertebrados como mamíferos, en

donde comprenden alrededor de 30 genes, de los cuales hay 3 isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), 4 cadenas β de activina, 20 proteínas morfogenéticas de hueso y 11 factores de crecimiento y diferenciación [41, 42]. Cada uno de estos ligandos se sintetizan como pre-proteínas diméricas, la dimerización requiere de prodominios, que son cortados por proteasas. Posteriormente los ligandos sintetizados son secretados como dímeros maduros que contienen de seis a nueve residuos de cisteína altamente conservados (**Tabla 1**) [43].

Los receptores del grupo de ligandos de la superfamilia, son de tipo I y tipo II, los receptores tipo I están codificados por siete genes en el genoma humano y consisten en cinasas similares al receptor de activina (ALK), mientras que los receptores de tipo II incluyen BMPRII, ACTRIIA, ACTRIIB y T β RII, y están codificados por cinco genes. Ambos tipos son serina/treonina cinasas, su estructura comprende un dominio extracelular rico en Cys y de unión a ligando N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad de cinasa de Ser-Thr (**Tabla 1**) [40, 41].

Tabla 1. Componentes de la superfamilia del TGF- β . Modificado de Rosemary, *et. al* 2012[40].

Superfamilia del TGF- β			
	TGF- β	Activina / Inhibina	BMP
Ligandos	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 	Activina A, Activina B Inhibina A, Inhibina B 	BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9, BMP10 
Receptor tipo I	T β RI (ALK5), ALK1 	ALK4, ALK7 	ALK1, ALK2, ALK3, ALK6 
Receptor tipo II	T β RII 	ACTRIIA, ACTRIIB 	BMPRII, ACTRIIA, ACTRIIB 
Receptor tipo III	T β RIII (betaglicano), endoglina, CRIPT03 	CRIP01, CRIP03, T β RIII (betaglicano) 	RGMA, RGMB (dragon), RGMC, endoglina 
R-SMAD	SMAD2, SMAD3 	SMAD2, SMAD3 	SMAD1, SMAD5, SMAD8 
Co-SMAD	SMAD4 	SMAD4 	SMAD4 
I-SMAD	SMAD7 	SMAD7 	SMAD6, SMAD7 

Después de la liberación del ligando dimérico, interactúa con un complejo tetramérico que contiene dos de cada una de las subunidades del receptor tipo I y tipo II. La unión del ligando al complejo de receptor permite activar diferentes vías de señalización, en las que se distinguen al menos dos, una vía canónica, dependiente de SMAD, y otra independiente de SMAD o no canónica. La vía de señalización canónica de la superfamilia TGF- β está altamente conservada, consiste en la unión del ligando al dominio extracelular del receptor tipo II, el cual se encuentra constitutivamente activo; la unión favorece una proximidad y conformación para los dominios intracelulares de los receptores, lo que facilita la fosforilación del receptor tipo I en residuos Ser y Thr de un dominio yuxtamembrana rico en Gly y Ser, esto permite el reclutamiento de proteínas R-SMADs como SMAD2 y SMAD3, mediante el andamiaje de proteínas como SARA, lo que conduce a la fosforilación de SMAD2/3, una vez fosforilados, se disocian de SARA e interactúan con SMAD4, formando un complejo SMAD que se transloca al núcleo,

en donde interactúan con factores de transcripción para regular la expresión génica (**Figura 7**). Los vertebrados tienen alrededor de ocho proteínas SMAD, las cuales se dividen en tres tipos funcionales (**Tabla 1**): SMADs específicos del receptor (R-SMAD) que consisten en SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD8; SMAD común (Co-SMAD), conformada por SMAD4; y SMADs inhibidores (I-SMAD) conformados por SMAD6 y SMAD7, estas últimas regulan la translocación al núcleo del complejo R-SMAD/Co-SMAD [38-40, 44].

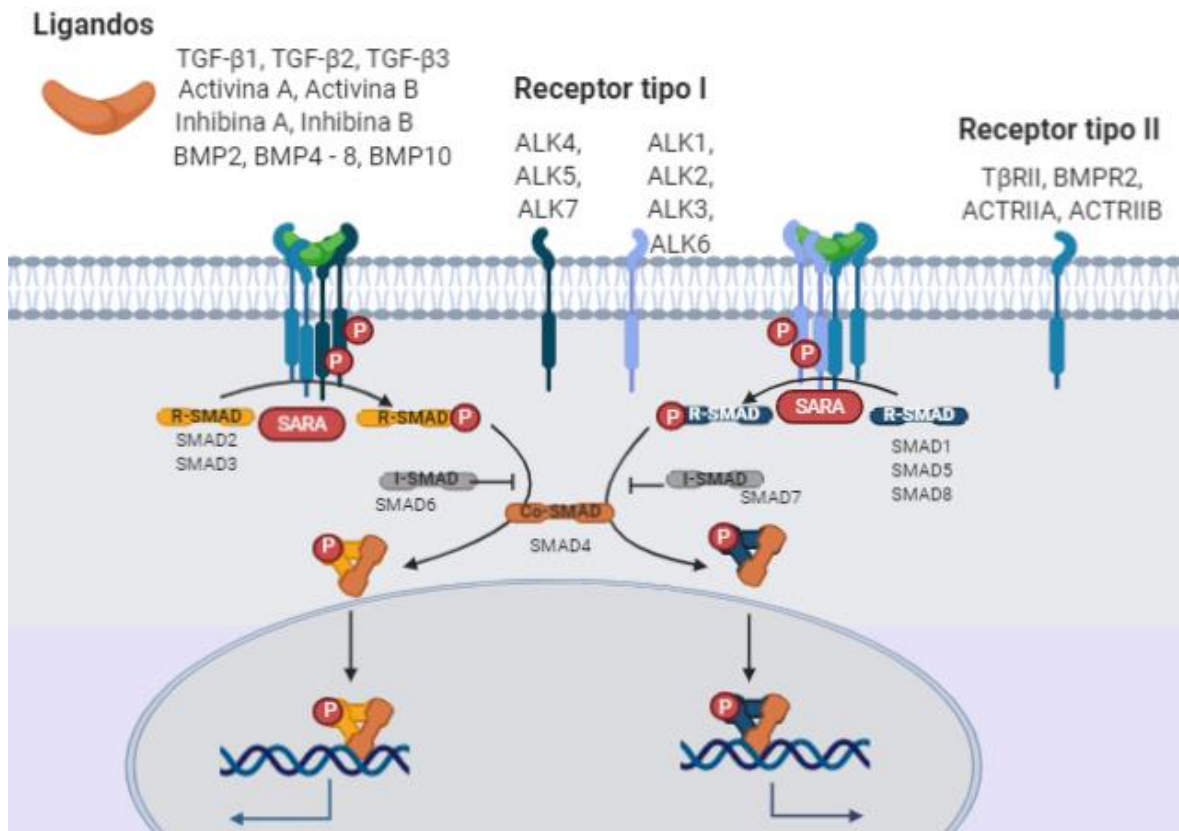


Figura 7. Vía de señalización canónica de la superfamilia del TGF-β. El reconocimiento de los ligandos (TGFβ, Activinas y BMP) en los receptores tipo II, inducen la formación de complejos entre los receptores tipo II y tipo I. Los receptores de tipo II fosforilan los receptores de tipo I, que propagan la señal mediante la fosforilación de SMADs: receptores de tipo I (ALK4, ALK5 y ALK7) fosforilan SMAD2 y SMAD3, mientras que ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 fosforilan SMAD1, SMAD5 y SMAD8. Posteriormente, forman complejos con el mediador común SMAD (SMAD4) y se translocan al núcleo para regular la transcripción génica. Modificado de Schmierer, B. and C.S. Hill, (2007) [41].

La estructura de R-SMAD y Co-SMAD consiste cada una en un dominio MH1 (homología de Mad 1) en el N-terminal y un dominio MH2 (homología de Mad 2) en el C-terminal, conectada por una proteína de unión rica en residuos de prolina, formando estructuras globulares; a diferencia de I-SMAD que consiste únicamente en un dominio MH2. El dominio MH1 permite la unión con una cadena de DNA y así puede promover la transcripción, mientras que el dominio MH2 permite la interacción con otras proteínas. La fosforilación en el C-terminal (SSXSmotif) de R-SMAD, por la actividad de la cinasa del receptor tipo I, favorece la asociación con SMAD4, así se forma un complejo entre dos R-SMADs fosforilados y Co-SMAD, que se dirige al núcleo; su translocación es posible gracias a una señal de localización nuclear (NLS) que forma parte del dominio MH1 y facilita la interacción con α -importina y β -importina. De esta forma se da la unión específica al DNA junto con otros factores de transcripción que se unen a secuencias distintas adyacentes al elemento de unión a SMAD (SBE), para iniciar el proceso de transcripción génica.

Por su parte, los I-SMAD, como SMAD6 y SMAD7, interfieren en la unión de R-SMAD con los receptores tipo I o compiten por la unión con co-SMAD para antagonizar la señalización. También los I-SMAD reclutan ligasas de ubiquitina o fosfatasa; por ejemplo, SMAD7 interactúa constitutivamente con el dominio HECT de la ligasa E3 de ubiquitina 1 y 2 (SMURF1, SMURF2) y los dirige al receptor activado, lo que conduce a la degradación de éstos. Además interactúa con GADD, una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa-1 (PP1), para permitir la desfosforilación de los receptores activos [38, 39, 41].

Los receptores tipo I tienen especificidad para activar solo una subclase de R-SMAD, de manera que ALK4, ALK5 y ALK7 son específicos para SMAD2 y SMAD3, mientras que ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 son específicos para SMAD1, SMAD5 y SMAD8 (**Tabla 1**). Dicha especificidad está dictada por variaciones en la secuencia de aminoácidos del bucle L45 en los receptores tipo I y en el bucle L3 de la respectiva subclase R-SMAD. Esta especificidad divide a los miembros de la superfamilia en dos ramas distintas: la rama nodal/ TGF β / Activina que señaliza a

través de ALK4, ALK5 y ALK7 y SMAD2 y SMAD3), y la rama BMP/GDF que señala a través de ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 y SMAD1, SMAD5 y SMAD8. Sin embargo, esto puede cambiar al haber interacciones a nivel ligando-receptor como interacciones tipo II-tipo I; por ejemplo, GDF8, GDF11 y GDF9, pueden señalar a través de ALK4, ALK5 y ALK7 y activar SMAD2 y SMAD3, ACTRIIB se une a varios receptores de tipo I, como ALK4 en respuesta a activina, ALK3 en respuesta a BMP2 o ALK2 en respuesta a BMP. Aunado a esto, en la modulación de la señalización también participan proteínas accesorias, como cordina, noggin y folistatina, que funcionan como atrapa ligandos extracelulares, cuya función consiste en evitar que los ligandos activos se unan a sus receptores afines. También participan receptores sin actividad cinasa, como los co-receptores integrados en la membrana (denominados receptores tipo III), que no son necesarios para la transducción de señales pero sí para mejorar la afinidad de la interacción de algunos ligandos con su receptor o presentar el ligando al receptor para regular la señalización positiva o negativamente, por ejemplo, la endoglina, el miembro de la familia EGF-CFC (FRL1) y el betaglicano (o receptor tipo III de TGF- β), este último, es co-receptor de ligandos como TGF- β , inhibinas y BMPs a través de sitios de unión en su dominio extracelular [39, 41].

Conforme a lo anterior, en la vía no canónica o independiente de SMAD, el complejo del receptor del ligando activado transmite una señal a través de factores como TRAF4, TRAF6, TAK1 (también conocido como MAP3K7), p38 MAPK, PI3K, AKT, ERK y NF- κ B. Además de estas vías canónicas y no canónicas, en la señalización también pueden influir vías de señalización como PI3K-AKT, WNT, Hedgehog (HH), Notch, interferón (IFN) y RAS (**Figura 8**); la interacción con estas vías permite cambiar la señalización y por tanto la función [38, 39, 44].

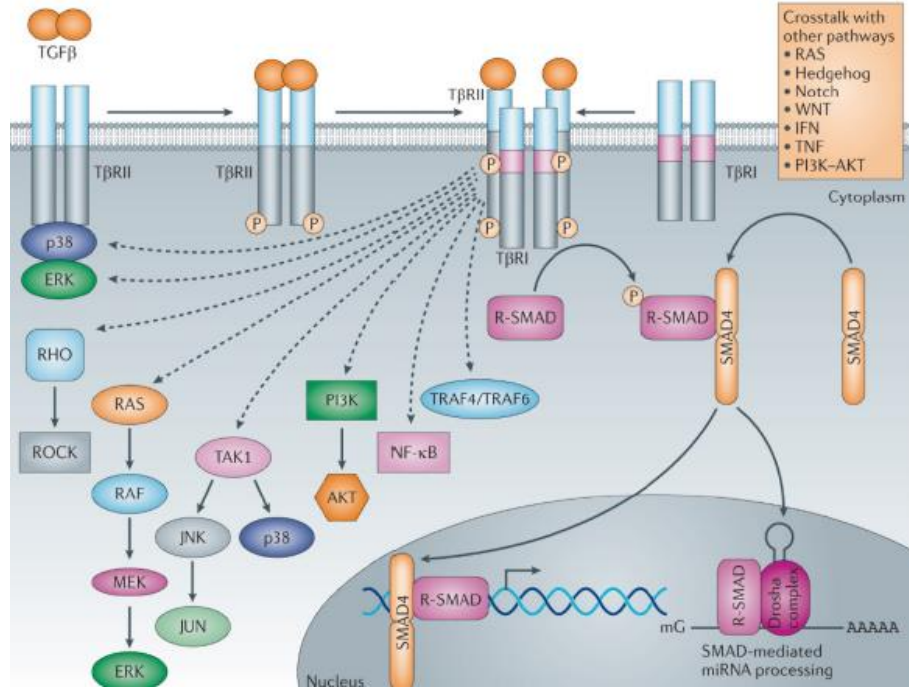


Figura 8. Señalización no canónica del TGF-β. En la vía no canónica, el complejo receptor del TGF-β activado transmite una señal a través de TRAF4 o TRAF6, factor asociado al receptor; TAK1, factor de crecimiento transformante –cinasa activada 1; p38 MAPK, proteína cinasa activada por mitógeno p38; RHO, PI3K-AKT, ERK, cinasas reguladas por señal extracelular; JNK, cinasa Jun-N terminal y NF-κB, factor nuclear kappa B [39].

Los ligandos de la superfamilia regulan muchos procesos biológicos tanto en la embriogénesis como en la vida adulta. Por ejemplo, la familia del TGF-β participa en el control de la actividad celular, estos ligandos pueden inhibir el crecimiento de varios tipos de células, como células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas y del sistema inmunológico [38]. En este sentido, en células NK, el TGF-β puede suprimir la producción de IFN γ , citocina necesaria para la actividad antitumoral, lo cual está mediado por los efectos transcripcionales de SMAD3 en el promotor de IFN γ . En linfocitos B puede inducir la apoptosis, mientras que en los linfocitos T favorece la supresión de la proliferación [39]. El TGF-β se expresa de manera abundante en la región subcapsular del timo, y por lo tanto juega un papel en la maduración de los linfocitos T retrasando la progresión del ciclo celular de los timocitos pre-DP y regular negativamente la generación de timocitos DP [16]. También se ha observado un defecto en la diferenciación de DN, DP y CD4 $^{+}$, después de la administración

exógena de TGF- β 1 o TGF- β 2 [45]. También tiene un importante papel en la diferenciación de células T efectoras, se observó que el TGF- β inhibe la diferenciación *in vitro* de células Th1 y Th2, mediante la inhibición de la expresión de T-bet a nivel transcripcional y GATA-3, respectivamente [46, 47]. Así mismo, junto con la interleucina-6 (IL-6), es importante en la diferenciación del linaje proinflamatorio Th17 [39]. También es importante en la expresión de Foxp3 y para la actividad supresora en iTreg [42].

Por su parte, la familia de las BMPs tiene funciones en distintos tejidos y órganos como huesos, corazón, riñones, ojos, piel y dientes [42, 48]. Particularmente BMP-2 tiene gran relevancia en la reparación de fracturas al participar en procesos de condrogénesis y osteogénesis [37], incluso se observó que los ratones con alteración en la producción de BMP-2 tenían una deficiencia en la reparación de fracturas, a pesar de que mostraban un desarrollo óseo normal [49]. Por otro lado, en cultivos de timo de órgano fetal (FTOC) se observó que BMP-4 y BMP-2 inhiben la proliferación de timocitos al disminuir su porcentaje en la fase G2 del ciclo celular, también afectan la progresión de los timocitos del estadio DN a DP; además se observó que el Tsg (*Twisted Gastrulation*, por sus siglas en inglés), un regulador de las señales de BMP que se expresa en timocitos después de la señalización del TCR, puede bloquear el efecto inhibitorio de BMP-4 y BMP-2 [50]. Por otro lado, al agregar los ligandos BMP-2 o BMP-4 en células CD4⁺ activadas por TCR, no se favorece la expresión de Foxp3 y por tanto una actividad supresora, pero sí se observó un aumento de la capacidad de TGF- β para promover la generación de iTreg Foxp3⁺; el inhibidor noggin mostró que ambos ligandos y la señalización del receptor BMP, no eran necesarios para que el TGF- β indujera la expresión de Foxp3 en células “naive”; sin embargo, se observó que BMP-2 y BMP-4 junto con TGF- β tienen un efecto sinérgico sobre la inducción de Foxp3⁺ [42].

III.IV.I Activinas e Inhibinas

a) *Ligandos y receptores*

Dentro de la familia de las activinas, se encuentra la inhibina; ambas son factores de crecimiento y diferenciación pluripotentes, descritas inicialmente como hormonas glicoproteicas, por su función para inhibir o estimular, respectivamente, la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH). Las activinas están conformadas por homodímeros de subunidades β , mientras que las inhibinas son heterodímeros de una subunidad β y una subunidad α (**Figura 9**). Se han descrito cuatro genes de la subunidad β (βA , βB , βC y βE) en humanos; sin embargo, solo dos subunidades son biológicamente activas, formando activina A ($\beta A:\beta A$), activina B ($\beta B:\beta B$) y activina AB ($\beta A:\beta B$), los heterodímeros de inhibina se forman de subunidades $\beta A:\alpha$ (inhibina A) y subunidades $\beta B:\alpha$ (inhibina B) [51, 52].

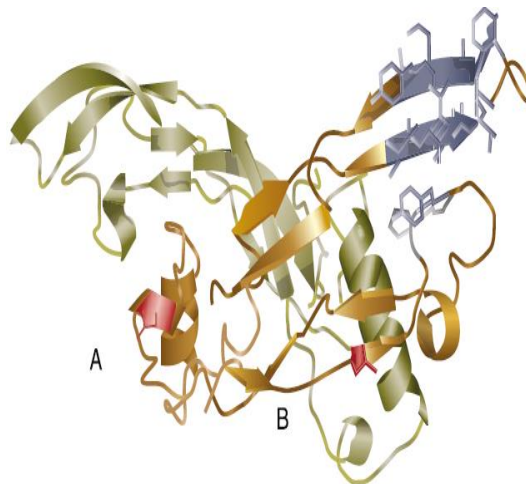


Figura 9, Estructura de inhibina. La subunidad α se muestra en primer plano, dimerizada con una sola subunidad βA en el fondo (verde claro) [43].

De manera similar a las familias de TGF- β y BMP, las subunidades de inhibina y activina se sintetizan como pre-proteínas que son dimerizadas y posteriormente se procesan para ser liberados como ligandos maduros (**Figura 10**). La subunidad α es sintetizada como un propéptido inactivo compuesto por un prodominio de 43 aminoácidos, un dominio αN de 171 aminoácidos y un dominio αC de 134 aminoácidos, el cual está separado por dos sitios de escisión de poliarginina. La

subunidad α humana tiene dos sitios de glicosilación unidos en el extremo N del prodominio, dicha glicosilación es necesaria para la secreción de inhibina. En la escisión proteolítica del propéptido están involucradas convertasas de proproteína como la furina, se genera una proteína madura de 134 aminoácidos con una masa molecular de 18 kDa [43, 53].

Las subunidades β se producen como un precursor con un prodominio en el extremo N y un dominio βA o βB maduro en el C terminal, este último separado por un sitio de escisión de poliarginina (Arg-XX-Arg o RXXR). Los prodominios de las subunidades βA y βB consisten en moléculas de 425 y 407 aminoácidos, respectivamente, con un peso molecular de 47 y 45 kDa. Para la escisión proteolítica, la serina peptidasa furina asociada a la membrana, reconoce la secuencia consenso RXXR, generando formas maduras de 116 y 115 aminoácidos, respectivamente, con un peso molecular de 13 kDa. El extremo C terminal, de las subunidades maduras forma un enlace disulfuro entre cadenas a través de Cys80 de la subunidad βA (o Cys79 de la subunidad βB) y Cys95 de la subunidad α , formando el heterodímero. La subunidad α se encuentra en el cromosoma 2 en humanos, en cambio, en el ratón la INHA y la INHB se ubican en el cromosoma 1, mientras que INHAB se encuentra en el cromosoma 13. Así mismo, los genes de las subunidades βA y βB se encuentran en humanos en el cromosoma 7 y 2, respectivamente [43].

En la familia inhibina/activina también participan receptores serina / treonina cinasa tipo I como ALK4 y ALK7 y receptores tipo II como ACTRIIA y ACTRIIB [39].

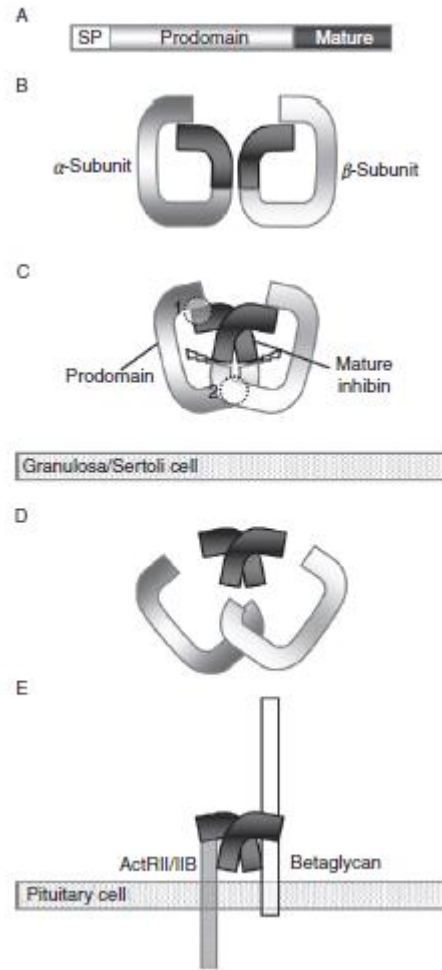


Figura 10. Síntesis de inhibina y activina. Las subunidades de inhibina y activina se sintetizan inicialmente como pre-pro-proteínas, que forman dímeros y luego se procesan hasta la madurez. **A.** Estructura de las formas de pre-pro-proteína de las subunidades α y β , comprenden un prodominio N-terminal y un dominio maduro C-terminal. **B, C.** Los residuos hidrofóbicos dentro de la porción N-terminal del pro-dominio (región 1) y las regiones del dominio maduro interactúan de manera no covalente, manteniendo la molécula en una conformación para la dimerización. Los pro-dominios de las subunidades de inhibina también se dimerizan a través de una interacción no covalente C-terminal (region 2). Los residuos hidrofóbicos dentro del pro-dominio de la subunidad α y los dominios pro y maduros de la subunidad β son importantes para el correcto ensamblaje y secreción de los factores de crecimiento maduros. **D.** La inhibina es secretada por la célula. **E.** Interacciones del ligando con el receptor [43].

b) Señalización

De manera similar a la señalización de los otros miembros de la superfamilia TGF- β , la unión de la activina al receptor tipo II, ACTRIIA (para activina A) o ACTRIIB (para activina B), induce la fosforilación y posterior activación del receptor de tipo I (ALK4), posteriormente se da la fosforilación de las proteínas SMAD2 y SMAD3, que formarán el complejo con la Smad común para dirigirse al núcleo y regular la expresión génica. Particularmente, la activina A tiene mayor afinidad por los receptores tipo II en comparación con la activina B [43].

Tanto activina como inhibina tienen un sitio de unión para los receptores tipo II, esto por la subunidad β que comparten, la activina se une a dos moléculas de ACTRIIB en una proporción 2:1, mientras que la inhibina se une sólo a una molécula de ACTRIIB a través de su subunidad β . Las inhibinas tienen menor afinidad de unión (aproximadamente diez veces menor) por ACTRIIA y ACTRIIB, en comparación con la afinidad de la activina. Sin embargo, las inhibinas pueden antagonizar las acciones de activinas y otros miembros de la superfamilia TGF- β que comparten los receptores tipo II [54]. El antagonismo de la señalización de activina se da por la unión competitiva de ACTRIIA y ACTRIIB, para posteriormente evitar el reclutamiento del receptor tipo I y por tanto la señalización intracelular a través de SMADs. Además, la región N terminal de la subunidad α también interactúa con ALK4, lo que puede contribuir al papel antagónico de la inhibina. La actividad antagónica de la inhibina involucra proteínas auxiliares como el betaglicano, correceptor que se une a la inhibina con alta afinidad, y además esta afinidad aumenta alrededor de 30 veces en las células que coexpresan ACTRII y betaglicano (**Figura 11**) [43, 52].

En algunos tejidos y células la inhibina no antagoniza a la activina, sugiriendo que son necesarios componentes adicionales para la acción de la inhibina. Otro nivel de regulación es a través de antagonistas solubles como folistatina (FST), BAMBI (un inhibidor unido a la membrana del receptor de activina) y Cripto (una proteína de membrana que inhibe la señalización de activina formando un complejo con activina y ACTRIIA). La folistatina está formada por un segmento amino terminal de 63 residuos, seguido de tres dominios de folistatina de 73 a 75 aminoácidos, estos

dominios contienen diez residuos de cisteína. La follistatina contribuye a regular procesos como el crecimiento celular y la secreción de FSH, formando complejos biológicamente inactivos, al unirse con alta afinidad a la activina [51, 52].

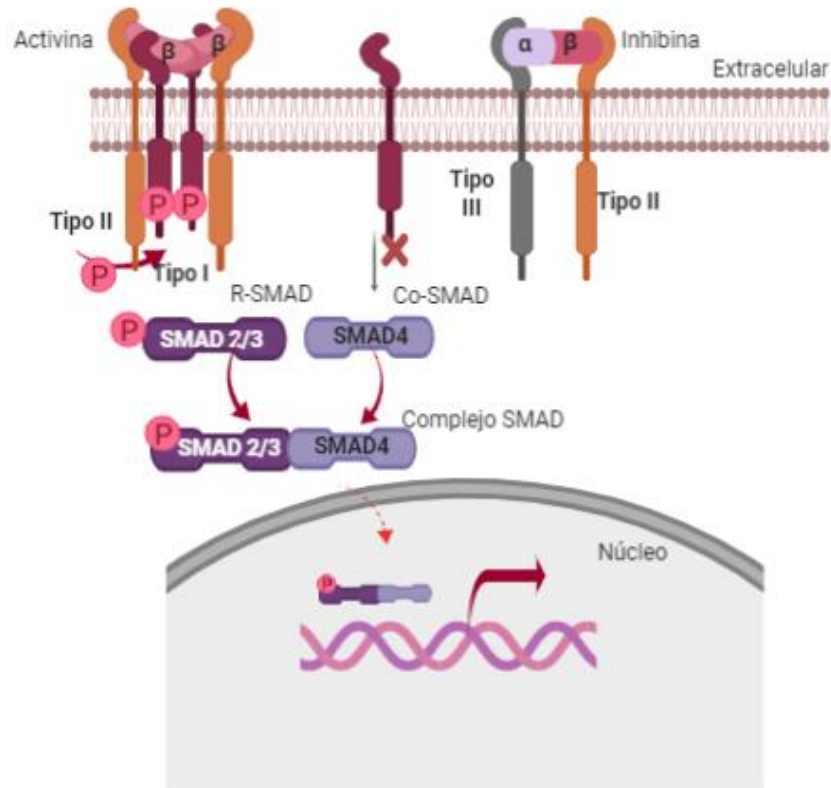


Figura 11. Mecanismo de acción de la inhibina. Las activinas son homodímeros de subunidades β , mientras que las inhibinas son heterodímeros de subunidades α y β . Las activinas se unen a receptores de serina-treonina tipo I y tipo II, de manera similar a la vía canónica de TGF- β , tras la unión del ligando, el receptor de tipo II fosforila al receptor tipo I, que a su vez fosforila las proteínas SMAD (SMAD 2/3). Una vez fosforilados, se asocian con SMAD4 y se dirigen al núcleo donde se unen a las secuencias promotoras de genes diana para regular la transcripción génica. Por su parte, las inhibinas se unen a los receptores de activina tipo II y bloquean el reclutamiento de receptores de tipo I, por tanto, bloquean la activación de las SMAD y la señalización. La inhibina se une con alta afinidad al receptor tipo III (ACTRII / TRBIII betaglicano), favoreciendo su unión a los receptores tipo II, por lo que aumenta las acciones antagonistas de las inhibinas. Modificado de Stenvers, K.L. and J.K. Findlay, (2010) [54].

c) *Funciones*

El análisis de los RNA mensajeros de α , βA y βB demuestra que se expresan en múltiples tejidos durante la vida adulta y fetal [53]. La activina es una citocina pleiotrópica [55], con distintas funciones en órganos reproductivos como gónadas, útero y pituitaria. Además de regular procesos como foliculogénesis y espermatogénesis, su papel más importante es la regulación transcripcional de FSH por esteroides gonadales y glucocorticoides; por ejemplo, la activina actúa sinérgicamente con el andrógeno para estimular la transcripción de FSH- β [56]; así mismo, participa en la modulación de la biosíntesis de LH- β y la liberación a través de la regulación de la acción de GnRH, apoyando su participación en la modulación del control reproductivo neuroendocrino [51]. La activina también se ha considerado como un supresor tumoral, al inhibir el crecimiento de muchos tipos de células, incluidas las células tumorales que pueden escapar del efecto inhibitorio, cuando se dan mutaciones en los receptores tipo I de activina [57].

Por otro lado, se ha observado que las inhibinas son importantes para mantener la función normal en muchos tejidos, especialmente los del eje reproductivo, debido a que se sintetiza durante el desarrollo embrionario en gónadas y placenta y durante la vida adulta continua en gónadas, pero también en hipófisis, glándula suprarrenal y sistema nervioso. La inhibina se ha caracterizado por su acción antagónica sobre la activina, ejemplo de esto es que ratones deficientes en la subunidad α desarrollan tumores gonadales a las 4 semanas [53], acompañado de un síndrome de desgaste similar a la caquexia, caracterizado por una pérdida de peso severa, en estos ratones deficientes las activinas incrementan en el suero [58]. Al cruzar el ratón deficiente de la subunidad α de la inhibina con el ratón deficiente ACTRII, se observó que los ratones no desarrollan el síndrome de desgaste, lo que permitió concluir que el aumento en los niveles de señalización de activina favorecen el desarrollo de caquexia [59]. En los ratones que desarrollan tumores gonadales a las 4 semanas, aumenta su supervivencia si son gonadectomizados; sin embargo, a las 21 semanas de edad desarrollan tumores corticales suprarrenales, desarrollando el mismo síndrome letal de desgaste caquético [58]. Debido a que las inhibinas tienen

acciones locales en los tejidos en los que se producen, podrían actuar como supresores tumorales en tejidos como ovario, próstata, endometrio y seno [54].

IV. ANTECEDENTES

Los miembros de la superfamilia del TGF- β están ampliamente expresados en varias células del sistema inmunológico y tienen un importante papel en la proliferación y la diferenciación, por lo cual la ausencia o deficiencia de algunos ligandos puede generar enfermedades graves [39]. Los dímeros de la familia del TGF- β han sido los más estudiados, particularmente la isoforma TGF- β 1, observando su participación en el desarrollo de las células T, homeostasis y tolerancia [60]. En cuanto a las otras familias, particularmente la familia de las activinas/ inhibinas, los estudios en el sistema inmunológico se han centrado en el papel de las activinas, debido principalmente a que comparte la vía de señalización canónica con TGF- β a través de SMAD2 y SMAD3 [61].

La activina se expresa en diferentes células del sistema inmunológico, como monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos y mastocitos, y su expresión incrementa durante la respuesta inmune. Por ejemplo, DCs derivadas de monocitos humanos (MoDC) y poblaciones de DCs de sangre periférica expresan RNAm de activina, así como los receptores tipo I y II; sin embargo, se observó un aumento en la secreción de activina A después de la exposición a bacterias como *Escherichia coli*, así como ligandos específicos de TLR (TLR-4). También observaron que al bloquear la señalización de activina autocrina en DCs con folistatina, se incrementó la producción de las citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70, lo que mostró que la activina constituye un mecanismo de retroalimentación (*feed-back*) negativo para regular la producción de estas citocinas [62].

En cultivos de timocitos de rata adulta, se observó que la activina A y TGF- β 1 estimulan la proliferación de estos, cuando son expuestos *in vitro* a IL-6 exógena [63]. También se ha observado que la activina A aumenta en los sueros de individuos con asma [56], incluso se ha observado una producción incrementada de activina A en células que se diferencian a un subtipo Th2 (fenotipo efector clave en

las respuestas alérgicas), en comparación con células Th1, sugiriendo que la expresión del gen βA está regulado de manera similar a otras citocinas específicas de Th2 [64]. La disminución de activina A durante la exposición a un alérgeno pulmonar mostró una exacerbación de la enfermedad de las vías respiratorias mediada por Th2, permitiendo concluir que la activina A endógena es supresora [55].

A pesar del papel antagónico de las inhibinas en la señalización de activinas, descrito principalmente en células y órganos reproductivos, las inhibinas pueden ejercer distintas funciones independiente de las activinas [65]. En este sentido, nuestro grupo de trabajo encontró la primera evidencia de que las inhibinas pueden estar regulando el proceso de organogénesis del timo y la diferenciación temprana de los timocitos. Se analizó el patrón de expresión de los componentes de la vía de señalización de activina en diferentes etapas de desarrollo en ratones, desde el timo fetal hasta adulto. Se observó una mayor expresión de los receptores de tipo I y II (ACTRIIA, ACTRIIB), SMAD2, 3 y 4, en timos fetales y adultos, preferentemente en etapas tempranas de desarrollo. En las células estromales se observó una expresión preferencial de las subunidades βA , βB y α , y solo de subunidades βB y α en timocitos, en estos últimos, la subunidad βA se expresa preferentemente en el estadio DN, y entre los timocitos SP, el $CD8^+$ mostró niveles significativamente más altos que $CD4^+$, tanto de βA como de α . También se observó mayores niveles de ALK4 en células estromales y en el estadio DN de timocitos, lo que permitió concluir que tanto las células estromales como los timocitos en el estadio DN, pueden responder potencialmente a los ligandos. Por tanto, la expresión de la activina B parece estar restringida a las células estromales, mientras que la expresión de la activina A, inhibina, ALK4, ACTRIIA, ACTRIIB y SMADs es compartida por las subpoblaciones del estroma y los timocitos (principalmente en el estadio DN). Así mismo, el análisis de la abundancia de RNAm en diferentes etapas de desarrollo mostró mayor expresión de la subunidad α en el timo fetal y adulto, lo que permitió proponer que las inhibinas son los principales ligandos expresados en timo fetal y adulto (**Figura 12**) [66].

Después de evaluar la expresión de estos ligandos, se estudió si eran capaces de regular puntos de control específicos durante el desarrollo de los timocitos, para ello, realizaron cultivos de timo fetal (FTOCs) en presencia de activina e inhibina recombinante, se observó que en presencia de ambos ligandos disminuye el número de timocitos DN3 y aumenta el número de células en estadio DN4, lo cual indica que tanto activina como inhibina facilitan el paso de DN3 a DN4, sugiriendo un papel positivo en el proceso de la selección β . Sin embargo, ambos ligandos controlan diferencialmente la transición a la etapa DP, pues la activina promueve el paso del estadio DN4 a una subpoblación intermedia (ISP) $CD8^+ CD24^{hi} TCR\beta^{lo}$, mientras que la inhibina promueve la diferenciación de DN4 a DP. También ambos ligandos favorecen la diferenciación hacia SP $CD8^+$. Así mismo, en ratones deficientes de la subunidad α de Inhibina ($Inha^{-/-}$), se observó un retraso en el desarrollo de células T *in vitro*, específicamente en las transiciones de DN2 a DN3 y de DN a DP, así como una reducción en el número de timocitos, lo que apoya aún más el papel de las inhibinas como regulador de las señales de desarrollo que tienen lugar durante la maduración de células T *in vivo* (**Figura 12**) [67].

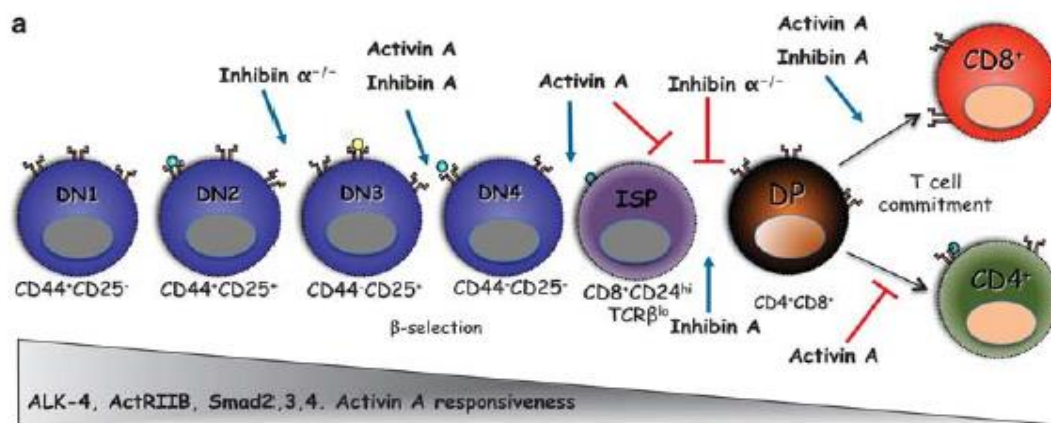


Figura 12. Papel de las inhibinas y activinas en la diferenciación de células T. En timo fetal y adulto se expresan ALK4, ACTRIIBs y SMADs 2, 3 y 4, y es mayor en las primeras etapas de desarrollo. La activina A y la inhibina A regulan la transición de DN a DP, así como la transición de DP a SP en FTOCs. Particularmente, la inhibina A promueve la transición a DP, mientras que la activina A induce la acumulación de una subpoblación de ISP. El análisis de FTOCs de ratones inhibin $\alpha^{-/-}$ muestra un retraso de DN2 a DN3 y de DN a DP y también una reducción en el número total de timocitos [68].

Debido a que se observó una expresión preferencial de las subunidades βA , βB y α , así como de ALK4, ACTRIIA, ACTRIIB y SMADs, en las células estromales, nuestro grupo investigó si las inhibinas pueden estar implicadas en la diferenciación y función de las células estromales. En ratones $Inh\alpha^{-/-}$ se caracterizaron células del estroma tímico, observando que la ausencia de inhibina promueve la diferenciación de las TEC medulares sobre las corticales. También se observó que cDCs tímicas tienen niveles reducidos de MHCII y CD86, en cambio las pDCs tienen niveles MHCII normales pero están reducidas en número. Esto sugiere que las inhibinas son importantes no solo durante el proceso de maduración de los timocitos, también en la regulación de la maduración de las APCs en timo. Por lo que en ausencia de inhibina, se podría afectar la avidéz de las interacciones TCR-péptido-MHCII, lo cual explicaría que haya una disminución de selección de timocitos $CD4^{+}$ y una mayor generación de linfocitos T reguladores tímicos o naturales (nTreg) [69].

En este contexto, en trabajos recientes se estudió la biología de las células dendríticas. Las DCs inmaduras se caracterizan por un fenotipo adherente, pero al ser células maduras cambian a un fenotipo migratorio no adherente y tienen una mayor expresión superficial de MHCII y moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, además de una mayor expresión del receptor de quimiocinas CCR7, lo que permite una rápida migración al ganglio linfático. Se observó que células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratones WT ($Inh\alpha^{+/+}$) al ser tratadas con LPS, mostraron un fenotipo maduro y que producían niveles significativos de inhibina A. Sin embargo, las BMDC de ratones $Inh\alpha^{-/-}$ conservaron su fenotipo adherente, asemejándose a DC inmaduras, acompañado de un fenotipo tolerogénico por sus bajos niveles de MHCII y CD86 después de su activación con LPS, además de una capacidad de migración disminuida *in vitro* hacia CCL19 y CCL21, ligandos de CCR7. Al evaluar su capacidad para activar células T $CD4^{+}$ alogénicas, se observó una capacidad reducida para inducir la proliferación de células T; sin embargo, no se sabía si los linfocitos T que carecen de inhibina podrían tener un defecto intrínseco en su activación y proliferación [70].

En datos recientes, se observó que los ratones deficientes de inhibinas tienen incrementados el número de células T reguladoras en periferia, similar a lo observado en timo [71]; sin embargo, el porcentaje y número de células T “naive” y de memoria en periferia no se ve afectado en comparación con su contraparte silvestre [72].

Lo anterior llevó a preguntarnos si las inhibinas tienen algún papel en los linfocitos T maduros, también debido a que ya se ha estudiado el papel de las activinas en la respuesta de linfocitos T maduros; por ejemplo, los linfocitos T al activarse producen activina, incluso se ha observado una producción incrementada de activina A en las células que se diferencian a un subtipo Th2 [55] y la activina A también aumenta en los sueros de individuos con asma [64].

La activina A, producida durante una respuesta Th2, ejerce una función supresora a través de la inducción de células T reguladoras antígeno-específicas que secretan IL-10 y TGF- β (probablemente Tr1) (**Figura 13**) [55]. Así mismo, la activina A induce la diferenciación de macrófagos M2 e indirectamente la producción de IgE por células B, característico de una respuesta Th2 [64]. En este contexto, también se ha reportado que la activina A regula la expresión de múltiples genes asociados con las células Th1 independientemente o en concordancia con señales adicionales, a través de SMAD2 y SMAD3 [73]. Por otro lado, las señales de activina A y del TGF- β se sinergizan y regulan la conversión de células T reguladoras Foxp3⁺ (**Figura 13**) [74].

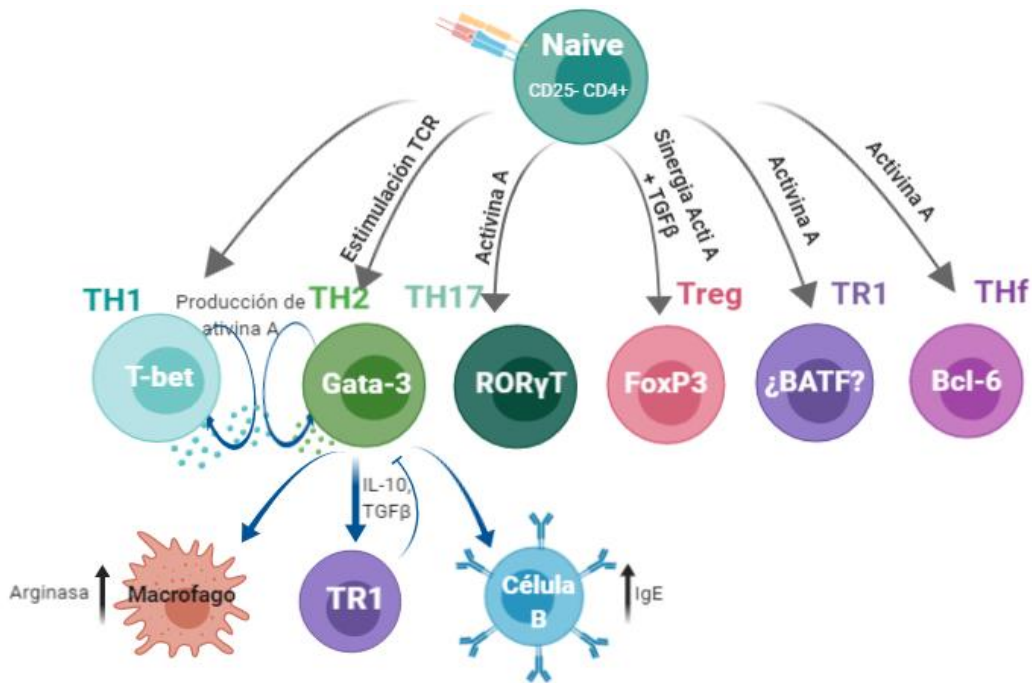


Figura 13. Papel de las activinas en la respuesta y diferenciación de células T. Las activinas participan en el desarrollo de las células T y en sus respuestas, dependiendo de las condiciones del microentorno (activación, citocinas). Las células T al activarse producen activina, la producción es mayor en células Th2, por lo que promueve las respuestas de tipo Th2; incluso la activina secretada en condiciones Th2, participa en la supresión de la respuesta mediante la generación de células Tr1. De igual manera, la activina con TGF- β sinergizan para la conversión de Tregs. También se ha reportado su participación en la diferenciación hacia Th17 y Thf. Modificado de Alemán-Muench, *et al.*, 2012 [68].

IV.I Antecedentes directos

Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo mostraron que los linfocitos T producen inhibina ante una activación parcial o subóptima (con anti-CD3 y anti-CD28), se observó un pico de secreción a las 96 h, previo al de activina (Tesis de doctorado- Marisol de la Fuente 2020). Además se observó que los linfocitos T de ratones $Inh\alpha^{-/-}$ no producen más activina respecto a los linfocitos T de ratones $Inh\alpha^{+/+}$, bajo condiciones subóptimas. Así mismo, datos recientemente publicados muestran que al cocultivar BMDC de ratones $Inh\alpha^{-/-}$ estimulados con LPS (mBMDC) o sin estímulo (iBMDC), con células T “naive” en presencia de concentraciones subóptimas de anti-CD3 y TGF- β , se favorece una mayor diferenciación de Treg $CD25^+ FoxP3^+$ en comparación con las células de ratones $Inh\alpha^{+/+}$ [71].

Por otro lado se ha observado la participación de miembros de la superfamilia del TGF- β en la diferenciación de linfocitos efectores Th1 y Th17, principalmente la del TGF- β . Por ejemplo, TGF- β 1 suprime la expresión del factor de transcripción T-bet inducido por la citocina IFN- γ , inhibiendo el desarrollo de Th1, esto se propone es a través de la proteína tirosina fosfatasa 1 (SHIP-1), pues en células T CD4⁺ aisladas de ratones deficientes en SHP-1, TGF- β 1 no puede suprimir T-bet [75]. Posteriormente estos mismos autores reportaron que los efectos inhibitorios de TGF- β 1 eran independientes de la señalización canónica con SMAD3, pero dependía de una ruta específica de MAP cinasa, debido a que observaron que al inhibir la ruta MEK / ERK se eliminaron los efectos inhibitorios de TGF- β 1 sobre IFN- γ en los linfocitos T [76]. Así mismo, se ha reportado la participación de BMPs en la activación y diferenciación de linfocitos T, utilizando dorsomorfina (DM), un inhibidor de la vía de las BMPs, se observó que DM inhibió la diferenciación de células Th1 y Th17, al suprimir la expresión de Tbx21 y Ror γ , pero no suprimió la expresión de Gata-3, lo que explica que no se vio afectada la diferenciación de los linfocitos Th2 [77].

En un contexto de células Th17, se ha observado que la activina A en conjunto con IL-6, puede inducir la diferenciación *in vitro* de células Th17 sin la participación del TGF- β [78]. También recientemente se estudió el papel de las DCs y citocinas asociadas a la diferenciación de Th17, utilizando la toxina del cólera (CT). La estimulación de DC con adyuvantes, aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras, así como la producción de IL-12, IL-4 o IL-6 y TGF- β que son citocinas polarizadoras Th1, Th2 y Th17. Particularmente, la CT estimula a DCs a producir IL-6 e IL-1 β , que juegan papeles críticos en la diferenciación Th17. Se observó que las BMDC tratadas con CT producen activina A y su neutralización disminuyó la diferenciación de Th17 por los BMDC, también se observó algo similar bajo una condición de dosis alta de antígeno. Al neutralizar TGF- β 1 de BMDC tratadas con CT, se observaron resultados similares a los observados con activina, lo que sugiere que TGF- β 1 y activina A actúan sinérgicamente en la diferenciación de Th17 por CT [79].

De acuerdo con lo anterior, nuestro grupo de trabajo investigó el papel de las inhibinas durante la activación y diferenciación de linfocitos T efectores. A partir de linfocitos T “*naive*” en cultivo con anti-CD3 y anti-CD28, se evaluó la expresión de los marcadores T β RIII, CD25, CD44 y CD69 en una cinética de activación, observando una disminución de CD25 y CD69, lo que indica un retraso en la activación temprana. Posteriormente, se evaluó la expresión de IFN- γ e IL-17 para Th1 y Th17, respectivamente, diferenciados a partir de linfocitos T “*naive*” de ratones $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ y $\text{Inh}\alpha^{+/+}$. Se observó una disminución significativa de IFN- γ en ratones $\text{Inh}\alpha^{-/-}$, lo que indicó una menor diferenciación hacia el subtipo Th1, se observaron resultados opuestos para Th17, al mostrar una mayor producción de IL-17 [72].

Todo lo anterior nos llevó a preguntarnos si los efectos observados en la diferenciación de células Th1 y Th17 se deben a la falta de producción y señalización autocrina de inhibina. Para lo cual era necesario reconstituir el sistema con inhibina recombinante y evaluar su efecto en la diferenciación a los fenotipos efectores Th1 y Th17.

V. JUSTIFICACIÓN

En diversos estudios se ha demostrado la participación de los miembros de la superfamilia del TGF- β , particularmente la familia de las activinas, en la biología de los linfocitos T, especialmente en el desarrollo y maduración. Nuestro grupo de trabajo fue el primero en demostrar la expresión de las subunidades de los ligandos, receptores y SMADs, componentes de las vías de las familias de activinas e inhibinas en timocitos, proponiendo que pueden estar regulando el proceso ontogénico de los timocitos y la diferenciación temprana de estos. Por otro lado, se ha observado la participación de miembros de la superfamilia del TGF- β en la activación y diferenciación de los linfocitos T, especialmente, la activina. Nuestro grupo de trabajo reportó defectos en la biología de células dendríticas de ratones deficientes de inhibina y su capacidad reducida para inducir la proliferación de células T. Posteriormente, al estudiar la participación de las inhibinas en procesos de activación y diferenciación de linfocitos T efectores de ratones deficientes de inhibina, se observó una activación disminuida y también una disminución en la diferenciación hacia el fenotipo Th1 y un aumento de células Th17. Dado que se desconoce si las inhibinas tienen un papel autocrino en los linfocitos T, es necesario investigar si los defectos en la activación y la modulación en la diferenciación Th1/Th17 se deben a la falta de señalización autocrina de las inhibinas.

VI. HIPÓTESIS

La producción de inhibina por los linfocitos T, favorece su diferenciación a células Th1 y disminuye su diferenciación a células Th17.

VII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto autocrino de la inhibina en la diferenciación de células Th1 y Th17.

VII.I Objetivos particulares

1. Evaluar la producción de inhibina y activina durante la activación de linfocitos T.
2. Reconstituir la expresión con inhibina recombinante, en cultivos de células deficientes ($Inh\alpha^{-/-}$) diferenciadas a Th1.
3. Reconstituir la falta de expresión de inhibina, con inhibina recombinante en cultivos de diferenciación Th17.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.I Ratones

Los experimentos fueron realizados con ratones hembra de 4 semanas, tanto silvestres ($Inh\alpha^{+/+}$) como ratones deficientes de la subunidad α de la inhibina ($Inh\alpha^{-/-}$), éstos últimos diseñados y descritos por el Dr. Martin Matzuk en 1992 [53]. Todos los ratones en fondo C57BL/6. El genotipo de los ratones se determinó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a partir de DNA extraído de un pequeño fragmento de cola, digerido con NaOH 50 mM y Tris 10 mM (pH 8.0). Para la reacción se utilizó la *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), el Buffer PCR 10X (Invitrogen), dNTPs, agua inyectable, así como los siguientes *primers*: Alelo mutante Inhibina α Hprt3: GGATATGCCCTTGACTATAATG (Forward); Intron: CCTGGGTGGAGCAGGATATGG (Reverse); E2-EX2 GGTCTCCTGCGGCTTTGC (Forward) [80], sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Con los productos anteriores se realizó una reacción en las muestras de los ratones WT y otra en las muestras de los KO, con los respectivos PRIMERS. Las condiciones de la reacción fueron previamente estandarizadas, de acuerdo con el protocolo del fabricante (*Taq* DNA Polymerase protocol, Invitrogen). Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis.

Todos los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), siguiendo las normas de ética para su manejo, aprobadas por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

VIII.II Ensayos de activación

Para la cinética de activación se extrajeron los ganglios linfáticos y el timo de 3 ratones hembras silvestres ($Inh\alpha^{+/+}$) de cuatro semanas de edad. Los órganos se disgregaron mecánicamente. Las células de timo se tiñeron con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromos para los controles de compensación: α CD4 APC, α CD4 PECy5, α CD4 PE y α CD4 APCCy7. Las células se incubaron 15 min a temperatura ambiente (TA), se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 min. A partir de células de ganglio se separaron las células T “naive”

(CD4⁺ CD25⁻ CD44^{lo} CD62L^{hi}) por citometría de flujo (sorting) en el equipo MoFlow (Beckman Coulter), para lo cual se tiñeron con α CD4 APC, α CD25 PECy5, α CD44 PE y α CD62L APCCy7 durante 20 min a TA, posteriormente se lavaron, centrifugaron y se resuspendieron en PBS.

Después del *sorting*, se contaron las células “naive” obtenidas y se sembraron 300,000 células por pozo en medio RPMI complementado, en una placa de 96 pozos de fondo plano, previamente sensibilizada con *goat* α -syrian hámster [2 μ g/ml] y α CD3/ α CD28 [1 μ g/ml].

La activación de las células se analizó a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Para cada tiempo se colectaron los sobrenadantes (SN) en tubos de 0.2 ml que fueron guardados a -20°C, mientras que las células fueron teñidas con α CD4 APC, α CD25 PECy5, α CD44 PE y Aqua Zombie, por 15 min a TA. Se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 min, posteriormente se resuspendieron en Buffer Facs y se adquirieron en el citómetro Attune Nxt (Thermo Scientific).

VIII.III ELISA

Para realizar el ensayo de ELISA se utilizaron los sobrenadantes colectados en la cinética de activación, así como sobrenadantes de ensayos previos (octubre y noviembre, 2017) donde se activaron células de ratones deficientes de inhibinas.

Se utilizaron los Kit Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine y Mouse INHA (Inhibin Alpha Chain), de R&D Systems y Elabscience, respectivamente. Para cada uno se siguieron las indicaciones de cada protocolo, que de manera general consistió en preparar las soluciones de lavado (*Wash Buffer*), soluciones estándar (*substrate solution*), diluciones para la curva estándar a partir de un stock de 1000 pg/ml y 10000 pg/ml para inhibina y activina, respectivamente.

Para la ELISA de inhibina se agregó 100 μ l por pozo de cada una de las muestras de sobrenadantes y se dejó en incubación 90 min a 37°, posteriormente se retiró el líquido y se agregaron 100 μ l del anticuerpo de detección biotinilado y se incubó por 1 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, nuevamente se retiró el líquido y se

realizaron 3 lavados con la solución Buffer de lavado. Posteriormente se agregaron 100 μ l de HPR conjugado y se dejó en incubación 30 min a 37°C, se realizaron 5 lavados con la solución Buffer de lavado. A continuación se agregaron 90 μ l de solución sustrato durante 15 min a 37°C. Finalmente se agregó 50 μ l de la solución de paro (stop) y se leyó a una densidad óptica de 450 nm.

Para la ELISA de activina fue necesario preparar la placa previo a la colocación de las muestras, para ello se agregó 200 μ l de la solución de Activina A (Anticuerpo Biotinilado) y se incubó 15 min a 37°C en agitación. Se lavó 2 veces con 200 μ l de buffer de lavado. Posteriormente se agregó 100 μ l de la solución diluyente (Assay Diluent) RDI-98 y 100 μ l de las muestras correspondientes. Se incubó 3 h a 37°C en agitación, se lavó 6 veces con 200 μ l de buffer de lavado. A continuación, se agregó 200 μ l de la solución *Activin conjugate* y se dejó en incubación 1 h a TA. Se lavó 6 veces con 200 μ l de buffer de lavado y se agregó 200 μ l de la solución de sustrato, se dejó la placa con la solución 30 min a TA. Finalmente se agregó 50 μ l de la solución de paro (stop) y se leyó a una densidad óptica de 450 nm.

VIII.IV Ensayos de diferenciación Th1 y Th17 *in vitro*

Se utilizaron ratones hembras silvestres (*Inha*^{+/+}) y *knock out* (*Inha*^{-/-}) de cuatro semanas de edad. De cada ratón se realizó la extracción de ganglios linfáticos, de bazo y de timo, que se disgregaron mecánicamente. El timo se utilizó para los controles de compensación, el protocolo de tinción para separación celular fue el mismo que para la cinética de activación.

Las suspensiones celulares de los ganglios y bazo se tiñeron con α CD4 APC, α CD25 PECy5, α CD44 PE y α CD62L APCCy7 y se incubó 20 min a TA, posteriormente se lavó y se resuspendió. Para el bazo, los eritrocitos se lisaron con 1 ml de la solución ACK durante 2 min y se lavaron con PBS, previo a la incubación con el mix de tinción. Posteriormente se realizó *sorting*, eligiendo las células “naive” (CD4⁺, CD25⁻ CD44^{lo} CD62L^{hi}).

Después del *sorting*, se contaron las células “naive” obtenidas, en cámara de Neubauer y se tiñeron con CellTrace Violet (CTV) durante 15 min a 37°C, seguido

de dos lavados con medio RPMI 10% de FBS. Posteriormente se cultivaron 300 mil células por pozo con las tres condiciones correspondientes (**Tabla 3**), en una placa de 96 pozos con fondo plano, previamente sensibilizada con *goat* α -syrian hamster [2 μ g/ml] y α CD3/ α CD28 [1 μ g/ml]. Las células se cultivaron a 37° durante 72 h.

Tabla 2. Citocinas y condiciones utilizadas para la diferenciación hacia células T efectoras. Se utilizó medio RPMI complementado con FBS, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y mercaptoetanol para cultivar las células sin cóctel de diferenciación, así mismo, para preparar cada cóctel de diferenciación. Cada condición se realizó por duplicado. Se siguieron las condiciones previamente reportadas por Christine M. *et al.*, (2014) [81].

FENOTIPO	CONDICIONES		
	Sin citocinas	Cóctel de diferenciación	Cóctel de diferenciación + Inhibina recombinante
Th1	-----	IL-12 [10 ng/ ml] + α IL-4 [5 μ g/ml]	Inhibina Recombinante 100 pg/ml
Th17	-----	IL-23 [10 ng/ ml] + α IL-4 [5 μ g/ml] + IL-6 [20 ng/ ml] + α IFN γ [10 μ g/ ml] + TGF- β [1.5 ng/ ml]	Inhibina Recombinante 100 pg/ml

A las 72 h se realizó una reestimulación con PMA [40ng/ml] - Ionomicina [400 ng/ml] y Brefeldina A [0.5 μ l/ 1x10⁶ células], y se incubó 5 h a 37°. Después del tiempo de incubación se tiñó superficialmente con α CD4 y con el marcador de viabilidad Zombie NIR durante 20 min a TA, posteriormente se lavaron las células con PBS. A continuación se realizó la permeabilización con FIX PERM 1X (Tonbo) durante 1h a TA, después del lavado con PermBuffer (Tonbo), se bloquearon sitios Fc con α CD16/32 (Fc Block) durante 20 min a 4°C. Finalmente se realizó la tinción intracelular con α IFN γ para Th1 o α IL17 para Th17 durante 30 min a 4°C, después de los lavados con PERM Buffer, las células se resuspendieron con Buffer Facs y se mantuvieron a 4°C hasta su lectura en el citómetro.

VIII.V Citometría de flujo

Para los ensayos realizados se utilizaron distintos anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos (**Tabla 4**), así como marcadores de viabilidad, Aqua Zombie (Biolegend) y Zombie Nir (Biolegend), los cuales son colorantes

fluorescentes permeables a células con daño en su membrana superficial. En los cultivos de diferenciación se utilizó CTV (Biolegend) para evaluar la proliferación.

Las tinciones se llevaron a cabo a TA durante 20 – 30 min, después de los lavados con buffer FACS, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 min, se lavaron y se mantuvieron en buffer de FACS hasta su adquisición.

Las separaciones celulares (sortings) y adquisiciones se realizaron en los equipos Mo Flow (Beckman Coulter) y Attune Nxt (Thermo Scientific), respectivamente, ubicados en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo. Los datos generados fueron analizados con el software FlowJo (X). Para las adquisiciones realizadas en el citómetro Attune Nxt, en la tabla 4 se muestran los canales y láseres usados para cada fluorocromo.

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales. Se muestra la molécula blanco y el fluorocromo a la que está acoplada, para cada anticuerpo se muestra la clona, marca y para los anticuerpos utilizados en tinciones adquiridas en el citómetro *Attune Nxt*, se muestra en que láser y canal se leyeron.

Molécula blanco	Fluorocromo	Clona	Marca	Láser	Canal
CD4	APC	GK1.5	BIOLEGEND	Rojo	RL1
	PE	GK1.5	BIOLEGEND	Amarillo	YL1
	PECy5	GK1.5	TONBO	Amarillo	YL3
	APC Cy7	RM4-5	TONBO	Rojo	RL3
CD25	PECy5	PC61	BIOLEGEND	Amarillo	YL3
CD44	PE	IM7	BIOLEGEND	Amarillo	YL1
CD62L	APC Cy7	MEL-14	BIOLEGEND	Rojo	RL3
IFN- γ	BV510	XMG1.2	BIOLEGEND	Violeta	VL2
IL-17	PE	TC11-18H10.1	BIOLEGEND	Amarillo	YL1
CD3	PURO	145-2C11	TONBO		
CD28	PURO	37.51	TONBO		
SYRIAN HAMSTER	PURO	Poly4056	BIOLEGEND		

VIII.VI Análisis estadístico

Todos los resultados son mostrados como promedios de cada uno de los experimentos. Para evaluar las diferencias entre los ratones silvestres ($Inh\alpha^{+/+}$) y deficientes de inhibina ($Inh\alpha^{-/-}$) se calculó la significancia mediante una prueba *t de Student* no pareada utilizando el software de análisis GraphPad. Los datos con $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

IX. RESULTADOS

IX.I Genotipificación de ratones deficientes en inhibina

El genotipo de los ratones se determinó por PCR, utilizando el PRIMER Hprt3 para el alelo mutante de inhibina α $Inh\alpha^{-/-}$, y el PRIMER E2-EX2 para el alelo silvestre $Inh\alpha^{+/+}$, ambos comparten el primer que replica la región del intrón. La reacción de PCR se realizó a partir de DNA extraído de un pequeño fragmento de cola de los ratones WT ($Inh\alpha^{+/+}$) y KO ($Inh\alpha^{-/-}$), se realizaron reacciones con las muestras WT y KO por separado para cada ratón. Las amplificaciones se analizaron por electroforesis y usando el equipo *Image Lab (BIO-RAD)*. Los ratones silvestres muestran una banda (WT) de alrededor de 500 pb, los ratones deficientes muestran una banda (KO) de alrededor de 800 pb y los ratones en heterocigosis (HT) muestran ambas bandas.

En el gel de agarosa (**Figura 14**) se muestran las amplificaciones representativas de tres ratones y un control negativo en donde se utilizó agua en lugar de muestra de DNA. Se realizó una reacción WT y otra KO, en el gel se muestran por separado. De manera que los primeros cuatro pozos corresponden a la reacción WT, donde solo los ratones 7077 y 7088 muestran la banda de 500 pb, los siguientes cuatro pozos corresponden a la reacción KO, y solo los ratones 7087 y 7088 muestran la banda de 800 pb, por lo que el ratón 7077 corresponde a un ratón silvestre, el ratón 7087 es deficiente de inhibina y el ratón 7088 es heterocigoto (HT). Todos los ratones utilizados en este trabajo, fueron genotipificados previamente.

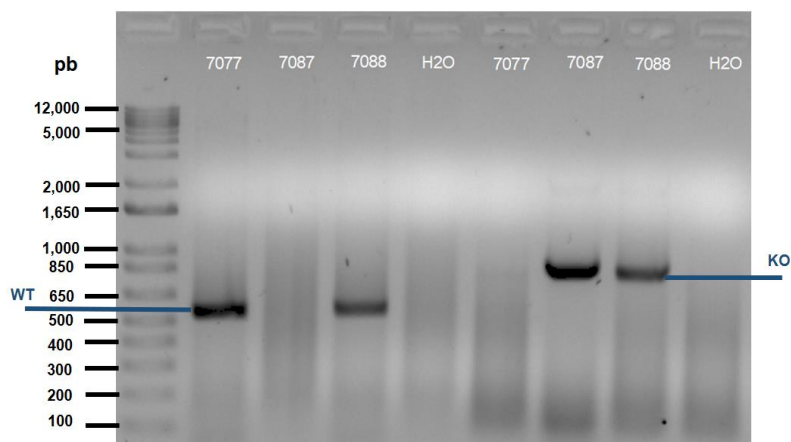


Figura 14. Genotipo de ratones silvestres y knock-out. Ejemplo de amplificados de las reacciones WT, correspondiente a la banda de 500 pb y KO, correspondiente a la banda de 800 pb, para los ratones 7077 ($Inh\alpha^{+/+}$), 7087 ($Inh\alpha^{-/-}$) y 7088 ($Inh\alpha^{+/-}$).

IX.II Activación de linfocitos T

Con la finalidad de evaluar la producción de inhibina y activina durante la activación de linfocitos T, se realizaron cultivos de activación. La cinética de activación se realizó a partir de linfocitos T “naive” ($CD4^+ CD25^- CD44^{lo} CD62L^{hi}$) aislados de ganglios linfáticos de ratones silvestres. Para la identificación y purificación de las células por *sorting*, es necesaria su caracterización fenotípica mediante marcadores moleculares que pueden estar presentes o ausentes. Para aislar los linfocitos T “naive” por *sorting*, se identificaron las células como $CD4^+ CD25^- CD44^{lo} CD62L^{hi}$, para lo que las células de ganglio se tiñeron con los anticuerpos $\alpha CD4$ APC, $\alpha CD25$ PECy5, $\alpha CD44$ PE y $\alpha CD62L$ APCCy7 durante 20 min a TA, posteriormente se lavaron, centrifugaron y se resuspendieron en PBS, para su posterior purificación mediante separación celular en el citómetro Mo Flow (Beckman Coulter).

Los linfocitos T “naive” se cultivaron en una placa previamente sensibilizada con 2 $\mu g/ml$ de *goat* α -syrian hámster Ig (H+L) y 1 $\mu g/ml$ de $\alpha CD3 + \alpha CD28$ pegado a placa. Se colectaron los sobrenadantes a las 0 y 12 h y después cada 24 h durante cinco días. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromos: $\alpha CD4$ APC, $\alpha CD25$ PECy5 y $\alpha CD44$ PE, así como Aqua Zombie (AZ), colorante de viabilidad que tiñe a las células muertas. Las muestras se adquirieron

en el citómetro Attune Nxt, utilizando los canales RL1, VL2, YL3 y YL1 para los fluorocromos APC, AZ, PECy5 y PE, respectivamente.

Para evaluar los marcadores de activación CD25 y CD44, la estrategia de análisis fue determinar los eventos simples, a partir de estos, las células sin *debris*, posteriormente el “*gate*” de células vivas se realizó con base a las células negativas para AZ, a partir de éste se eligieron las células CD4⁺ y a partir de éstas, las células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD44⁺ (**Figura 15**).

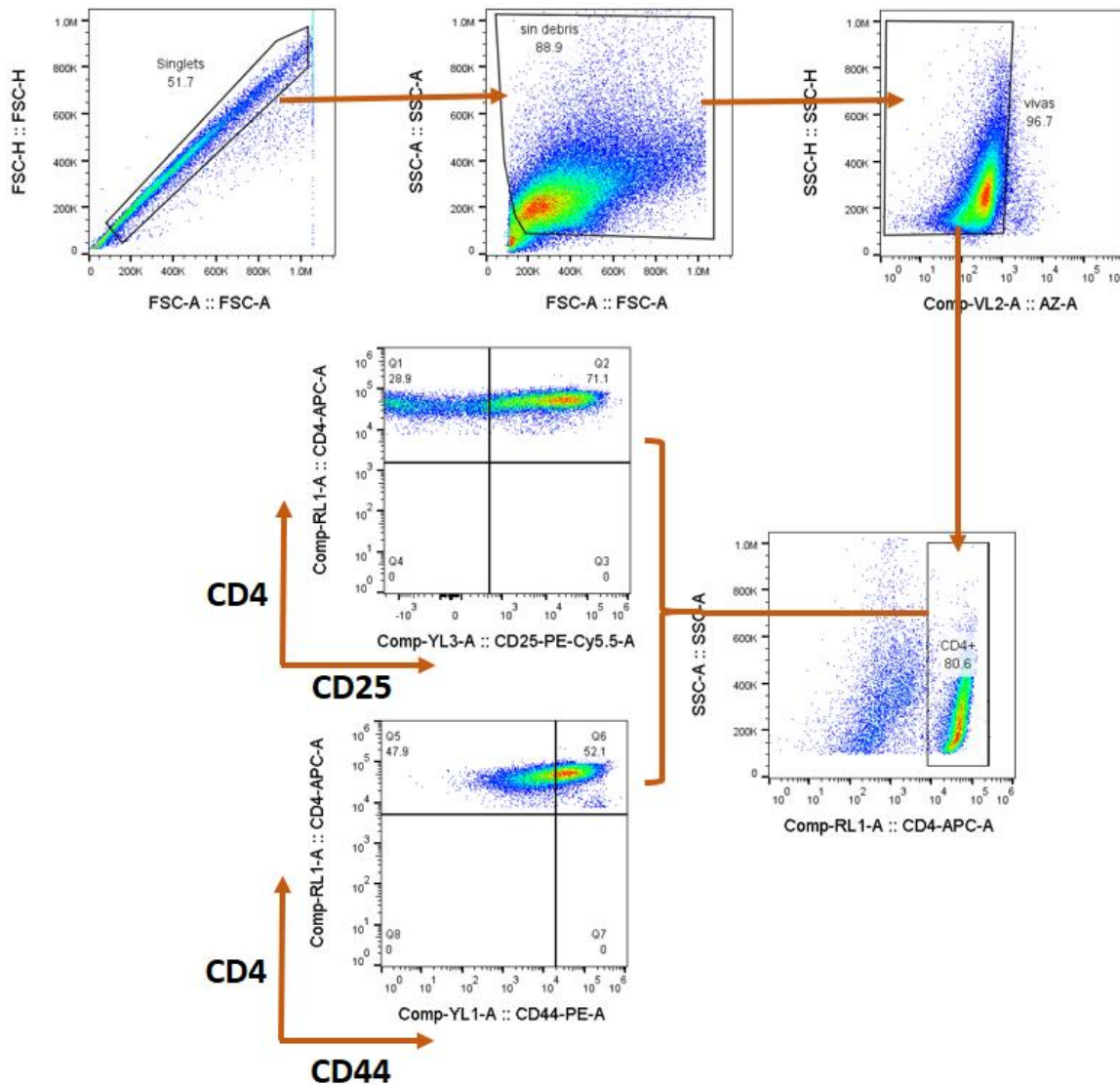


Figura 15. Estrategia de análisis para CD25 y CD44. Primero se escogieron los eventos simples, seguido de las células sin *debris*, a partir de esta región se determinó las células vivas, seguido de las células CD4⁺, y a partir de éstas, las células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD44⁺.

A partir de las células vivas CD4⁺ se evaluó el porcentaje de células que expresaban CD44 y CD25 a diferentes tiempos, en la figura **16a y b** se muestran los *Dot plots* representativos de células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD44⁺, respectivamente, la población positiva se estableció con base a las 0 h, observando una mayor expresión para ambos marcadores de activación entre las 48 y 72 h. En los incisos **c y d**, se muestran los histogramas representativos de la expresión de CD25 y CD44 a diferentes tiempos. La mayor expresión de CD25⁺ se da a las 48 h (**Figura 16e**), a diferencia de CD44⁺ que muestra un pico de expresión a las 72 h (**Figura 16g**). Las figuras **16f, h** muestran la gráfica de la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de la expresión de CD25 y CD44, respectivamente, a diferentes tiempos. Los gráficos muestran el promedio de tres repeticiones y el análisis estadístico de incremento en la expresión se obtuvo con relación al tiempo 0. Para ambos marcadores se observa un incremento a partir de las 24 h de activación y tienen un pico de expresión a las 72 h. Al analizar la viabilidad, se observó que el porcentaje de viabilidad va disminuyendo con el tiempo.

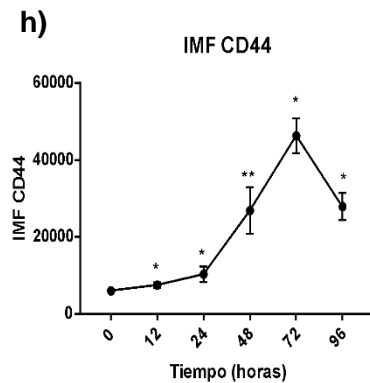
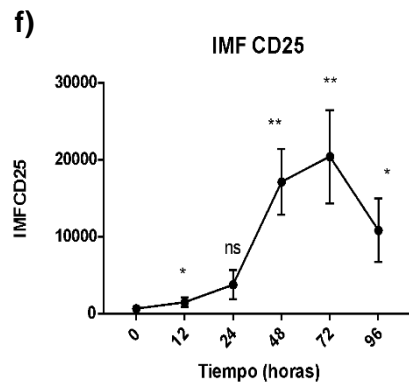
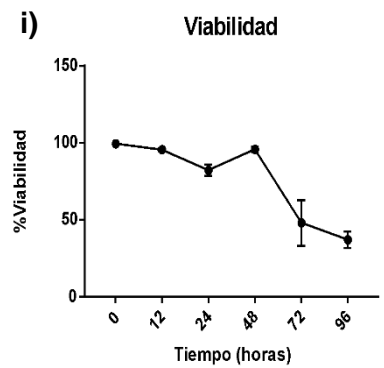
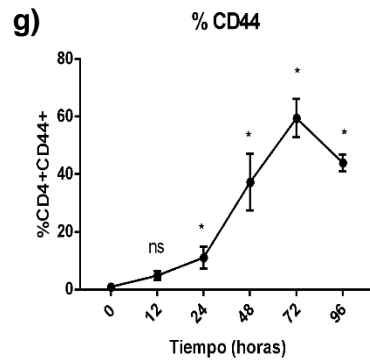
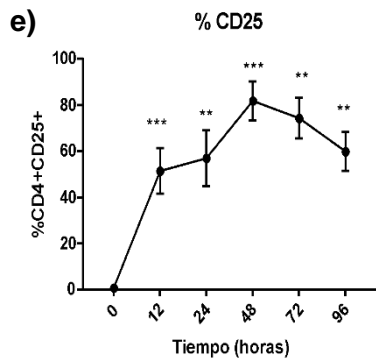
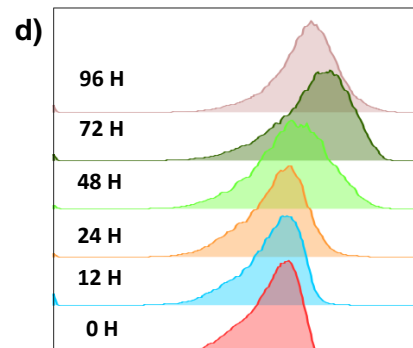
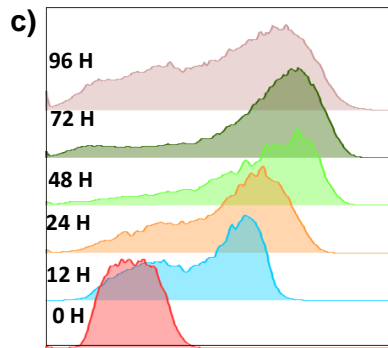
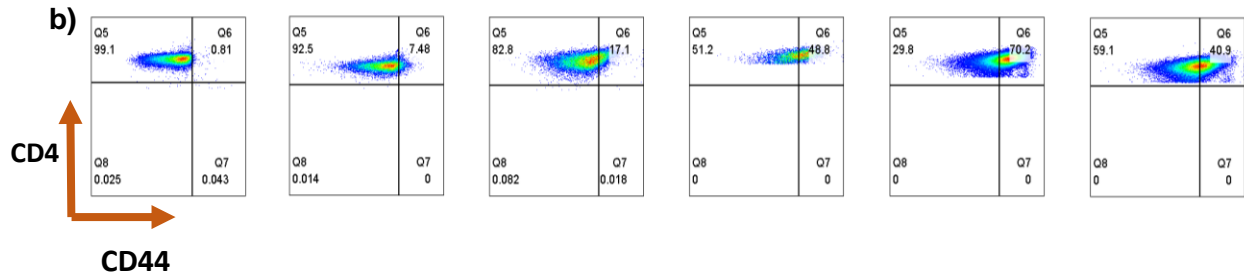
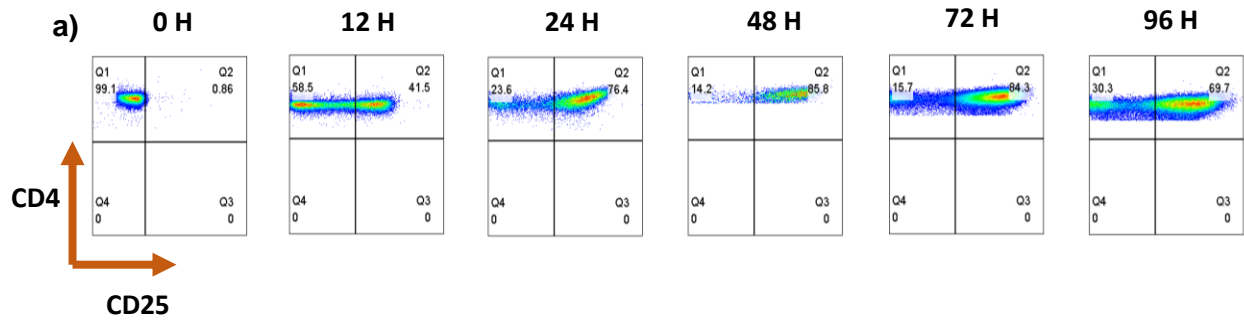


Figura 16. . Expresión de CD25 y CD44 en linfocitos T CD4+ activados de ratones silvestres (Inha^{+/+}). La expresión de CD25 y CD44 se analizó a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 h en células T “naïve” aisladas y activadas con α CD3/ α CD28 (1 μ g/ml). **a y b)** Dot plots representativos de la expresión de CD25 y CD44 para cada tiempo analizado. **c y d)** Histogramas representativos de la expresión de CD25 y CD44. **e – h)** Gráficas de la expresión de CD25 y CD44. **e)** Porcentaje de células CD25⁺, **f)** MFI para CD25, **g)** Porcentaje de células CD44⁺, **h)** IMF de células CD44. **i)** Gráfica representativa del porcentaje de viabilidad. **n=3**
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

IX.III Producción de inhibina y activina

Con la finalidad de evaluar la producción de inhibina y activina después de la activación de linfocitos T “naïve”, se realizó la técnica de ELISA. Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de la cinética de activación previamente descrita, además de sobrenadantes de ensayos previos. Se utilizaron los Kit Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine y Mouse INHA (Inhibin Alpha Chain), de R&D Systems y Elabscience, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos ensayos se leyeron a una densidad óptica de 450 nm.

Las soluciones de la curva estándar se realizaron a partir de un stock de 1,000 pg/ml y 10,000 pg/ml para inhibina y activina, respectivamente y se colocaron por duplicado. Con los valores obtenidos de la densidad óptica (OD), se obtuvieron los valores promedio para cada concentración (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 0 pg/ml), de los valores obtenidos de los promedios para cada concentración, se le restó el promedio de la densidad óptica a la concentración 0 pg/ml, con estos valores se realizó la curva estándar para inhibina (**Figura 17a**).

A partir de los valores obtenidos de restar el promedio de la concentración 0 pg/ml a los promedios para cada concentración, se calculó el logaritmo base 10 (LOG10), así como a cada una de las concentraciones (1000 pg/ml, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 0), ambos valores se graficaron para obtener la curva estándar linealizada (**Figura 17b**). A partir de la ecuación de la línea recta obtenida, se interpolaron los datos de densidad óptica de las muestras y se obtuvieron los valores de concentración de inhibina de las muestras, basados en la densidad óptica.

En la gráfica 19 se muestra la producción de inhibina en concentración de pg/ml respecto al tiempo, bajo condiciones de activación óptima α CD3/ α CD28 (1 μ g/ml). La producción de inhibina comienza a incrementar a las 12 h y muestra un pico de producción a las 24 h (**Figura 17c**).

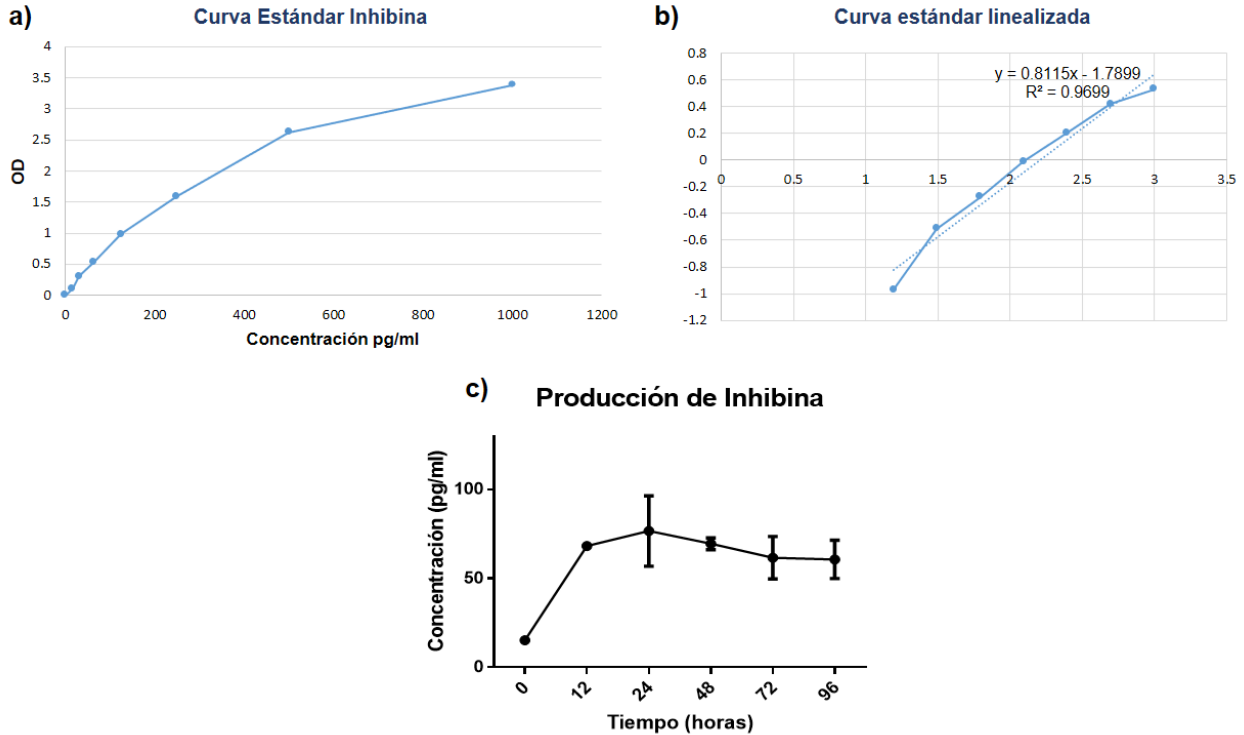


Figura 17. . Producción de inhibina. A partir de linfocitos T “naive” aislados de ganglios de ratones silvestres (Inh $\alpha^{+/+}$), y activados policlonalmente, se colectaron los sobrenadantes a 6 tiempos diferentes de activación, con los cuales se realizó ELISA para determinar la producción en diferentes tiempos. **a)** Curva estándar de inhibina. **b)** Curva estándar linealizada. **c)** Gráfica de producción de inhibina en concentración pg/ml.

La curva estándar (**Figura 18a**) y curva estándar linealizada (**Figura 18b**) de la ELISA de activina, se realizaron como las curvas de inhibina. Se muestra la producción de activina en concentración de pg/ml respecto al tiempo, bajo condiciones de activación óptima anti-CD3 y anti-CD28 (1 μ g/ml). La producción de activina comienza a incrementar a las 48 h y muestra un pico de producción a las

96 h en los ratones silvestres, mientras que para los ratones *knock-out* el pico de producción es de 48 h (**Figura 18c**). No se observó diferencia significativa en la producción de esta citocina entre los ratones silvestres y los ratones *knock-out*.

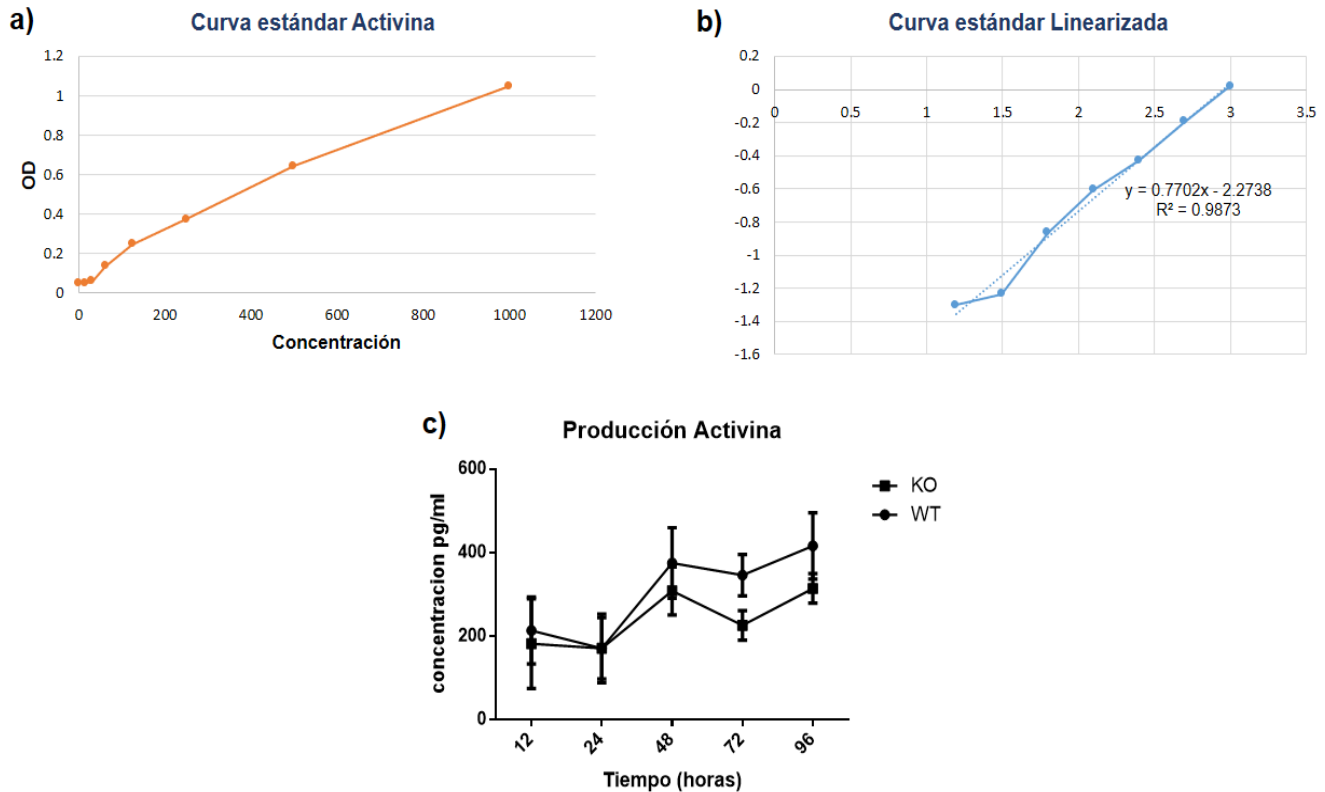


Figura 18. Producción de Activina A. A partir de sobrenadantes colectados de células T de ratones silvestres ($Inha^{+/+}$) y deficientes de inhibina ($Inha^{-/-}$), a 0 y 12 horas, y cada 24 h durante 5 días más, se realizó ELISA para determinar la producción de activina, **a)** Curva estándar de activina. **b)** Curva estándar linearizada. **c)** Gráfica de producción de Activina A en concentración pg/ml.

IX.IV Diferenciación de células Th1

IX.IV.I Las inhibinas regulan negativamente la diferenciación de células Th1.

Con la finalidad de evaluar el efecto autocrino de las inhibinas durante la diferenciación funcional hacia Th1, se aislaron linfocitos T “naïve” de ratones hembras WT ($Inha^{+/+}$) y KO ($Inha^{-/-}$) de 4 semanas, y se cultivaron en una placa sensibilizada con *goat* α -syrian hamster [1ug/ml] y anti-CD3 y anti-CD28 [2ug/ml]

pegado a placa. En el cultivo se mantuvieron 3 condiciones: células con un cóctel de citocinas de IL-12 [10 ng/ ml] + α IL-4 [5 μ g/ml]; células con el cóctel más inhibina recombinante [100 pg/ml] y células sin el cóctel de diferenciación ni inhibina recombinante.

Al tercer día de cultivo se realizó una tinción superficial e intracelular, después de re-estimular con PMA [40ng/ml] y Ionomicina [400 ng/ml] y bloquear el tráfico vesicular con Brefeldina A [0.5 μ l/ 1×10^6 células]. Posteriormente, se adquirieron las muestras en el equipo Attune Nxt (Thermo Scientific).

Los datos generados, se analizaron en el software FlowJo X, primero se determinaron los eventos simples, seguido de una región de tamaño contra granularidad para seleccionar las células excluyendo los debris, posteriormente se escogieron las células vivas que son negativas para Zombie Nir, de esta región se escogió las células CD4⁺ y de estas las proliferantes que producían IFN- γ (**Figura 19**).

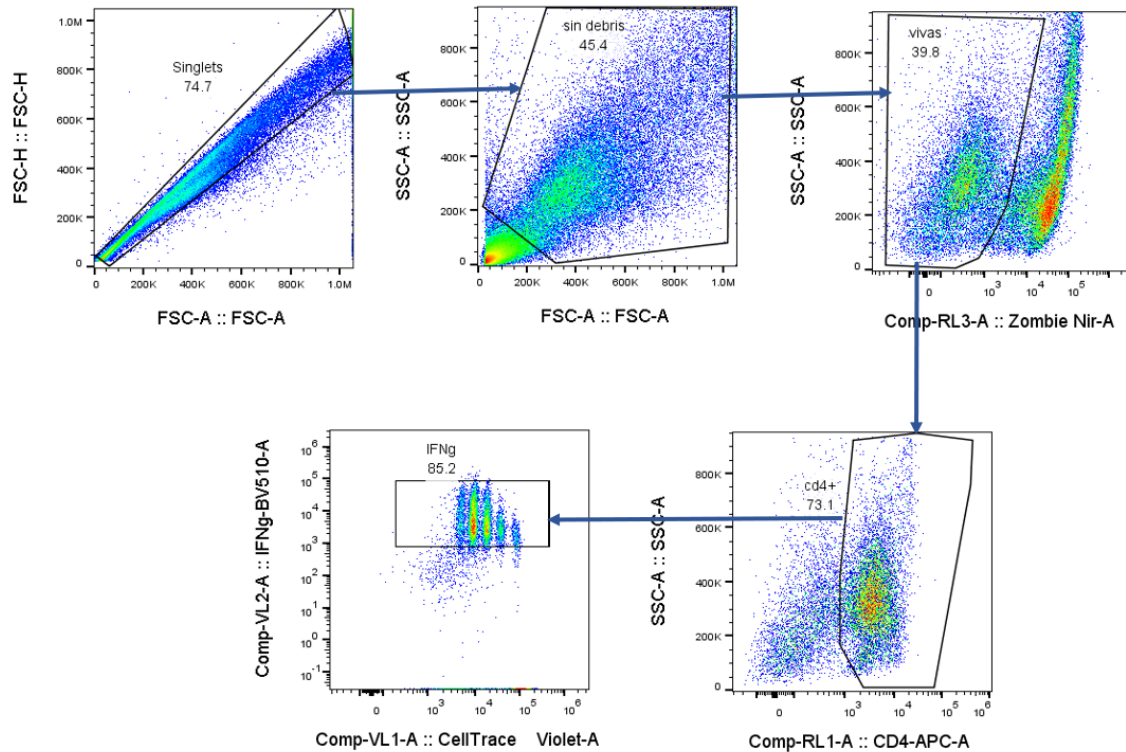


Figura 19. Estrategia de análisis para determinar la población Th1. Se evaluó la diferenciación hacia el linaje efector Th1 a partir de linfocitos T “naive” ($CD4^+$, $CD25^+$, $CD62L^{hi}$, $CD44^{lo}$), cultivados en presencia del cóctel de citocinas correspondiente. Para su análisis, primero se determinaron los eventos simples, seguidos de las células sin debri, de esta región se seleccionaron las células negativas para Zombie Nir, seguido de las células $CD4^+$ y finalmente las células proliferantes que expresaban IFN- γ .

Se evaluó la diferenciación hacia células Th1 a partir de células “naive” obtenidas de ratones $Inh\alpha^{+/+}$ e $Inh\alpha^{-/-}$, el porcentaje de diferenciación Th1 se determinó como células $CD4^+$ proliferantes y productoras de IFN γ , se muestran los *dot plots* representativos de células proliferantes $CD4^+CTV^+IFN\gamma^+$ de ratones silvestres y deficientes bajo las diferentes condiciones analizadas: primero sin cóctel de diferenciación, luego bajo condiciones polarizantes Th1 (cóctel de diferenciación) y por último, con el cóctel de diferenciación más inhibina recombinante (**Figura 20a**). Se analizó la expresión de IFN γ normalizando a un valor de 1 la expresión de los ratones silvestres, por lo que se muestran los valores como incremento relativo (IR). Con el cóctel de diferenciación, se observa una disminución significativa hacia el linaje Th1 en las células $Inh\alpha^{-/-}$, en comparación con las células $Inh\alpha^{+/+}$; sin embargo,

al agregar a estos cultivos de diferenciación la inhibina recombinante exógena, se observa una tendencia hacia el incremento en el porcentaje de células productoras de IFN γ , en células Inh $\alpha^{-/-}$, mientras que en células Inh $\alpha^{+/+}$ se observa una ligera disminución (**Figura 20b**). También se muestra la gráfica de intensidad media de fluorescencia de IFN γ (IMF) (**Figura 20C**), no se observan diferencias entre la IMF de IFN γ entre los ratones silvestres y deficientes de inhibina, tampoco reconstituyendo el sistema con inhibina recombinante. Así mismo, al analizar la viabilidad, se observó que las células Inh $\alpha^{-/-}$ presentan una tendencia a incrementar el porcentaje de viabilidad respecto a las células Inh $\alpha^{+/+}$ (**Figura 20d**), esta tendencia no se observa cuando se agrega a los cultivos inhibina recombinante exógena.

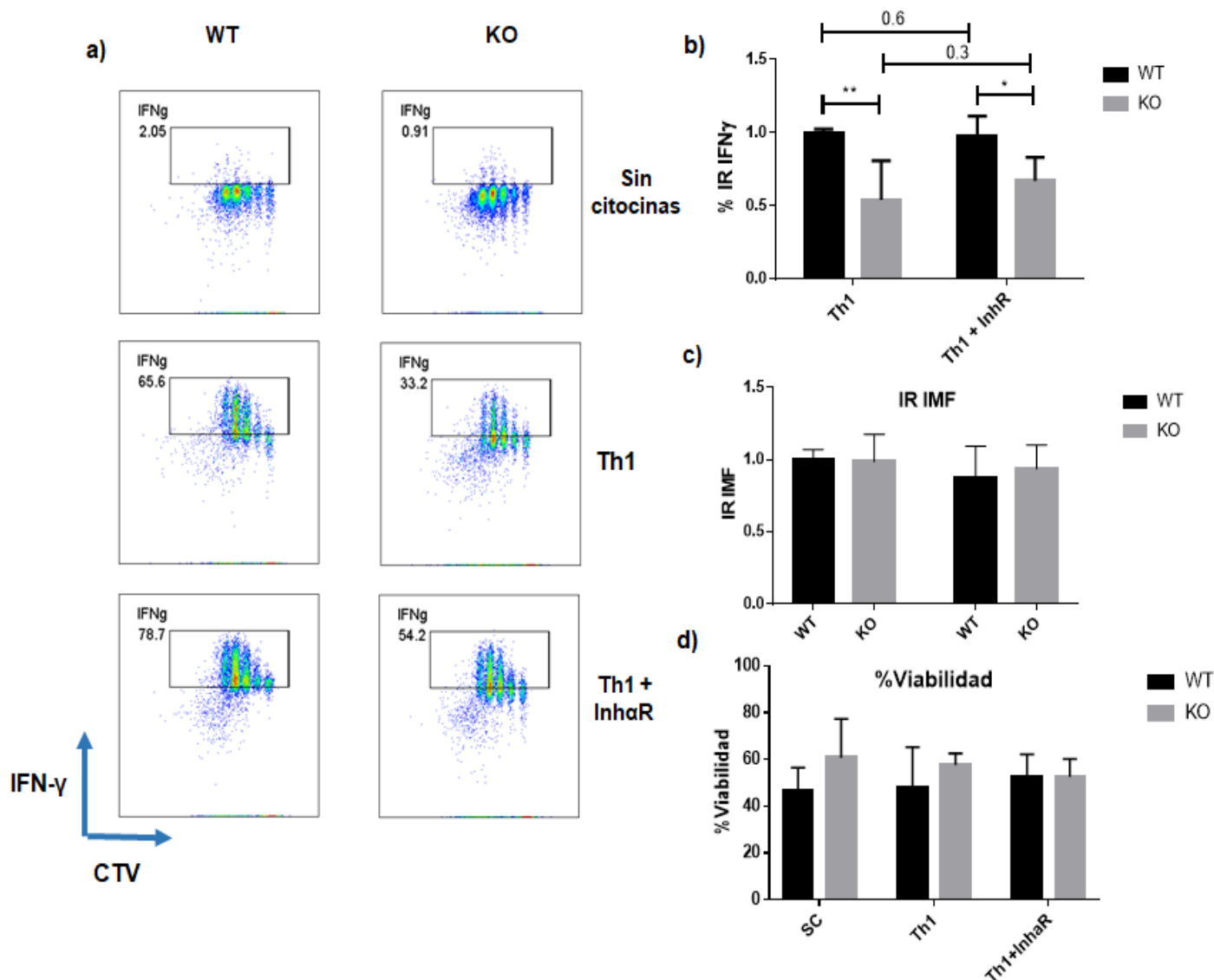


Figura 20. Diferenciación hacia linfocitos Th1 en presencia de Inhibina recombinante exógena. Se muestran gráficas representativas de 3 experimentos independientes, cada uno con las 3 condiciones por duplicado. **a)** Dot plots representativos de células CD4⁺CTV⁺IFN γ ⁺ de ratones silvestres y deficientes bajo las tres condiciones analizadas. **b)** Gráfica de incremento relativo (IR) respecto al WT. **c)** Gráfica de IR de IMF de IFN γ **d)** Gráfica de porcentaje de viabilidad expresado como media +/- SE. Análisis estadístico t de Student. n=3 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

IX.V Diferenciación de células Th17

IX.V.I Las inhibinas disminuyen la diferenciación de células Th17

Con la finalidad de evaluar el efecto intrínseco de las inhibinas durante la diferenciación hacia linfocitos Th17, se aislaron linfocitos T “*naive*” de ratones hembras WT ($Inh\alpha^{+/+}$) y KO ($Inh\alpha^{-/-}$) de 4 semanas, y se activaron en ausencia de células presentadoras, es decir, mediante anti-CD3 y anti-CD28 [2ug/ml] pegado a placa, en presencia del cóctel de citocinas para inducir la diferenciación de células Th17. Después de 3 días de cultivo, se re-estimularon con PMA-ionomicina y se realizó un bloqueo del tráfico vesicular con Brefeldina A para favorecer la acumulación intracelular de citocinas. Posteriormente, se realizó la tinción superficial y después de permeabilizar, una tinción intracelular, para su análisis por citometría de flujo. Las muestras se adquirieron en el equipo Attune Nxt y fueron analizados en el software FlowJo, siguiendo la misma estrategia de análisis que Th1, a partir de las células vivas CD4+, se analizaron las células proliferantes y productoras de IL-17 (**Figura 21**).

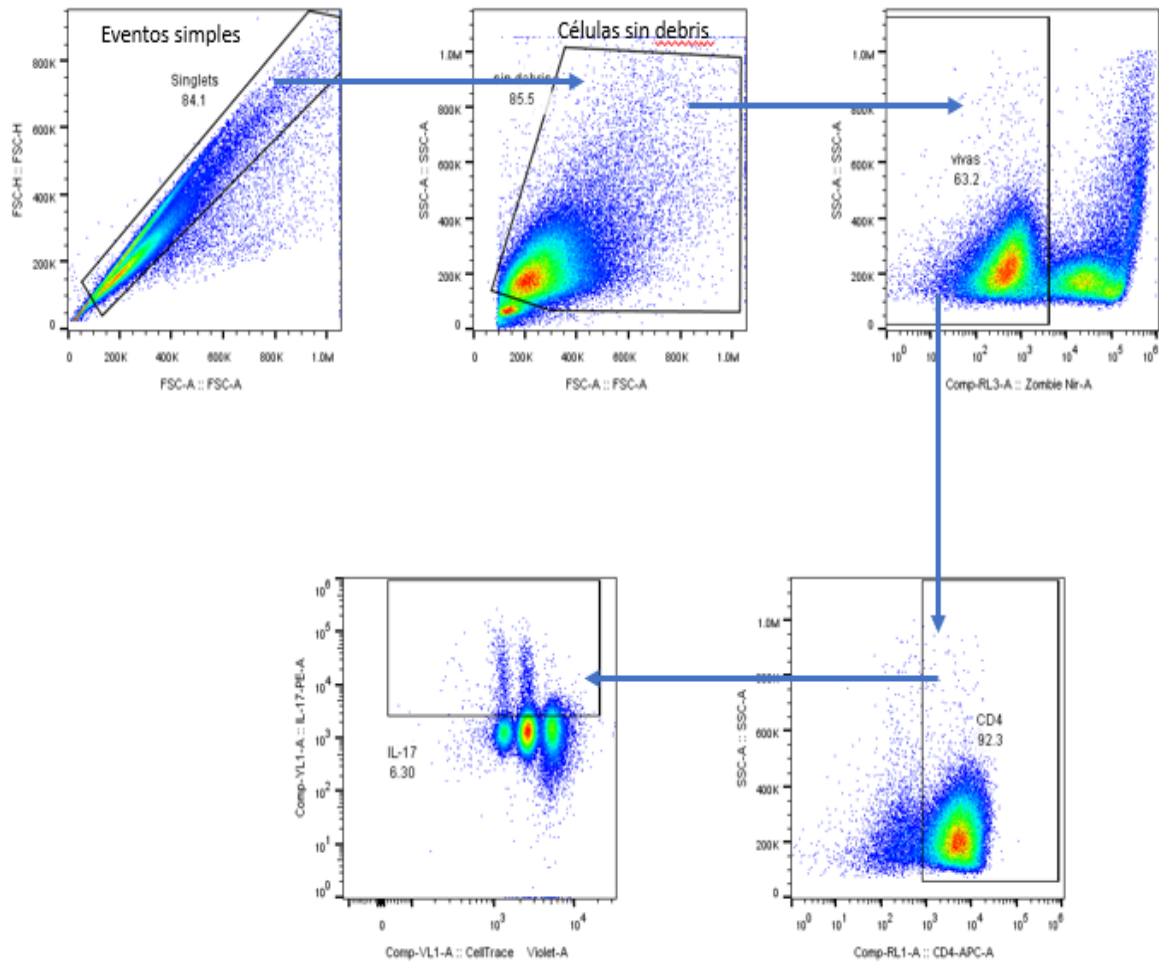


Figura 21. Estrategia de análisis para la evaluación de la diferenciación hacia Th17. Se evaluó la diferenciación de células T a partir de linfocitos T “naïve” ($CD4^+CD25^+CD62L^{hi}CD44^{lo}$), cultivados en presencia del cóctel de citocinas polarizantes para Th17. Para su análisis, primero se determinaron los eventos simples, seguidos de las células *sin debris*, de esta región se seleccionaron las células negativas para Zombie Nir, seguido de las células $CD4^+$ y finalmente las células proliferantes que expresaban IL-17, en base a la dilución de la marca Cell trace violet.

Se evaluó la diferenciación hacia células Th17 a partir de células “naïve” obtenidas de ratones $Inh\alpha^{+/+}$ e $Inh\alpha^{-/-}$, el porcentaje de diferenciación hacia Th17 se determinó como el porcentaje de células $CD4^+$ productoras de IL-17. En la **Figura 22a**, se muestran los dot plots representativos de células proliferantes $CD4^+CTV^+IL-17^+$ de ratones silvestres y deficientes de inhibinas bajo las diferentes condiciones evaluadas. Se analizó la expresión de IL-17 normalizando a un valor de 1 la expresión de los ratones silvestres, por lo que se muestran los valores como

incremento relativo (IR). Con el cóctel de diferenciación, se observa un incremento significativo hacia el linaje Th17 en las células $Inh\alpha^{-/-}$, en comparación con las células $Inh\alpha^{+/+}$; sin embargo, al agregar el cóctel de diferenciación con inhibina recombinante, se observa una disminución significativa de células $Inh\alpha^{-/-}$ productoras de IL-17 en comparación a la condición donde no se añadió inhibina exógena. Por otro lado, en las células $Inh\alpha^{+/+}$ también se observó una ligera disminución del porcentaje de Th17 cuando se agregó inhibina exógena al cultivo, aunque la diferencia no fue significativa (**Figura 22b**). También se muestra la gráfica de intensidad media de fluorescencia (IMF) de IL-17 (**Figura 22C**) donde no se observan diferencias significativas en la IMF de IL-17 entre las diferentes condiciones evaluadas. Así mismo, al analizar la viabilidad, se observaron porcentajes de viabilidad similares entre las células $Inh\alpha^{-/-}$ e $Inh\alpha^{+/+}$ (**Figura 22d**), excepto que, en condiciones sin cóctel de diferenciación, también se observa una tendencia a incrementar la viabilidad de las células deficientes de inhibina.

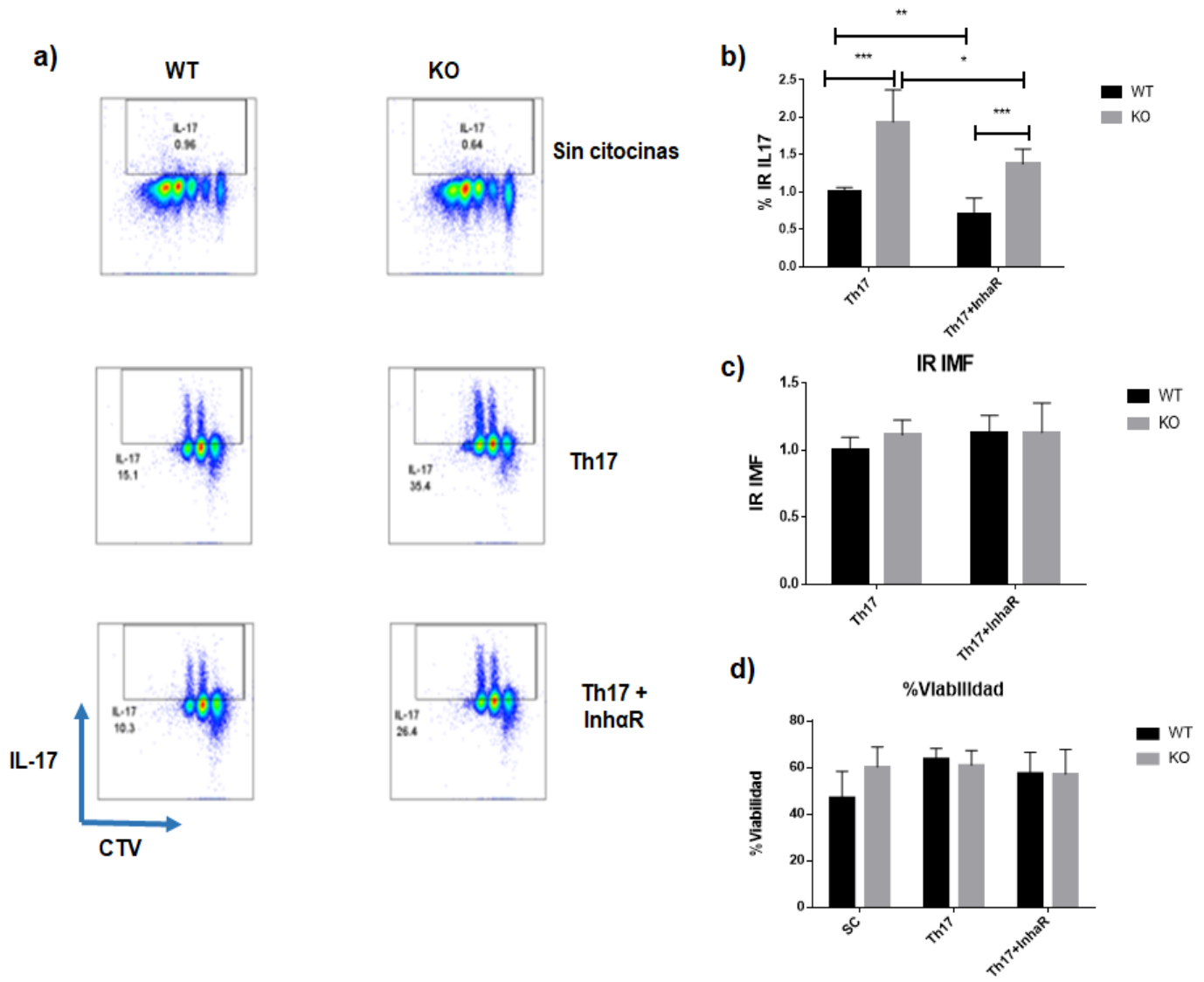


Figura 22. Diferenciación hacia linfocitos Th17. Se muestran gráficas representativas de 4 experimentos independientes, cada uno con las 3 condiciones de estimulación por duplicado. **a)** Dot plots representativos de células CD4⁺CTV⁺IL-17⁺ de ratones silvestres y deficientes en Inhibina α , bajo las diferentes condiciones evaluadas. **b)** Gráfica de incremento relativo de porcentaje de diferenciación (IR) respecto al WT. **c)** Gráfica representativa de IMF de IL-17. **d)** Gráfica de porcentaje de viabilidad. Las gráficas muestran el promedio. Análisis estadístico *t de student*. n=4 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

X. DISCUSIÓN

Después de evaluar la expresión de las inhibinas en timo [66] y observar que regulan puntos de control específicos durante el desarrollo de los timocitos [67], se evaluó si las inhibinas también tenían un papel funcional en los linfocitos T en periferia. Se sabe que la activación y diferenciación de las células T CD4⁺, está dada por diferentes factores, como la cantidad de señales que recibe al reconocer su antígeno, especialmente la fuerza de la estimulación a través del TCR, así como por factores solubles, como las citocinas del microambiente en el que se encuentren [82, 83].

Después de la activación por el reconocimiento del antígeno y la coestimulación, hay cambios en la expresión de moléculas de superficie, que participan en las respuestas funcionales de los linfocitos. Dichas moléculas o marcadores de activación, se expresan diferencialmente por las células que responden dependiendo del contexto de citocinas y señales presentes [82]. Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, donde se evaluó la expresión del betaglicano (TβRIII) y marcadores típicos de activación en linfocitos T de ratones *Inhα^{-/-}* y ratones *Inhα^{+/+}*, se observó que los niveles del TβRIII incrementan cuando los linfocitos T *Inhα^{+/+}* se activan, de manera paralela a otros marcadores de activación tales como CD25, CD69 y CD44, pero en linfocitos T de ratones deficientes (*Inhα^{-/-}*) se observa una menor expresión de TβRIII en comparación con las células de ratones *Inhα^{+/+}*, además de un retraso en la activación temprana, al mostrar una disminución significativa de CD25 y CD69 respecto a linfocitos *Inhα^{+/+}*.

Estos datos podrían indicar que la diferenciación preferencial hacia el linaje Th17 de los linfocitos T “naive” *Inhα^{-/-}* podría estar reflejando una disminución en las señales de activación del linfocito T, lo cual previamente se ha demostrado que favorece Th17 versus Th1 [72].

Posteriormente, se evaluó el papel de las inhibinas en la diferenciación de linajes efectores, observando una disminución en la diferenciación hacia el linaje Th1 y un incremento hacia Th17 en comparación con las células de ratones *Inhα^{+/+}*. Esto

permitió proponer que las inhibinas tienen un papel importante durante la activación de los linfocitos T y modulan la expresión del T β RIII durante la activación [72]. Debido a que la inhibina es una proteína de secreción, a continuación nos preguntamos si la inhibina podría ser producida por los mismos linfocitos T y si esta podría ejercer un efecto autocrino, particularmente en la diferenciación de células T efectoras. Para saber si los efectos observados se debían a un proceso autocrino, en este trabajo evaluamos por primera vez la producción de inhibina en sobrenadantes de cultivo de células $\text{Inh}\alpha^{+/+}$, así como la producción de activina en células $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ y $\text{Inh}\alpha^{-/-}$, bajo una activación óptima. Para ello fue necesario realizar una cinética de activación a partir de linfocitos T “naïve” activados policlonalmente bajo una concentración óptima con anti-CD3 y anti-CD28 [1 μ g/ml], se evaluó el porcentaje de células de ratones $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ que expresaban los marcadores CD44 y CD25 a diferentes tiempos. Como se muestra en la **Figura 16** los marcadores de activación CD25⁺ (**Figura 16a**) y CD44⁺ (**Figura 16b**), muestran un pico de expresión máxima de 48h para CD25 (**Figura 16e**) y de 72 h para CD44 (**Figura 16g**), coincidiendo con lo reportado anteriormente [72].

La producción de Activina A por parte de linfocitos T activados había sido previamente reportada en varios estudios en los que se evidenció que su producción se correlaciona con su capacidad de diferenciarse hacia el linaje Th2 *in vitro*, por lo cual se ha considerado a la Activina como una nueva citocina Th2 [55, 64]. Sin embargo, aún no había sido reportada la expresión de inhibina por parte de los linfocitos T activados.

En este sentido, resultados previos no publicados de nuestro grupo de trabajo, mostraron que los linfocitos T $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ bajo una activación subóptima con 1 μ g/ml de anti-CD3 pegado a placa y 2 μ g/ml de anti-CD28 soluble, tienen un pico de producción de inhibina a las 96 h, previo al pico de producción de activina [Tesis de doctorado Marisol de la Fuente 2019]. Debido a esto se evaluó la producción de inhibina y activina mediante ELISA, bajo activación policlonal con anti-CD3 y anti-CD28 (1 μ g/ml) pegado a placa. Se observó que la producción de inhibina incrementa a las 12 h y muestra un pico de producción a las 24 h (**Figura 17c**), esto

nos indica que bajo una estimulación óptima, los linfocitos T muestran la máxima producción de inhibina 72 h antes, en comparación con las condiciones subóptimas. Es decir, nuestros datos indican que a mayor intensidad de señal, es más temprana la producción de inhibina. También encontramos que el pico de producción de inhibinas coincide en concentración, entre la estimulación óptima y sub-óptima, ya que en ambos estudios se observó alrededor 100 pg/ml de producción de inhibina.

En cuanto a la producción de activina, comienza a incrementar a las 48 h y muestra un pico de producción a las 96 h en ratones silvestres ($Inh\alpha^{+/+}$), mientras que en los ratones deficientes ($Inh\alpha^{-/-}$) el pico de producción es a las 48 h (**Figura 18c**). En otros trabajos se ha medido la producción de activina, Ogawa, K. *et al.*, (2006) [64], donde aislaron células T CD4 mediante selección negativa utilizando un kit de aislamiento (Miltenyi Biotec), y las trataron con mAb anti-CD3 unido a la placa y mAb anti-CD28 soluble, ambos a una concentración de 2 μ g/ml. Examinaron la expresión de activina en medios condicionados mediante un ensayo de diferenciación eritroide para detectar la bioactividad específica de la activina, observaron que había mayor producción de activina (más de 200 ng/ml) en las células estimuladas con anti-CD3 pegado a la placa y anti-CD28 soluble después de 6 días de cultivo. Es importante resaltar que nosotros observamos una mayor producción de activina (alrededor de 400 pg/ml) en células de ratones silvestres con una menor concentración de anti-CD3 y anti-CD28; la diferencia puede deberse a que nosotros utilizamos ambos reactivos pegados a la placa lo cual facilita un entrecruzamiento más efectivo del TCR, y que nuestro procedimiento de evaluación es por anticuerpos de detección por ELISA, no por bioactividad.

Nuestros experimentos nos permitieron medir simultáneamente la producción de inhibina, y de activina, bajo condiciones de activación óptimas, y nos permitió observar que, de manera interesante, el pico de producción de inhibina es previo al pico de producción de activina. Además, nuestros resultados indicaron que los linfocitos T de ratones $Inh\alpha^{-/-}$ no producen más activina en comparación con los linfocitos T de ratones $Inh\alpha^{+/+}$ (**Figura 18c**). Esto último es importante, porque se ha reportado que en los ratones $Inh\alpha^{+/+}$ la subunidad α se produce diez veces más que

la subunidad β [84], de manera que la síntesis de inhibinas, mediante el ensamblaje de subunidades α y β , compite con la formación de homodímeros $\beta\beta$. Este hecho explica que en ratones deficientes de inhibina ($Inha^{-/-}$) se incrementen los niveles de activina en suero a partir de las 9 semanas de vida, promoviendo el ensamble de subunidades β [58]. Sin embargo, la observación de que los linfocitos T $Inha^{-/-}$ no producen niveles más altos de activina en comparación con los linfocitos T $Inha^{+/+}$ demuestra que las alteraciones observadas en la polarización *in vitro* de linfocitos Th, no se deben a una sobreproducción de Activina A por parte del linfocito T $Inha^{-/-}$ sino a la ausencia de la inhibina producida de manera intrínseca por el linfocito T tras la activación, lo cual podría ejercer un efecto autocrino durante el establecimiento del linaje efector.

Dados los hallazgos sobre la importancia de las inhibinas en el desarrollo de los timocitos [69] y la observación de que los linfocitos T $Inha^{-/-}$ tienen una menor activación, asociada a una disminución en la diferenciación Th1 y un incremento hacia Th17 en comparación con los linfocitos T $Inha^{+/+}$ en ausencia de APCs [72], quisimos investigar si la producción autocrina de inhibina en linfocitos T “naïve” activados policlonalmente, podría estar regulando el proceso de diferenciación Th. Para ello, se analizó la diferenciación de linfocitos T “naïve” purificados en presencia de un cóctel de citocinas polarizante para Th1 y Th17, en presencia o ausencia de Inhibina A recombinante (rInha), con el fin de reconstituir la expresión en el caso de células deficientes. Como se describió anteriormente, se observa una disminución significativa hacia el linaje Th1 en células T $Inha^{-/-}$ en comparación con las células T $Inha^{+/+}$, coincidiendo con los datos previos [72]; de manera interesante, al agregar inhibina recombinante se observó que las células T $Inha^{-/-}$ incrementan ligeramente la producción de IFN- γ ($p=0.3$) (**Figura 20b**), en comparación con aquellas que no se cultivaron en presencia de inhibina recombinante, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas con los tres experimentos independientes evaluados, por lo que se propone incrementar el número de experimentos.

En contraste, con el cóctel para el linaje Th17, se observó un incremento significativo hacia Th17 en células $Inha^{-/-}$ en comparación con las células T $Inha^{+/+}$,

y al añadir inhibina recombinante, disminuyeron de manera significativa la producción de IL-17 (**Figura 22b**) en comparación con aquellas que no se cultivaron en presencia de inhibina recombinante, alcanzando niveles casi similares al de los linfocitos T $Inh\alpha^{+/+}$. Esto sugiere que el efecto de la inhibina producida por los linfocitos T activados tiene un mayor impacto en la diferenciación Th17 que hacia el linaje Th1.

Debido a que la diferenciación hacia los linajes Th efectores está determinada por distintos conjuntos de citocinas del microambiente, la fuerza de las señales mediadas por el TCR y coestimuladoras [85, 86], los efectos observados en la diferenciación hacia Th1 y Th17, podrían asociarse a los defectos en la activación temprana [72], sugiriendo que la falta de producción de inhibina en las células T afecta de alguna manera la activación a través del TCR. En este contexto, se ha reportado que el desarrollo de Th1 se favorece por una dosis alta de péptido o un ligando fuertemente agonista [83], mientras que la estimulación de baja intensidad en un microambiente de citocinas polarizantes como IL-6, IL-23, TGF- β , favorece el desarrollo de células Th17 [86].

Por lo tanto, nuestro datos podrían indicar que al no secretar inhibina, hay una menor diferenciación hacia el linaje Th1 porque este subtipo requiere una mayor activación, a diferencia del linaje Th17. Para poder confirmar esta posibilidad, sería necesario analizar la fosforilación de moléculas río abajo del TCR y fundamentales para la activación del linfocito T, incluidas las vías proximales como ZAP70, o la vía del Calcio o la activación moléculas cuya fosforilación se correlaciona con el nivel de activación del TCR, como la ligasa de ubiquitina c-Cbl, así como la vía de la MAPK, (Erk, P38 y Jnk), entre otras.

Por otro lado, dado que la diferenciación hacia un linaje efector requiere de citocinas, sería importante evidenciar la activación moléculas río abajo de la señalización por IFN γ , IL-6, y TGF- β , que son citocinas utilizadas en nuestros cócteles de diferenciación. Además, sería importante evaluar la expresión de receptores de citocinas específicos después de la estimulación de los linfocitos T,

así como las moléculas efectoras río abajo, incluyendo los STATs específicos [86, 87].

Por otro lado, se ha reportado la participación de miembros de la superfamilia TGF- β en la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17. Por ejemplo, TGF- β 1 suprime la expresión de T-bet, que es importante para el establecimiento de una alta expresión de IFN- γ , inhibiendo el desarrollo de Th1 [75]; además, dichos efectos inhibitorios de TGF- β 1 son independientes de la señalización canónica con SMAD3, pero dependientes de la ruta MEK / ERK, de manera que TGF- β 1 requiere de SMAD3 para la inhibición de los eventos mediados por TCR, mientras que requiere de MEK / ERK para la inhibición de la señalización de IFN γ [76]. También se ha visto que en tejidos de ratones TGF- β 1^{-/-} hay señalización constitutiva de IFN- γ , indicando que TGF- β 1 normalmente inhibe la señalización de IFN- γ [88]. Dado estos antecedentes y que también se observó un incremento hacia el linaje Th17, podríamos pensar que la falta de producción de inhibinas en los linfocitos T, incrementa su sensibilidad al TGF- β . Esto se podría demostrar evaluando la respuesta de fosforilación de Smad3 en respuesta a TGF β de linfocitos T *Inh α* ^{-/-} en comparación con la de linfocitos T *Inh α* ^{+/+} mediante tinción intracelular y análisis por citometría de flujo.

Por otro lado, se ha reportado que la Activina A también promueve la diferenciación hacia Th17, pues en conjunto con IL-6, puede inducir la diferenciación *in vitro* de células Th17 sin la participación de TGF- β [78]. De igual forma, se observó que las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) tratadas con toxina del cólera (CT) producen Activina A y su neutralización disminuyó la diferenciación de Th17; este efecto también fue observado de manera similar al neutralizar TGF- β 1 en BMDC y tratadas con CT bajo una condición de dosis alta de antígeno, sugiriendo que TGF- β 1 y Activina A actúan sinérgicamente en la diferenciación de Th17 [79].

Los antecedentes anteriores podrían sugerir que bajo una deficiencia de inhibina, habría un incremento de las activinas que podrían estar regulando la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th17; sin embargo, en el caso de linfocitos Th1 se han observado bajos niveles de activina [64]. Además, tal y como se mencionó anteriormente, al evaluar la producción de Activina A en linfocitos T “naïve” mediante

ELISA, no se observó una mayor producción en las células deficientes de inhibinas; no obstante, es necesario medir la producción de activinas en linfocitos T bajo condiciones polarizantes, para dilucidar si existen niveles incrementados de activina en linfocitos T ya diferenciados hacia ambos linajes.

Respecto al linaje Th17, se ha observado, que además de la inhibina, el betaglicano se une a TGF- β y BMPs; particularmente, las isoformas TGF- β 1 y 2 compiten con la inhibina por los sitios de unión a betaglicano [89]. Así mismo, la unión de inhibina A a la superficie celular provoca la internalización endocítica de betaglicano, reduciendo así el número de sitios de unión disponibles para TGF- β 2 [90]. Esto indica que la inhibina puede antagonizar la señalización de TGF- β 2 en contextos celulares donde la expresión superficial de betaglicano es limitante [83]. De manera interesante, en resultados preliminares de nuestro laboratorio, se observó una menor expresión de T β RIII en linfocitos T *Inh α ^{-/-}* activados, lo que sugirió que las inhibinas podrían modular la expresión de T β RIII durante la activación de linfocitos T [72]. Estos antecedentes nos permiten proponer que ante una deficiencia de inhibina, se regula la expresión de betaglicano para su unión con el TGF- β , citocina implicada en la diferenciación hacia el linaje Th17. Por lo que sería importante evaluar si la falta de inhibina genera una mayor respuesta hacia TGF- β al no haber competencia por betaglicano, midiendo la expresión de este correceptor en cultivos de linfocitos T ya diferenciados.

Finalmente, al analizar la viabilidad, las células deficientes de Inhibina mostraron una tendencia a un mayor porcentaje de viabilidad en comparación con las células silvestres (**Figura 20d y 22d**), al agregar inhibina recombinante, se observaron porcentajes similares a las células silvestres. Se ha observado que miembros de la superfamilia del TGF- β pueden regular la proliferación y muerte de diferentes células, por ejemplo, la Activina A puede regular la apoptosis en células plasmáticas y hepatocitos [91], TGF- β puede inducir la apoptosis de los linfocitos B, mientras que en los linfocitos T favorece la supresión de la proliferación [39]. Tanto la activina A como el TGF- β 1 pueden inhibir la producción *in vitro* de IL-6 por los timocitos en presencia de fitohemaglutinina e IL-1. Pero en presencia de IL-6 exógena, ambos

ligandos pueden estimular la proliferación de timocitos [63]. Estos antecedentes, nos permite proponer que la falta de producción de inhibina podría estar confiriendo a los linfocitos T, una mayor resistencia a la muerte. Sin embargo, se requieren hacer otras evaluaciones para confirmar este dato, por ejemplo la evaluación de la apoptosis mediante la tinción de anexina/7AAD por citometría de flujo.

XI. CONCLUSIONES

- Nuestros datos mostraron por primera vez que los linfocitos T “naïve” bajo una activación policlonal por entrecruzamiento del TCR secretan inhibina.
- El pico de producción de inhibina A es previo al pico de producción de Activina A.
- Los linfocitos T de ratones $inha^{-/-}$ producen niveles similares de Activina A a los de los linfocitos T de ratones $Inh\alpha^{+/+}$.
- Demostramos que las Inhibinas favorecen la diferenciación hacia el linaje Th1 y disminuye la diferenciación hacia el linaje Th17.
- Al reconstituir el cultivo de polarización con inhibina recombinante, se observó que las células T $Inh\alpha^{-/-}$ incrementan ligeramente la producción de IFN- γ en comparación con aquellas que no se cultivaron en presencia de inhibina recombinante.
- Para el linaje Th17, las células T $Inh\alpha^{-/-}$ cultivadas con inhibina recombinante, disminuyeron significativamente la producción de IL-17 en comparación con aquellas que no se cultivaron en presencia de inhibina recombinante, alcanzando niveles similares al de los linfocitos T $Inh\alpha^{+/+}$.

XI.I CONCLUSIÓN FINAL

Con Base en nuestros resultados proponemos que las inhibinas modulan la diferenciación de los linfocitos Th efectoras, favoreciendo un perfil Th1 y regulando negativamente hacia Th17, a través de su producción autocrina (**Figura 23**).

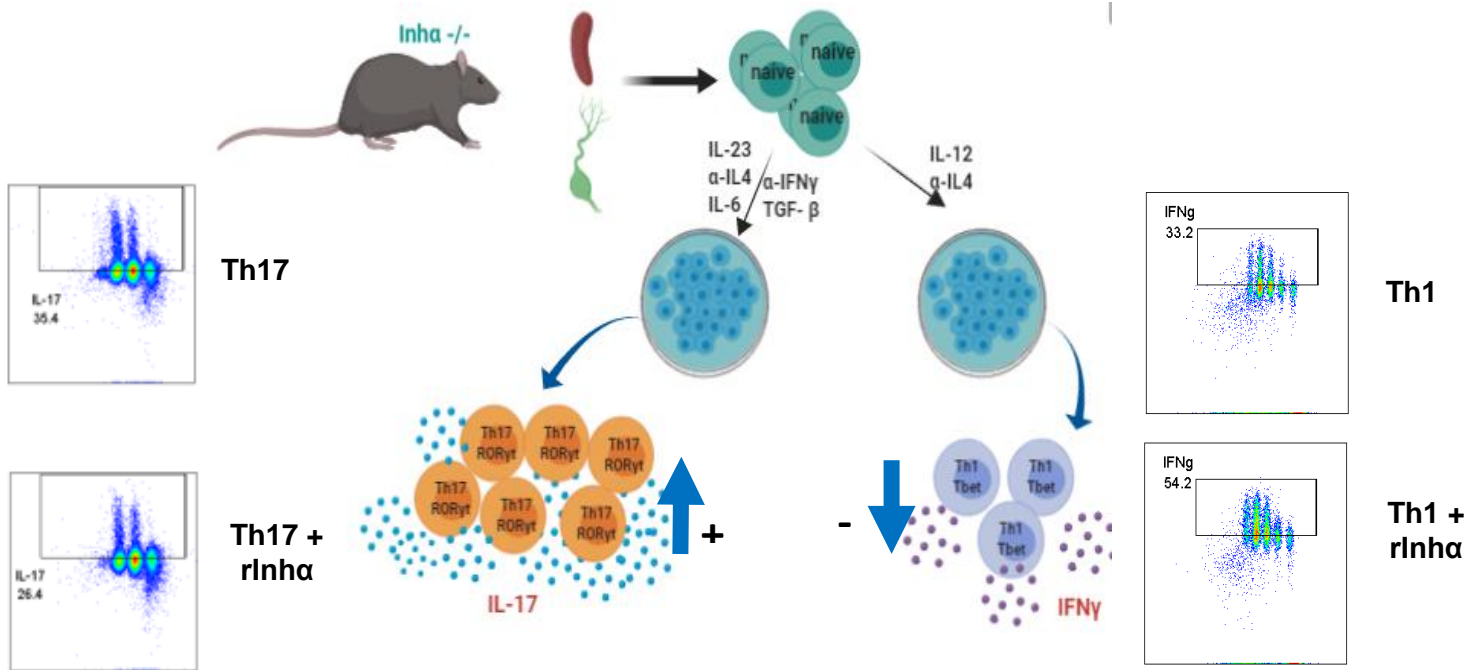


Figura 23, Resumen de resultados. Los linfocitos T deficientes de inhibina (*Inha*^{-/-}) fueron cultivados en condiciones polarizantes Th1 y Th17, en presencia o ausencia de Inhibina A recombinante (rInha) para reconstituir la expresión. En presencia de inhibina recombinante exógena hay un ligero incremento de la producción de IFN-γ y disminuye la producción de IL-17, y en comparación con las células T en ausencia de rInha.

XII. PERSPECTIVAS

- Determinar si los efectos observados en los linfocitos T deficientes de inhibina en la activación y diferenciación se deben a un defecto en la señalización a través del TCR, evaluando la fosforilación de cinasas importantes en la señalización.
- Corroborar si la inhibina A exógena puede incrementar de manera significativa la producción de IFN γ (incrementar la n de experimentos)
- Demostrar si la inhibina actúa de manera autocrina promoviendo la diferenciación de linfocitos Th1 o disminuyendo la polarización hacia Th17, bloqueando la inhibina producida por los linfocitos T Inh $\alpha^{+/+}$ activados con anticuerpos bloqueantes ante Inh A.
- Evaluar si la falta de inhibina genera una mayor respuesta hacia TGF β al no haber competencia por betaglicano, midiendo este correceptor en cultivos de linfocitos T ya diferenciados. Y evaluando la fosforilación de SMAD2/3 en respuesta a TGF β en células deficientes de inhibinas.

XIII. REFERENCIAS

1. Male, D., Brostoff, J., Roth, D. y Roitt, I, *Inmunología*, in *Inmunología*, Elsevier, Editor. 2013: España.
2. Vega Robledo, G., *La Respuesta Inmune*. Medigraphic, 2008. **51 (3)**: p. 128 - 129.
3. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343(1)**: p. 37-49.
4. Marshall, J.S., et al., *An introduction to immunology and immunopathology*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2018. **14(Suppl 2)**: p. 49.
5. Nicholson, L.B., *The immune system*. Essays Biochem, 2016. **60(3)**: p. 275-301.
6. Sonnenberg, G.F. and M.R. Hepworth, *Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2019. **19(10)**: p. 599-613.
7. Boehm, T. and J.B. Swann, *Origin and evolution of adaptive immunity*. Annu Rev Anim Biosci, 2014. **2**: p. 259-83.
8. Kamradt, T. and K. Ferrari-Kuhne, *[Adaptive immunity]*. Dtsch Med Wochenschr, 2011. **136(33)**: p. 1678-83.
9. Natoli, G. and R. Ostuni, *Adaptation and memory in immune responses*. Nat Immunol, 2019. **20(7)**: p. 783-792.
10. Bleul, C.C., et al., *Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell*. Nature, 2006. **441(7096)**: p. 992-6.
11. Gordon, J. and N.R. Manley, *Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis*. Development, 2011. **138(18)**: p. 3865-78.
12. Hollander, G., et al., *Cellular and molecular events during early thymus development*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 28-46.
13. Rodewald, H.R., *Thymus organogenesis*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 355-88.

14. Robertson, P., et al., *CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus*. *Exp Hematol*, 2006. **34**(3): p. 308-19.
15. Klein, L., et al., *Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(6): p. 377-91.
16. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(2): p. 127-35.
17. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(5): p. 309-22.
18. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(2): p. 108-17.
19. Itano, A.A. and M.K. Jenkins, *Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(8): p. 733-9.
20. Roche, P.A. and K. Furuta, *The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(4): p. 203-16.
21. Courtney, A.H., W.L. Lo, and A. Weiss, *TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation*. *Trends Biochem Sci*, 2018. **43**(2): p. 108-123.
22. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 591-619.
23. Fooksman, D.R., et al., *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 79-105.
24. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(3): p. 180-90.
25. Cibrian, D. and F. Sanchez-Madrid, *CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper*. *Eur J Immunol*, 2017. **47**(6): p. 946-953.
26. Agaloti, T., et al., *TH17 cell plasticity: The role of dendritic cells and molecular mechanisms*. *J Autoimmun*, 2018. **87**: p. 50-60.
27. Hirahara, K., et al., *Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics*. *Immunology*, 2011. **134**(3): p. 235-45.
28. DuPage, M. and J.A. Bluestone, *Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(3): p. 149-63.

29. Saravia, J., N.M. Chapman, and H. Chi, *Helper T cell differentiation*. Cell Mol Immunol, 2019. **16**(7): p. 634-643.
30. Ouyang, W., et al., *Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 745-55.
31. Usui, T., et al., *T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 755-66.
32. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
33. Glatman Zaretsky, A., et al., *T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens*. J Exp Med, 2009. **206**(5): p. 991-9.
34. Hegazy, A.N., et al., *Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 116-28.
35. Wang, Y., et al., *The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon-gamma-producing T helper 17 cells*. Immunity, 2014. **40**(3): p. 355-66.
36. Feng, T., et al., *Interleukin-12 converts Foxp3+ regulatory T cells to interferon-gamma-producing Foxp3+ T cells that inhibit colitis*. Gastroenterology, 2011. **140**(7): p. 2031-43.
37. McClymont, S.A., et al., *Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes*. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 3918-26.
38. Poniatowski, L.A., et al., *Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 137823.
39. Akhurst, R.J. and A. Hata, *Targeting the TGFβ signalling pathway in disease*. Nature Reviews Drug Discovery, 2012. **11**(10): p. 790-811.
40. Kitisin, K., et al., *TGF-β Signaling in Development*. 2007. **2007**(399): p. cm1-cm1.

41. Schmierer, B. and C.S. Hill, *TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 970-82.
42. Lu, L., et al., *Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg*. Eur J Immunol, 2010. **40**(1): p. 142-52.
43. Mankanji, Y., et al., *Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review*. Endocr Rev, 2014. **35**(5): p. 747-94.
44. Licona-Limón, P. and G. Soldevila, *The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights*. Immunology letters, 2007. **109**(1): p. 1-12.
45. Plum, J., et al., *Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5789-98.
46. Gorelik, L., P.E. Fields, and R.A. Flavell, *Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4773-7.
47. Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell, *Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1499-505.
48. Sierra-García, G.C.-R., R.; González-Horta, A.; Lara-Arias, J., *Proteínas morfogenéticas óseas (BMP): aplicación clínica para reconstrucción de defectos en hueso*. Gac Med Mex., 2016. **152:381-5**.
49. Tsuji, K., et al., *BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing*. Nat Genet, 2006. **38**(12): p. 1424-9.
50. Graf, D., et al., *The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 163-71.
51. Xia, Y. and A.L. Schneyer, *The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function*. J Endocrinol, 2009. **202**(1): p. 1-12.
52. Harrison, C.A., et al., *Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(2): p. 73-8.

53. Matzuk, M.M., et al., *Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 313-9.
54. Stenvers, K.L. and J.K. Findlay, *Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(3): p. 174-80.
55. Semitekolou, M., et al., *Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease*. J Exp Med, 2009. **206**(8): p. 1769-85.
56. Spady, T.J., et al., *Androgen regulates follicle-stimulating hormone beta gene expression in an activin-dependent manner in immortalized gonadotropes*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(4): p. 925-40.
57. Su, G.H., et al., *ACVR1B (ALK4, activin receptor type 1B) gene mutations in pancreatic carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3254-7.
58. Matzuk, M.M., et al., *Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8817-21.
59. Coerver, K.A., et al., *Activin signaling through activin receptor type II causes the cachexia-like symptoms in inhibin-deficient mice*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(5): p. 534-43.
60. Li, M.O. and R.A. Flavell, *TGF-beta: a master of all T cell trades*. Cell, 2008. **134**(3): p. 392-404.
61. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
62. Robson, N.C., et al., *Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2733-43.
63. Hedger, M.P., D.J. Phillips, and D.M. de Kretser, *Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 in vitro*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 595-602.

64. Ogawa, K., et al., *Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6787-94.
65. Phillips, D.J. and T.K. Woodruff, *Inhibin: actions and signalling*. Growth Factors, 2004. **22**(1): p. 13-8.
66. Licona, P., J. Chimal-Monroy, and G. Soldevila, *Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development*. Dev Dyn, 2006. **235**(4): p. 1124-32.
67. Licona-Limon, P., et al., *Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(2): p. 229-35.
68. Aleman-Muench, G.R. and G. Soldevila, *When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(2): p. 137-48.
69. Carbajal-Franco, E., et al., *Inhibins tune the thymocyte selection process by regulating thymic stromal cell differentiation*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 837859.
70. Olguin-Alor, R., et al., *A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167813.
71. de la Fuente-Granada, M., et al., *Inhibins regulate peripheral regulatory T cell induction through modulation of dendritic cell function*. FEBS Open Bio, 2019. **9**(1): p. 137-147.
72. Ortega Francisco, S.A., *Papel de las inhibinas y el betaglicano en la activación y diferenciación de los linfocitos T*, in *Inmunología*. 2019, Universidad Nacional Autonoma de México: México. p. 123.
73. Locci, M., et al., *Activin A programs the differentiation of human TFH cells*. Nat Immunol, 2016. **17**(8): p. 976-84.
74. Huber, S., et al., *Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4633-40.

75. Park, I.K., et al., *TGF-beta1 inhibits T-bet induction by IFN-gamma in murine CD4+ T cells through the protein tyrosine phosphatase Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5666-74.
76. Park, I.K., J.J. Letterio, and J.D. Gorham, *TGF-beta 1 inhibition of IFN-gamma-induced signaling and Th1 gene expression in CD4+ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent*. Mol Immunol, 2007. **44**(13): p. 3283-90.
77. Yoshioka, Y., et al., *Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation*. Eur J Immunol, 2012. **42**(3): p. 749-59.
78. Malhotra, N., E. Robertson, and J. Kang, *SMAD2 is essential for TGF beta-mediated Th17 cell generation*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29044-8.
79. Kang, J.O., J.B. Lee, and J. Chang, *Cholera Toxin Promotes Th17 Cell Differentiation by Modulating Expression of Polarizing Cytokines and the Antigen-Presenting Potential of Dendritic Cells*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0157015.
80. Nalam, R.L., C. Andreu-Vieyra, and M.M. Matzuk, *Absence of inhibin alpha and retinoblastoma protein leads to early sertoli cell dysfunction*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11797.
81. McGuire, D.J., et al., *CD5 enhances Th17-cell differentiation by regulating IFN-gamma response and RORgammat localization*. Eur J Immunol, 2014. **44**(4): p. 1137-42.
82. Shiner, E.K., B.C. Holbrook, and M.A. Alexander-Miller, *CD4+ T cell subset differentiation and avidity setpoint are dictated by the interplay of cytokine and antigen mediated signals*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100175.
83. van Panhuys, N., F. Klauschen, and R.N. Germain, *T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 63-74.
84. Thompson, T.B., et al., *Beta A versus beta B: is it merely a matter of expression?* Mol Cell Endocrinol, 2004. **225**(1-2): p. 9-17.

85. Nakayama, T. and M. Yamashita, *The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation*. *Semin Immunol*, 2010. **22**(5): p. 303-9.
86. Purvis, H.A., et al., *Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses*. *Blood*, 2010. **116**(23): p. 4829-37.
87. Yamane, H. and W.E. Paul, *Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets*. *Immunol Rev*, 2013. **252**(1): p. 12-23.
88. McCartney-Francis, N.L. and S.M. Wahl, *Dysregulation of IFN-gamma signaling pathways in the absence of TGF-beta 1*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5941-7.
89. Farnworth, P.G., et al., *Transforming growth factor-beta blocks inhibin binding to different target cell types in a context-dependent manner through dual mechanisms involving betaglycan*. *Endocrinology*, 2007. **148**(11): p. 5355-68.
90. Looyenga, B.D., et al., *Inhibin-A antagonizes TGFbeta2 signaling by down-regulating cell surface expression of the TGFbeta coreceptor betaglycan*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(3): p. 608-20.
91. Nishihara, T., N. Okahashi, and N. Ueda, *Activin A induces apoptotic cell death*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **197**(2): p. 985-91.