



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PAPEL DE LAS INHIBINAS EN LA DIFERENCIACIÓN, MADURACIÓN Y  
FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias

PRESENTA:  
M. en C. Roxana Olguín Alor

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Bonifaz Alfonso Centro Médico Nacional Siglo XXI	Dra. Marina Macías Silva Instituto de Fisiología Celular, UNAM
--	---

Ciudad de México. Diciembre, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*“La educación no es el  
aprendizaje de los hechos,  
sino el entrenamiento  
de la mente para pensar”*

ALBERT EINSTEIN

Este proyecto fue apoyado por los proyectos de DGAPA (UNAM) #IN209615. ROA fue apoyada con la beca #339203 proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Toda la investigación realizada para esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio A107 del departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Además, ROA fue apoyada con donativos para la asistencia a congresos, tanto nacionales como internacionales, otorgados por el “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, investigadora apasionada, a veces psicóloga y, muchas otras, madre de los estudiantes, gracias por todo el apoyo, guía y soporte que me ha brindado a lo largo de tanto tiempo. Usted ha sido una gran maestra, enseñándome que, a pesar de las frustraciones y desánimos que se presenten en esta labor, la investigación es un arte que se basa el trabajo diario y la perseverancia, pero sobre todas las cosas, en la pasión con la que realizamos nuestras actividades. ¡Gracias por todo!

Al Dr. Eduardo García Zepeda por las enseñanzas académicas y personales, pero, sobre todo, por haberme enseñado a tener la actitud necesaria para transmitir la investigación ya que se requiere de fuerza y seguridad para defender nuestros ideales y, aun así, de humildad y sencillez para aceptar las opiniones de los demás. ¡Usted vive en todas las personas que lo conocimos!

A las integrantes de mi comité tutorial, Dra. Marina Macías Silva y Dra. Laura Bonifaz Alfonzo, por haberme guiado durante mi trayectoria académica.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas y a los asistentes de procesos, Leticia García, Adelina González, Lilia de la Rocha y Julio Palacios, por el apoyo y guía en todos los procesos que llevé a cabo durante el doctorado.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo y al equipo LabNalCit, QFB. Carlos Castellanos Barba, M. en C. Erick Christian Iván Espíndola Arriaga y Dra. Andrea Bedoya López, por brindar la infraestructura, capacitación y apoyo para el uso de los citómetros de flujo.

A Marisol de la Fuente Granada y Sandra Ortega por el gran apoyo que me han brindado y porque hemos formado un buen equipo. A todos los compañeros del laboratorio,

Ismael Martínez, Evelyn Álvarez, Arimelek Cortés, Cynthia López Pacheco, Erica Burgueño, Jacobo Martínez, Scarlett Ortega, Flor Sánchez, Aleida Núñez, Nara Acevedo, Antonio García, Oscar Ovando y Gisela DuPont por todo el apoyo en las buenas y malas rachas experimentales; y a los “recién llegados” Óscar Hernández, Lizbeth Bolaños, Saúl Arteaga, Samuel Mendoza, Luis Daniel Ferrer y Gabriela Fonseca por darme la oportunidad de transmitirles mis conocimientos.

Finalmente, a mis padres, Joel Olguín Álvarez y Sonia Alor Beltrán; a mi hermana Zulema Olguín Alor, y a mi familia Miguel Zúñiga Benítez, Alicia Alor Beltrán, Ana Silvia Zúñiga Alor, Rafael Tapia y Jonathan Tapa Zúñiga por el apoyo incondicional y por alentarme en los momentos más requeridos. Todos ustedes han sido parte importante de mi formación como persona, me han enseñado tanto valores y conocimientos; así como errores y tropiezos. De todos y de todo he aprendido mucho. ¡MUCHAS GRACIAS!

## CONTENIDO

<b>1. ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>2. RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>3. ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>4. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
Células Dendríticas.....	14
Clasificación.....	16
Ontogenia .....	21
Citocinas que controlan el linaje de DCs.....	23
Funciones de las DCs .....	27
Inmunidad .....	27
Tolerancia.....	30
Superfamilia de TGF $\beta$ .....	35
Inhibinas .....	41
Mecanismo de señalización de las Inhibinas .....	43
Superfamilia de TGF $\beta$ en la biología de las DCs .....	47
<b>5. ANTECEDENTES .....</b>	<b>49</b>
<b>6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>52</b>
<b>7. HIPÓTESIS.....</b>	<b>53</b>
<b>8. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>54</b>
<b>9. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>54</b>

<b>10. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
Ratones .....	55
Generación de Células Dendríticas a partir de células de médula ósea.....	55
Obtención de DCs de órganos linfoides periféricos .....	56
Obtención de DCs de piel.....	56
Citometría de Flujo.....	57
Inmunofluorescencia y microscopía.....	58
Quimiotaxis .....	60
Migración <i>in vivo</i> de BMDC .....	60
Movilización de calcio.....	61
Fosforilación de ERK.....	61
Cuantificación de citocinas.....	62
Ensayo de proliferación de Linfocitos T .....	62
Estimulación de DCs <i>in vivo</i> con LPS.....	63
Hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) .....	63
Análisis estadístico .....	64
<b>11. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
La diferenciación <i>in vitro</i> de las DCs está disminuida en ausencia de Inhibinas.....	65
La maduración <i>in vitro</i> de las DCs está afectada en ausencia de Inhibinas .....	67



Las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ presentan una migración dependiente de CCR7 disminuida comparada con $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ .....	70
Las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ muestran baja capacidad para estimular linfocitos T alogénicos....	72
Las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ producen mayor nivel de IL-10 en respuesta a LPS .....	73
La frecuencia y números de subpoblaciones de DCs en homeostasis no están alteradas en el ratón $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ .....	76
DCs $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ presentan una maduración disminuida <i>in vivo</i> .....	81
La respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada está disminuida en el ratón $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ ..	85
<b>12. DISCUSIÓN</b> .....	<b>87</b>
<b>13. CONCLUSIONES</b> .....	<b>94</b>
<b>14. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>94</b>
<b>15. REFERENCIAS</b> .....	<b>95</b>
<b>16. ARTÍCULO DE PUBLICACIÓN</b> .....	<b>111</b>

## 1. ABREVIATURAS

ACK	Buffer de lisis de eritrocitos (amonio clorado de potasio)
ACTRII	Receptor tipo dos de Activina
ALK	Activin receptor-like Kinase
BATF3	Factor de transcripción de cierre de leucina básico tipo ATR 3
BMDC	Célula dendrítica derivada de médula ósea
BSA	Albúmina sérica bovina
BST2	Antígeno estromal de médula ósea 2
Buffer FACS	Solución de acondicionamiento para Citometría de flujo
cDC	Célula dendrítica convencional
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CDP	Progenitor común para células dendríticas
CFS-1R	Receptor del factor estimulante de colonia 1
CMP	Progenitor mieloide común
Co-SMAD	SMAD común
CBA	Arreglo de perlas para la medición de citocinas
CTV	Rastreador celular violeta
DAB2	Proteína adaptadora supresora de tumor “Disabled homolog 2”
DC	Célula dendrítica
DCIR	Receptor inhibitorio de células dendríticas 1
DNGR1	Receptor para células necróticas
DOK1	Proteína adaptadora de regulación negativa “Docking protein 1”
DTR	Receptor de la toxina diftérica
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
EpCam	Molécula de adhesión de células epiteliales
ESAM	Molécula de adhesión de células endoteliales
FAK	Cinasa de adhesión focal
FKBP12	Proteína de unión a la droga inmunosupresora FK506
GM-CSF	Factor estimulante de colonia granulocítica y monocítica

GM-CSFR	Receptor del factor estimulante de colonia granulocítica y monocítica
GMP	Progenitor de granulocitos y monocitos
HSV-4	Virus del herpes simple
HTR	Hipersensibilidad de tipo retardado
iBMDC	Célula dendrítica derivada de médula ósea inmadura
ID2	Inhibidor de la unión a DNA
IMF	Intensidad media de fluorescencia
INF	Interferón
INHBP	Proteína de unión a Inhibina B
Inh $\alpha^{-/-}$	Deficiente de Inhibina $\alpha$
Inh $\alpha^{+/+}$	Suficiente de Inhibina $\alpha$
IRF8	Factor regulador de interferon
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
I-SMAD	SMAD inhibidora
LAP	Proteína asociada a latencia
LB	Linfocito B
LC	Célula de Langerhans
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
LTBP	Proteína de unión a TGF $\beta$ latente
LT $\beta$ R	Receptor de linfotoxina $\beta$
MAPK	Cinasa de proteínas activadas por mitógeno
mBMDC	Célula dendrítica derivada de médula ósea madura
M-CSFR	Receptor para el factor estimulante de colonia de macrófagos
MDP	Progenitor de monocitos y células dendríticas
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MLR	Reacción leucocitaria mixta
Mo-DC	Células dendríticas derivadas de monocitos
MPP	Progenitor multipotencial
mTEC	Células epiteliales tímicas de médula
NFIL3	Factor nuclear regulado por IL-3

NK	Células “natural killer”
NL	Nódulo linfático
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PBS	Buffer salino de fosfatos
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PreDC	Estadio pre-célula dendrítica
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RIG-1	Gen inducible de ácido retinoico
R-SMAD	Factor de transcripción asociado a receptor
Runx3	Factor de transcripción 3 asociado a Runt
SARA	Proteína de anclaje de SMAD al receptor de Activina
SFB	Suero fetal bovino
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
T $\beta$ RIII	Betaglicano. Receptor tipo 3 de TGF $\beta$
Tip-DC	Célula dendrítica productora de TNF/iNOS
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocito T regulador
WASP	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich
Zbtb46	Factor de transcripción “zinc finger and BTB domain containing 46”

## 2. RESUMEN

La inmunobiología de las células dendríticas (DCs) se encuentra en constante estudio debido a sus funciones en el mantenimiento de la inmunidad y la tolerancia. Se ha demostrado la participación de ligandos de la superfamilia de TGF $\beta$ , como Activina A y TGF $\beta$ , durante el proceso de maduración de las DCs; sin embargo, se desconoce la influencia que puedan tener las Inhibinas en la inmunobiología de las DCs. Nuestro grupo ha reportado que las Inhibinas modulan la maduración de las células estromales tímicas y DCs tímicas sugiriendo que las Inhibinas están involucradas en la inmunobiología de las DCs. Mediante el uso de ratones deficientes de Inhibinas, se demostró que las DCs derivadas de médula ósea (BMDC)  $Inh\alpha^{-/-}$  tienen un fenotipo “semi-maduro” en respuesta a LPS ya que tienen baja expresión de MHC II y CD86 y alta expresión de PD-L1, sin tener alteraciones en la secreción de TNF y CCL12; con un incremento de IL-10 y un ligero decremento en IL-6 comparado con  $Inh\alpha^{+/+}$ . Lo anterior correlaciona con la habilidad reducida de activar a linfocitos T alogénicos. Además, se demostró que las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  tratadas con LPS producen Inhibina A sugiriendo la participación de dicha citocina en la maduración de las DCs. De manera interesante, las mBMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  tienen disminuida la migración hacia CCL19 y CCL21 a pesar de la expresión normal del receptor CCR7. Los ensayos *in vivo* corroboraron que las DCs del ratón  $Inh\alpha^{-/-}$  tienen baja maduración tras la inoculación de LPS, especialmente en las células de Langerhans (CD207<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>), lo cual resulta en la falta de inflamación de la oreja en ensayos de hipersensibilidad de tipo retardado debido a la deficiencia en la maduración y migración de las DCs CD207<sup>+</sup> al NL drenante. En conclusión, nuestros resultados demuestran que las Inhibinas tienen un papel clave en la maduración y función de las DCs, regulando el balance entre la inmunidad y tolerancia.

### 3. ABSTRACT

The dendritic cells (DCs) immunobiology is in constant investigation due to their mainly function in maintenance of immunity and immune tolerance. It has been demonstrated the involvement of the TGF $\beta$  superfamily ligands, such as Activin A and TGF $\beta$ , during the DC maturation process, however the influence of Inhibins in DC immunobiology remains unclear. Our group has reported that the Inhibins modulates the maturation of both thymic DCs and thymic stromal cells suggesting the Inhibins involvement in DC immunobiology. By the study of Inhibins deficient mice, we demonstrated that  $Inh\alpha^{-/-}$  bone marrow DC (BMDC) has a semi-mature phenotype in response to LPS due to the MHC II and CD86 low expression and PD-L1 high expression, with normal TNF and CCL2 secretion, but increased levels of IL-10 and slightly decreased IL-6 in compared with  $Inh\alpha^{+/+}$ . This correlates with the reduced ability to activate allogeneic T cells. Furthermore, we demonstrate the Inhibin A secretion by LPS-treated  $Inh\alpha^{+/+}$  BMDC suggesting the involvement of Inhibin A in DCs maturation. Interestingly,  $Inh\alpha^{-/-}$  mBMDC showed impaired migration towards CCL19 and CCL21, assessed by *in vitro* chemotaxis and *in vivo* competitive homing experiments, despite their normal CCR7 expression. The *in vivo* assays corroborate the low  $Inh\alpha^{-/-}$  DC maturation after LPS inoculation, specially in Langerhans cells (CD207<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>), resulting in the lack of ear inflammation in delayed-type hypersensitivity assays due to a deficient in both maturation and migration to draining lymph node of CD207<sup>+</sup> DCs. In conclusion, our data demonstrate that Inhibins play a key role in peripheral DC maturation and function, regulating the balance between immunity and tolerance.

#### **4. INTRODUCCIÓN**

El Sistema Inmune es un sistema altamente complejo, en donde participan una gran diversidad de células y factores solubles que, en conjunto, se encargan de mantener en homeostasis inmunológica al organismo. Una de las funciones principales del sistema inmune es proteger al organismo de diversos daños como los causados por patógenos o aquellos generados por el desgaste del organismo, lo que se denomina inmunidad y la generación de memoria inmunológica; y la otra función principal es mantener la tolerancia hacia antígenos propios y evitar la autoinmunidad.

Unas de las principales células que juegan un papel importante en el balance entre inmunidad y tolerancia son las células dendríticas (DC), las cuales se encargan de presentar los antígenos tanto propios como ajenos a los Linfocitos T (LT) para generar tolerancia o inmunidad, respectivamente.

##### **Células Dendríticas**

Desde su descubrimiento en 1973 por Ralph Steinman y Zan Cohn (1), las DCs han sido objeto de estudio debido a su gran capacidad para capturar, procesar y presentar antígenos en contexto de moléculas codificadas en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)-péptido y establecer una respuesta inmune adaptativa ante antígenos foráneos. Debido a lo anterior, se dice que las DCs forman un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa a través de las interacciones célula-célula y mediante la secreción de citocinas (2). En los años posteriores a su descubrimiento, se estableció la contribución de las DCs en la inducción de tolerancia hacia antígenos propios.

En consecuencia, tanto la industria farmacéutica como la ciencia se han interesado en el potencial terapéutico que se puede obtener tras la modulación de las funciones de las DCs para generar vacunas y terapias para combatir patógenos, tumores y enfermedades autoinmunes.

Las DCs expresan la integrina CD11c, MHC II y CD45 (3, 4); y carecen de los marcadores de linaje para LT, linfocitos B (LB), células “natural killer” (NK), granulocitos y eritrocitos. Tanto los marcadores de linaje como CD11c, MHC II y CD45 fueron de ayuda para identificar a las DCs; sin embargo, conforme se estudiaron se evidenció la gran heterogeneidad que presentan. En ratón, se identificaron DCs presentes en los órganos linfoides, como bazo y nódulos linfáticos (NL) caracterizadas por la expresión de la molécula CD8; así como las DCs residentes de tejido no linfático, caracterizadas por la expresión de CD103. La expresión tanto de CD8 como CD103 acarrea funciones diferentes en el establecimiento de la respuesta inmune. Después, se identificó una población de células que, morfológicamente, asemejaban a células plasmáticas pero que, en respuesta a estímulos virales, producen grandes cantidades de interferón (IFN)- $\alpha$ . De manera importante, estas células se diferencian a DCs inmunogénicas tras la estimulación y pueden activar a LTs contra antígenos virales. Dichas células se nombraron como DCs plasmacitoides (pDC) y se distinguieron de aquellas descubiertas por Steinman, a las que denominaron DCs convencionales (cDC). Posteriormente, se descubrieron DCs que podían originarse a partir de células monocíticas en un contexto de inflamación, dichas células se llamaron DCs inflamatorias ya que son reclutadas al sitio de inflamación, son capaces de presentar antígenos y fenotípicamente son parecidos a las cDCs. Sin embargo, ahora se sabe que dichas células representan un tipo de células plásticas capaces de adquirir diferentes funciones, las



cuales algunas son compartidas con las cDCs. Debido a lo anterior, surgió la necesidad de identificar su origen y diferenciación.

## **Clasificación**

### **DCs convencionales (cDCs)**

En la literatura refieren a las cDCs como todas las DCs que se derivan del progenitor común para DCs (CDP) con excepción de las pDCs. Las cDCs tienen una gran heterogeneidad y diversidad en cuanto a localización en el organismo; sin embargo, diversos estudios genéticos y funcionales han revelado que las DCs residentes de tejido linfático  $CD8\alpha^+$  y las DCs residentes de tejido no linfático  $CD103^+$  por un lado y las DCs residentes de tejido linfático  $CD4^+$  y las DCs residentes de tejido no linfático  $CD11b^+$  por otro lado, constituyen dos linajes de DCs distintos. Cada linaje, sin importar la localización ni los diferentes fenotipos, poseen características y propiedades únicas, por lo que, recientemente, se ha propuesto que las DCs murinas sean divididas en dos subgrupos mayoritarios: cDC1 (DC  $CD8\alpha^+$  de tejido linfoide y DC  $CD103^+$  de tejido no linfoide) y cDC2 (DC  $CD4^+$  de tejido linfoide y DC  $CD11b^+$  de tejido no linfoide) (Figura 1).

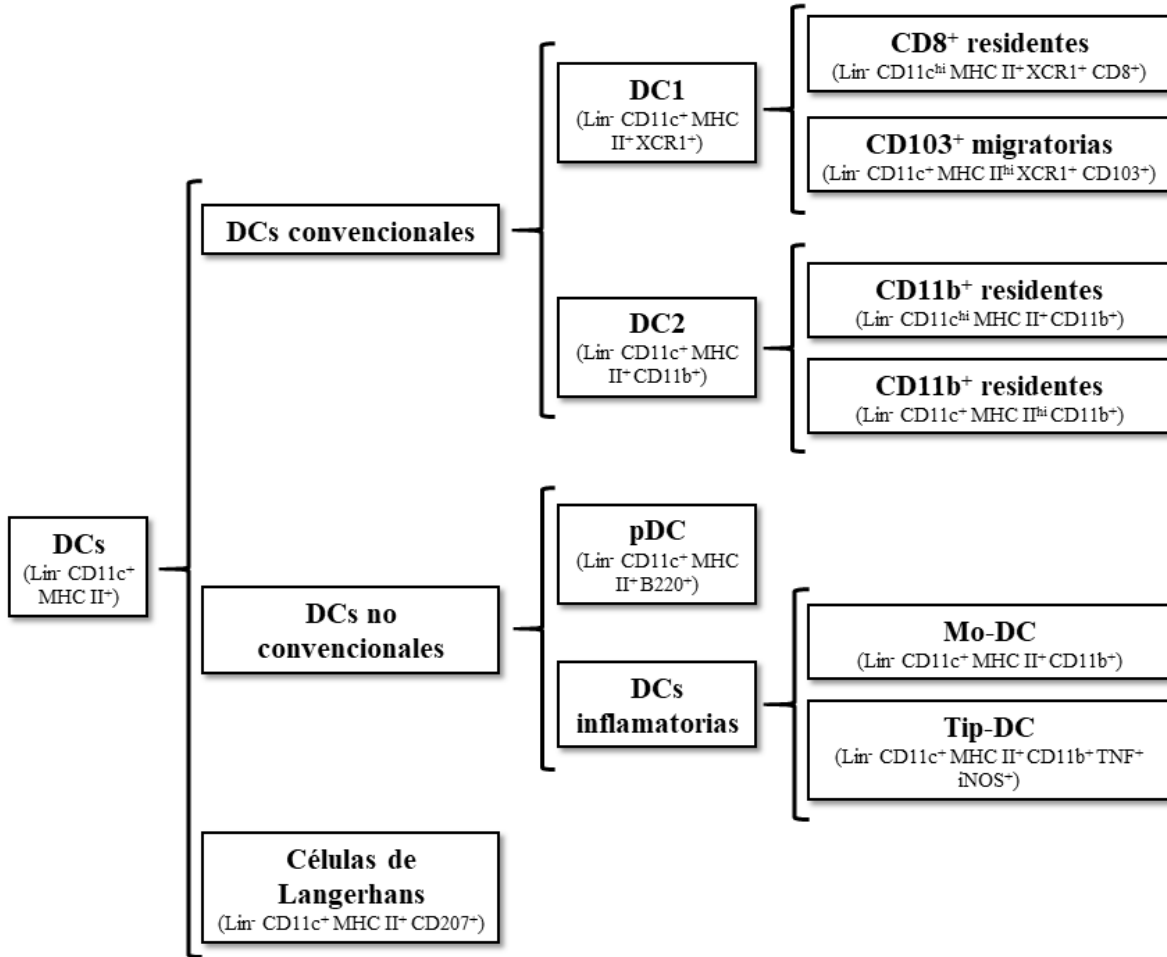
#### ***DC1***

Las DCs  $CD8\alpha^+$  (en tejido linfoide) o las DCs  $CD103^+$  (en tejido no linfoide y en la fracción migratoria en NL) representan un linaje unificado por las habilidades funcionales y los factores de transcripción requeridos para su función. Las cDC1 tienen una dependencia estricta al ligando de Flt3 (Flt3L) para su diferenciación (5) y requieren del receptor para el factor estimulante de colonia granulocítica y monocítica (GM-CSFR) para el mantenimiento

del ciclo celular (6). Durante el desarrollo, las cDC1 requieren de los factores de transcripción Inhibidor de la unión a DNA 2 (ID2), Factor de transcripción de cierre de leucina básico tipo ATR 3 (BAFT3), Factor regulador de interferón 8 (IRF8) y el Factor nuclear regulado por IL-3 (NFIL3) (7-9); sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que regula a cada uno de estos factores de transcripción. Las moléculas expresadas en superficie XCR1 y Clec9a (DNGR1) son marcadores conservados en estas células tanto en ratón como en humano. El XCR1, receptor de la quimiocina XCL1, se piensa que tiene un papel importante en la promoción de la interacción selectiva y efectiva entre cDC1 y los LT CD8 $\alpha^+$  (10, 11). Las cDC1 expresan los receptores tipo Toll (TLR) 3, 4, 11 y 13 lo que las habilita para reconocer una gran variedad de patrones asociados a patógenos (PAMP). De manera interesante, siendo las únicas DCs que expresan TLR3, que reconoce RNA viral de doble cadena, constituyen uno de los primeros sensores de infecciones virales (12).

## ***DC2***

La segunda subpoblación mayoritaria de DCs está compuesta por las DCs CD4 $^+$  (en tejido linfoide) y las DCs CD11b $^+$  (en tejido no linfoide y en la fracción migratoria en NLs). Las DCs de este linaje co-expresan CD4 y CD11b en el bazo (13) o CD24 (HSA, heat stable antigen) y CD11b en órganos no linfoides, como el pulmón (14), intestino (15) y dermis (16). En el bazo, las DC CD11b $^+$  puede ser dividida por la expresión de la molécula de adhesión específico de células endoteliales (ESAM), Clec12A (DCAL2) y el receptor inhibitorio de célula dendrítica 1 (DCIR1) en varias subpoblaciones con funciones especializadas (13, 17). En el intestino delgado y grueso, una subpoblación de DCs CD11b $^+$  co-expresa CD103 y CD11b (18, 19).



**Figura 1. Clasificación de las células dendríticas.** DCs: células dendríticas. pDC: células dendríticas plasmacitoides. Mo-DC: células dendríticas derivadas de monocitos. Tip-DC: células dendríticas productoras de TNF/iNOS. Residentes: células dendríticas residentes de tejido linfoide. Migratorias: células dendríticas de tejido no linfoide.

### DCs no convencionales

Históricamente, se han clasificado en DCs no convencionales a las DCs que no comparten los mismos precursores ontogénicos que las cDCs; sin embargo, también tienen su origen en médula ósea. Se han clasificado principalmente dos tipos de subpoblaciones de DCs: DCs plasmacitoides y DCs inflamatorias.

### ***DC plasmacitoides***

Las pDCs representan una subpoblación pequeña de DCs que, a pesar de compartir el mismo origen que las cDCs, tienen un ciclo de vida diferente. Las pDCs se caracterizan por la expresión baja de CD11c, BST2, Siglec-H y B220, así como por depender del factor de transcripción E2-2 para su desarrollo (20). En homeostasis, las pDCs se encuentran en médula ósea y órganos linfoides, como bazo y NLS; sin embargo, después de una infección o inflamación se pueden localizar en el sitio de inflamación (21, 22). Una característica importante de las pDCs es que expresan altos niveles de los TLR 7 y 9 que, cuando son ligados por productos virales, estimulan la secreción de grandes cantidades de INF tipo I, IL-12 e IL-6 (23, 24). Más aún, las pDCs secretan la citocina antiviral IFN- $\lambda$  después de la exposición a parapoxvirus o a HSV-1 (25).

### ***DC inflamatorias***

Las DCs inflamatorias aparecen durante la inflamación de un tejido debido a la invasión de un patógeno o por enfermedades autoinmunes, como la inflamación intestinal. El origen de las DCs inflamatorias son los monocitos (Mo-DCs) (26) y se caracterizan por expresar CD11b, CD11c, MHC II, CD64, Fc $\gamma$ R $\epsilon$ , entre una gran variedad de niveles de Ly6C (27, 28). En concordancia con su origen monocítico, las Mo-DCs dependen del receptor del factor estimulante de colonia 1 (CSF-1R) (6). Funcionalmente, inducen una respuesta preferencial tipo Th1 a través de la producción de grandes cantidades de IL-12 (26, 29, 30). Aún más, las Mo-DCs liberan cantidades sustanciales de IL-23 después del estímulo adecuado (31) para promover la inmunidad tipo Th17. Por otro lado, las DCs inflamatorias que emergen en el bazo durante la infección con *Listeria monocytogenes* se caracterizan por la alta secreción de TNF $\alpha$  e iNOS, por lo que fueron denominadas TipDC (DCs productoras

de TNF/iNOS) (28). De manera interesante, se ha observado que las DCs inflamatorias tienen una alta plasticidad ya que se ha reportado que, durante la infección con bacterias gram-positivas, emergen DCs inflamatorias CD209 $\alpha^+$  dependientes de Flt3L y que expresan Zbtb46 distintas de las Mo-DCs. Además, se ha observado que las DCs inflamatorias CD209 $\alpha^+$  son altamente funcionales en la presentación cruzada *in vivo* (32). Aún se desconoce si la heterogeneidad de las DCs inflamatorias se debe al origen de las mismas o al tipo de reto inflamatorio al cual son expuestas.

### **Células de Langerhans**

Las Células de Langerhans (LC) son DCs que se localizan en la capa epidermal de la piel en una densidad de 700 LC/mm<sup>2</sup> aproximadamente (33). A diferencia de las cDCs, las LC tienen una ontogenia única ya que se derivan principalmente de precursores embrionicos, siendo los monocitos de hígado fetal sus precursores más importantes (34, 35); además, se caracterizan por ser radiorresistentes y por tener la capacidad de autorenovarse (35, 36). La diferenciación de las LCs, en contraste con las cDCs, es independiente de Flt3L (8), pero requieren de CSF-1R (37) y del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (38), además de ser dependientes del factor de transcripción ID2 así como del factor de transcripción relacionado a runt 3 (RUNX3) (39, 40). En homeostasis, las LCs tienen una vida media entre 53-78 días y su renovación depende de la proliferación del 1-2% de LCs que se encuentran activamente proliferando (35); sin embargo, durante procesos inflamatorios de la piel, en donde hay pérdida de LCs, daño en la barrera epidermal-dermal y liberación de quimiocinas, la recuperación de las LCs depende de los monocitos Gr1<sup>hi</sup> de sangre (39). Las LCs, en comparación con las cDCs dermales, expresan bajo nivel de MHC II, niveles intermedios de

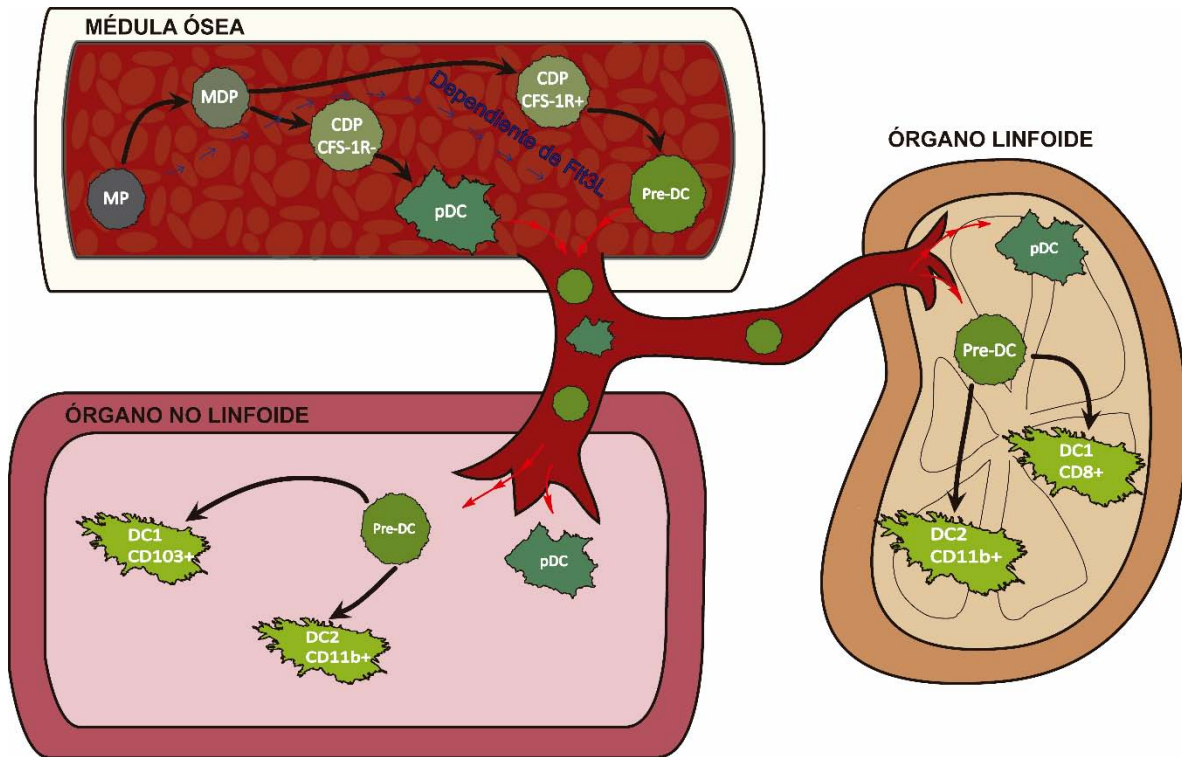
CD11c y alto nivel de la lectina tipo C Langerina (CD207); además, debido a su localización, expresan la molécula de adhesión de células epiteliales (Epcam). En contraste con otras poblaciones de DCs, las LCs parecen ser altamente adaptables, donde el ambiente y los patógenos dictaminan las funciones especializadas de las mismas.

### **Ontogenia**

La mayoría de las DCs son células hematopoyéticas de vida corta, excepto las células LCs de epidermis, las cuales son reemplazadas constantemente por precursores que llegan vía sanguínea. Las DCs se desarrollan a partir de los progenitores de médula ósea, al igual que otros leucocitos; teniendo como origen tanto de progenitores linfoides comunes (CLP) como de progenitores mieloides comunes (CMP). Mediante ensayos de transferencia adoptiva de CLP y CMP en ratones irradiados letalmente, se demostró que ambos progenitores generan cDCs y pDCs, observándose el mismo potencial de CLP y CMP humanos en cultivos *in vitro* (41-44). A pesar de lo anterior, se ha observado que las CMPs son más eficientes para generar cDCs de bazo y NL, mientras que las CLPs son más potentes para producir cDCs tímicas (42, 45).

Diversos ensayos se han realizado para establecer el desarrollo de las DCs (Figura 2) (46). De acuerdo con dichos ensayos, los progenitores de DCs expresan Flt3, por lo que se logró identificar a un precursor común para monocitos, macrófagos y DCs (progenitor macrófago-dendrítico MDP) (47). MDP se caracteriza por la expresión de Flt3, CSF-1R y altos niveles de c-Kit. Se ha propuesto que las MDP han pasado por un proceso de compromiso hacia linaje DC o monocito/macrófago ya que se ha observado que el potencial de las MDP a generar tanto DC como monocitos se limita a una pequeña fracción, de manera

que las MDP individuales generan células monocíticas o DC (48). En seguida se identificó a un progenitor restringido a DCs que produce pDCs y cDCs pero no monocitos tanto *in vitro* (49) como *in vivo* (5, 18, 50), el cual fue llamado progenitor común de célula dendrítica (CDP). Dentro del compartimento CDP, se pueden distinguir dos poblaciones por la expresión de CSF-1R: aquella que se diferencia principalmente a pDC (CSF-1R<sup>-</sup>) y aquella que se diferencia principalmente a cDC (CSF-1R<sup>+</sup>) (50-52). Subsecuentemente, el compartimento CDP se diferencia en la subpoblación denominada pre-DC, la cual expresa CD11c y el factor de transcripción Zbtb46, caracterizada por abandonar la médula ósea y poblar los tejidos periféricos. Se ha observado que subpoblaciones de pre-DCs (distinguidas por la expresión de Siglec-H y Ly6C) tienen predisposición a generar células cDC1 o cDC2: pre-DC Siglec-H<sup>-</sup> Ly6C<sup>-</sup> dan lugar a las cDC1 mientras que pre-DCs Siglec-H<sup>-</sup> Ly6C<sup>+</sup> se diferencian a cDC2, demostrado que el compromiso hacia dichos linajes se presenta de manera muy temprana, antes de abandonar la médula ósea (53). Finalmente, las pre-DC se diferencian a DC, donde las propiedades fenotípicas y funcionales terminan de moldearse por la influencia del microambiente específico del tejido.



**Figura 2. Desarrollo de las células dendríticas.** Las DCs se desarrollan a partir MP. Las MP se diferencian a MDP, las cuales han pasado por un proceso de compromiso hacia linaje DC o monocito/macrófago. En seguida, se diferencia el CDP, las cuales se distinguen las CDP CSF-1R<sup>-</sup>, que se diferencia principalmente a pDC, y CDP CSF-1R<sup>+</sup>, que se diferencia principalmente a cDC. Subsecuentemente, se diferencia la subpoblación pre-DC, la cual abandona la médula ósea para poblar los tejidos periféricos. Finalmente, las pre-DC se diferencian a DC *in situ*. MDP: progenitor de macrófago-dendrítica. CDP: Progenitor común de DC. Pre-DC: precursor de DC. Modificado de (12)

### Citocinas que controlan el linaje de DCs

El proceso de diferenciación de las DCs está controlado por diversas citocinas como Flt3L, GM-CSF y ligandos del receptor para el factor estimulante de colonia de macrófago (M-CSFR) (54-56); sin embargo, se desconoce si otras citocinas pudieran estar involucradas en la diferenciación de las DCs.



### **Ligando de Flt3**

La citocina Flt3L es un regulador clave de la diferenciación de DCs, la cual es producida por el estroma de múltiples tejidos, células endoteliales y LT activados (57). El receptor Flt3 se expresa tanto en células madre hematopoyéticas como en progenitores mieloides y linfoides (58, 59); sin embargo, se mantiene expresado en los precursores de DCs (MDP, CDP y pre-DCs) (5, 47, 51, 60, 61) mientras que se pierde su expresión en los precursores comprometidos a linajes diferentes a DC (58). Flt3 está ausente en la mayoría de los leucocitos en la periferia, manteniéndose su expresión en pre-DC, pDC y cDCs de cualquier tejido (58), con excepción de las LCs, las cuales no se afectan por la pérdida de Flt3 ni de Flt3L (8, 18). Se ha observado que en ratones con deficiencia en Flt3 o Flt3L tienen números reducidos de MDP, CDP, pDCs y cDCs de tejido (61-63). De manera interesante, la inhibición de Flt3 y la eliminación de cDCs provoca el incremento en los niveles séricos de Flt3L (64, 65), sugiriendo un mecanismo de retroalimentación donde bajos números de cDCs resultan en el incremento de la producción de Flt3L, que a su vez, induce la diferenciación de DCs. En concordancia con lo anterior, la inyección o la sobreexpresión de Flt3L, tanto en ratón (66, 67) como en humanos (66, 68), provoca una expansión dramática de cDCs y pDCs en sangre y tejidos linfáticos y no linfáticos. Además de su participación en la diferenciación de las DCs, Flt3L también regula la proliferación de las DCs para mantener la población en homeostasis (61).

## **M-CSF**

M-CSF es un factor hematopoyético que regula la supervivencia, proliferación y diferenciación de los macrófagos (69). Su receptor, CSF-1R, está expresado en CMPs, MDPs, monocitos y macrófagos. CSF-1R también es expresado por CDPs, disminuyendo su expresión en pre-DCs y perdiendo completamente su expresión en DC1, pero manteniéndose en DC2. Por lo que la fuerza en las señales debidas por Flt3 contra CSF-1R determina la progresión de MDP hacia CDP en vez de monocitos (57). Se ha observado que CSF-1R regula parcialmente la diferenciación o supervivencia de las DC2 de tejido no linfoide (8, 18). En ratones deficientes de CSF-1R, las LCs están ausentes (37); sin embargo, se desarrollan normalmente en el ratón con una mutación natural en M-CSF (70), lo que sugiere que otro ligando de CSF-1R distinto a M-CSF está involucrado en la homeostasis de las LC. En esta dirección, IL-34, ligando de alta afinidad por CSF-1R (71), es producido en altas cantidades por los queratinocitos en la epidermis, mientras que los niveles de M-CSF son pobremente detectables (72, 73). En concordancia con lo anterior, las LCs del ratón deficiente de IL-34 están ausentes sin afectarse otras poblaciones de DCs ni macrófagos (72, 73).

## **GM-CSF**

GM-CSF es un factor de crecimiento hematopoyético que controla la diferenciación del linaje mieloide (74). Se une específicamente a CSF-2R, el cual es expresado por CMPs, MDPs, CDPs, DC1 y DC2 (6, 63). La participación de GM-CSF en el desarrollo de las DCs fue descrita en ensayos *in vitro*, donde GM-CSF fue suficiente para promover la diferenciación de progenitores hematopoyéticos y monocitos circulantes hacia células que asemejaban a las DCs tanto en morfología como en la expresión de marcadores de superficie

y la capacidad para estimular LT (75-77). Debido a lo anterior, GM-CSF sigue siendo una de las citocinas clave para la generación de vacunas con base en DCs (78); sin embargo, en el ratón deficiente de GM-CSF o de su receptor, la diferenciación de cDCs de tejido linfoide no se encuentra alterada (6). En estudios posteriores se confirmó que la ausencia de GM-CSF no afecta el desarrollo de cDCs de tejido linfoide; sin embargo, también revelaron una reducción en el número de DC1 y DC2 en el intestino, dermis y pulmón del ratón GM-CSF<sup>-/-</sup>, lo que concuerda con una alta producción de GM-CSF en dichos tejidos en el ratón silvestre (6, 63, 79). El remanente de cDCs de tejido presentes en el ratón deficiente de GM-CSF mostraron defectos pro-apoptóticos, sugiriendo que GM-CSF es un regulador crítico para la supervivencia de cDCs en tejido no linfático (6). De manera importante, GM-CSF también controla la expresión de CD103 en cDCs de tejido (6, 7, 80) y ha sido implicado en las etapas finales de la maduración de las cDCs y en la adquisición de la capacidad de presentación cruzada de antígenos (80, 81). Por lo tanto, aunque GM-CSF no tiene efecto en las DCs de tejido linfoide ni en la diferenciación de las DCs, regula la homeostasis y funcionamiento de las DCs de tejido no linfoide.

### **Linfotoxina $\beta$**

Se ha observado que en ratones deficientes del receptor de linfotoxina  $\beta$  (LT $\beta$ R) o de su ligando asociado a membrana LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 tienen números reducidos en las cDCs de bazo (82-84), específicamente en las DC2 las cuales presentan deficiencias en su proliferación (83, 84). La principal fuente de LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 para la homeostasis de las DC2 son los linfocitos B y se ha observado que la sobreexpresión transgénica de LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 en dichas células provoca una expansión de la población DC2 (83). Más aún, el ratón deficiente de RelB, importante para

la señalización de  $LT\beta R$ , tiene una reducción dramática en el número de DC2 de bazo (85). A pesar de lo anterior, la contribución de  $LT\beta R$  en la homeostasis de DC2 de tejido linfoide aún no ha sido explorada.

## **TGF $\beta$ 1**

Se ha observado que TGF $\beta$ 1 es requerido principalmente para la diferenciación de LC tanto en ratón como en humanos (38, 86, 87). Aunque TGF $\beta$ 1 es expresado por queratinocitos y LCs, se necesita la fuente autocrina para el desarrollo de las LC (88). TGF $\beta$ 1 también actúa directamente sobre las LCs, autocrina o parácrinamente, para inhibir la migración homeostática e inducida por inflamación (89, 90). Adicionalmente, TGF $\beta$ 1 regula la maduración de las DCs provocando un fenotipo tolerogénico en las mismas (91-93).

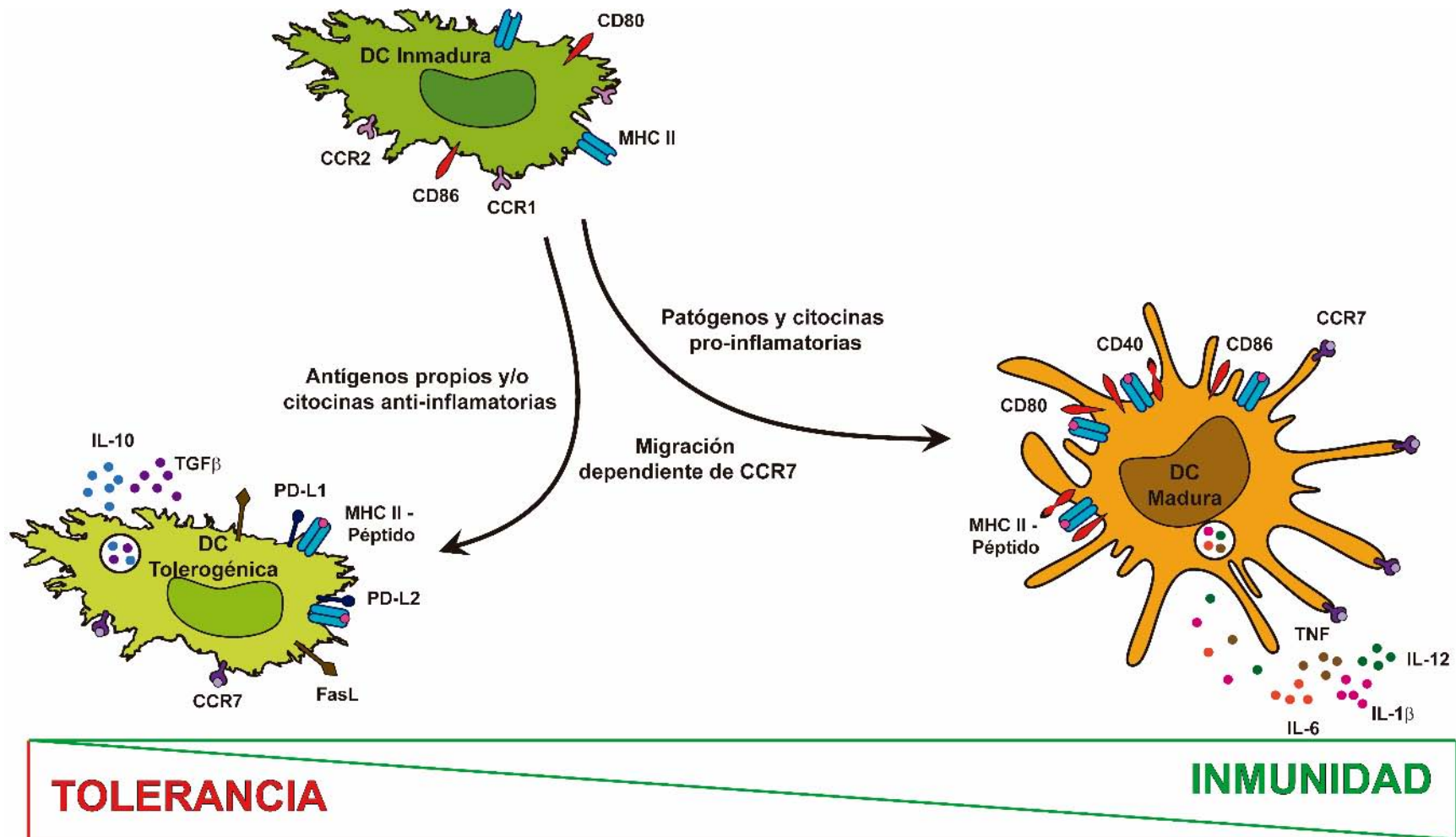
## **Funciones de las DCs**

### **Inmunidad**

Al término de la diferenciación, las DCs se encuentran en estado inmaduro. Las DCs inmaduras (iDCs) se caracterizan por tener alta capacidad de endocitosis y procesamiento de antígenos, además de tener baja expresión de MHC II y de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD86. Las iDCs son centinelas que continuamente están censando la presencia de antígenos, para lo cual, requieren abrirse paso entre el tejido. En este contexto, su morfología extendida con alta cantidad de podosomas tiene un papel fundamental ya que los podosomas, siendo estructuras de adhesión formadas por actina filamentosa y moléculas de anclaje como la cinasa de adhesión focal (FAK), Vinculina, Cofilina, la proteína del síndrome

de Wiskott Aldrich (WASP), entre otras (94, 95)), tienen características protrusivas e invasivas, capaces de expresar metaloproteasas (MMP-14) importantes para la degradación de la matriz extracelular (96). Asimismo, las iDCs expresan diversos receptores de quimiocinas dependiendo del tejido en donde se encuentren.

Cuando las iDCs capturan y procesan antígenos, en presencia de citocinas pro-inflamatorias, comienzan el proceso de maduración, en donde las DCs migran hacia los NLs. Durante dicho proceso, las DCs modifican su morfología presentándose en forma contraída, acompañada por la disolución de los podosomas (97). Aunado a lo anterior, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas de las DCs se modifica, de tal manera que principalmente se encuentra en superficie el receptor CCR7, dirigiendo la migración hacia los NLs. Debido a lo anterior, la migración que presentan las mDCs es rápida y dirigida. Además, las DCs incrementan la expresión de MHC II, CD40, CD80 y CD86 para que, en conjunto con la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (revisado en (98, 99)) (Figura 3), se presenten antígenos y se activen a los LT para iniciar la respuesta inmune adaptativa.



**Figura 3. Características de las DCs inmunogénicas y tolerogénicas.** Las DCs inmunogénicas se caracterizan por tener alta expresión de MHC II y moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) y por secretar citocinas pro-inflamatorias. Las DCs tolerogénicas se caracterizan por tener alta expresión de moléculas co-inhibidoras (PD-L1, PD-L2) y por secretar citocinas anti-inflamatorias (TGFβ, IL-10).

## Tolerancia

Además de su función en la inmunidad, las DCs participan activamente en la tolerancia inmunológica en homeostasis. Diversos estudios han resaltado la participación de las DCs en el desarrollo de los LT en el timo, demostrando que las DCs son capaces de inducir la selección negativa de los LT, pero no la selección positiva (100). Durante la selección negativa, las DCs presentan, de manera directa o por presentación cruzada, antígenos propios a los timocitos resultando en la delección de clonas autorreactivas de LT (101-103) o en la generación de linfocitos T reguladores (Tregs) naturales (104). Dichos antígenos pueden provenir de las células epiteliales tímicas de médula (mTEC), ya que expresan diversos antígenos específicos de tejidos periféricos dependientes del regulador autoinmune AIRE (105). Aunado a lo anterior, las DCs periféricas cargadas con antígenos migran hacia el timo para promover la selección negativa (106).

Debido a las limitaciones de la tolerancia central, es necesario mantener la tolerancia en la periferia para: 1) deletar LTs autorreactivos que hayan escapado a la selección negativa, 2) promover la tolerancia a antígenos ambientales provenientes de la microbiota comensal y/o de la dieta diaria y 3) evitar la activación cruzada de LTs con TCRs específicos para antígenos foráneos a antígenos propios. En este contexto, imágenes de dos fotones y de microscopía intravital han revelado interacciones dinámicas entre las DCs y los LTs, incluso en ausencia de estímulos infecciosos (107, 108). Scheinecker et al demostró que, en condiciones homeostáticas, las DCs presentan antígenos propios a los LTs en los NL (109). De esta manera, las DCs tienen un papel clave en el mantenimiento y la promoción de la tolerancia de los LTs periféricos, por medio de la presentación continua de antígenos propios

e inocuos (110, 111). En este caso, las DCs que capturan antígenos en un microambiente con citocinas tolerogénicas como TGFβ e IL-10, se activan e incrementan las moléculas MHC II; sin embargo, en vez de incrementar la expresión de moléculas co-estimuladoras, incrementan principalmente moléculas co-inhibidoras, como es el caso de PD-L1 y PD-L2; además, son incapaces de secretar citocinas proinflamatorias. En consecuencia, los LT que reconozcan los antígenos presentados por las DCs no se activarán para establecer una respuesta inmune sino por el contrario, generarán anergia o, ayudados por las citocinas antiinflamatorias producidas por las DCs, como TGFβ e IL-10, se inducirá la generación de Tregs. Lo anterior fue demostrado por el grupo de Maries van den Broek, en donde la expresión de un antígeno inmunodominante derivado de virus por las DCs resulta en la anergia de los LTs CD8<sup>+</sup> (112). En estudios posteriores se observó que la tolerancia inducida por las DCs involucra la expresión de PD-1 y CTLA4 en LTs CD8<sup>+</sup> y en la inducción de Tregs (113, 114).

### ***Funciones especializadas: DC1***

Como se mencionó anteriormente, las DCs CD8<sup>+</sup> y DCs CD103<sup>+</sup> comparten características tanto de ontogenia como de función. En este sentido, se ha observado que tienen un patrón de expresión similar de TLRs, receptores de lectina tipo C y receptores de quimiocinas (115). Particularmente, las DC1 expresan TLR3 (116, 117), que une a RNA viral de doble cadena, y TLR11 (118), que une a proteína de *Toxoplasma gondii*. Además, expresan altos niveles del receptor scavenger CD36, el cual une a células muertas (119), y de Clec9A (11), lectina tipo C que une cuerpos necróticos. Aunado a lo anterior, expresan CD205, CD207 pero no DCIR2 y dectina 1 (11, 120-124).

Estudios *ex vivo*, en donde se purifican DCs tras la inoculación *in vivo* de un antígeno, han revelado una capacidad superior de las DC1 sobre las DC2 para presentar antígenos



microbianos (125-130) y antígenos asociados a células (126, 131-134) a los LT CD8<sup>+</sup>. En el ratón Langerina-DTR, en donde las DCs CD207<sup>+</sup> expresan el receptor de la toxina diftérica, se eliminan las DCs CD103<sup>+</sup> de pulmón, DCs CD8<sup>+</sup> junto con las LCs tras la inoculación de la toxina diftérica. En este modelo se evidenció la participación no redundante de las DCs CD207<sup>+</sup> en la inducción de LT CD8<sup>+</sup> específicos para el virus de influenza (135) y específicos para *Leishmania major* (136). De manera similar, el ratón deficiente de Batf3, el cual es deficiente de DCs CD8<sup>+</sup> y CD103<sup>+</sup>, es incapaz de establecer una respuesta citotóxica específica tras la inoculación subcutánea del virus del Nilo o tras la infección pulmonar con el virus de influenza (131, 137). En este sentido, se ha observado que las DCs CD8<sup>+</sup> tienen mayor expresión de genes relacionados con la presentación vía MHC I que las DCs CD11b<sup>+</sup> (120). Además, son la fuente principal de IL-12 (138) e IL-15 (139), las cuales están involucradas en la diferenciación de LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos (140). Más aún, las DC1 son las únicas células hematopoyéticas que expresan el receptor de quimiocina XCR1 y los LT CD8<sup>+</sup> rápidamente expresan el ligando XCL1 tras la presentación antigénica con las DC CD8<sup>+</sup>, de esta manera se favorece la diferenciación de LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos (141). Por lo tanto, las DC1 tienen mayor potencial para activar a LT CD8<sup>+</sup> que las DC2.

En concordancia con lo anterior, las DC1 también tienen mayor capacidad para realizar la presentación cruzada de antígenos. La habilidad de las DCs CD8<sup>+</sup> para procesar y cargar antígenos exógenos de manera eficiente se estableció desde el 2000 (132). De manera similar, las DCs CD103<sup>+</sup> dermales y de pulmón tienen una habilidad superior para presentar antígenos asociados a células por presentación cruzada en comparación con las DCs CD11b<sup>+</sup> (142). La presentación cruzada depende de dos factores críticos: 1) una vía endocítica con bajo potencial para degradar antígenos (143, 144) y 2) un transporte vía fagosoma hacia el

citosol que permita tanto la transferencia de antígenos del fagosoma hacia el citosol como del montaje a las moléculas MHC I (145). Las DC CD8<sup>+</sup> presentan ambas características ya que están enriquecidas en Rac2, una GTPasa que ayuda al mantener el fagosoma alcalino limitando la actividad proteasa y favoreciendo la presentación cruzada de antígenos exógenos (146).

Además de la función de las DC1 en la activación de LT CD8<sup>+</sup>, también se ha descrito la participación de las DC1 en la activación de LT CD4<sup>+</sup>; sin embargo, es dependiente del tipo de antígeno. Se ha observado que las DCs CD103<sup>+</sup> dermales controlan la inducción de LT CD4<sup>+</sup> INF $\gamma$ <sup>+</sup> antígeno específico tras la infección cutánea con *Candida albicans* (147). Además, la deficiencia de DCs CD103<sup>+</sup> del ratón langerina-DTR disminuye la inducción de la respuesta tipo Th1 y el desarrollo de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) (79). Por otro lado, el ratón deficiente de Batf3 puede establecer, de manera eficiente, una respuesta tipo T CD4<sup>+</sup> en respuesta a fibrosarcoma y al virus del Nilo (131); así como una respuesta específica a la glicoproteína de oligodendrocito tras la inmunización subcutánea, provocando la enfermedad severa de EAE (7).

### ***Funciones especializadas: DC2***

La contribución de las DC2 a la inmunidad ha sido difícil de determinar ya que se carece de modelos de estudio en donde se eliminen condicionalmente las DCs CD11b<sup>+</sup>. Se sabe que las DC2 tienen diferente patrón de expresión de PRRs en comparación con las DC1, aunque el perfil exacto de PRRs se desconoce ya que depende de los subtipos de DC2. A manera de ejemplo, el patrón de expresión de PRRs de las DCs CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> del intestino tiene mayor similitud a las DCs CD11b<sup>-</sup> CD103<sup>+</sup> que a las DCs CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>. Las DCs

CD11b<sup>+</sup> de bazo expresan altos niveles de RIG-1 (148) y son grandes productoras de citocinas tanto en homeostasis como tras la estimulación (149).

A pesar de que la presentación cruzada de antígenos está constitutivamente activa en las DC1, se ha observado que dicha presentación puede ser inducida en las DCs CD11b<sup>+</sup> de bazo mediante la ligación del receptor para Fcγ (150). En ensayos *ex vivo* de modelos de infección viral, se sugiere que las DC2 pueden presentar antígenos virales a los LT CD8<sup>+</sup> (151-153); sin embargo, se desconoce si la presentación vía MHC I resulta de la presentación cruzada o de la presentación directa de los antígenos virales. En otros estudios, en donde los ratones son infectados con el virus de la influenza, se ha observado que las DCs CD11b<sup>+</sup> estimulan específicamente a los LT CD4<sup>+</sup> siendo incapaces de presentar células infectadas por el virus mediante la presentación cruzada (137).

Por otro lado, se piensa que las DC2 tienen una función predominante en la presentación por MHC II. Se ha demostrado que las DCs CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> de bazo expresan altos niveles de genes que codifican para proteínas involucradas en la vía MHC II comparado con las DCs CD8<sup>+</sup> (120). En ensayos *in vivo*, se ha demostrado que las DC CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> tienen mayor eficiencia para presentar por MHC II a los LT CD4<sup>+</sup> que las DCs CD8<sup>+</sup> en homeostasis (154). En concordancia con lo anterior, se ha observado que, tras la infección con HSV-1 o el virus de influenza, las DCs CD11b<sup>+</sup> migratorias presentan antígenos virales predominantemente a los LT CD4<sup>+</sup> *ex vivo* (126, 151). Además, las DC CD11b<sup>+</sup> dermales son la subpoblación predominante para dirigir la acumulación de LT CD4<sup>+</sup> efectores y de Tregs después de la vacunación subcutánea de antígenos relevantes (153, 155).

## **Superfamilia de TGF $\beta$**

La superfamilia de TGF $\beta$  es un grupo compuesto por factores de crecimiento extracelulares, los cuales están involucrados en la regulación de numerosos procesos celulares que incluyen la diferenciación, proliferación, organización del citoesqueleto, adhesión y apoptosis.

La superfamilia comprende más de 30 moléculas que se clasifican en 3 familias principales: 1) TGF $\beta$  compuesta por 3 isoformas; 2) Activinas e Inhibinas, que comprenden las múltiples formas de Activinas e Inhibinas; 3) las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) que comprenden también a los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), NODAL y la hormona anti-Mulleriana (AMH).

En general, los miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  están compuestos por dos subunidades proteicas, las cuales son expresados como proteínas precursoras. Cada precursor está compuesto por un péptido señal en el extremo N-terminal, seguido de un prodominio, y el dominio maduro en el extremo C-terminal. Las citocinas maduras, usualmente homo- o heterodímeros, están unidos por puentes disulfuro producto de 6 a 9 residuos de cisteínas que se encuentran en el dominio maduro (156); sin embargo, el prodominio es importante para el correcto plegamiento, formación del puente disulfuro y exportación de la proteína madura. El prodominio es cortado del dominio activo por convertasas como la furina (157); sin embargo, permanecen unidos a la proteína madura mediante enlaces no covalentes inclusive después de la secreción, tal es el caso de TGF $\beta$ . Dicha unión es suficientemente fuerte para evitar la actividad biológica de los ligandos. En el caso de TGF $\beta$ , el prodominio se llama

péptido asociado a latencia (LAP), el cual puede interactuar con la proteína de unión a TGF $\beta$  latente (LTBP) para localizar a TGF $\beta$  en la matriz extracelular (158).

Los miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  señalizan a través de una familia de receptores de membrana con actividad de cinasa de serina y treonina. Con base en sus propiedades estructurales y funcionales, los receptores se dividen en 2 subtipos: receptores tipo I (Activin Like Kinase ALK) y receptores tipo II (159). En vertebrados, se han descrito 7 receptores tipo I (ALK 1-7) y 5 receptores tipo II (Tabla 1). Los receptores tipo I y tipo II son glicoproteínas de aproximadamente 55kDa y 70kDa respectivamente, con una región extracelular de alrededor de 150 aminoácidos con más de 10 residuos de cisteína importantes para el plegamiento de la región. Adicionalmente, el receptor tipo I tiene la característica de poseer una región altamente conservada de 30 aminoácidos en la región intracelular, la cual precede al dominio cinasa, denominado dominio GS por la secuencia SGS $\beta$ SG que contienen (160).

Cuando los ligandos se unen al receptor tipo II, el receptor tipo I correspondiente es reclutado para formar un complejo receptor/ligando, en donde el receptor tipo I es activado por la fosforilación del dominio GS dado por el receptor tipo II (161, 162), el cual está constitutivamente activo (Figura 4). En consecuencia, los sitios serina/treonina fosforilados proveen un sitio de unión para las moléculas SMAD, las cuales son, a su vez, fosforiladas por el receptor tipo I.

**Tabla 1. Ligandos y receptores de la superfamilia de TGF $\beta$**

<b>Familia</b>	<b>Ligandos</b>	<b>Receptores tipo I</b>	<b>Receptores tipo II</b>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	TGF $\beta$ 1 TGF $\beta$ 2 TGF $\beta$ 3	ALK1, ALK5	TGFBR2
<b>Activinas</b>	Activina A	ALK4, ALK7	ACVR2A, ACVR2B
<b>Inhibinas</b>	Activina AB		
	Activina B	Desconocido	
	Inhibina A	T $\beta$ RIII	ACVR2A, ACVR2B
	Inhibina B	InhBP	
<b>NODAL</b>	NODAL	ALK4, ALK7	ACVR2A, ACVR2B
<b>BMP</b>	BMP-2	ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
<b>GDF</b>	BMP-3	Desconocido	ACVR2B
	BMP-4	ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	BMP-5	ALK2, ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	BMP-6	ALK2, ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	BMP-7	ALK2, ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	BMP-8B	ALK2, ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	BMP-10	ALK1	ACVR2A, BMPR2
	BMP-15	ALK6	BMPR2
	GDF-1	ALK4, ALK7	ACVR2A, ACVR2B
	GDF-2	ALK1	ACVR2A, BMPR2
	GDF-3	ALK4, ALK7	ACVR2A, ACVR2B
	GDF-5	ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	GDF-6	ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	GDF-7	ALK3, ALK6	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2
	GDF-8	ALK4, ALK5	ACVR2B
	GDF-9	ALK5	BMPR2
	GDF-10	ALK4	ACVR2A, ACVR2B
	GDF-11	ALK4, ALK5	ACVR2A, ACVR2B
	GDF-15	Desconocido	TGFBR2
<b>AMH</b>	AMH	ALK4, ALK3	AMHR2

ACVR, receptor de Activina; ALK, cinasa tipo receptor de Activina; AMH, hormona anti-Mulleriana; AMHR, receptor de AMH; BMP, proteína morfogénica de hueso; BMPR, receptor de BMP; GDF, factor de crecimiento y diferenciación; TGFBR, receptor de TGF $\beta$ . (163).

Betaglicano (T $\beta$ RIII) y Endoglina son receptores tipo III de la superfamilia de TGF $\beta$ . Endoglina se expresa en altos niveles en células endoteliales y en bajos niveles en monocitos, precursores eritroides y otros tipos celulares (164, 165). T $\beta$ RIII es una proteína anclada a membrana que une a TGF $\beta$ , facilitando la interacción del ligando con el receptor tipo II (166, 167). Además, se ha observado que también une a Inhibina, promoviendo la unión al receptor tipo II para Activina (168).

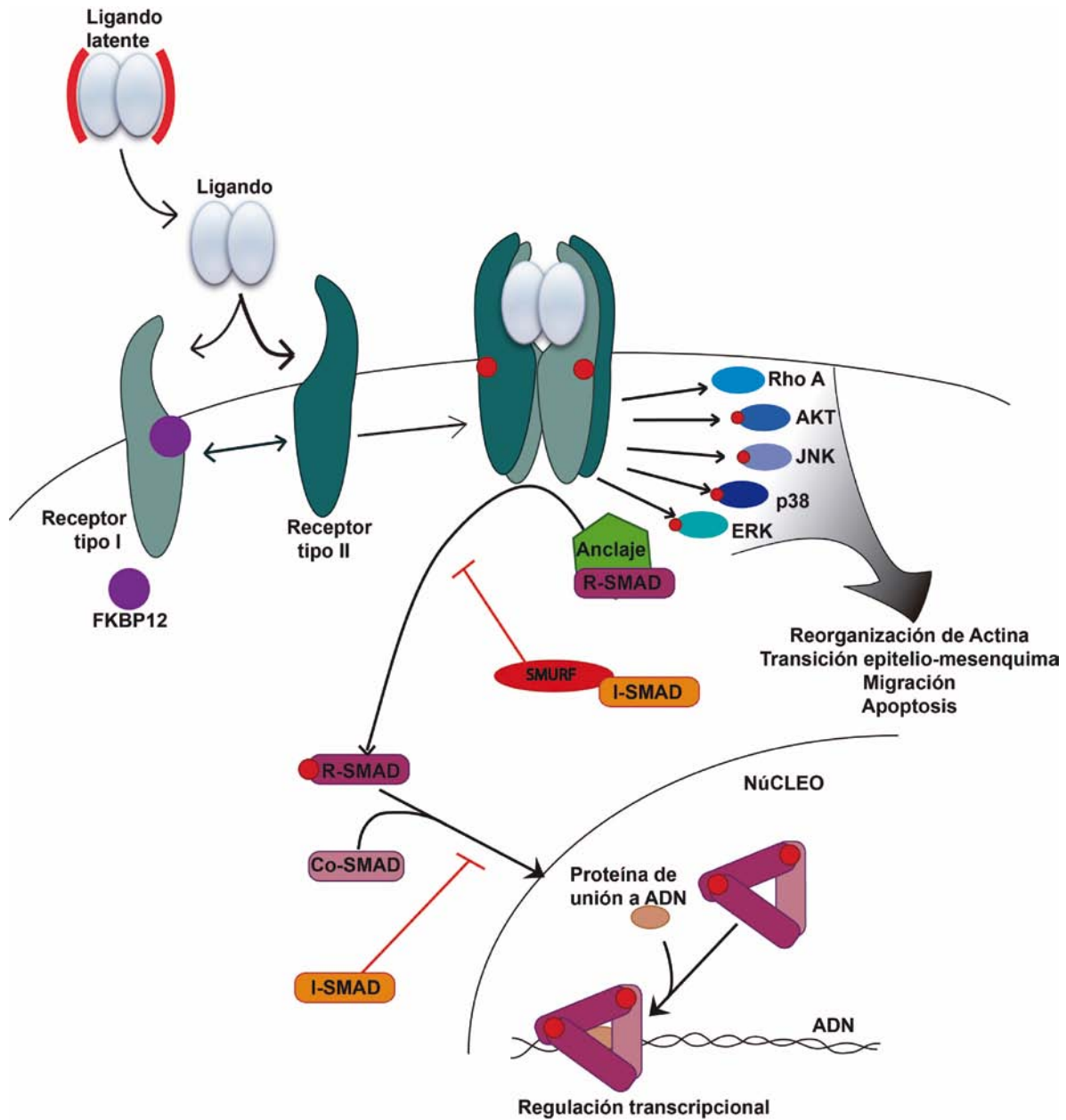
Existen 8 proteínas SMAD codificadas en el humano y ratón. Debido a su actividad, se pueden dividir en 3 grupos principales: 1) R-SMAD, o SMAD reguladas por receptores, son las que actúan como sustratos de los receptores tipo I (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8); 2) Co-SMAD, o SMAD común (SMAD4), el cual funciona como compañero en común de todos los R-SMAD; y las 3) I-SMAD, o SMAD inhibitorias (SMAD6, SMAD7), las cuales actúan como señuelos para interferir en las interacciones SMAD-receptor o SMAD-SMAD.

Las R-SMAD y SMAD4 están en continuo movimiento entre el núcleo y el citoplasma, por lo que se requiere de proteínas de anclaje para la presentación de la R-SMAD al receptor tipo I. Dentro de las proteínas de anclaje que promueven la fosforilación de R-SMAD se encuentran SARA, endofina, axina, DAB2 y DOK1 (170). Cuando las R-SMAD son fosforiladas por el receptor tipo I, forman complejos con la Co-SMAD para trasladarse al núcleo, en donde regulan la transcripción de genes por la interacción directa con el DNA o por la interacción con otros factores de transcripción (figura 4). La señalización mediada por R-SMAD puede ser inhibida por la SMAD7 ya que evita la fosforilación de R-SMAD por ocupar el sitio de unión de los receptores tipo I (171). Por otro lado, la SMAD6 inhibe preferencialmente la señalización mediada por BMPs ya que compete con SMAD4 por la

unión de SMAD1 fosforilado, formando un complejo inactivo SMAD1/SMAD6 (172). Tanto SMAD6 como SMAD7 funcionan como retroalimentación negativa ya que se ha observado que los niveles de SMAD6 y SMAD7 incrementan en respuesta a BMP, Activina y TGF $\beta$  (169, 173).

La señalización dependiente de SMADs es la vía que más se ha estudiado para la superfamilia y se denomina la vía de señalización canónica. Sin embargo, la unión de los ligandos a los receptores también activa diversas vías de señalización alternativas, conocidas como señalización no canónica. Estas vías de señalización involucran la activación de diversas moléculas como las GTPasas Rho, Rac y Cdc42; la vía de MAPKs que incluyen MEK1/2 y ERK1/2, así como TRAF4/6, TAK1, MKK3/6 y p38; la vía PI3K-AKT-mTOR; GSK3 $\beta$ , las cinasas dependientes de ciclina (CDKs) (163, 174). Dichas moléculas pueden interaccionar con las SMAD o ser directamente activadas por los receptores.



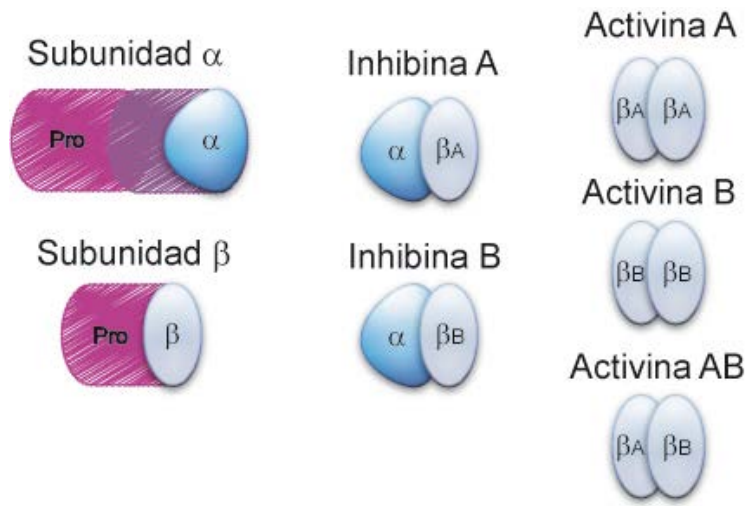


**Figura 4. Mecanismo de señalización de la superfamilia de TGFβ.** Los miembros de la superfamilia son ligandos diméricos que permanecen en forma latente por la unión no covalente de su propéptido o atrapados por la unión de otros factores como Folistatina. En la forma libre, los ligandos se unen a los receptores tipo I y tipo II, promoviendo la formación de un complejo heterotetramérico. En la región citoplasmática del receptor tipo I, el dominio GS está inhibido por FKBP12; sin embargo, la fosforilación del dominio GS por el receptor tipo II provoca un sitio de unión para la R-SMAD. Basalmente, las R-SMAD y SMAD4 están en constante movimiento entre el núcleo y el citoplasma. Las proteínas de anclaje, como SARA, capturan a las R-SMAD para presentarlas al receptor tipo I, en consecuencia, el receptor tipo I fosforila a la R-SMAD en la región C-terminal, permitiendo la unión a SMAD4 y la acumulación del complejo R-SMAD/SMAD4 en el núcleo. Dicho complejo se une a cofactores de unión a DNA que le permiten unirse a genes específicos para activar o reprimirlos. La defosforilación de la R-SMAD termina el ciclo de señalización (169).

## Inhibinas

El descubrimiento de las Inhibinas se remonta a 1932, cuando McCullagh demostró que el extracto de testículos de toro previene la hipertrofia de la glándula pituitaria asociada a la castración en ratas. A dicho extracto lo llamó “Inhibina” (175). Actualmente se sabe que las Inhibinas forman parte del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (176) ya que son producidas en las gónadas, por las células de Sertoli en los testículos y las células granulosas en los folículos ováricos, y actúan de manera endócrina regulando negativamente la síntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH). Sin embargo, es cada vez más amplio el espectro de funciones de estas hormonas, incluidos efectos sobre células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B (177).

Las Inhibinas son heterodímeros conformados por una subunidad  $\alpha$ , de aproximadamente 20kDa, y una  $\beta$ , de aproximadamente 14kDa, unidos por un puente disulfuro, mientras que sus homólogas, las Activinas, forman un dímero compuesto por dos subunidades  $\beta$  (178). Hasta el momento, se ha descrito un único tipo de subunidad  $\alpha$ ; sin embargo, existen diferentes tipos de subunidades  $\beta$ : A, B, C y E, generando diferentes subtipos tanto de Inhibinas como de Activinas, las cuales se denominan de acuerdo al tipo de subunidad  $\beta$  que las compongan, de tal manera que la Inhibina A es un dímero  $\alpha\beta_A$ , la Inhibina B es  $\alpha\beta_B$ , la Activina A  $\beta_A\beta_A$ , Activina B  $\beta_B\beta_B$  y la Activina AB es  $\beta_A\beta_B$  (Figura 5).



**Figura 5. Composición de las Activinas y las Inhibinas.** Las subunidades de las Inhibinas y Activinas son sintetizadas como pro-proteínas compuesto por el prodominio y el dominio maduro. Las pro-proteínas se dimerizan y el prodominio es cortado, dando lugar a las Inhibinas y Activinas (179).

Al igual que otros ligandos de la superfamilia de  $TGF\beta$ , las subunidades se expresan como proproteínas, los prodominios de las subunidades son importantes para el plegamiento y ensamblaje de los péptidos maduros ya que promueven la conformación adecuada para la dimerización de las subunidades (180, 181). Se ha observado que cualquier mutación en el prodominio, especialmente en los aminoácidos Leu30, Phe37 y Leu41, reduce la producción de Activina A e Inhibina A debido a una falla en la dimerización de las subunidades (179). Además del pro-dominio, la subunidad  $\alpha$  de Inhibinas tienen glicosilaciones postraduccionales las cuales repercuten en la producción, secreción y actividad de la Inhibina A, además de afectar la afinidad por  $T\beta RIII$  (182-184). La subunidad  $\alpha$  también se puede encontrar en una forma no activa, aunque se desconoce la actividad que pueda tener.

Una vez que las subunidades se encuentran dimerizadas, el pro-dominio es cortado por convertasas de proproteínas; sin embargo, se mantienen asociadas a través de interacciones no covalentes (185, 186). En esta forma, tanto las Inhibinas como las Activinas

son secretadas de las células y son protegidas de la degradación que puedan sufrir extracelularmente (180). La unión de los dímeros maduros a los receptores desplaza a los prodominios (181).

### **Mecanismo de señalización de las Inhibinas**

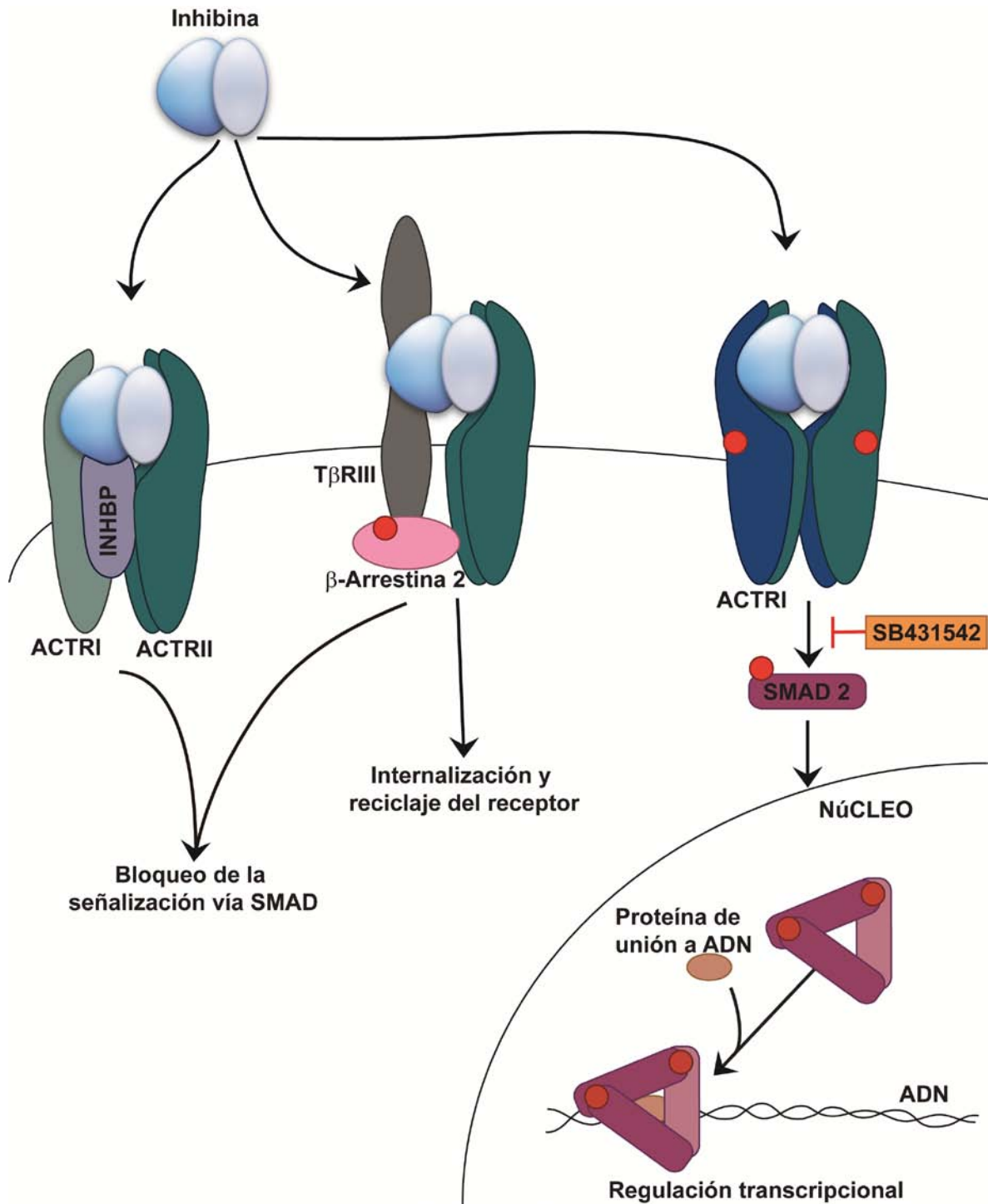
En relación con su principal función regulando la secreción de la FSH, las Inhibinas ejecutan sus funciones biológicas antagonizando las acciones de las Activinas. Al igual que el resto de los miembros de la superfamilia de TGF $\beta$ , las Activinas señalizan por la vía canónica la cual inicia cuando se unen al receptor tipo II (ACTRII, ACTRIIB), en consecuencia, se recluta al receptor tipo I (ALK4), el cual es fosforilado por el receptor tipo II. En seguida, el receptor tipo I fosforila a las proteínas SMAD2/3, las cuales se unen con la SMAD4 permitiendo su translocación a núcleo para actuar como factores de transcripción (187).

Por otro lado, la vía de señalización de las Inhibinas está pobremente esclarecida debido a las dificultades metodológicas para la generación y purificación de las Inhibinas recombinantes, además del desconocimiento de su receptor. En diversos estudios se ha evidenciado la presencia de receptores específicos para Inhibina tanto en tejidos normales como tumorales (188, 189). Además, se han purificado proteínas de membrana que unen específicamente a Inhibinas de tumores gonadales en el ratón deficiente de Inhibina  $\alpha$  (188). A pesar de lo anterior, los intentos por clonar otros miembros de la familia de receptores cinasa para serina y treonina han fallado (190), por lo que se ha propuesto que las Inhibinas actúan como ligandos antagónicos de la señalización de las Activinas (190). Esto se debe a que las Inhibinas pueden unirse al receptor tipo II (ACTRII, ACTRIIB) por medio de la

subunidad  $\beta$  bloqueando la interacción del receptor con las Activinas (Figura 6). La afinidad con la que las Inhibinas se unen al receptor tipo II es controversial: en algunos ensayos se ha reportado que la afinidad de la Inhibina A por el ACTRIIA y ACTRIIB es de 2-10 veces menor que la afinidad de la Activina A (191), sin embargo, en otros sistemas se ha reportado que la Inhibina A antagoniza a la Activina A en concentraciones equimolares o hasta en menor concentración (191). En otros estudios utilizando líneas celulares que responden a Activina se ha observado que son insensibles a Inhibina, incluso a altas concentraciones, lo que sugiere que se necesita más que la simple competencia por el receptor (191-193).

En otros estudios se han identificado sitios de unión de las Inhibinas diferentes a los sitios de unión de la Activina A, sugiriendo fuertemente la existencia de receptores específicos de Inhibina (190). Uno de los candidatos es T $\beta$ RIII (correceptor para TGF $\beta$ ) ya que se sabe que puede unir Inhibina A con alta afinidad en un sitio diferente al sitio de unión de TGF $\beta$  (168, 191, 194). Se ha observado que la mutación de los aminoácidos Thr111, Ser112 y Tyr120 en T $\beta$ RIII, importantes para la unión de Inhibina, provoca que la Inhibina A sea incapaz de suprimir la liberación de FSH inducida por Activina en células pituitarias de rata (184). Otro de los receptores candidatos es la proteína de unión a Inhibina/p120 (INHBP/P120), el cual es una proteína transmembranal con una cola citoplasmática corta y deficiente de actividad cinasa (191). A diferencia de T $\beta$ RIII, INHBP forma un complejo con ALK4 independientemente de la unión del ligando; sin embargo, INHBP no bloquea la señalización de Activina en ausencia de Inhibina. Además, se ha reportado que la transcripción de genes debido al estímulo con Activina es bloqueada por INHBP en presencia de Inhibina B, pero no así con Inhibina A, lo que sugiere que INHBP podría ser específico para Inhibina B (191, 195, 196).

Debido a que tanto T $\beta$ RIII como INHBP carecen de dominios cinasa en la cola citoplasmática capaz de fosforilar a R-SMAD, se dice que las Inhibinas no señalizan por la vía canónica de la superfamilia de TGF $\beta$  (197). A pesar de lo anterior, se ha demostrado en diversos ensayos utilizando células del sistema inmune que las Inhibinas pueden tener un mecanismo de acción propio y que la función que ejercen no es necesariamente la opuesta a las Activinas (198). Aunado a lo anterior, en datos no publicados de nuestro grupo de investigación, se ha observado que la estimulación de timocitos y células Jurkat con la Inhibina A y la Inhibina B resulta en la fosforilación del factor de transcripción SMAD2 dependiente del receptor tipo I, lo cual sugiere que las Inhibinas puede unirse a un receptor tipo I para inducir una señal intracelular vía SMAD en la célula (199).



**Figura 6. Mecanismo de señalización de las Inhibinas.** Las Inhibinas pueden unirse a diversos tipos de receptores. I. La Inhibina B se unen al receptor tipo II, INHBP y al receptor tipo I. Este complejo evita la señalización vía SMAD. II. Las Inhibinas se unen al receptor tipo II por la subunidad  $\beta$  y T $\beta$ RIII por la subunidad  $\alpha$ , evitando el reclutamiento del receptor tipo I. Este complejo induce la internalización del receptor tipo II. III. Las Inhibinas inducen la fosforilación de SMAD2 la cual es bloqueada en presencia del inhibidor de receptores tipo I (SB431542).

## Superfamilia de TGF $\beta$ en la biología de las DCs

Existen numerosos reportes que enfatizan la participación de diferentes miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  en la biología de las DCs, especialmente de TGF $\beta$ . En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que TGF $\beta$  está involucrada en la diferenciación de las DCs. Cuando se tratan células progenitoras multipotenciales (MPP) con TGF $\beta$ 1 resulta en la regulación positiva de genes asociados a DCs, como Flt3L, Irf8 e Irf4, sugiriendo que TGF $\beta$ 1 induce el compromiso a DC en MPP. Además, TGF $\beta$ 1 acelera la diferenciación a DCs a partir de CDPs dirigiendo la diferenciación hacia el fenotipo cDCs a costa del desarrollo de pDCs (200, 201).

La participación de TGF $\beta$  en el desarrollo de LCs se ha propuesto desde hace 20 años, cuando se demostró que el ratón deficiente de TGF $\beta$  carece completamente de LCs (38). En diversos estudios posteriores, se ha ratificado la función de TGF $\beta$  en el desarrollo de LC, por ejemplo, en ensayos *in vitro* se demostró que TGF $\beta$  dirige la diferenciación de progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> hacia el fenotipo LC (202). Además, TGF $\beta$ 1 dirige la diferenciación de monocitos hacia LCs en presencia de GM-CSF e IL-4 (86). A pesar de lo anterior, las LCs pueden encontrarse en sitios carentes de TGF $\beta$ 1 como en la capa basal de queratinocitos y en la epidermis prenatal (203, 204). En este contexto, se ha encontrado que BMP7 promueve la diferenciación de LC en ausencia de la señalización canónica por TGF $\beta$ , además, en el ratón deficiente de BMP7 la población LC se encuentra disminuida (205). De manera interesante, BMP7 está altamente expresado en la epidermis fetal al mismo tiempo en que las LCs están presentes, pero TGF $\beta$  es indetectable. Al igual que TGF $\beta$ 1 y BMP7, se ha observado que la inyección de Activina A en explantes humanos de piel induce el incremento del número de células CD1 $\alpha$ <sup>+</sup> CD207<sup>+</sup> tanto en epidermis como en dermis (206). De manera



interesante, la diferenciación de LCs por Activina A es independiente de TGF $\beta$ . En concordancia con lo anterior, los números de LCs están incrementados en el ratón que sobreexpresa Activina A en la piel (207, 208). Los datos anteriores sugieren fuertemente que diversos ligandos de la superfamilia de TGF $\beta$  están involucrados en el desarrollo de las DCs, teniendo funciones complementarias.

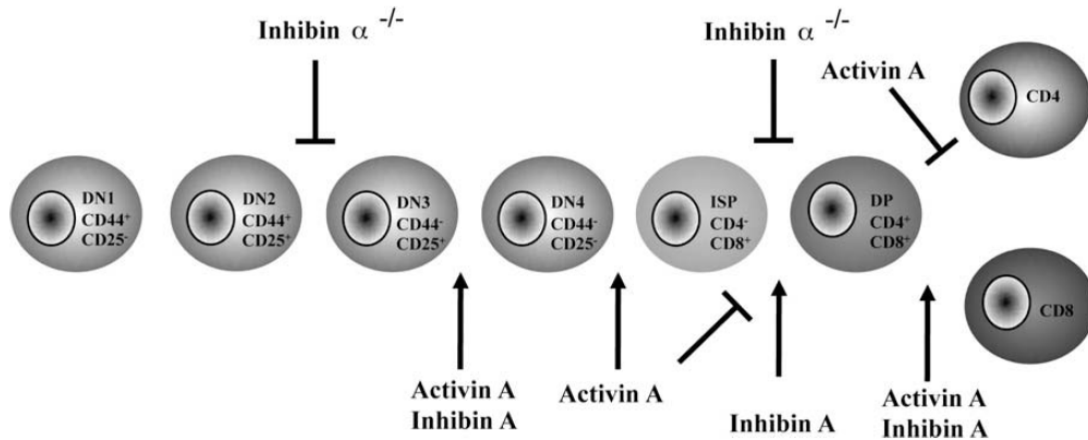
Las DCs expresan, al menos a nivel transcripcional, los receptores tipo I (ALK2, ALK3, ALK4, ALK5) y receptores tipo II (TGFBRII, BMPRII, ACTRIIA, ACTRIIB). Además, expresan todos los componentes de la vía canónica de señalización, incluyendo las R-SMAD (SMAD1/5/8 y SMAD2/3); así como SMAD4 (205, 209, 210). Debido a lo anterior, las DCs son capaces de responder a casi todos los miembros de la superfamilia de TGF $\beta$ . De manera general, se sabe que en las DCs, TGF $\beta$  disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNF $\alpha$ , IL-12 e INF $\gamma$ , promoviendo la liberación de citocinas antiinflamatorias como el mismo TGF $\beta$  (163). Además, TGF $\beta$  disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80, CD83, CD86; así como MHC II (90, 211-213).

Otros ligandos, como Activina A, han mostrado tener funciones reguladoras sobre las DCs. La inhibición endógena de Activina A por Folistatina, el cual se une a Activina evitando la unión al receptor tipo II, incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-6, IL-8, IL-12, TNF $\alpha$  e IL-10, inducidas por la estimulación con CD40L (209). De manera similar, la neutralización de Activina A, producida por las DCs durante la interacción con células NK, incrementa la expresión de IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ , incrementando la maduración de las DCs (214). GDF15, la cual está involucrada en patologías como cáncer, obesidad y enfermedades inflamatorias, actúa de manera similar a Activina A. GDF15 disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras (CD83, CD86) en las DCs y mantiene la alta

capacidad para capturar antígenos tras la activación de las DCs (214-217). A pesar de lo mencionado anteriormente, se desconoce la función del resto de miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  en la biología de las DCs.

## 5. ANTECEDENTES

A pesar de su función ampliamente estudiada como antagonista de las funciones mediadas por las Activinas, la evidencia demostrando que las Inhibinas pueden ejercer diversas funciones en diferentes tipos celulares, independientemente de las Activinas (218) va en aumento. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha observado que las Inhibinas y Activinas regulan diferentes puntos de control durante el desarrollo de los linfocitos T. En ensayos de cultivo de timo fetal en presencia de Inhibina A o Activina A recombinante, se observó que la Inhibina A promueve el paso de los timocitos en estadio doble negativo (DN, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) 3 a DN4, al igual que la Activina A (219). Más aún, se demostró que la Inhibina A promueve el paso de DN4 a doble positivo (DP, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) mientras que la Activina A retrasa dicha transición, promoviendo la acumulación de células transitorias simples positivas CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup> ISP) (Figura 7). En datos no publicados de nuestro grupo de trabajo, se ha observado que la estimulación de timocitos y células Jurkat con Inhibina A e Inhibina B resulta en la fosforilación del factor SMAD2. Dicha fosforilación es dependiente de receptor tipo I ya que cuando las células son tratadas con el inhibidor SB431542, el cual inhibe a los receptores ALK4, ALK5 y ALK7, la fosforilación de SMAD2 en respuesta a Inhibina A e Inhibina B está abatida (199). Estos resultados sugieren que las Inhibinas pueden tener una función y mecanismo de acción diferente a las Activinas. Dicha función puede ser independiente o antagónica a las Activinas.



**Figura 7. Participación de Inhibinas y Activinas en el desarrollo de linfocitos T.** Inhibina A y Activina A promueven la transición de DN3 a DN4. Inhibina A promueve la transición hacia DP mientras que la Activina A induce la acumulación de la subpoblación transitoria simple positivo. En estadios posteriores, tanto Activina A como Inhibina A promueven la maduración de los timocitos, favoreciendo la diferenciación de timocitos CD8<sup>+</sup>. Durante las etapas tempranas del desarrollo fetal, la usencia de inhibinas retrasa las transiciones DN2-DN3 y DN-DP, reduciendo el número total de timocitos (219).

Aunado a lo anterior, se determinó que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están expresadas tanto a nivel transcripcional como proteico en el estroma tímico, por lo que se demostró que tanto las Inhibinas como las Activinas se expresan abundantemente en el estroma tímico (220). Más aún, se demostró que los receptores ALK4, ACTRIIA y ACTRIIB; así como las SMAD2, SMAD3 y SMAD4, también son expresados en el estroma tímico. Estos datos sugieren que las células que componen el estroma, como células epiteliales tímicas, fibroblastos, macrófagos y DCs convencionales (220), expresan Inhibina y Activina a la vez que son susceptibles a la señalización de las mismas.

En concordancia, recientemente hemos reportado que las Inhibinas participan en la diferenciación y maduración de las células del estroma tímico. En el modelo de ratón deficiente de Inhibina  $\alpha$ , se caracterizaron las células que componen el estroma tímico evidenciándose que la diferenciación de las TECs está alterada, de manera que la ausencia de Inhibinas promueve la diferenciación de las TEC medulares sobre las TEC de la corteza

(221). Además, se observó una reducción en la expresión de moléculas de MHC II y CD86 en las DCs tímicas convencionales en ausencia de Inhibina, sin afectar la frecuencia ni el número total de dicha población. Por el contrario, las pDCs de timo deficiente de Inhibina presentan niveles normales de MHC II; sin embargo, se encuentran reducidas en números absolutos. Estos resultados sugieren fuertemente que las Inhibinas regulan, selectivamente, la maduración de las DCs tímicas. Dichas afectaciones del estroma tímico en ausencia de Inhibinas provoca la disminución de la selección de LT CD4<sup>+</sup> favoreciendo la generación de Tregs naturales.

Existen reportes donde se demuestra la influencia de las Activinas en la diferenciación, regulación de la respuesta, migración y maduración de diferentes subtipos de DC (206, 208, 209), pero se sabe poco sobre la influencia de las Inhibinas en este tipo celular. Segerer y colaboradores evaluaron la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos humanos (Mo-DC) en presencia de Inhibina A o Activina A. Ellos reportan que la maduración de Mo-DC debida a un coctel de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) en presencia tanto de Inhibina A como de Activina A genera que las Mo-DC presenten un fenotipo tipo tolerogénico (217), ya que mantienen los podosomas característicos de una DC inmadura; además, en ensayos de reacción leucocitaria mixta (MLR), la proliferación de linfocitos T se encuentra abatida en comparación con las Mo-DC maduras sin Inhibina A ni Activina A.

Aunado a lo anterior, en ensayos realizados en el laboratorio durante la maestría, se observó que los marcadores de maduración, como MHC II, CD80 y CD86, se encuentran disminuidos tras el estímulo con LPS en las DCs derivadas a partir de médula ósea de ratones deficientes de Inhibina (Inh $\alpha$ <sup>-/-</sup>) (223); inclusive, se observa una disminución en la generación

de DCs. Además, las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  tienen baja capacidad migratoria hacia la quimiocina CCL19, sugiriendo fuertemente que la maduración de las DCs en ausencia de Inhibina está disminuida; sin embargo, es necesario profundizar en la investigación para descartar la participación de las Activinas en dicho proceso, ya que los ratones  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  tienen una alta concentración de Activinas en suero (222). Así mismo, es necesario investigar otros posibles defectos asociados a la maduración y función de las DCs.

## 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las DCs son células del sistema inmune que mantienen el balance entre la inmunidad y la tolerancia. Debido a la capacidad para presentar antígenos y la dualidad de sus funciones existe un gran interés en establecer terapias inmunológicas basadas en la modulación de las DCs, tanto para potenciar la inmunidad o promover la tolerancia inmunológica del individuo. Por ello, es importante conocer las citocinas que influyen en la biología de las DCs, desde su desarrollo en médula ósea como en la diferenciación y maduración en la periferia. Actualmente se conocen algunas de las citocinas participantes en la diferenciación y maduración de las DCs, como Flt3L, GM-CSF, M-CSF,  $\text{TGF}\beta$ , entre otros; sin embargo, evidencia reciente indica que existen otros mediadores del proceso que están actualmente siendo evaluados.

Miembros de la superfamilia de  $\text{TGF}\beta$  participan tanto en la diferenciación como maduración de las DCs. Tal es el caso de Activina A, BMP7 y  $\text{TGF}\beta$ , siendo este último el más estudiado; sin embargo, se desconoce la influencia de otros ligandos, en específico de las Inhibinas. Anteriormente se ha sugerido la influencia de la Inhibina A en la maduración

de las Mo-DCs humanos ya que su adición provoca un fenotipo tipo inmaduro bajo el estímulo de citocinas pro-inflamatorias, esto tiene como consecuencia, baja capacidad para activar a linfocitos T. Sin embargo, en DCs convencionales del estroma tímico, donde se expresan tanto las Inhibinas, Activinas y sus receptores, se observó una reducción en la expresión de moléculas de MHC II y CD86, demostrando que la maduración de las DCs tímicas está disminuida en ausencia de Inhibinas.

Aunado a lo anterior, datos previos del laboratorio demostraron que las BMDCs  $Inh\alpha^{-/-}$  muestran deficiencias en el incremento de la expresión en superficie de las moléculas MHC II, CD80 y CD86 después del estímulo con LPS (223); sin embargo, se desconoce si las BMDCs son capaces de establecer una respuesta inmune efectora. Además, debido a la disminución en la obtención de DCs, y no así de las pre-DCs, en cultivos de médula ósea de ratones  $Inh\alpha^{-/-}$ , es probable que la diferenciación *in situ*, es decir el paso de pre-DC a DC, se encuentre alterada.

Debido a lo anterior, se planteó investigar la participación de las Inhibinas en la diferenciación *in vivo* de las DCs, así como la repercusión en el proceso de activación, maduración y función de las DCs para estimular a LT.

## **7. HIPÓTESIS**

La ausencia de Inhibinas disminuye la diferenciación, maduración y función inmunogénica de las células dendríticas.

## 8. OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de la ausencia de las Inhibinas en la diferenciación y función de las células dendríticas

## 9. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión de los marcadores de maduración MHC II, CD40, CD80 y CD86, así como las moléculas co-inhibidoras PD-L1 y PD-L2 en BMDCs  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$  tras el estímulo con LPS.
2. Evaluar la capacidad migratoria dependiente de CCR7 *in vitro* e *in vivo* de las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$ .
3. Evaluar la inducción de proliferación de linfocitos T  $CD4^{+}$   $CD25^{-}$   $Foxp3^{-}$  de linfocitos T alogénicos en presencia de BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$ .
4. Evaluar la producción de las citocinas IL-6, IL-10, IL-12, TNF, CCL2 e  $INF\gamma$  por CBA, así como Activina A, Inhibina A y  $TGF\beta$  por ELISA, producidas en cultivos de BMDCs  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$  estimulados con LPS.
5. Analizar las subpoblaciones de DCs *in vivo* ( $Lin^{-}$   $CD11c^{+}$   $MHCII^{+}$ ) mediante los marcadores CD8, CD11b, CD103 y CD207 en los ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$ .
6. Evaluar la población células de Langerhans en láminas epidérmicas mediante tinción de MHCII y análisis por microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal.
7. Evaluar la función *in vivo* de las DCs  $Inh\alpha^{-/-}$  mediante ensayos de hipersensibilidad de tipo retardado.

## 10. MATERIALES Y MÉTODOS

### Ratones

Los ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$  en fondo C57BL/6 fueron generados y donados por el Dr. Martin Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston TX) (224). El ratón transgénico Actina-Proteína Verde Fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) en el fondo C57BL/6 fue obtenido del Dr. M. Okawa (Genome Information Research Center, Osaka University, Japan) (225). El ratón *knock in* (KI)  $Foxp3^{EGFP}$  en fondo BALB/c (Cg-Foxp3tm2Tch/J) fue comprado de Jackson Laboratories. Todos los ratones se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB, UNAM, México) siguiendo las normas de ética y salud animal aprobadas por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

### Generación de Células Dendríticas a partir de células de médula ósea

Las células de médula ósea se obtuvieron de la tibia y el fémur de ratones hembras de 9 semanas de edad  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$ . Se drenó la médula ósea haciendo pasar 3 ml de medio RPMI 1640, suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de Penicilina, 100  $\mu$ g/ml de Estreptomicina, a través de los huesos mediante el uso de una jeringa y aguja de 27G. La médula ósea se disgregó, se filtró a través de una malla de nylon de 50  $\mu$ m y se recolectó en un tubo de 15 ml. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min para, finalmente, ser resuspendidas en 3 ml de medio RPMI 10% SFB. Se obtuvo una alícuota de 100  $\mu$ l a la cual se lisaron los eritrocitos con el buffer ACK durante 2 min, para realizar el recuento de las células.



Para diferenciar células dendríticas *in vitro*, se sembraron  $5 \times 10^6$  células en 10 ml de RPMI 1640 10% SFB y 5% de sobrenadante de células CHO productoras de GM-CSF (77) en cajas bacteriológicas las cuales se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Al tercer día, se adicionaron 8 ml de medio RPMI 10% SFB suplementado con sobrenadante de células CHO productoras de GM-CSF. Al quinto día, se adicionó 1 µg/ml de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Aldrich) para inducir la maduración de las células dendríticas. Al sexto día, se colectaron las células no adherentes (conteniendo del 50-60% de DCs CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>) para posteriores ensayos.

### **Obtención de DCs de órganos linfoides periféricos**

Se obtuvieron los ganglios linfáticos periféricos (ganglios inguinales, axilares y cervicales) y el bazo de ratones *Inhα*<sup>+/+</sup> y *Inhα*<sup>-/-</sup> de 3 semanas de edad. Dichos órganos se cortaron en pedazos pequeños con ayuda de dos navajas para bisturí y se dejaron en digestión en medio RPMI 1640 suplementado con 5 mg/ml de Colagenasa tipo IV (GIBCO), 25 U/ml de DNAsa (Roche) y 5% de SFB inactivado durante 1 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. En seguida, el tejido remanente se disgregó mecánicamente con la ayuda de un émbolo. La suspensión celular se filtró usando una malla de nylon de 50 µm y se lavó con PBS. Para el bazo, los eritrocitos se lisaron con el buffer ACK durante 2 min y se lavó con PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en buffer FACS para posterior análisis por citometría de flujo.

### **Obtención de DCs de piel**

Las orejas de ratones sacrificados de 3 semanas de edad fueron removidas desde la base y separadas en las partes dorsal y ventral. El tejido se digirió con 0.25 mg/ml de Liberasa

TL (Roche) y 0.125 mg/ml de DNAsa grado II (Roche) en medio RPMI 1640 durante 45 min a 37°C. A continuación, el tejido se cortó en pequeños pedazos y se incubó durante 45 min a 37°C. Después, se detuvo la digestión con 5 µM de EDTA en medio RPMI 1640 10% SFB. Las células se resuspendieron e incubaron 5 min a 4°C en RPMI 1640 10% SFB 0.125 mg/ml de DNAsa grado II. Finalmente, las células se lavaron y resuspendieron en RPMI 1640 10% SFB para posterior análisis por citometría de flujo.

### **Citometría de Flujo**

Para el análisis fenotípico, las células se incubaron con anticuerpos primarios durante 20 min a 4°C, seguido de dos lavados con buffer FACS. Cuando fue necesario, las células se incubaron con estreptavidina acoplada a fluorocromo durante 20 min a 4°C y se lavaron con buffer FACS. Finalmente, las células se fijaron con 4% de Paraformaldehído en PBS.

Las células dendríticas derivadas de médula ósea se tiñeron con los anticuerpos anti-I-A/I-E A (M5/114.15.2) y anti-CD80 PerCp/Cy5.5 (16-10A1) de Biolegend; anti-CD11c PE (N418), anti-CD11c PE Cy7 (N418) y anti-CD86 APC (GL-1) de Tonbo Biosciences; anti-CD40 PE (3/23), anti-CD274 PE (MIH5) y anti-CD273 PE (TY25) de BD Biosciences; anti-TLR4/MD2 complex PE Cy7 (MTS510) y anti-CD197 PerCp/Cy5.5 de eBiosciences.

Para el análisis de subpoblaciones de DCs *ex vivo* y después de la estimulación *in vivo* con LPS, las células se bloquearon previamente con el anticuerpo puro anti-CD16/32 (93), seguido de la tinción con anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2) y anti-CD11c Alexa Fluor 700 (N418) de Biolegend; anti-CD3 PE (145-2C11), anti-TER119 PE (TER-119), anti-CD8α APC (53-6.7), anti-CD11b Violet Fluor 450 (M1/70) y anti-CD11c PE Cy7 (N418) de Tonbo Biosciences; anti-CD19 PE (1D3), anti-NK PE (2B4) y Streptavidin APC Cy7 de BD

Biosciences; anti-CD103 biotina (2E7), anti-CD207 (eBioRMUL2) de eBiosciences y anti-rat IgG Qdot 605 de Invitrogen.

Todas las muestras se adquirieron en el citómetro Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies) y se analizaron con el programa FlowJo 10 (Tree Star Inc).

### **Inmunofluorescencia y microscopía**

BMDC. Al día 5 de cultivo, se enriquecieron las células CD11c<sup>+</sup> por selección positiva usando anti-CD11c micro perlas (Miltenyi Biotec) y se resuspendieron en medio RPMI 1040 10% SFB en una densidad de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. Se sembraron 500  $\mu$ l de suspensión celular sobre cubreobjetos tratados con fibronectina (Calbiochem) por pozo (placa de 24 pozos) y se incubaron a 37°C 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h con y sin LPS (1  $\mu$ g/ml). Después, las células se fijaron con 500  $\mu$ l de 7.4% de Formaldehído en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cuidadosamente, se quitó el sobrenadante y se lavaron los cubreobjetos con 500  $\mu$ l de PBS. Las células se permeabilizaron con 250  $\mu$ l de 0.1% de Tritón-X100 en PBS durante 6 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se bloquearon con 250  $\mu$ l de 2% Albúmina sérica de bovino (Sigma), 0.1% de Tween 20 (Sigma) en PBS 1 h a temperatura ambiente. Las células se tiñeron con anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 y Faloidina-Rodamina en 0.1% Tween 20 en PBS. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando el medio de montaje para fluorescencia (DAKO). Las células se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM5 equipado con el programa LSM5 PASCAL 2.8. El análisis del área de las células basado en la tinción de Faloidina-Rodamina se realizó con el programa ImageJ 1.46r. El análisis de cada célula individual se realizó en 3 experimentos independientes, generando una *n* de 60 células por condición. Los

resultados se expresan como el porcentaje del área de la célula normalizado al promedio del área dada por las células  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  iBMDC (100%).

Células de Langerhans. Las orejas de ratones sacrificados  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  y  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  de 3 semanas de edad se cortaron desde la base, se separaron las partes dorsal y ventral de las orejas y se incubaron en 5 mM de EDTA durante 1 h a 37°C 5%  $\text{CO}_2$ . La dermis fue removida de la piel, dejando solo las láminas epidérmicas, las cuales se lavaron con PBS, se fijaron con acetona a 4°C durante 6 min, se bloquearon con 1% de BSA en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y se tiñeron con anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 y anti-CD80 PerCP / Cy5.5. Finalmente, las láminas epidérmicas se colocaron en el portaobjetos utilizando el medio de montaje para fluorescencia (DAKO). Las láminas epidérmicas se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM5 (para maduración *in vivo*) y en el microscopio invertido Olympus IX71 (para conteos celulares). El análisis de la intensidad de fluorescencia por célula y conteos celulares se realizaron con el programa ImageJ 1.48r (National Institutes of Health, USA). Para conteos celulares, se realizaron al menos 3 experimentos independientes proporcionando un valor de  $n = 60$  micrografías, utilizando el objetivo de 40x. Para la maduración *in vivo*, se realizó el análisis individual de las células en cada condición adquiriendo un promedio de 15 micrografías utilizando el objetivo de inmersión 100x y cuantificando un promedio de 75 células por condición. Los resultados se expresan como el incremento relativo de la IMF de células estimuladas dividido entre la IMF de células no estimuladas.

## **Quimiotaxis**

Las BMDCs, tanto inmaduras como maduras, se marcaron con calceína  $1\mu\text{g/ml}$  en HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5% BSA) en una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml durante 15min a  $37^\circ\text{C}$ . Se lavaron dos veces con HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5% BSA). Finalmente, se resuspendieron en HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5% BSA) para obtener una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mL. Las quimiotaxis se realizaron en cámara de Boyden de 48 pozos utilizando una membrana de policarbonato con poros de  $5\mu\text{m}$  (Neuroprobe) tratada previamente con fibronectina. En la parte inferior de la cámara se colocaron diferentes diluciones de quimiocina (0 ng/ml – 1000 ng/ml). En la parte superior de la cámara se colocaron  $50\mu\text{L}$  de la suspensión celular ( $1 \times 10^5$  células por pozo). La cámara se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 1.5h. La intensidad media de fluorescencia en la membrana se determinó en un equipo Typhoon Scanner 9400. Se reporta como índice de quimiotaxis calculado como la división de la IMF de las células estimuladas con quimiocina entre la IMF de las células con medio solo (quimioinesis).

## **Migración *in vivo* de BMDC**

Los ensayos de migración *in vivo* se realizaron como se describió previamente (227). Brevemente, las BMDC estimuladas con LPS de ratones Actina-GFP ( $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ ) y de ratones  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  teñidas con CTV (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se mezclaron 1 : 1 en PBS. Un total de  $2 \times 10^6$  células en  $50\mu\text{l}$  se inyectaron en el cojinete plantar izquierdo y, como control,  $50\mu\text{l}$  de PBS en el cojinete plantar derecho de ratones hembras C57BL/6 de 6-9 semanas de edad. Después de 48 horas, se extrajeron los ganglios

linfáticos drenantes (ganglios linfáticos popíteos) y se tiñeron con anti-CD11c PE (Tonbo) y el marcador de viabilidad Zombie Aqua (Invitrogen).

### **Movilización de calcio**

BMDC, resuspendidas en RPMI 1640 2% SFB en una concentración de  $2.5 \times 10^6$  células / ml, se tiñeron con  $4.59 \mu\text{M}$  de Fura Red (Molecular Probes) y  $2.6 \mu\text{M}$  de Fluo-3 (Molecular Probes) durante 45 min a  $37^\circ\text{C}$  en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con RPMI 1640 2% SFB y se incubaron durante 45 min más a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 0% SFB y dejaron en hielo hasta la adquisición en el FACS Calibur. Las células se precalentaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 min y se adquirieron durante 100 s para establecer la línea basar de  $\text{Ca}^{2+}$ , en seguida, se añadió el estímulo, 300 ng/ml de CCL19 y CCL21, y se adquirieron las células por 300 s. Como control positivo, las muestras se estimularon con PMA (40 ng/ml) e Ionomicina (400 ng/ml). Los datos se analizaron con el programa FCS Express 5 Plus (De Novo software) y se expresan como la relación de la mediana de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (FL1H/FL3H).

### **Fosforilación de ERK**

La fosforilación de ERK se detectó por medio de citometría de flujo después de la tinción intracelular de las BMDC siguiendo el protocolo de tinción “Phospho-flow” de BD Biosciences. Brevemente,  $10^6$  BMDC estimuladas con LPS se tiñeron extracelularmente con anti-CD11c PE y anti-I-A/I-E AF488; en seguida, se estimularon con 300 ng/ml de las quimiocinas CCL19 o CCL21 en medio RPMI 1640 0.2% SFB a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 s; 1, 3 y 5 minutos. La estimulación se detuvo por fijación con 150  $\mu\text{l}$  del buffer Lyse/Fix (BD

Biosciences) durante 10 min a 37°C. Para permeabilizar, las células se incubaron con 100 µl del buffer Perm II (BD Biosciences) durante 20 min a 4°C y se tiñeron con el anticuerpo anti-pErk PE-CF594 (Biolegend). Para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, se bloquearon los receptores Fc de las BMDC con el anticuerpo anti-CD16/32 previo a la tinción de Erk. Los datos se analizaron con el programa FlowJo 10 Tree Star. El incremento relativo de pErk se calculó como la relación de la IMF de las células estimuladas entre la IMF de las células sin estimular.

### **Cuantificación de citocinas**

Los sobrenadantes de los cultivos de BMDC estimulados con LPS, LPS + Inhibina A o medio se colectaron a las 3, 6, 12, 18 y 24 horas y se almacenaron a -20°C hasta su uso. IL-6, IL-10, CCL2 y TNF se cuantificaron por medio del “CBA Mouse Inflammation kit” (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se adquirieron en el citómetro FACS Calibur (BD Biosciences) y se analizaron con el programa FCAP array. La presencia de Inhibina A y Activina A se cuantificó utilizando el kit de ELISA “Human/Mouse/Rat Activin A” (R&D systems) y “Mouse InhA” (Elabscience) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### **Ensayo de proliferación de Linfocitos T**

Linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> (LT) de bazo y ganglios linfáticos periféricos de ratones hembra Foxp3<sup>EGFP</sup> Balb/c se aislaron por citometría de flujo con el citómetro FACS Aria I (BD) y se marcaron con CTV. 1.25x10<sup>5</sup> linfocitos T se sembraron en placas de 96 pozos en medio RPMI 1640 10% SFB. Por otro lado, se enriquecieron las BMDC CD11c<sup>+</sup>

por medio de perlas magnéticas (Miltenty) y se cocultivaron con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> a diferentes diluciones: 1:1, 1:2, 1:4, 1:10 y 1:20 (LT : BMDC). Después de 3 y 5 días de cultivo, se colectaron las células y se tiñeron con anti-CD4 PE (Tonbo) y zombie aqua (Biolegend). La proliferación se evaluó por la dilución de CTV de las células CD4<sup>+</sup> zombie aqua<sup>-</sup> y se expresó como el porcentaje de células divididas, usando la ecuación:

$$\% \text{ células divididas} = \frac{\# \text{ células que fueron a división}}{\# \text{ células al inicio del cultivo}} * 100$$

### **Estimulación de DCs *in vivo* con LPS**

Ratones hembra de 3 semanas de edad se inocularon en las orejas con 1 µg de LPS (oreja izquierda) y PBS como control (oreja derecha). Después de 6, 18 y 72 horas, se obtuvieron los ganglios linfáticos drenantes para evaluar la expresión de MHC II, CD80, CD86 y PD-L1 en DCs por citometría de flujo; así como MHC II y CD80 en LCs de láminas epidérmicas de las orejas por medio de microscopía de inmunofluorescencia descrita anteriormente.

### **Hipersensibilidad de tipo retardado (HTR)**

Ratones hembras de 3 semanas de edad se inmunizaron por vía subcutánea en el lomo con 100 ng de ovalbúmina (OVA) y 10 µg de LPS. Ratones controles se inocularon con PBS, 100 ng de OVA o 10 µg de LPS. Siete días después, los ratones se retaron con 100 ng de OVA inoculados en la oreja izquierda y PBS en la oreja derecha. Después de 24 horas, el grosor de la oreja se midió utilizando un micrómetro digital y se calculó el incremento relativo de acuerdo con la siguiente ecuación:



$$\text{Grosor de la oreja (IR)} = \frac{OVA\ 24h/OVA\ inicio}{PBS\ 24h/PBS\ inicio}$$

Las orejas completas, cortadas desde la base de los ratones sacrificados, se embebieron en parafina y se realizaron cortes para el análisis histoquímico utilizando la tinción con Hematoxilina-Eosina. La infiltración celular se analizó en 27 campos de cada sección de la oreja y se expresó como el número de células por mm<sup>2</sup>.

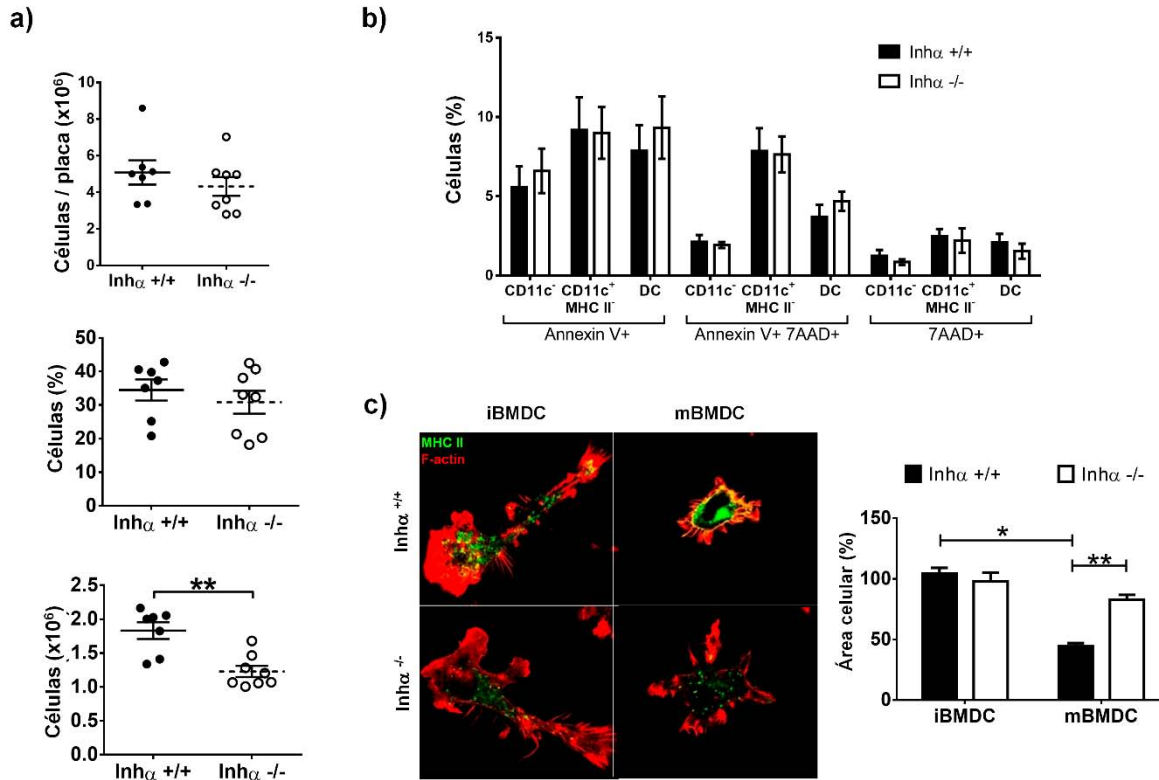
### **Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (SEM). La significancia de los resultados se calculó con la prueba T de Student de una o dos colas, pareado o no pareado según el caso, utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism 6. Valores de  $P < 0.05$  se consideraron como estadísticamente significativos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 11. RESULTADOS

### **La diferenciación *in vitro* de las DCs está disminuida en ausencia de Inhibinas**

En ensayos realizados durante la maestría de diferenciación DCs *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea de ratones  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  y  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ , se observó menor proporción de BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  tras de 5 días de cultivo en presencia de GM-CSF en comparación con las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ . Para investigar si la diferencia en proporción de BMDCs es debida a un defecto en la celularidad de los cultivos  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ , se evaluaron los números totales y de las BMDC en los cultivos celulares de médula ósea de ratones  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  y  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ . De manera interesante, aunque en estos cultivos la frecuencia de DCs no se encuentra alterada en ausencia de Inhibinas, los números totales de las DCs son significativamente menores comparado con las DCs  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (Figura 8A). Debido a lo anterior, se realizó el conteo de las células al final del cultivo (día 6) y la tinción con Anexina V y 7AA-D para evaluar la apoptosis de las células. Como se muestra en la figura 6A, los cultivo de BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  tienen el mismo número de células por placa que los cultivos  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ . Además, las células mostraron los mismos niveles de apoptosis temprana (Anexina V<sup>+</sup>), apoptosis tardía (Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) y muerte (7-AAD<sup>+</sup>) que las células  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (Figura 8B), indicando que la disminución en el número de DCs  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  obtenidas en cultivo no se debe a la falta de proliferación ni al incremento en la muerte celular, sugiriendo que en ausencia de Inhibinas la diferenciación de las DCs está afectada.



**Figura 8. La diferenciación está afectada en las BMDC *Inhα*<sup>-/-</sup>.** Las BMDC se derivaron *in vitro* en presencia de GM-CSF. A. Al día 6 de cultivo, se obtuvieron las células para analizar el número total de células en cultivo (arriba), frecuencia (medio) y números totales (abajo) de las DCs (CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>) por citometría de flujo (media ± SEM de 4-7 experimentos independientes, n = 8). B. Frecuencia de células Anexina V<sup>+</sup>, Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup> y 7-AAD<sup>+</sup> en las poblaciones DC, CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup> analizados por citometría de flujo (media ± SEM de 5 experimentos independientes). C. Las BMDC se tiñeron para F-actina (rojo) y MHC II (verde) sobre una superficie cubierta con fibronectina para analizar la morfología por microscopía de inmunofluorescencia. La gráfica de barras representa la media ± SEM de 3 experimentos independientes. Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

Las DCs inmaduras, caracterizadas por tener un fenotipo extendido y adherente con presencia de podosomas, cambian su morfología hacia un fenotipo migratorio redondo y no adherente tras la maduración (228). Para evaluar el cambio morfológico debido a la activación de las DCs, al día 5 de cultivo se colectaron y enriquecieron, por perlas magnéticas, las células CD11c<sup>+</sup> y fueron estimuladas con LPS durante 24 horas para su posterior tinción de F-actina y MHC II para microscopía confocal. Como era esperado, las BMDC *Inhα*<sup>+/+</sup> disminuyen su área celular cuando maduran con LPS; sin embargo, las

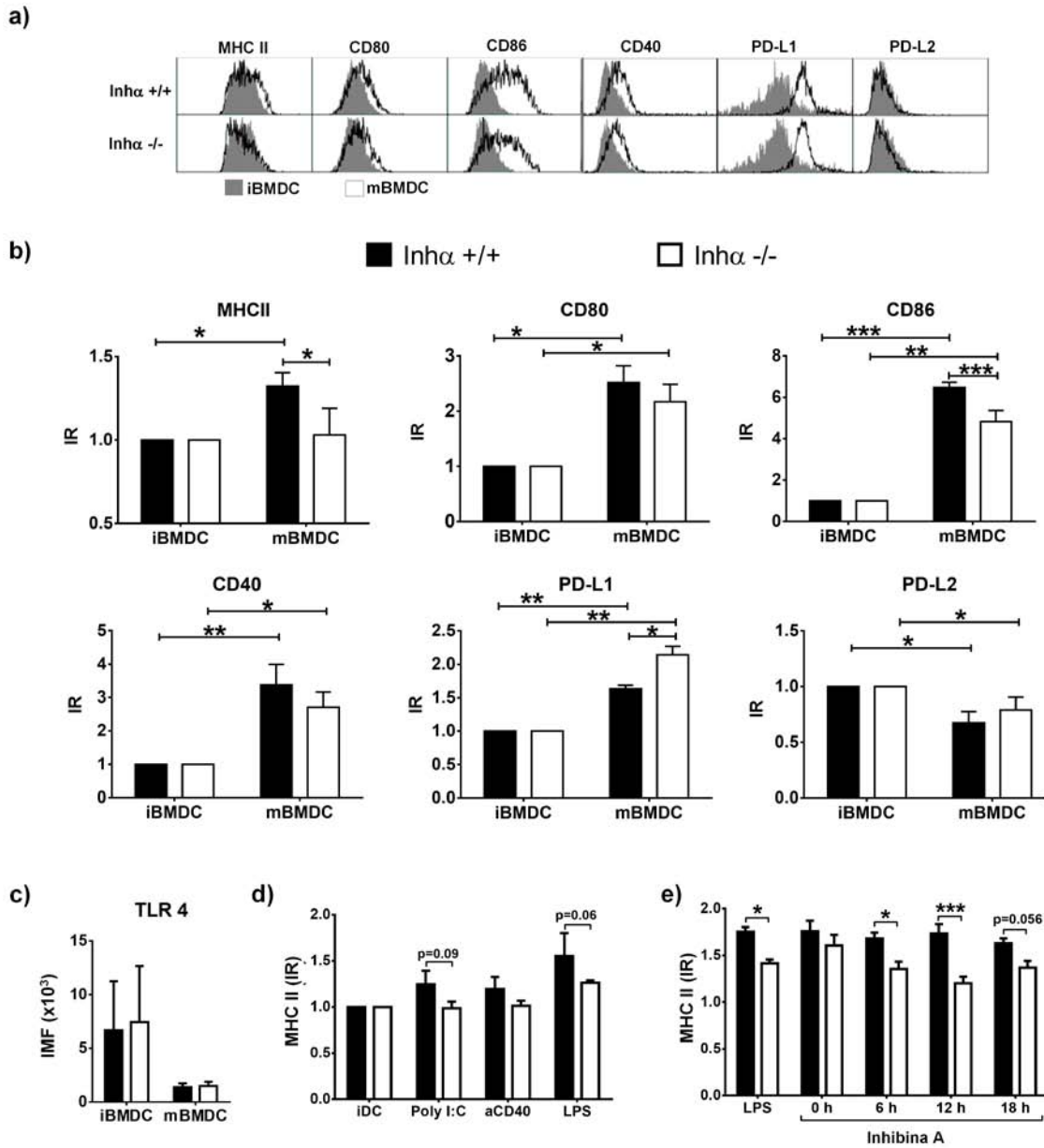
BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  estimuladas con LPS mantienen su morfología extendida, asemejando a las DCs inmaduras (Figura 8C) y, por ende, sugiriendo que la activación y maduración por LPS está afectada en las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ .

### **La maduración *in vitro* de las DCs está afectada en ausencia de Inhibinas**

Aunado a los cambios morfológicos previamente descritos, las DCs incrementan la expresión en superficie de MHC II y moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40, entre otras (98), durante el proceso de maduración. Previamente, nuestro grupo de trabajo demostró que las DCs convencionales tímicas tienen reducida la expresión de MHC II y CD86 en ausencia de Inhibinas (221). Además, se ha reportado que la adición tanto Activina A como Inhibina A pueden promover DCs tolerogénicas cuando son estimuladas con un coctel de citocinas pro-inflamatorias (217), por lo que analizamos la expresión de MHC II, así como moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras tras el estímulo con LPS en BMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  y BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ . En concordancia con lo observado morfológicamente, la expresión de MHC II y CD86 está significativamente disminuida en las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  comparado con las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ , mientras que CD80 y CD40 muestran una tendencia a disminuir y la expresión de PD-L1 tras la estimulación con LPS está significativamente incrementada (Figura 9A-B). El defecto en el incremento de la expresión de moléculas co-estimuladoras no se debió a alteraciones en la expresión de TLR4, receptor tipo Toll que reconoce a LPS, en superficie de las BMDC ya que la expresión de TLR4 es alta cuando las BMDC están inmaduras y se disminuye la expresión en superficie después de la estimulación

con LPS (Figura 9C), no observándose diferencias en la expresión del TLR4 en las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  con respecto a las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$ .

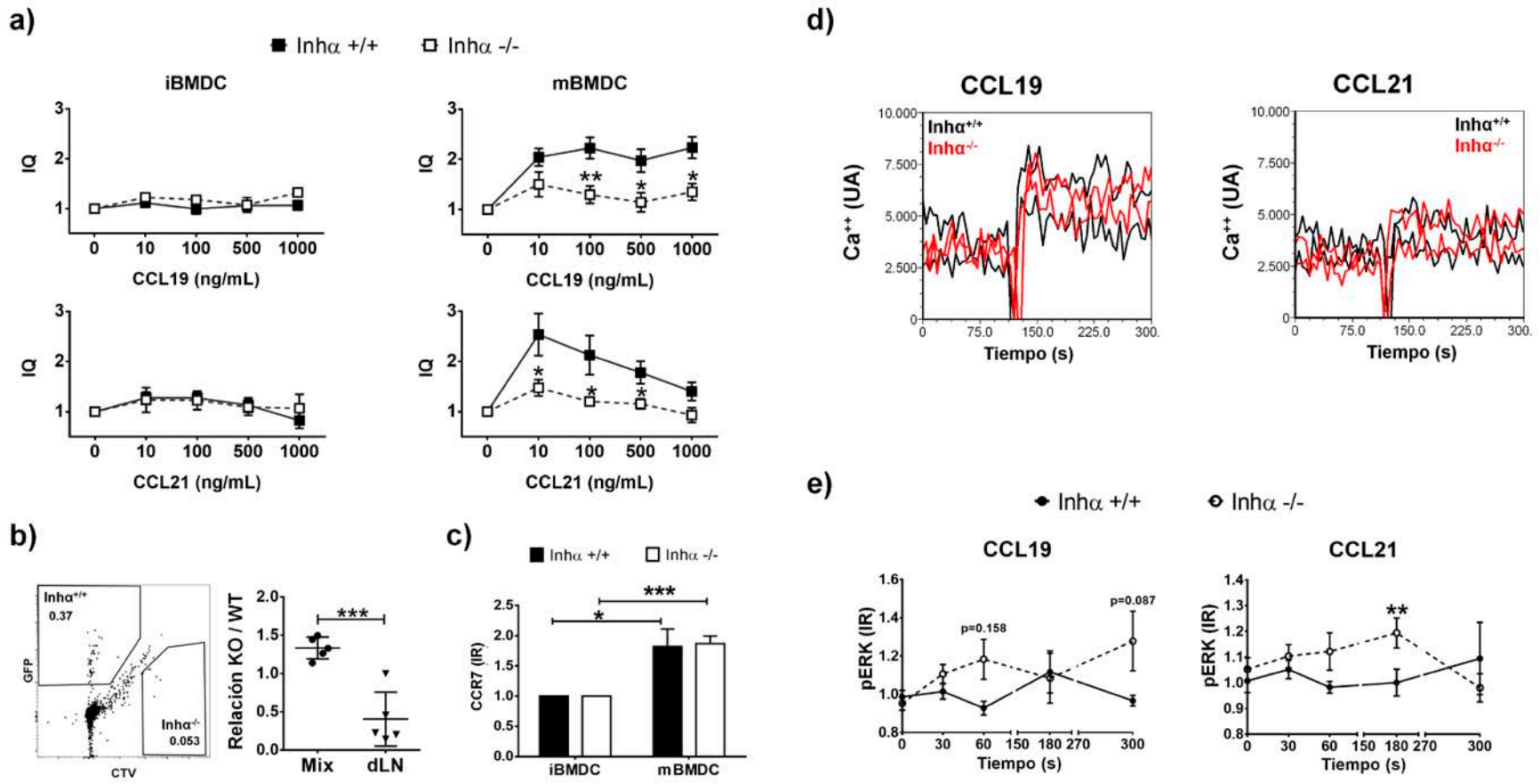
Además, con la finalidad de investigar si el defecto en la expresión de MHC II era un problema específico por la señalización de TLR4 o si era un defecto general de las DC  $Inh\alpha^{-/-}$  ante otros estímulos de maduración, se evaluó la expresión de MHC II en las BMDC tras la estimulación con Poly I:C, ligando de TLR3, y con anti-CD40. De manera interesante, se detectó la misma tendencia que lo observado con el estímulo con LPS en donde las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  expresan menores niveles de MHC II en comparación con las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  (Figura 9D). Estos resultados demuestran que la falta de maduración observada en BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  es consecuencia de un defecto que involucra distintas vías de maduración de las DCs. Para investigar si los defectos en maduración observados en las DC  $Inh\alpha^{-/-}$  pudieran ser la consecuencia de la falta de producción de Inhibina de manera autocrina en respuesta a LPS, se evaluó la expresión de MHC II de las BMDC tras la estimulación con LPS en presencia de 150 pg/ml de Inhibina A exógena recombinante desde el tiempo 0 y a las 6, 12 y 18 horas después de la adición de LPS. Como se muestra en la Figura 9E, la adición de Inhibina A a las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  no reconstituyó la expresión de MHC II en superficie; sin embargo, cuando se añadió Inhibina A al mismo tiempo que LPS en el cultivo  $Inh\alpha^{-/-}$ , se observa la recuperación en la expresión de MHC II alcanzando el nivel que en las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$ , mientras que este efecto no se reprodujo cuando se añadió Inhibina A en tiempos posteriores.



**Figura 9. La maduración está afectada en las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  tras la estimulación con LPS. A-B.** Al día 5 de cultivo, las células se estimularon con LPS (1 $\mu$ g/ml) para inducir la maduración. Después de 24 horas, se colectaron las BMDC y se analizó la expresión de MHC II, CD40, CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 de la población DC por citometría de flujo. Histogramas representativos de las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  (arriba) y  $Inh\alpha^{-/-}$  (abajo). La intensidad media de fluorescencia esta reportada como el incremento relativo (IR) comparado con el ratón  $Inh\alpha^{+/+}$ . Las gráficas de barras muestran la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. C. Expresión de TLR4 en DCs (CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>) analizado por citometría de flujo (media  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes). D. Expresión de MHC II en respuesta a diferentes estímulos de maduración durante 24 horas expresados como el incremento relativo comparado con las BMDC sin estímulo (media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes). E. Expresión de MHC II en BMDC en presencia de 150 pg/ml de Inhibina A recombinante a 0, 6, 12 y 18 horas después del estímulo con LPS. Los datos están expresados como el incremento relativo comparado con las BMDC sin LPS (media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes). Prueba de T de Student de dos colas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## **Las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ presentan una migración dependiente de CCR7 disminuida comparada con $\text{Inh}\alpha^{+/+}$**

Durante la maduración de las DCs, el incremento en la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 se acompaña de cambios morfológicos donde las células adquieren un fenotipo un fenotipo no adherente, lo cual permite la migración rápida de las DCs hacia los NL, donde se lleva a cabo la activación de los linfocitos T vírgenes. Como las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  muestra una maduración disminuida, quisimos evaluar la capacidad migratoria de las BMDC mediante ensayos *in vitro* de quimiotaxis hacia CCL19 y CCL21, ambos ligandos de CCR7. Como era esperado, las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  muestran una migración eficiente hacia ambas quimiocinas en el rango de concentraciones de 10-1000 ng/ml para CCL19 (Figura 10A, panel superior) y de 10-500 ng/ml para CCL21 (Figura 10A, panel inferior), a diferencia de sus contrapartes inmaduras, las cuales migran pobremente hacia estas quimiocinas. En contraste, las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  fueron incapaces de migrar hacia CCL19 y CCL21, de manera semejante a las iBMDC (Figura 10A). Para evaluar si estas deficiencias en migración *in vitro* pudieran tener relevancia en la llegada de linfocitos a los nódulos linfáticos, se realizaron ensayos de migración *in vivo* donde se inoculó una mezcla de mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  ( $\text{GFP}^+$ ) con mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  ( $\text{CTV}^+$ ) en el cojinete plantar de un ratón C57BL/6, se observa que las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  migran pobremente hacia el NL drenante después de 48 horas en comparación con las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (Figura 10B).



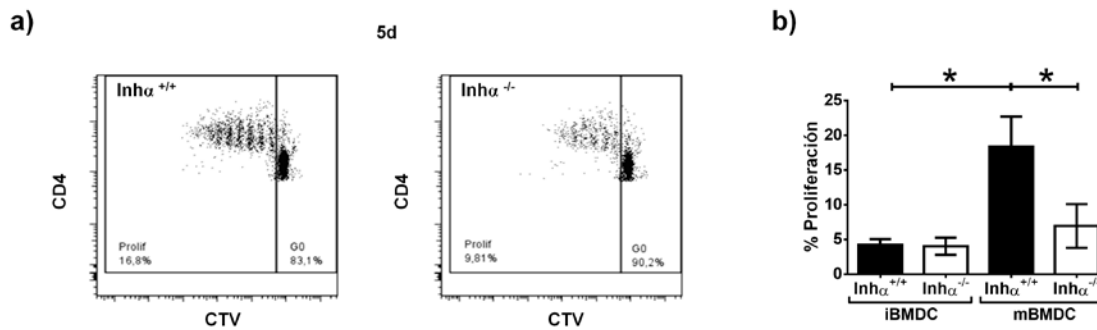
**Figura 10. BMDC *Inha*<sup>-/-</sup> estimulados con LPS tienen migración deficiente hacia CCL19 y CCL21.** A. Quimiotaxis hacia CCL19 y CCL21 de las BMDC *Inha*<sup>+/+</sup> y *Inha*<sup>-/-</sup> inmaduras o estimuladas con LPS. Las gráficas muestran el índice de quimiotaxis (IQ) expresado como la media ± SEM de 4 experimentos independientes. B. La mezcla 1:1 de BMDC *Inha*<sup>+/+</sup> (GFP<sup>+</sup>) y *Inha*<sup>-/-</sup> (CTV<sup>+</sup>) se inoculó en el cojinete plantar de un ratón C57BL/6. 48 horas después, se analizó el NL drenante para la presencia de BMDC. La gráfica representa la relación *Inha*<sup>-/-</sup> / *Inha*<sup>+/+</sup> de la mezcla inoculada y de la obtenida en NL drenante (media ± SEM de 2 experimentos independientes, n=5). C. Expresión de CCR7 en BMDC. La IMF se reporta como el incremento relativo comparado con la iBMDC (media ± SEM de 3 experimentos independientes). D. Análisis de flujo de calcio de mBMDC *Inha*<sup>+/+</sup> y *Inha*<sup>-/-</sup> estimuladas con 300ng/ml de CCL19 y CCL21. E. Curva de tiempo de la fosforilación de ERK en respuesta a CCL19 y CCL21 en mBMDC *Inha*<sup>+/+</sup> y *Inha*<sup>-/-</sup> analizado por citometría de flujo. La IMF se reporta como el incremento relativo comparado con las células sin estimular. Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.



La falta de migración no es debida a una baja expresión de CCR7 ya que no hay diferencias significativas en los niveles del receptor de quimiocina entre las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  y  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  (Figura 10C). Para investigar a profundidad el mecanismo por el cual hay baja migración en las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ , se realizaron ensayos de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 10D) y fosforilación de ERK (Figura 10E) en respuesta a los ligandos de CCR7. Aunque el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por CCL19 y CCL21 no se encuentra afectada en las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ , inesperadamente, la fosforilación de ERK está incrementada significativamente en las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  en diferentes tiempos tras la estimulación con las quimiocinas.

### **Las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ muestran baja capacidad para estimular linfocitos T alogénicos**

Una característica principal de una DC completamente madura es su habilidad para activar a los linfocitos T naive (229). Dado que las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  muestran un fenotipo aparentemente “semi-maduro”, evaluamos su habilidad para activar linfocitos T  $\text{CD4}^+$  alogénicos. Las BMDC  $\text{CD11c}^+$  inmaduras o estimuladas con LPS se co-cultivaron con linfocitos T  $\text{CD4}^+$   $\text{CD25}^-$   $\text{Foxp3}^-$  alogénicos previamente teñidos con CTV, después de 5 días, se analizó la proliferación por dilución del CTV de los linfocitos en la población  $\text{CD4}^+$  Zombie aqua. Como se muestra en la figura 11, tanto iBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  como  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  inducen una proliferación insignificante de los linfocitos T, por otro lado, las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  inducen significativamente la proliferación de los linfocitos T comparado con sus contrapartes iBMDC. Interesantemente, las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  no inducen un incremento significativo en la proliferación de los linfocitos T comparado con sus contrapartes inmaduras y fue significativamente menor que las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (Figura 11B).



**Figura 11. Las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  tienen baja capacidad para estimular linfocitos T  $CD4^+ CD25^- Foxp3^-$  alogénicos.** Las células  $CD11c^+$  se separaron al día 6 de cultivo y se co-cultivaron con linfocitos T  $CD4^+ CD25^- Foxp3^-$  de ratones  $Foxp3-GFP$  KI Balb/c teñidos con CTV. Al día 5, se midió la proliferación de los linfocitos T por la dilución de CTV. A. Gráfica de puntos representativo de BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  (izquierda) y  $Inh\alpha^{-/-}$  (derecha). B. Gráfica de barras del porcentaje de los linfocitos T divididos con la relación 1:10 representa la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

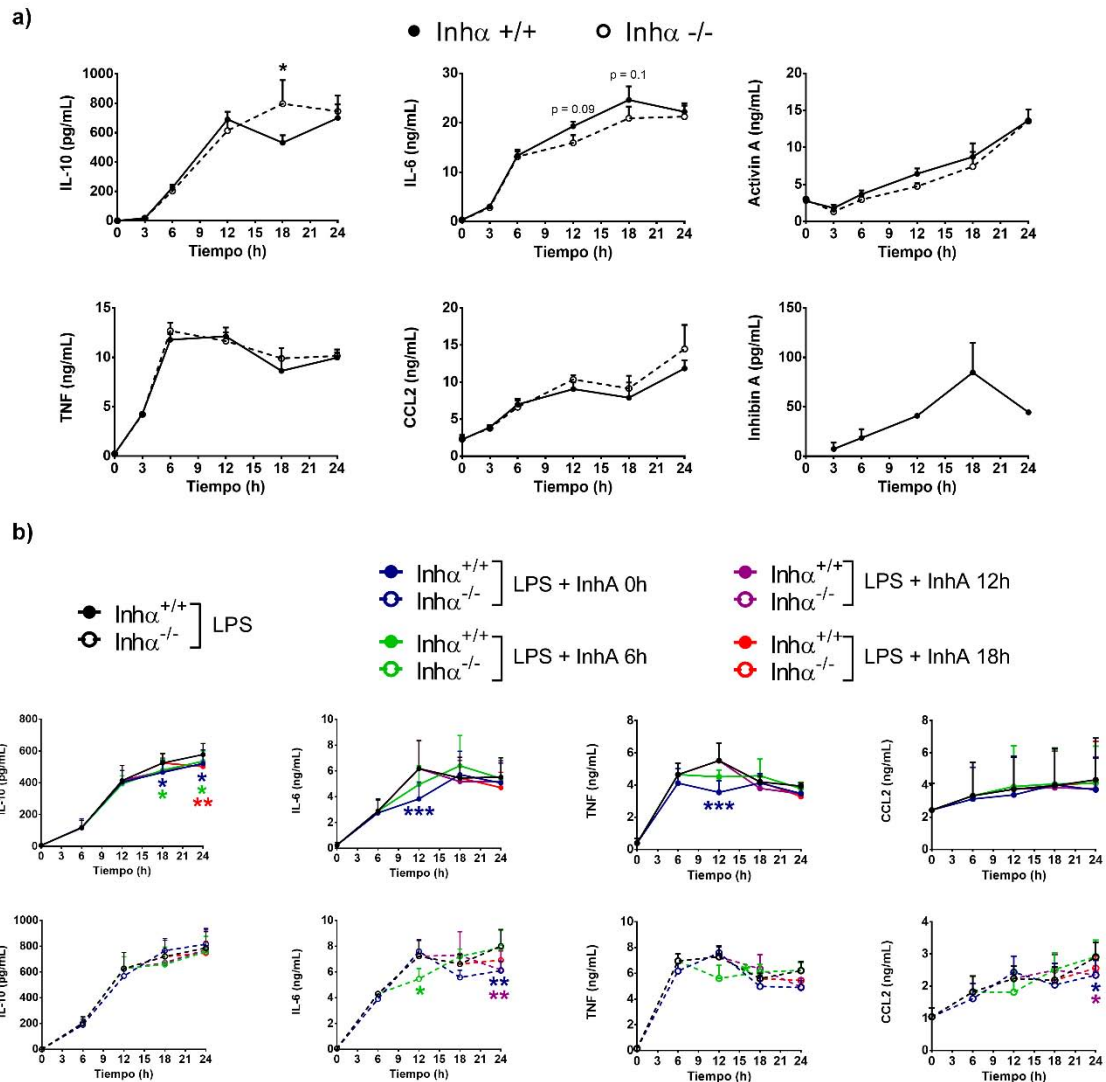
### Las mBMDC $Inh\alpha^{-/-}$ producen mayor nivel de IL-10 en respuesta a LPS

Debido a que la maduración de las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  está alterada, decidimos profundizar en la investigación y saber si la ausencia de Inhibinas afecta la capacidad para producir citocinas. Se sabe que las DCs pueden secretar citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-6, etc, las cuales están asociadas con la activación eficiente de los linfocitos T (98), así como las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF $\beta$  las cuales están asociadas con la inducción de la tolerancia (230). Nosotros evaluamos la producción de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, CCL2, INF $\gamma$  e IL-10 por CBA en los sobrenadantes de los cultivos de BMDC antes y a 3, 6, 12, 18 y 24 horas después de la estimulación con LPS. Las citocinas IL-12 e INF $\gamma$  no se detectaron en ningún tiempo evaluado (dato no mostrado). Como se muestra en la Figura 12A, TNF $\alpha$  y CCL2 son producidos de manera similar en las mBMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$ . De manera interesante, mBMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  producen mayor cantidad de IL-10, acompañado con

una tendencia a disminuir la cantidad de IL-6, a 18 horas después de la estimulación con LPS, alcanzando los mismos niveles que las mBMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  a 24 horas. Aunque TGF $\beta$  no fue detectado en los sobrenadantes en ningún tiempo (dato no mostrado), la disparidad entre la modulación a la baja de los marcadores de superficie y la producción de citocinas pro-inflamatorias asemeja el fenotipo “semi-maduro” reportado previamente en las DCs asociadas a tumor, las cuales han sido asociadas a anergia, inducción de linfocitos T reguladores y respuesta anti-tumoral deficiente (231).

Previamente, se ha demostrado que DCs derivadas de monocitos producen grandes cantidades de Activina A en respuesta a la estimulación de diversos TLRs, tan pronto como 2 horas después (209), mientras que no existen reportes sobre la producción de Inhibina en alguna de estas células. Además, se ha reportado que tanto Activina A como Inhibina A recombinante pueden disminuir la maduración de las DCs *in vitro* (217). Debido a lo anterior, nosotros investigamos si Activina A e Inhibina A pueden ser producidas por las BMDC maduras con LPS. Nuestros resultados muestran que la Activina A es producida a las 6 horas de estimulación con LPS y que va incrementando hasta las 24 horas, mientras que la Inhibina A es secretada por las BMDC a las 6 horas de estimulación, alcanzando el máximo de concentración a las 18 horas, la cual disminuye a las 24 horas (Figura 12A). Estos datos sugieren que Inhibina A puede actuar sobre las BMDC de manera autocrina. Interesantemente, en ensayos posteriores donde se adicionó Inhibina A recombinante durante la estimulación con LPS (0, 6, 12 y 18 horas después del estímulo con LPS) generó una reducción en la producción de IL-6 tanto en BDMC  $Inh\alpha^{+/+}$  como  $Inh\alpha^{-/-}$ , afectándose la producción de TNF $\alpha$  en BDMC  $Inh\alpha^{+/+}$  y de CCL2 en BDMC  $Inh\alpha^{-/-}$ . Además, la Inhibina A recombinante provocó la disminución en la producción de IL-10 en las mBMDC  $Inh\alpha^{+/+}$

(Figura 12B), lo que concuerda con los datos previamente reportados (217); sin embargo, la concentración de IL-10 no está alterada en BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$ .



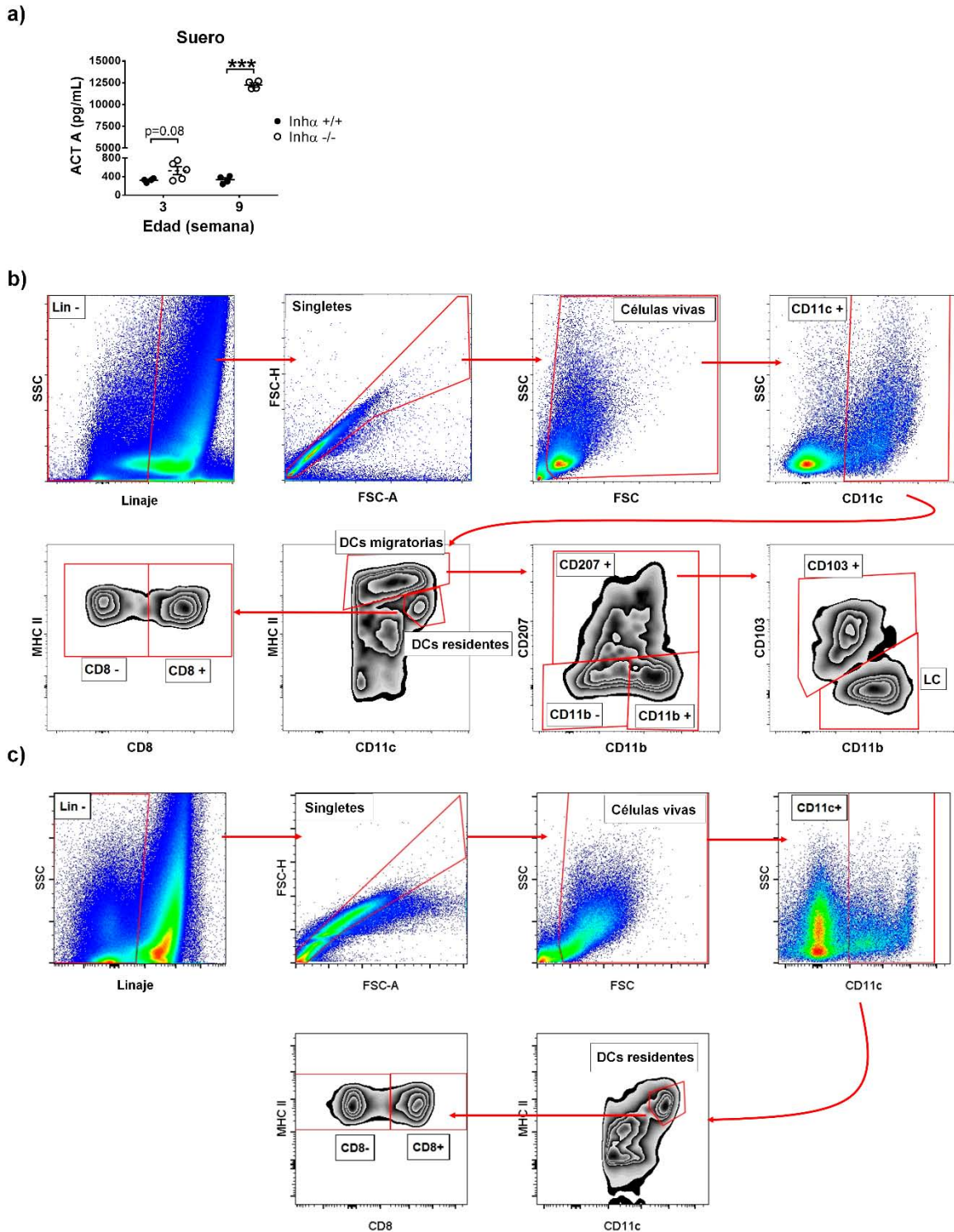
**Figura 12. Las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  producen mayor cantidad de IL-10 tras la estimulación con LPS.** A. Las citocinas de los sobrenadantes de los cultivos de BMDC se midieron a diferentes tiempos por ELISA (Inhibina A y Activina A) y CBA (IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  y CCL2). Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes y 2 experimentos independientes para Inhibina A. B. Curva de tiempo de producción de IL-10, IL-6, TNF y CCL2 por las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  (arriba) y  $Inh\alpha^{-/-}$  (abajo) en presencia de Inhibina A recombinante (150pg/ml) a 0h, 6h, 12h y 18h después de la estimulación con LPS. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## **La frecuencia y números de subpoblaciones de DCs en homeostasis no están alteradas en el ratón $\text{Inh}\alpha^{-/-}$**

La baja diferenciación de DCs observada en los cultivos *in vitro* nos hizo investigar si la ausencia de Inhibinas también afecta la diferenciación de DCs *in vivo*, por lo que se evaluaron las diferentes subpoblaciones de DCs en el NL, bazo y piel de ratones  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  y  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ . Dado que se ha reportado que los ratones deficientes de Inhibina incrementan la concentración de Activinas en suero y presentan tumores en las gónadas desde las 4 semanas de edad (232), se cuantificó la Activina A en suero de ratones hembras de 3 y 9 semanas de edad para evitar la desigualdad en la concentración de Activina A. Como se observa en la figura 13A, la concentración de Activina A en ratones  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  es igual a las 3 y 9 semanas de edad mientras que en ratones  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ , el nivel de Activina A se incrementa 20 veces en comparación con el ratón  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ ; sin embargo, la diferencia es mínima a 3 semanas de edad observándose una ligera tendencia a aumentar en los ratones  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ . Debido a lo anterior, se decidió utilizar ratones de 3 semanas de edad para los ensayos *in vivo* y *ex vivo* posteriores.

Se obtuvieron los órganos linfoides secundarios (nódulo linfático y bazo), se disgregaron enzimáticamente con Colagenasa IV y DNAsa I durante 1 hora y se tiñeron con diferentes anticuerpos para evaluar a las DCs. En la figura 13 se muestra la estrategia de análisis para definir las subpoblaciones de DCs en NL (Figura 13B) y bazo (Figura 13C). Dentro de la suspensión celular, las células vivas  $\text{CD}19^{-}$   $\text{CD}3^{-}$   $\text{TER}119^{-}$   $\text{CD}49b^{-}$  se seleccionaron para el análisis. Para el NL, la población  $\text{CD}11c^{\text{hi}}$   $\text{MHC II}^{\text{int}}$  representa las DCs residentes de tejido linfoide, las cuales son divididas en DCs  $\text{CD}8\alpha^{+}$  y  $\text{CD}8\alpha^{-}$ . La población  $\text{CD}11c^{\text{Int}}$   $\text{MHC II}^{\text{hi}}$  representa a las DCs migratorias, las cuales se dividen en  $\text{CD}11b^{-}$ ,  $\text{CD}11b^{+}$ ,  $\text{CD}103^{+}$  y LC ( $\text{CD}207^{+}$   $\text{CD}11b^{+}$   $\text{CD}103^{-}$ ). Para el bazo, la población  $\text{CD}11c^{\text{hi}}$   $\text{MHC}$

$II^{int}$  representa las DCs residentes de tejido linfoide, las cuales son divididas en DCs  $CD8\alpha^+$  y  $CD8\alpha^-$ . Se analizaron las DCs convencionales como residentes ( $Lin^- CD11c^+ MHC II^{lo}$ ) y migratorias ( $Lin^- CD11c^+ MHC II^{hi}$ ) en NL y bazo, como previamente se reportó por Idoyaga y colaboradores (233), y no se encontraron diferencias en frecuencia ni números totales entre los ratones  $Inh\alpha^{-/-}$  y  $Inh\alpha^{+/+}$  (Figura 14A). Se ha reportado que las subpoblaciones de DCs pueden modular la respuesta inmune diferencialmente, de manera que las DCs  $CD8\alpha^+$  y DCs  $CD103^+$  están especializadas en inducir respuestas tolerogénicas bajo ciertas condiciones, comparadas con sus contrapartes DCs  $CD8\alpha^-$  y DCs  $CD103^-$  (233). El análisis de dichas subpoblaciones de DCs no muestran diferencias en la frecuencia ni en los números totales de las DCs residentes  $CD8\alpha^+$  y  $CD8\alpha^-$ . Para caracterizar a las DCs migratorias, se usaron los marcadores CD207, CD11b y CD103 siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la Figura 13B. Como se muestra en la figura 14A, ni la frecuencia ni los números totales de las subpoblaciones de DCs  $CD11b^+$ ,  $CD11b^-$ ,  $CD103^+$  o LC es significativamente diferente entre los ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$ .



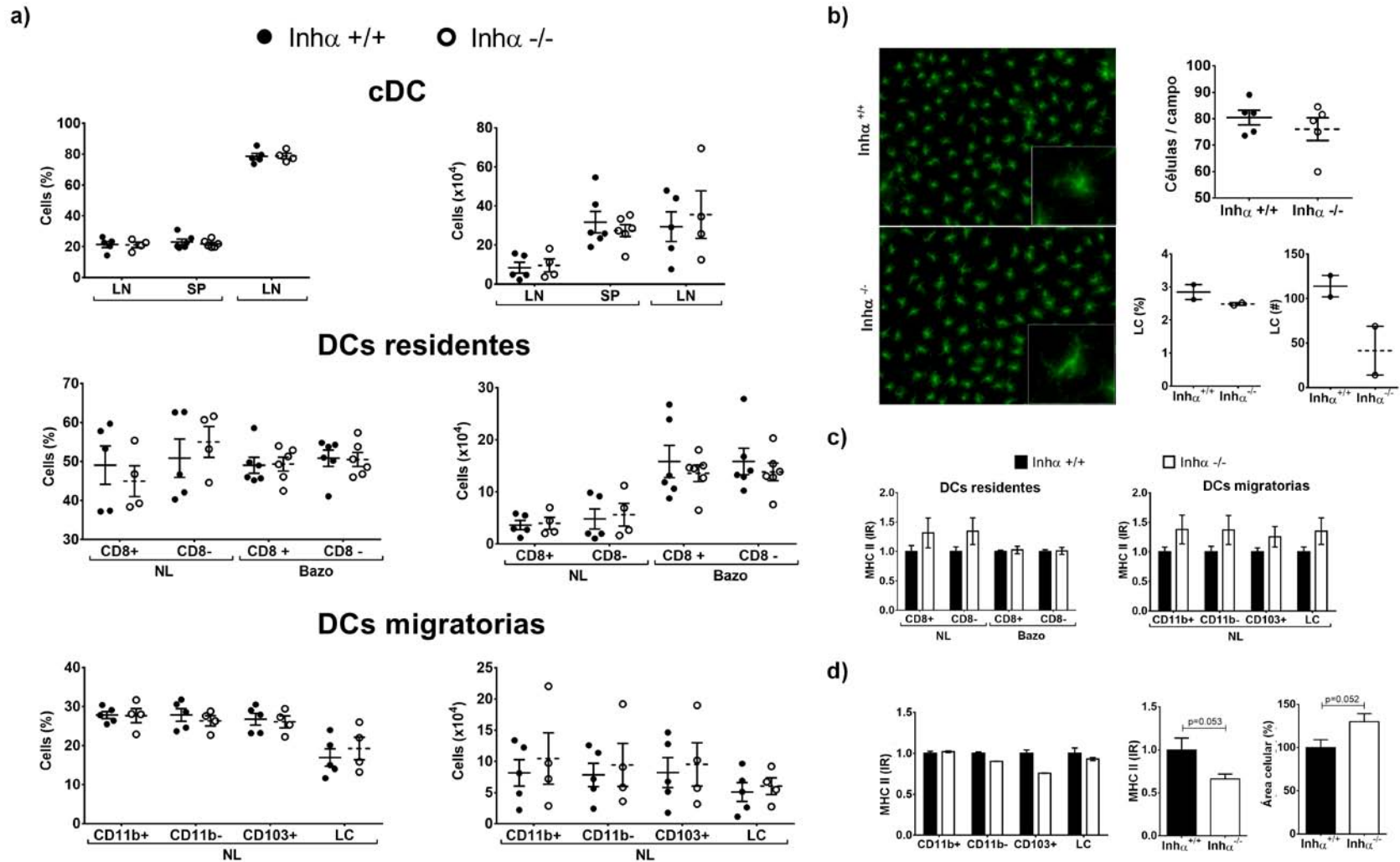
**Figura 13. Análisis de la Activina A en suero y estrategia de análisis de las subpoblaciones de DCs *ex vivo*.**  
 A. La Activina A se cuantificó en el suero de ratones  $Inha^{+/+}$  y  $Inha^{-/-}$  de 3 y 9 semanas de edad por ELISA (media  $\pm$  EE de 3-4 experimentos independientes,  $n=3-5$ ). B-C. Estrategia de análisis para definir las subpoblaciones de DCs en NL (B) y bazo (C) de ratones  $Inha^{+/+}$  y  $Inha^{-/-}$ . B. Dentro de la suspensión celular, las células vivas  $CD19^{-} CD3^{-} TER119^{-} CD49b^{-}$  se seleccionaron para el análisis. La población  $CD11c^{hi}$  MHC II<sup>int</sup> representa las DCs residentes de tejido linfoide, las cuales son divididas en DCs  $CD8\alpha^{+}$  y  $CD8\alpha^{-}$ . La población  $CD11c^{int}$  MHC II<sup>hi</sup> representa a las DCs migratorias, las cuales se dividen en  $CD11b^{-}$ ,  $CD11b^{+}$ ,

CD103<sup>+</sup> y LC (CD207<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>). C. Los esplenocitos vivos CD19<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup> CD49b<sup>-</sup> se seleccionaron para el análisis. La población CD11c<sup>hi</sup> MHC II<sup>int</sup> representa las DCs residentes de tejido linfóide, las cuales son divididas en DCs CD8α<sup>+</sup> y CD8α<sup>-</sup>. Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

---

Dado que la Activina A promueve la diferenciación de LC a partir de monocitos en la piel (206, 234) y que el ratón *Inhα*<sup>-/-</sup> tiene niveles de Activina A sérica incrementados en los adultos, también investigamos si la ausencia de Inhibinas impacta en la diferenciación de LC *in vivo*. Sin embargo, como se muestra en la figura 14B, no hay diferencias en los números de LC en el ratón *Inhα*<sup>-/-</sup> comparado con el ratón *Inhα*<sup>+/+</sup>. Estos resultados se confirmaron después de la digestión de la piel y analizados por citometría de flujo (Figura 14B, panel inferior). Dado que previamente se demostró que las DCs convencionales tímicas del ratón deficiente de Inhibina tienen menor expresión de MHC II en homeostasis (221), evaluamos la expresión de MHC II en las diferentes poblaciones de DCs. Como se muestra en la figura 14C, la expresión de MHC II en DCs residentes y migratorias no se encuentra alterada en NL ni bazo. De manera interesante, las LC del ratón *Inhα*<sup>-/-</sup> muestran menor expresión de MHC II, analizado por la tinción de láminas epidérmicas por inmunofluorescencia y por citometría de flujo, la cual está acompañada por un aumento en el área celular en comparación con el ratón *Inhα*<sup>+/+</sup> (Figura 14D).





**Figura 14.** Las poblaciones de DCs no se encuentran afectadas en el ratón deficiente de Inhibina  $\alpha$ , pero las LC presentan baja expresión de MHC II. Ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$  de 3 semanas de edad se analizaron para las poblaciones cDCs ( $Lin^{-} CD11c^{+} MHC II^{+}$ ), DCs migratorias ( $Lin^{-} CD11c^{+} MHC II^{hi}$ ) y DCs residentes ( $Lin^{-} CD11c^{hi} MHC II^{+}$ ) en NL y bazo por citometría de flujo. Mayor caracterización de las subpoblaciones de DCs migratorias en NL con base en la expresión de CD11b, CD103 y CD207. A. Gráficas representan la frecuencia (izquierda) y números totales (derecha) (media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos)

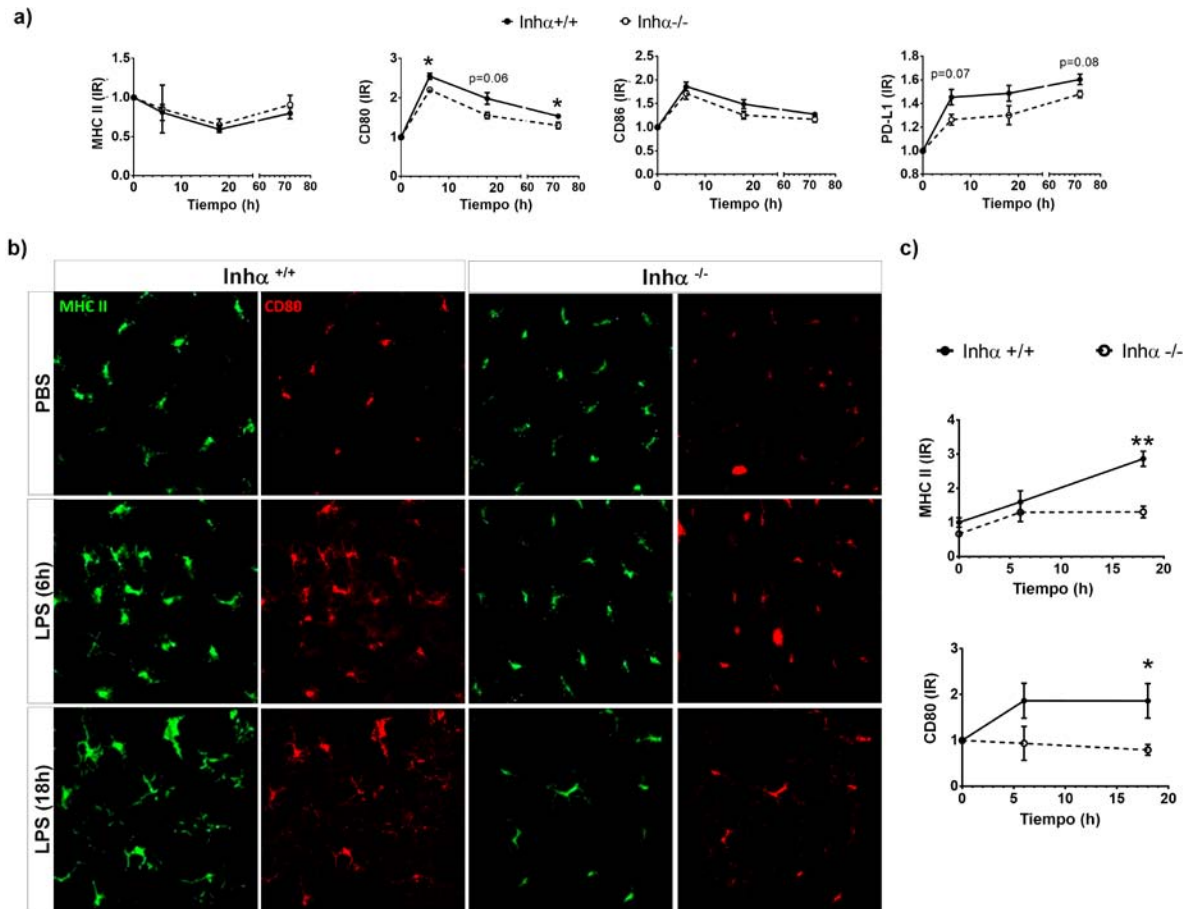
independientes, n=4-6 ratones). B. Láminas epidérmicas de la oreja se tiñeron con MHC II AF488 para el análisis de LCs por inmunofluorescencia. Imágenes representativas a 20x (izquierda) y gráficas que representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes expresado como células por campo. El panel de abajo muestra el análisis por citometría de flujo de las LCs (CD207<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>) obtenidas de la digestión enzimática de láminas de piel en condiciones homeostáticas (izquierda, porcentaje; derecha, números totales). C. Expresión de MHC II en subpoblaciones de DC de NL y bazo. Las gráficas de barras representan la expresión relativa de la IMF de MHC II comparado con el ratón  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (media  $\pm$  SEM). D. Expresión de MHC II en las DCs de piel. Izquierda: análisis por citometría de flujo (n=2). Centro: análisis por microscopía de inmunofluorescencia en láminas epidérmicas. Los datos están representados como la expresión relativa comparado al  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ . Derecha: análisis del área celular de las LCs de las láminas epidérmicas. Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

---

### **DCs $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ presentan una maduración disminuida *in vivo***

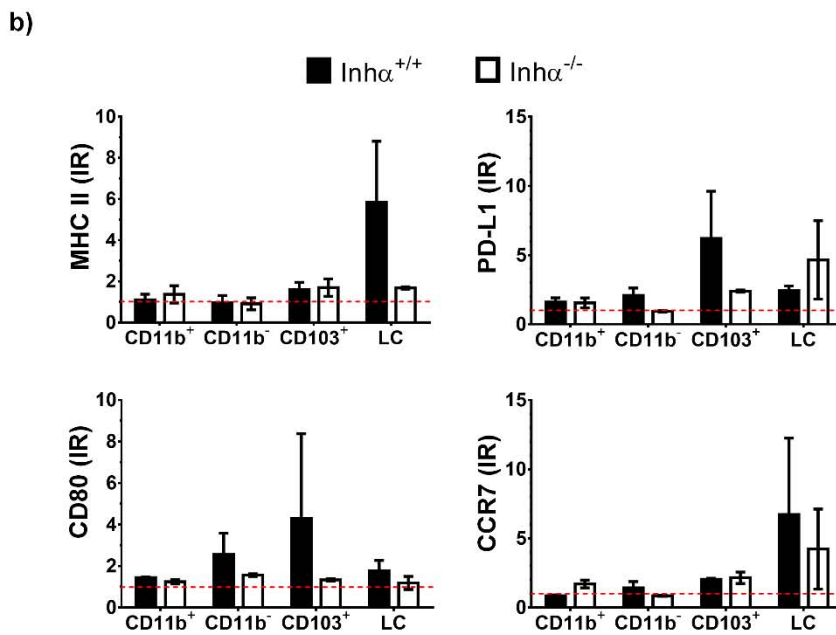
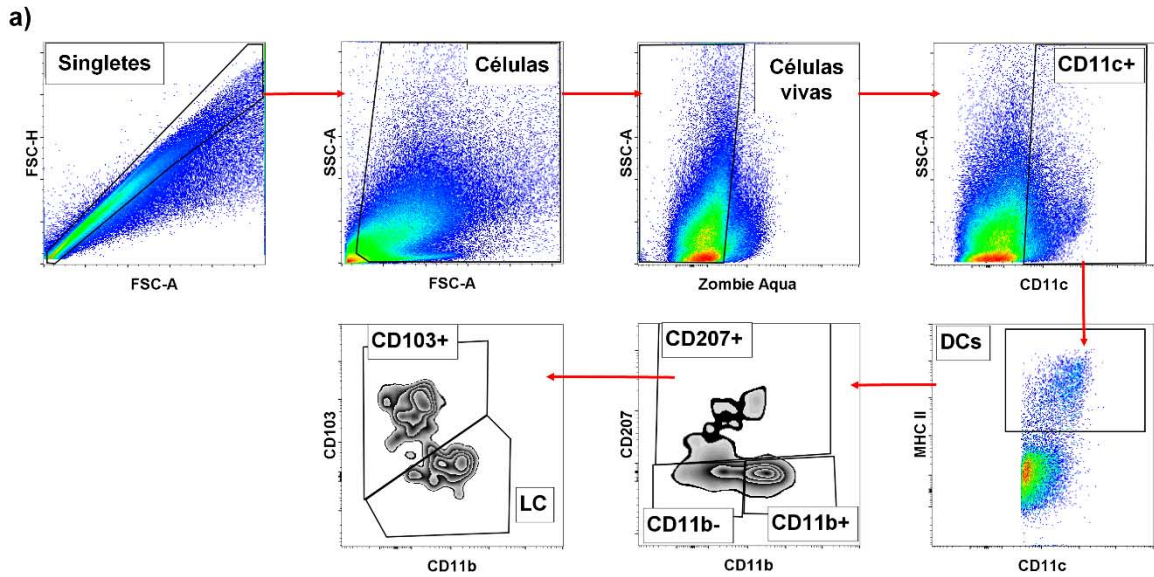
Aunque no se encontraron diferencias en las subpoblaciones de DCs en condiciones homeostáticas, en seguida evaluamos el efecto de la ausencia de Inhibinas bajo condiciones inflamatorias. Para analizar la maduración de las DCs *in vivo*, se inoculó LPS o PBS de manera subcutánea en las orejas de ratones de 3 semanas de edad y se evaluó la expresión de marcadores de maduración en las DCs del NL drenante después de 6, 18 y 72 horas. Como se muestra en la figura 15A, las DCs  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  expresan niveles menores de CD80 y PD-L1 tras la estimulación con LPS comparado con las DCs  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ . La expresión de CD86 está ligeramente disminuida en las DCs  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  comparado con las  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ , aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. También se evaluó la expresión de MHC II y CD80 en las LC de láminas epidérmicas y, como se muestra en la figura 15B, las LCs  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  incrementan los niveles de MHC II y CD80 tan pronto como 6 horas después de la inoculación de LPS, mientras que no se observaron cambios en las LCs de la oreja inoculada con PBS (Figura 15B-C). En contraste, no se observó incremento en la expresión de MHC II ni CD80 en las LCs  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  estimuladas con LPS, sugiriendo fuertemente que, al

igual que las DCs convencionales, la maduración de las LCs está alterada en ausencia de Inhibinas.



**Figura 15. La maduración inducida por LPS está afectada *in vivo* en el ratón *Inhα*<sup>-/-</sup>.** Ratones *Inhα*<sup>+/+</sup> y *Inhα*<sup>-/-</sup> se inocularon intradérmicamente con 1μg de LPS en la oreja izquierda y con PBS en la oreja derecha. Después de 6, 18 y 72 horas, se obtuvieron láminas epidérmicas y el NL drenante para evaluar la maduración de las DCs. A. Curva de tiempo de la expresión de MHC II, CD80, CD86 y PD-L1 en DCs convencionales (CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>). B. Micrografías de microscopio confocal de las láminas epidérmicas teñidas para MHC II (verde) y CD80 (rojo). C. Expresión relativa de MHC II y CD80 en LC de láminas epidérmicas. Las gráficas representan la media ± SEM del incremento relativo de la oreja con LPS contra la oreja con PBS de 5 experimentos independientes. Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

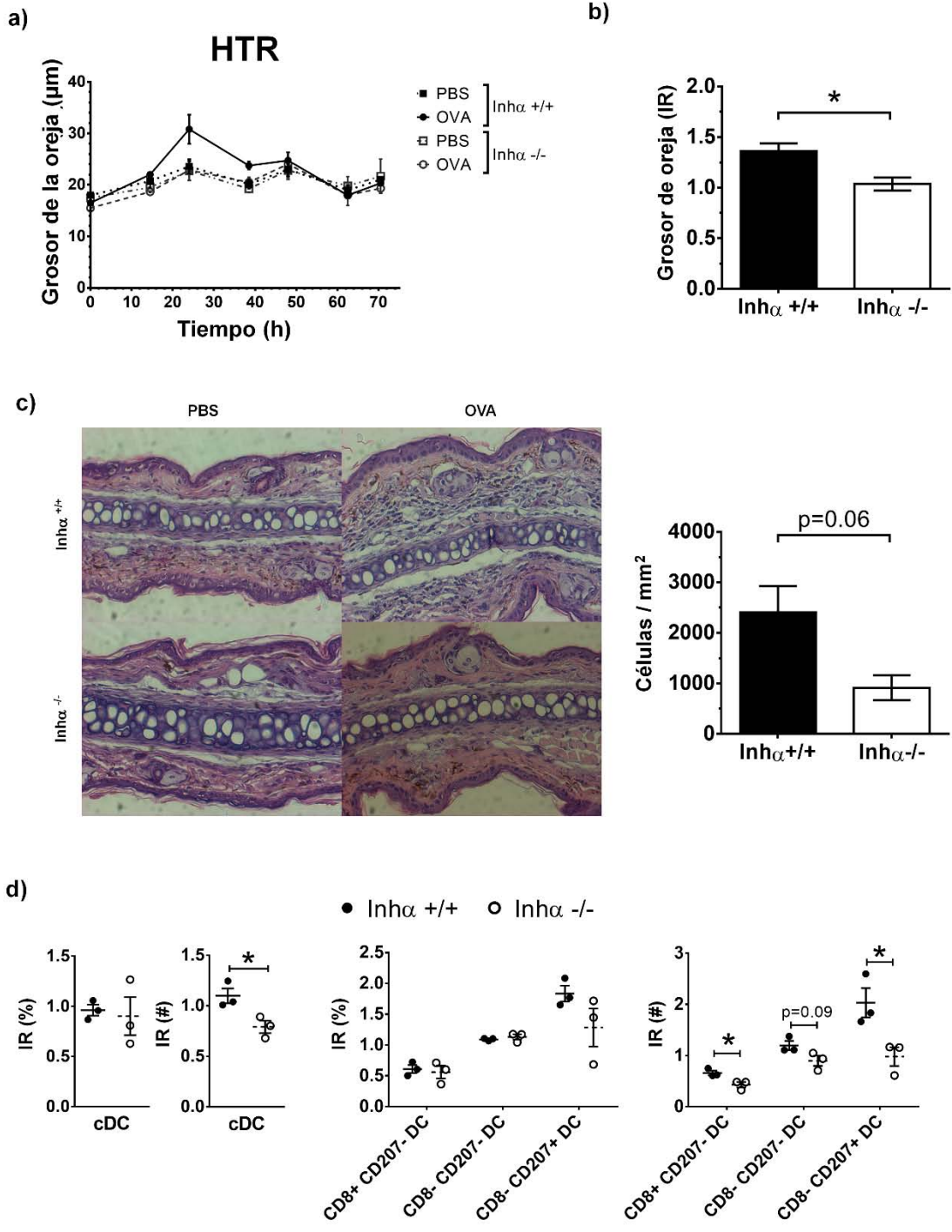
Para profundizar en la caracterización de las DCs de piel, 18 horas después de la inoculación de LPS se disgregaron las orejas y se tiñeron con los anticuerpos contra CD207, CD11b y CD103 para analizar por citometría de flujo las poblaciones LC, CD11b<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup> y CD103<sup>+</sup>, ya que, tras un estímulo de maduración, tanto las DCs migratorias como las DCs residentes incrementan la expresión de MHC II en superficie dificultando su análisis por separado. La estrategia de análisis para definir las subpoblaciones de DCs se muestra en la figura 16A en donde la población CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> representa a las DCs convencionales, las cuales son divididas en 4 poblaciones con base en la expresión de CD11b, CD207 y CD103. Como se observa en la figura 16B, las LCs expresan bajo nivel de MHC II, CD80 y CCR7 correlacionando con un incremento en la expresión de PD-L1, sugiriendo que la maduración de las mismas está abatida en los ratones *Inhα*<sup>-/-</sup>. Aunado a lo anterior, la expresión de CD80 y PD-L1 en las DCs CD103<sup>+</sup> se encuentra abatida tras el estímulo con LPS correlacionando con una deficiencia en la maduración de DCs.



**Figura 16. Las DCs de piel del ratón  $Inh\alpha^{-/-}$  tienen la maduración alterada *in vivo*.** Ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$  de 3 semanas de edad se inocularon intradermalmente con  $1\mu\text{g}$  de LPS en la oreja izquierda y PBS en la oreja derecha. Después de 18 horas, las orejas se disgregaron para evaluar la maduración en las subpoblaciones de DCs. A. Estrategia de análisis para definir las subpoblaciones de DCs. La población  $CD11c^+$  MHC II<sup>+</sup> representa a las DCs convencionales, las cuales son divididas en 4 poblaciones con base en la expresión de CD11b, CD207 y CD103. B. Expresión de MHC II, CD80, PD-L1 y CCR7 en las poblaciones de DCs: CD11b<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup> y LC (n=2).

## **La respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada está disminuida en el ratón $Inh\alpha^{-/-}$**

Para investigar si las alteraciones en la maduración de las DCs en respuesta a LPS puede afectar la activación de linfocitos T *in vivo*, se realizaron ensayos de HTR en respuesta a OVA. Ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  y  $Inh\alpha^{-/-}$  fueron inoculados subcutáneamente con OVA + LPS como adyuvante (como se describe en Materiales y Métodos). Como se observa en la figura 17A, el ratón deficiente de Inhibina no presenta engrosamiento de la oreja retada con OVA en ninguno de los tiempos evaluados (hasta 72 horas después del reto), de hecho, a las 24 horas después del reto, el engrosamiento de la oreja del ratón  $Inh\alpha^{+/+}$  es de 1.4 veces comparado con la oreja con PBS mientras que en la oreja del ratón  $Inh\alpha^{-/-}$  no se incrementa el grosor (figura 17B). Como era sugerente, la falta de engrosamiento de la oreja en el ratón  $Inh\alpha^{-/-}$  correlaciona con una pobre infiltración celular en la oreja (figura 17C panel inferior), mientras que las células se reclutan en la oreja del ratón  $Inh\alpha^{+/+}$  retado con OVA (Figura 17C panel superior). Adicionalmente, cuando las poblaciones de DCs se evaluaron en el NL drenante a las 24 horas después del reto, el ratón deficiente de Inhibina mostró menor números de DCs convencionales comparado con el ratón  $Inh\alpha^{+/+}$  (Figura 17D). Asimismo, el análisis de las subpoblaciones de DCs mostró que las DCs  $CD8\alpha^{-} CD207^{+}$ , la cual está compuesta principalmente por LCs, son las que se encuentran más reducidas en el NL drenante del ratón  $Inh\alpha^{-/-}$  tras el reto con OVA. Nuestros datos sugieren que las DCs  $Inh\alpha^{-/-}$  no son capaces de establecer una respuesta inmune apropiada debido a la falta de maduración y migración de las DCs.



**Figura 17. El ratón  $Inh\alpha^{-/-}$  muestra deficiente respuesta HTR inducida por el reto con OVA.** Ratones de 3 semanas de edad se inmunizaron con 100ng de OVA + 10 $\mu$ g de LPS en el lomo. Después de 7 días, los ratones se retaron en la oreja izquierda con 100ng de OVA y PBS en la oreja derecha. A. El grosor de la oreja se midió cada 12 horas y hasta las 72 horas después del reto (media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes). B. Grosor de la oreja 24h después del reto expresado como el incremento relativo del reto con OVA comparado con el reto con PBS. C. Secciones de oreja teñidas con H&E 24h después del reto (izquierda). Se muestra un experimento representativo. Cuantificación de las células infiltrantes (derecha) en las orejas retadas con OVA

después de 24h (media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes, n=3). D. Frecuencia y números totales de las poblaciones de DCs en el NL drenante expresado como el incremento relativo de la oreja retada con OVA comparado con el reto con PBS. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes (n=3). Prueba de T de Student no pareado de dos colas. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001.

---

## 12. DISCUSIÓN

Existe evidencia creciente que demuestra el papel de las Activinas en la regulación de la inmunidad; sin embargo, aún se desconocen los posibles mecanismos a través los cuales las inhibinas ejercen su función sobre las células inmunes. Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a investigar la participación de las Inhibinas en los procesos biológicos de las células del sistema inmune, demostrando previamente que las Inhibinas son requeridas para la maduración de las DCs en el timo y que en ausencia de las Inhibinas, la reducción de MHC II y CD86 en las DCs del estroma tímico tiene un impacto en la selección de los timocitos (221). Sin embargo, la función de las Inhibinas en la maduración y función de las DCs convencionales de la periferia no se había explorado hasta el momento.

Nuestros resultados muestran que la ausencia de Inhibinas conlleva una disminución de la maduración de BMDC *in vitro*, evidenciado por la reducción de la expresión de MHC II, CD80 y CD86, así como por el incremento en la expresión de la molécula co-inhibidora PD-L1 en respuesta a LPS (Figura 18A-B). La baja expresión de MHC II y CD86 que encontramos no coincide con un reporte previo donde se mostró que la adición de Inhibina A recombinante es capaz de prevenir el incremento de la expresión de HLA-DR durante la maduración de DCs derivados de monocitos humanos *in vitro* en respuesta a citocinas pro-inflamatorias (Prostaglandina E2, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  (217). Sin embargo, cabe resaltar que los ligandos de Activinas e Inhibinas pueden ejercer diferentes efectos en las células del



sistema inmune dependiendo de la etapa de desarrollo, las condiciones homeostáticas (235) o inflamatorias (236, 237), así como en respuesta a diversos estímulos (209).

A pesar de que se observó una deficiente expresión de marcadores de maduración en las DCs estimuladas con LPS, la expresión de CCR7 en las mBMDC no fue menor en ausencia de Inhibinas, a pesar de la reducida capacidad migratoria hacia CCL19 y CCL21 *in vitro* y de la disminución de la llegada a NL (“homing”) *in vivo*, lo que pudiera implicar alteraciones en las vías de señalización dependientes de CCR7. De hecho, a pesar de que la movilización de  $Ca^{2+}$  no está alterada en las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$ , la fosforilación de ERK se encontró incrementada en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21. La relevancia funcional de la hiperfosforilación de ERK se desconoce; sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la falta de balance de las vías de señalización río debajo de CCR7 se encuentren involucradas en la falta de migración de las células. En este contexto, nuestro grupo ha reportado previamente que la falta de migración de los linfocitos T deficientes de Jak3 correlaciona con la hiperactivación de cofilina, la cual es un blanco de ERK, lo cual se asocia a alteraciones en las dinámicas del citoesqueleto de actina (238). Alternativamente, las alteraciones en la morfología de las mBMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  sugiere que la expresión y/o función de moléculas de adhesión podrían estar alteradas, y de esta manera explicar la baja migración observada en las DCs deficientes de Inhibina. En este sentido, T $\beta$ RIII podría estar involucrado en la migración deficiente de las mBMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  ya que se ha observado que se asocia a la GTPasa Cdc42 en los filopodios de células tumorales potenciando la adhesión de las células, cuando se abate la expresión de T $\beta$ RIII, las células tumorales se vuelven metastásicas a causa del incremento en su capacidad migratoria (Figura 18D).

El fenotipo alterado mostrado por las DCs  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  sugirió que también podrían estar disminuidas sus funciones. Como se describió, las mBMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  indujeron una pobre respuesta en linfocitos T alogénicos, posiblemente como consecuencia de la baja expresión de MHC II y CD86 y de la alta expresión de PD-L1. En este contexto, se ha observado que PD-L1 puede disminuir la señalización del receptor de linfocitos T (TCR por sus siglas en inglés) por medio del reclutamiento de SHP-2 (239) y, en consecuencia, promueve la anergia de los linfocitos T y la inducción de Treg (240, 241). De manera interesante, datos preliminares del laboratorio indican que la falta de maduración de las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  tiene un impacto en la polarización de linfocitos T y en la inducción de las Treg (tesis de doctorado de Sandra Ortega y Marisol de la Fuente, en proceso).

Un mecanismo potencial que puede estar involucrado en la maduración alterada de las DCs en ausencia de Inhibinas puede ser la sobreproducción de Activinas, debido a que la ausencia de la subunidad  $\alpha$  de Inhibinas resulta en un incremento en el ensamblaje de dímeros de subunidades  $\beta$ , conllevando al incremento en la expresión de Activinas (224). En este contexto, Robson y colaboradores han demostrado que las mo-DCs secretan Activina A en respuesta a ligandos de TLR (LPS, R-848, Poly I:C y Pam3Cys), CD40L y Prostaglandina E2, actuando autocrinamente como mecanismo de retroalimentación negativa para contrarrestar el proceso de maduración (209). Sin embargo, de manera interesante, no se observaron diferencias significativas en la secreción de Activina A entre las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  y las  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  tras la estimulación con LPS (Figura 9B), argumentando en contra de la participación de la Activina en la disminución de la maduración de las BMDC  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ . Por consiguiente, aunque se ha reportado que la adición de las proteínas recombinantes, Activina A o Inhibina A, disminuyen la maduración de mediada por citocinas pro-inflamatorias en

cultivos de Mo-DCs humanos (217), nuestros datos indican que las Inhibinas son requeridas para promover la maduración de DCs en respuesta a ligandos de TLR.

Más allá de la función antagónica de las Inhibinas sobre la señalización de las Activinas, existe evidencia reciente que indica un posible mecanismo para explicar las funciones mediadas por la Inhibina (242). De hecho, existen reportes sugiriendo que las Inhibinas pueden transducir señales a través de un receptor independiente (revisado en (218)), por lo tanto, las Inhibinas pueden tener una función propia en la regulación de la maduración de las DCs. Además, nuestros datos demuestran por primera vez que las BMDC pueden secretar Inhibina A tras la estimulación con LPS, mostrando un pico de secreción a 18 horas. De manera interesante, en este tiempo, las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  producen mayor cantidad de IL-10 y una ligera disminución de IL-6 comparado con las BMDC  $Inh\alpha^{+/+}$  (Figura 9), lo que podría explicar parcialmente la baja capacidad estimuladora de estas DCs (Figura 8). Sin embargo, las señales mediadas por Inhibina parecen no regular directamente la secreción de citocinas ya que tras la adición de Inhibina A recombinante, las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  fueron incapaces de restaurar las cantidades de IL-10 e IL-6 en respuesta a LPS, sugiriendo que las Inhibinas modulan la maduración de las DCs a través de otros mecanismos. En este contexto, la Inhibina A recombinante fue capaz de restaurar el incremento de la expresión MHC II en las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$ , pero solo cuando se adicionó el ligando al mismo tiempo que el estímulo de LPS (Figura 13E).

La producción aumentada de IL-10 y la ligera disminución de IL-6 en las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  puede implicar la activación de diferentes vías de señalización río debajo de TLRs. Así, la estimulación de TLRs conlleva la expresión de citocinas pro-inflamatorias dependientes de NF $\kappa$ B, pero también a la activación de los factores de transcripción

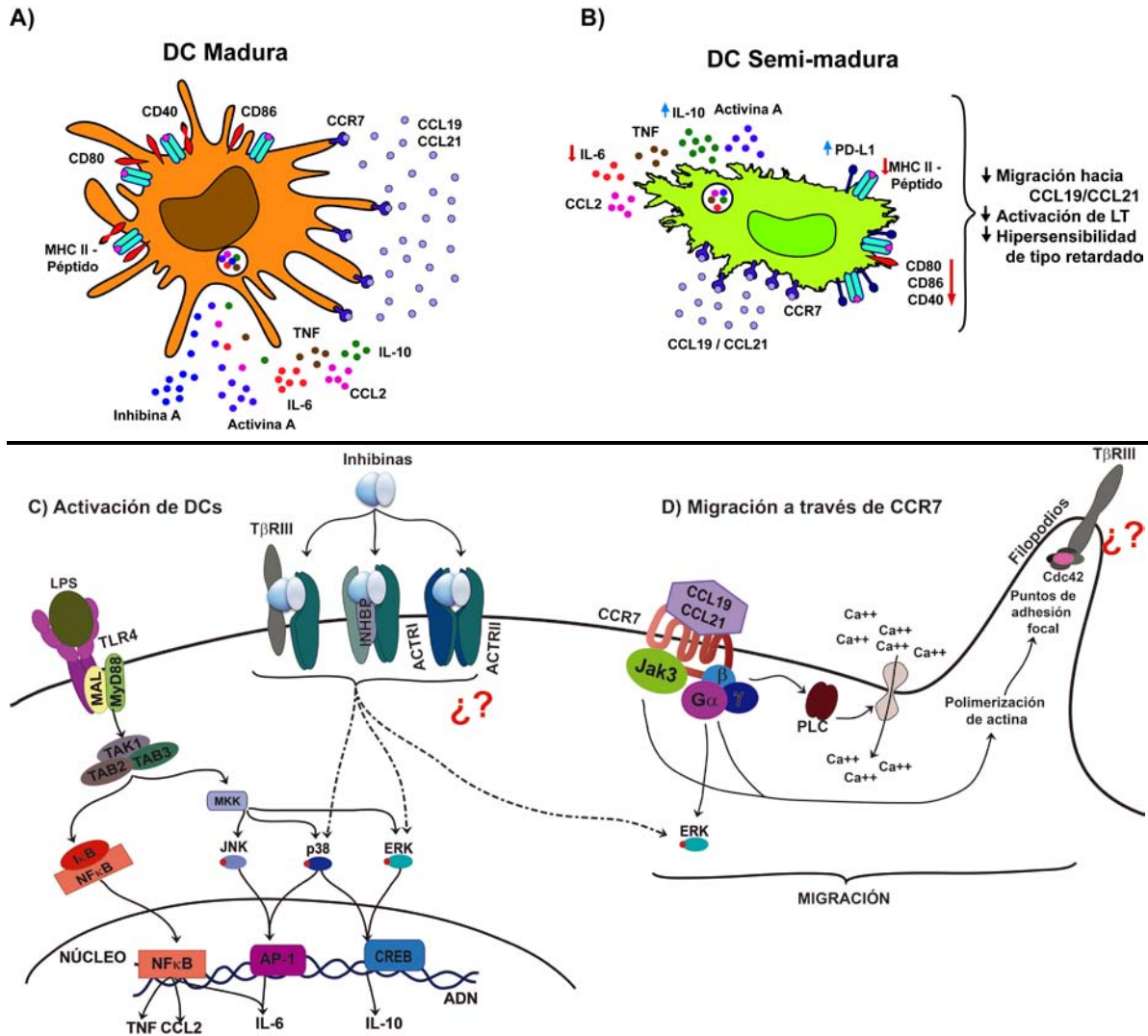
dependientes de MAPKs, AP-1 y CREB (243). Se ha observado que IL-10 se produce de manera dependiente de CREB en macrófagos tras la activación de TLR2/TLR4, río debajo de la fosforilación de p38 y otras MAPKs (244). Por otro lado, en mieloma múltiple, la producción de IL-6 es abatida por la unión de CREB al sitio CREB de la región promotora de IL-6, de manera independiente de NFκB (245). Por lo tanto, un posible mecanismo para explicar el aumento de IL-10 y la disminución de IL-6 por las BMDC  $Inh\alpha^{-/-}$  podría involucrar la activación preferencial de CREB sobre AP-1 en respuesta a LPS (Figura 18C).

Otra citocina que puede regular negativamente la maduración de las DCs es TGFβ. De hecho, las DCs adquieren un fenotipo tolerogénico en presencia de TGFβ, caracterizado por la baja expresión de los marcadores de maduración de DCs como CD83, CD80 y CD86, así como MHC II, y por la baja producción de citocinas pro-inflamatorias, como TNFα, IL-12 e IFNα, y alta producción de citocinas anti-inflamatorias, como TGFβ (163). Aunque en ausencia de Inhibinas las mBMDC exhibieron un fenotipo “semi-maduro”, no se detectaron niveles significativos de TGFβ en el sobrenadante de los cultivos estimulados con LPS (dato no mostrado), argumentando en contra de la posible participación de esta citocina en la alteración de la maduración.

La participación de la Inhibinas en la diferenciación de las DCs *in vivo* permanece sin esclarecerse. Nuestros datos muestran que la diferenciación *in vitro* de las DCs a partir de progenitores de médula ósea está disminuida significativamente en ausencia de Inhibinas (Figura 1A); sin embargo, no se encontraron diferencias en la frecuencia ni en los números totales de las DCs convencionales en NL y bazo de los ratones  $Inh\alpha^{-/-}$  comparado con los ratones  $Inh\alpha^{+/+}$  (Figura 10). Esta discrepancia puede explicarse por el hecho de que *in vivo*,

las pre-DCs pueden ser provistas por un ambiente de citocinas específicas de tejido que compensen la generación de DCs en ausencia de Inhibinas (revisado en (246, 247)).

Existe evidencia que muestra que miembros de la superfamilia de TGF $\beta$  promueven la diferenciación de LC de manera autocrina (38). De hecho, Musso y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de Activina A bajo el control del promotor de queratina aumenta la diferenciación de LC a partir de monocitos circulantes, mientras que sobreexpresión de Folistatina, reduce la generación *in vivo* (206). De manera interesante, aunque los números de LC en láminas epidérmicas no se encontraron alterados en el ratón deficiente de Inhibina, el fenotipo de LC está alterado, mostrando menor expresión de MHC II y un incremento en la extensión de las células, sugiriendo una participación de las Inhibinas en la homeostasis de LCs. En condiciones inflamatorias, las LCs incrementan la expresión de MHC II y moléculas co-estimuladoras y, en paralelo, pierden el fenotipo extendido adquiriendo una forma redonda que les permite migrar hacia NL. Estos cambios están acompañados por la disminución de la expresión de E-caderina y el incremento en la expresión de N-caderina y CCR7 (revisado en (248)). De manera interesante, el incremento de moléculas co-estimuladoras en las LCs estuvo disminuida tras la estimulación *in vivo* de LPS en el ratón deficiente de Inhibina, el cual correlaciona con los resultados de la maduración de las BMDC. Además, las LCs  $Inh\alpha^{-/-}$  también muestran diferencias en la morfología comparado con las LCs  $Inh\alpha^{+/+}$ , lo que podría indicar un incremento en la expresión de moléculas de adhesión, como E-caderina.



**Figura 18. Papel de las Inhibinas en las DCs.** A. Tras el estímulo con LPS, las DCs se activan y maduran, adquiriendo características especiales: sobreexpresión de MHC II y moléculas coestimuladoras, secreción de citocinas proinflamatorias, Activina A e Inhibina A, y migran hacia el NL en respuesta a los ligandos de CCR7. B. En ausencia de Inhibina, las DCs tienen un fenotipo semi-maduro en respuesta al estímulo con LPS, caracterizada por tener baja expresión de MHC II y moléculas coestimuladoras, alta expresión de PD-L1, secreción de citocinas proinflamatorias y baja migración en respuesta a CCL19 y CCL21. C. Las Inhibinas pueden regular la producción de citocinas a través de la activación de las MAP cinasas JNK, p38 y ERK, ya que son importantes para la activación de AP-1 y CREB que regulan la producción de IL-6 e IL-10 respectivamente. D. La migración hacia CCL19 y CCL21 puede afectarse por un incremento en la adhesión de las DCs. En ausencia de Inhibinas, es probable que TβRIII esté libre y sea capaz de unirse a Cdc42 en los filopodios, potenciando la adhesión de las DCs en dichas zonas.

Finalmente, para ejercer una respuesta inmune *in vivo*, las DCs capturan antígenos en la periferia y migran hacia los NL drenantes para presentarlos y activar a los linfocitos T. En ensayos de HTR, tanto las LCs como las DCs dermales son importantes para inducir la respuesta de linfocitos T (248). El ratón  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  muestra una respuesta HTR pobre tras el reto con OVA, que puede ser el resultado de la falta de maduración y, en consecuencia, una migración reducida de las DCs  $\text{CD8}^- \text{CD207}^+$  hacia el NL drenante. Como esta respuesta inmune local depende de las DCs de piel, aún queda por evaluar el efecto de las funciones mediadas por Inhibinas en respuestas inmune sistémicas o en ambientes tolerogénicos, como en el tracto intestinal, las cuales requieren de la participación de otras subpoblaciones de DCs.

### **13. CONCLUSIONES**

Las Inhibinas participan en la maduración de las DCs ya que, en ausencia de Inhibinas, las DCs tienen un fenotipo semi-maduro cuando son estimuladas con LPS. Además, las Inhibinas participan en el proceso de migración debido a que las DCs deficientes de Inhibina son incapaces de migrar hacia CCL19 y CCL21.

Debido al fenotipo semi-maduro, la migración deficiente hacia ligandos de CCR7 y a la baja capacidad para activar a LT, la función inmunogénica de las DCs está disminuida en ausencia de Inhibinas.

### **14. PERSPECTIVAS**

Se deben investigar los mecanismos de señalización de las Inhibinas involucrados en los procesos de maduración y migración de las DCs. De manera particular:

1. Evaluar la activación de las vías de señalización río debajo de TLRs en ausencia de Inhibinas.
2. Investigar las vías de señalización que se activan tras la estimulación con Inhibina A en DCs.
3. Investigar el mecanismo por el cual las DCs no migran hacia los ligandos de CCR7 en ausencia de Inhibinas.

## 15. REFERENCIAS

1. Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162.
2. Gregori, S. 2011. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens* 77: 89-99.
3. Steinman, R. M., G. Kaplan, M. D. Witmer, and Z. A. Cohn. 1979. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 149: 1-16.
4. Metlay, J. P., M. D. Witmer-Pack, R. Agger, M. T. Crowley, D. Lawless, and R. M. Steinman. 1990. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 171: 1753-1771.
5. Liu, K., G. D. Victora, T. A. Schwickert, P. Guermonprez, M. M. Meredith, K. Yao, F. F. Chu, G. J. Randolph, A. Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324: 392-397.
6. Greter, M., J. Helft, A. Chow, D. Hashimoto, A. Mortha, J. Agudo-Cantero, M. Bogunovic, E. L. Gautier, J. Miller, M. Leboeuf, G. Lu, C. Aloman, B. D. Brown, J. W. Pollard, H. Xiong, G. J. Randolph, J. E. Chipuk, P. S. Frenette, and M. Merad. 2012. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 36: 1031-1046.
7. Edelson, B. T., T. R. Bradstreet, W. Kc, K. Hildner, J. W. Herzog, J. Sim, J. H. Russell, T. L. Murphy, E. R. Unanue, and K. M. Murphy. 2011. Batf3-dependent CD11b(low/-) peripheral dendritic cells are GM-CSF-independent and are not required for Th cell priming after subcutaneous immunization. *PLoS one* 6: e25660.
8. Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* 206: 3115-3130.
9. Kashiwada, M., N. L. Pham, L. L. Pewe, J. T. Harty, and P. B. Rothman. 2011. NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8alpha(+) dendritic cell development. *Blood* 117: 6193-6197.
10. Ahrens, S., S. Zelenay, D. Sancho, P. Hanc, S. Kjaer, C. Feest, G. Fletcher, C. Durkin, A. Postigo, M. Skehel, F. Batista, B. Thompson, M. Way, C. Reis e Sousa, and O. Schulz. 2012. F-actin is



- an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* 36: 635-645.
11. Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martinez, P. Hernanz-Falcon, I. Rosewell, and C. Reis e Sousa. 2009. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458: 899-903.
  12. Schlitzer, A., N. McGovern, and F. Ginhoux. 2015. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Seminars in cell & developmental biology* 41: 9-22.
  13. Lewis, K. L., M. L. Caton, M. Bogunovic, M. Greter, L. T. Grajkowska, D. Ng, A. Klinakis, I. F. Charo, S. Jung, J. L. Gommerman, Ivanov, II, K. Liu, M. Merad, and B. Reizis. 2011. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* 35: 780-791.
  14. Schlitzer, A., N. McGovern, P. Teo, T. Zelante, K. Atarashi, D. Low, A. W. Ho, P. See, A. Shin, P. S. Wasan, G. Hoeffel, B. Malleret, A. Heiseke, S. Chew, L. Jardine, H. A. Purvis, C. M. Hilkens, J. Tam, M. Poidinger, E. R. Stanley, A. B. Krug, L. Renia, B. Sivasankar, L. G. Ng, M. Collin, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Honda, M. Haniffa, and F. Ginhoux. 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b<sup>+</sup> dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38: 970-983.
  15. Persson, E. K., H. Uronen-Hansson, M. Semmrich, A. Rivollier, K. Hagerbrand, J. Marsal, S. Gudjonsson, U. Hakansson, B. Reizis, K. Kotarsky, and W. W. Agace. 2013. IRF4 transcription-factor-dependent CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 38: 958-969.
  16. Tamoutounour, S., M. Guilliams, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, and S. Henri. 2013. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39: 925-938.
  17. Kasahara, S., and E. A. Clark. 2012. Dendritic cell-associated lectin 2 (DCAL2) defines a distinct CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cell subset. *Journal of leukocyte biology* 91: 437-448.
  18. Bogunovic, M., F. Ginhoux, J. Helft, L. Shang, D. Hashimoto, M. Greter, K. Liu, C. Jakubzick, M. A. Ingersoll, M. Leboeuf, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, S. A. Lira, G. J. Randolph, and M. Merad. 2009. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31: 513-525.
  19. Varol, C., A. Vallon-Eberhard, E. Elinav, T. Aychek, Y. Shapira, H. Luche, H. J. Fehling, W. D. Hardt, G. Shakhar, and S. Jung. 2009. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31: 502-512.
  20. Cisse, B., M. L. Caton, M. Lehner, T. Maeda, S. Scheu, R. Locksley, D. Holmberg, C. Zweier, N. S. den Hollander, S. G. Kant, W. Holter, A. Rauch, Y. Zhuang, and B. Reizis. 2008. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135: 37-48.
  21. Albanesi, C., C. Scarponi, S. Pallotta, R. Daniele, D. Bosisio, S. Madonna, P. Fortugno, S. Gonzalvo-Feo, J. D. Franssen, M. Parmentier, O. De Pita, G. Girolomoni, and S. Sozzani. 2009. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med* 206: 249-258.
  22. Nestle, F. O., C. Conrad, A. Tun-Kyi, B. Homey, M. Gombert, O. Boyman, G. Burg, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2005. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202: 135-143.
  23. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology* 2: 1144-1150.

24. Nakano, H., M. Yanagita, and M. D. Gunn. 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194: 1171-1178.
25. Lauterbach, H., B. Bathke, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, C. A. Luber, G. Fejer, M. A. Freudenberg, G. M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, L. Wu, K. Shortman, P. Chaplin, M. Suter, M. O'Keeffe, and H. Hochrein. 2010. Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J Exp Med* 207: 2703-2717.
26. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin. 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 26: 519-531.
27. Plantinga, M., M. Guilliams, M. Vanheerswynghe, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38: 322-335.
28. Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19: 59-70.
29. Nakano, H., K. L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D. N. Cook, T. Kakiuchi, and M. D. Gunn. 2009. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nature immunology* 10: 394-402.
30. Hohl, T. M., A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack, and E. G. Pamer. 2009. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell host & microbe* 6: 470-481.
31. Mochizuki, K., F. Xie, S. He, Q. Tong, Y. Liu, I. Mochizuki, Y. Guo, K. Kato, H. Yagita, S. Mineishi, and Y. Zhang. 2013. Delta-like ligand 4 identifies a previously uncharacterized population of inflammatory dendritic cells that plays important roles in eliciting allogeneic T cell responses in mice. *Journal of immunology* 190: 3772-3782.
32. Cheong, C., I. Matos, J. H. Choi, D. B. Dandamudi, E. Shrestha, M. P. Longhi, K. L. Jeffrey, R. M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C. G. Park, and R. M. Steinman. 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143: 416-429.
33. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* 8: 935-947.
34. Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S. H. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S. J. Conway, E. R. Stanley, J. K. Chan, L. G. Ng, I. M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209: 1167-1181.
35. Ginhoux, F., and M. Merad. 2010. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and cell biology* 88: 387-392.
36. Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster, and E. G. Engleman. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature immunology* 3: 1135-1141.
37. Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubreau, X. M. Dai, E. R. Stanley, G. J. Randolph, and M. Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology* 7: 265-273.
38. Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr, and M. C. Udey. 1996. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming

- growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184: 2417-2422.
39. Sere, K., J. H. Baek, J. Ober-Blobaum, G. Muller-Newen, F. Tacke, Y. Yokota, M. Zenke, and T. Hieronymus. 2012. Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation. *Immunity* 37: 905-916.
  40. Fainaru, O., E. Woolf, J. Lotem, M. Yarmus, O. Brenner, D. Goldenberg, V. Negreanu, Y. Bernstein, D. Levanon, S. Jung, and Y. Groner. 2004. Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *The EMBO journal* 23: 969-979.
  41. Traver, D., K. Akashi, M. Manz, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman, and I. L. Weissman. 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290: 2152-2154.
  42. Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, and K. Akashi. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97: 3333-3341.
  43. Wu, L., A. D'Amico, H. Hochrein, M. O'Keeffe, K. Shortman, and K. Lucas. 2001. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98: 3376-3382.
  44. Shigematsu, H., B. Reizis, H. Iwasaki, S. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi, and K. Akashi. 2004. Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21: 43-53.
  45. Manz, M. G., D. Traver, K. Akashi, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman, and I. L. Weissman. 2001. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938: 167-173; discussion 173-164.
  46. Liu, K., and M. C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234: 45-54.
  47. Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311: 83-87.
  48. Sathe, P., D. Metcalf, D. Vremec, S. H. Naik, W. Y. Langdon, N. D. Huntington, L. Wu, and K. Shortman. 2014. Lymphoid tissue and plasmacytoid dendritic cells and macrophages do not share a common macrophage-dendritic cell-restricted progenitor. *Immunity* 41: 104-115.
  49. Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe, and K. Shortman. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nature immunology* 7: 663-671.
  50. Onai, N., K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amaike, N. Toyama-Sorimachi, K. Matsushima, K. Inaba, and T. Ohteki. 2013. A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity* 38: 943-957.
  51. Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, and M. G. Manz. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nature immunology* 8: 1207-1216.
  52. Schraml, B. U., J. van Blijswijk, S. Zelenay, P. G. Whitney, A. Filby, S. E. Acton, N. C. Rogers, N. Moncaut, J. J. Carvajal, and C. Reis e Sousa. 2013. Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell* 154: 843-858.
  53. Schlitzer, A., V. Sivakamasundari, J. Chen, H. R. Sumatoh, J. Schreuder, J. Lum, B. Malleret, S. Zhang, A. Larbi, F. Zolezzi, L. Renia, M. Poidinger, S. Naik, E. W. Newell, P. Robson, and F. Ginhoux. 2015. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nature immunology* 16: 718-728.

54. Sathe, P., and L. Wu. 2011. The network of cytokines, receptors and transcription factors governing the development of dendritic cell subsets. *Protein Cell* 2: 620-630.
55. van de Laar, L., P. J. Coffey, and A. M. Woltman. 2012. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119: 3383-3393.
56. Moore, A. J., and M. K. Anderson. 2013. Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story. *Adv Hematol* 2013: 949513.
57. Schmid, M. A., D. Kingston, S. Boddupalli, and M. G. Manz. 2010. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev* 234: 32-44.
58. Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I. L. Weissman, and M. G. Manz. 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198: 305-313.
59. Adolfsson, J., O. J. Borge, D. Bryder, K. Theilgaard-Monch, I. Astrand-Grundstrom, E. Sitnicka, Y. Sasaki, and S. E. Jacobsen. 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15: 659-669.
60. Naik, S. H., P. Sathe, H. Y. Park, D. Metcalf, A. I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J. Y. Kwak, L. Wu, and K. Shortman. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature immunology* 8: 1217-1226.
61. Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, and M. Nussenzweig. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nature immunology* 9: 676-683.
62. McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95: 3489-3497.
63. Kingston, D., M. A. Schmid, N. Onai, A. Obata-Onai, D. Baumjohann, and M. G. Manz. 2009. The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* 114: 835-843.
64. Tussiwand, R., N. Onai, L. Mazzucchelli, and M. G. Manz. 2005. Inhibition of natural type I IFN-producing and dendritic cell development by a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor with Flt3 affinity. *Journal of immunology* 175: 3674-3680.
65. Birnberg, T., L. Bar-On, A. Sapozhnikov, M. L. Caton, L. Cervantes-Barragan, D. Makia, R. Krauthgamer, O. Brenner, B. Ludewig, D. Brockschneider, D. Riethmacher, B. Reizis, and S. Jung. 2008. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29: 986-997.
66. Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, and H. J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184: 1953-1962.
67. Manfra, D. J., S. C. Chen, K. K. Jensen, J. S. Fine, M. T. Wiekowski, and S. A. Lira. 2003. Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice. *Journal of immunology* 170: 2843-2852.
68. Fong, L., Y. Hou, A. Rivas, C. Benike, A. Yuen, G. A. Fisher, M. M. Davis, and E. G. Engleman. 2001. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor

- immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8809-8814.
69. Pixley, F. J., and E. R. Stanley. 2004. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology* 14: 628-638.
  70. Witmer-Pack, M. D., D. A. Hughes, G. Schuler, L. Lawson, A. McWilliam, K. Inaba, R. M. Steinman, and S. Gordon. 1993. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *Journal of cell science* 104 ( Pt 4): 1021-1029.
  71. Lin, H., E. Lee, K. Hestir, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Behrens, D. Hollenbaugh, T. Linnemann, M. Qin, J. Wong, K. Chu, S. K. Doberstein, and L. T. Williams. 2008. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320: 807-811.
  72. Wang, Y., K. J. Szretter, W. Vermi, S. Gilfillan, C. Rossini, M. Cella, A. D. Barrow, M. S. Diamond, and M. Colonna. 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology* 13: 753-760.
  73. Greter, M., I. Lelios, P. Pelczar, G. Hoeffel, J. Price, M. Leboeuf, T. M. Kundig, K. Frei, F. Ginhoux, M. Merad, and B. Becher. 2012. Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* 37: 1050-1060.
  74. Burgess, A. W., J. Camakaris, and D. Metcalf. 1977. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *The Journal of biological chemistry* 252: 1998-2003.
  75. Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 184: 695-706.
  76. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179: 1109-1118.
  77. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-1702.
  78. Banchereau, J., and A. K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature reviews. Immunology* 5: 296-306.
  79. King, I. L., M. A. Kroenke, and B. M. Segal. 2010. GM-CSF-dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J Exp Med* 207: 953-961.
  80. Zhan, Y., E. M. Carrington, A. van Nieuwenhuijze, S. Bedoui, S. Seah, Y. Xu, N. Wang, J. D. Mintern, J. A. Villadangos, I. P. Wicks, and A. M. Lew. 2011. GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8(+) spleen dendritic cells. *European journal of immunology* 41: 2585-2595.
  81. Sathe, P., J. Pooley, D. Vremec, J. Mintern, J. O. Jin, L. Wu, J. Y. Kwak, J. A. Villadangos, and K. Shortman. 2011. The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *Journal of immunology* 186: 5184-5192.
  82. Wu, Q., Y. Wang, J. Wang, E. O. Hedgeman, J. L. Browning, and Y. X. Fu. 1999. The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J Exp Med* 190: 629-638.

83. Kabashima, K., T. A. Banks, K. M. Ansel, T. T. Lu, C. F. Ware, and J. G. Cyster. 2005. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22: 439-450.
84. Wang, Y. G., K. D. Kim, J. Wang, P. Yu, and Y. X. Fu. 2005. Stimulating lymphotoxin beta receptor on the dendritic cells is critical for their homeostasis and expansion. *Journal of immunology* 175: 6997-7002.
85. Wu, L., A. D'Amico, K. D. Winkel, M. Suter, D. Lo, and K. Shortman. 1998. RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 9: 839-847.
86. Geissmann, F., C. Prost, J. P. Monnet, M. Dy, N. Brousse, and O. Hermine. 1998. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 187: 961-966.
87. Strobl, H., C. Bello-Fernandez, E. Riedl, W. F. Pickl, O. Majdic, S. D. Lyman, and W. Knapp. 1997. flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90: 1425-1434.
88. Kaplan, D. H., M. O. Li, M. C. Jenison, W. D. Shlomchik, R. A. Flavell, and M. J. Shlomchik. 2007. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204: 2545-2552.
89. Bobr, A., B. Z. Igyarto, K. M. Haley, M. O. Li, R. A. Flavell, and D. H. Kaplan. 2012. Autocrine/paracrine TGF-beta1 inhibits Langerhans cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 10492-10497.
90. Kel, J. M., M. J. Girard-Madoux, B. Reizis, and B. E. Clausen. 2010. TGF-beta is required to maintain the pool of immature Langerhans cells in the epidermis. *Journal of immunology* 185: 3248-3255.
91. Ramalingam, R., C. B. Larmonier, R. D. Thurston, M. T. Midura-Kiela, S. G. Zheng, F. K. Ghishan, and P. R. Kiela. 2012. Dendritic cell-specific disruption of TGF-beta receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity. *Journal of immunology* 189: 3878-3893.
92. Lievens, D., K. L. Habets, A. K. Robertson, Y. Laouar, H. Winkels, T. Rademakers, L. Beckers, E. Wijnands, L. Boon, M. Mosaheb, H. Ait-Oufella, Z. Mallat, R. A. Flavell, M. Rudling, C. J. Binder, N. Gerdes, E. A. Biessen, C. Weber, M. J. Daemen, J. Kuiper, and E. Lutgens. 2013. Abrogated transforming growth factor beta receptor II (TGFbetaRII) signalling in dendritic cells promotes immune reactivity of T cells resulting in enhanced atherosclerosis. *European heart journal* 34: 3717-3727.
93. Laouar, Y., T. Town, D. Jeng, E. Tran, Y. Wan, V. K. Kuchroo, and R. A. Flavell. 2008. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 10865-10870.
94. Kanchanawong, P., G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman. 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 468: 580-584.
95. Murphy, D. A., and S. A. Courtneidge. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 413-426.
96. Gawden-Bone, C., Z. Zhou, E. King, A. Prescott, C. Watts, and J. Lucocq. 2010. Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14. *Journal of cell science* 123: 1427-1437.

97. van den Dries, K., S. F. van Helden, J. te Riet, R. Diez-Ahedo, C. Manzo, M. M. Oud, F. N. van Leeuwen, R. Brock, M. F. Garcia-Parajo, A. Cambi, and C. G. Figdor. 2012. Geometry sensing by dendritic cells dictates spatial organization and PGE(2)-induced dissolution of podosomes. *Cell Mol Life Sci* 69: 1889-1901.
98. Lutz, M. B., and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23: 445-449.
99. Villadangos, J. A., and W. R. Heath. 2005. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol* 17: 262-272.
100. Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen. 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185: 541-550.
101. Hubert, F. X., S. A. Kinkel, G. M. Davey, B. Phipson, S. N. Mueller, A. Liston, A. I. Proietto, P. Z. Cannon, S. Forehan, G. K. Smyth, L. Wu, C. C. Goodnow, F. R. Carbone, H. S. Scott, and W. R. Heath. 2011. Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* 118: 2462-2472.
102. Klein, L., M. Hinterberger, J. von Rohrscheidt, and M. Aichinger. 2011. Autonomous versus dendritic cell-dependent contributions of medullary thymic epithelial cells to central tolerance. *Trends Immunol* 32: 188-193.
103. Aichinger, M., C. Wu, J. Nedjic, and L. Klein. 2013. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J Exp Med* 210: 287-300.
104. Lei, Y., A. M. Ripen, N. Ishimaru, I. Ohigashi, T. Nagasawa, L. T. Jeker, M. R. Bosl, G. A. Hollander, Y. Hayashi, W. Malefyt Rde, T. Nitta, and Y. Takahama. 2011. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 208: 383-394.
105. Peterson, P., T. Org, and A. Rebane. 2008. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nature reviews. Immunology* 8: 948-957.
106. Proietto, A. I., S. van Dommelen, and L. Wu. 2009. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunology and cell biology* 87: 39-45.
107. Shakhar, G., R. L. Lindquist, D. Skokos, D. Dudziak, J. H. Huang, M. C. Nussenzweig, and M. L. Dustin. 2005. Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nature immunology* 6: 707-714.
108. Stoll, S., J. Delon, T. M. Brotz, and R. N. Germain. 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296: 1873-1876.
109. Scheinecker, C., R. McHugh, E. M. Shevach, and R. N. Germain. 2002. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196: 1079-1090.
110. Steinman, R. M., and M. C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 351-358.
111. Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* 21: 685-711.
112. Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias, and M. van den Broek. 2003. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* 18: 713-720.

113. Probst, H. C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology* 6: 280-286.
114. Schildknecht, A., S. Brauer, C. Brenner, K. Lahl, H. Schild, T. Sparwasser, H. C. Probst, and M. van den Broek. 2010. FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8<sup>+</sup> T-cell tolerance induced by steady-state dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 199-203.
115. Miller, J. C., B. D. Brown, T. Shay, E. L. Gautier, V. Jovic, A. Cohain, G. Pandey, M. Leboeuf, K. G. Elpek, J. Helft, D. Hashimoto, A. Chow, J. Price, M. Greter, M. Bogunovic, A. Bellemare-Pelletier, P. S. Frenette, G. J. Randolph, S. J. Turley, M. Merad, and C. Immunological Genome. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature immunology* 13: 888-899.
116. Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2003. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha<sup>+</sup> DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *European journal of immunology* 33: 827-833.
117. Davey, G. M., M. Wojtasiak, A. I. Proietto, F. R. Carbone, W. R. Heath, and S. Bedoui. 2010. Cutting edge: priming of CD8 T cell immunity to herpes simplex virus type 1 requires cognate TLR3 expression in vivo. *Journal of immunology* 184: 2243-2246.
118. Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626-1629.
119. Ren, Y., R. L. Silverstein, J. Allen, and J. Savill. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 181: 1857-1862.
120. Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumppheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315: 107-111.
121. Cheong, C., J. Idoyaga, Y. Do, M. Pack, S. H. Park, H. Lee, Y. S. Kang, J. H. Choi, J. Y. Kim, A. Bonito, K. Inaba, S. Yamazaki, R. M. Steinman, and C. G. Park. 2007. Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domain of mouse langerin/CD207. *Journal of immunological methods* 324: 48-62.
122. Flacher, V., P. Douillard, S. Ait-Yahia, P. Stoitzner, V. Clair-Moninot, N. Romani, and S. Saeland. 2008. Expression of langerin/CD207 reveals dendritic cell heterogeneity between inbred mouse strains. *Immunology* 123: 339-347.
123. Sancho, D., D. Mourao-Sa, O. P. Joffre, O. Schulz, N. C. Rogers, D. J. Pennington, J. R. Carlyle, and C. Reis e Sousa. 2008. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *The Journal of clinical investigation* 118: 2098-2110.
124. Poulin, L. F., Y. Reyal, H. Uronen-Hansson, B. U. Schraml, D. Sancho, K. M. Murphy, U. K. Hakansson, L. F. Moita, W. W. Agace, D. Bonnet, and C. Reis e Sousa. 2012. DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* 119: 6052-6062.
125. Lukens, M. V., D. Kruijzen, F. E. Coenjaerts, J. L. Kimpen, and G. M. van Bleek. 2009. Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node. *Journal of virology* 83: 7235-7243.
126. Bedoui, S., P. G. Whitney, J. Waithman, L. Eidsmo, L. Wakim, I. Caminschi, R. S. Allan, M. Wojtasiak, K. Shortman, F. R. Carbone, A. G. Brooks, and W. R. Heath. 2009. Cross-



- presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature immunology* 10: 488-495.
127. Lundie, R. J., T. F. de Koning-Ward, G. M. Davey, C. Q. Nie, D. S. Hansen, L. S. Lau, J. D. Mintern, G. T. Belz, L. Schofield, F. R. Carbone, J. A. Villadangos, B. S. Crabb, and W. R. Heath. 2008. Blood-stage Plasmodium infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14509-14514.
  128. Belz, G. T., S. Bedoui, F. Kupresanin, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2007. Minimal activation of memory CD8+ T cell by tissue-derived dendritic cells favors the stimulation of naive CD8+ T cells. *Nature immunology* 8: 1060-1066.
  129. Belz, G. T., K. Shortman, M. J. Bevan, and W. R. Heath. 2005. CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *Journal of immunology* 175: 196-200.
  130. Belz, G. T., C. M. Smith, L. Kleinert, P. Reading, A. Brooks, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2004. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8670-8675.
  131. Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322: 1097-1100.
  132. den Haan, J. M., S. M. Lehar, and M. J. Bevan. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192: 1685-1696.
  133. Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R. M. Steinman, and K. Inaba. 2002. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195: 1289-1302.
  134. Henri, S., L. F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guilliams, B. de Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2010. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207: 189-206.
  135. GeurtsvanKessel, C. H., M. A. Willart, L. S. van Rijt, F. Muskens, M. Kool, C. Baas, K. Thielemans, C. Bennett, B. E. Clausen, H. C. Hoogsteden, A. D. Osterhaus, G. F. Rimmelzwaan, and B. N. Lambrecht. 2008. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 205: 1621-1634.
  136. Brewig, N., A. Kissenpfennig, B. Malissen, A. Veit, T. Bickert, B. Fleischer, S. Mostbock, and U. Ritter. 2009. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *Journal of immunology* 182: 774-783.
  137. Helft, J., B. Manicassamy, P. Guermonprez, D. Hashimoto, A. Silvin, J. Agudo, B. D. Brown, M. Schmolke, J. C. Miller, M. Leboeuf, K. M. Murphy, A. Garcia-Sastre, and M. Merad. 2012. Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection. *The Journal of clinical investigation* 122: 4037-4047.
  138. Mashayekhi, M., M. M. Sandau, I. R. Dunay, E. M. Frickel, A. Khan, R. S. Goldszmid, A. Sher, H. L. Ploegh, T. L. Murphy, L. D. Sibley, and K. M. Murphy. 2011. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35: 249-259.

139. Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli, and D. F. Tough. 2001. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *Journal of immunology* 167: 1179-1187.
140. Pulendran, B. 2004. Immune activation: death, danger and dendritic cells. *Current biology : CB* 14: R30-32.
141. Dorner, B. G., M. B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Guttler, A. Hutloff, H. W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, R. S. Jack, V. Henn, and R. A. Kroczeck. 2009. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* 31: 823-833.
142. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2009. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature immunology* 10: 1237-1244.
143. Delamarre, L., M. Pack, H. Chang, I. Mellman, and E. S. Trombetta. 2005. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307: 1630-1634.
144. Lennon-Dumenil, A. M., A. H. Bakker, R. Maehr, E. Fiebiger, H. S. Overkleeft, M. Roseblatt, H. L. Ploegh, and C. Lagaudriere-Gesbert. 2002. Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med* 196: 529-540.
145. Kovacsovics-Bankowski, M., and K. L. Rock. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267: 243-246.
146. Savina, A., A. Peres, I. Cebrian, N. Carmo, C. Moita, N. Hacohen, L. F. Moita, and S. Amigorena. 2009. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* 30: 544-555.
147. Igyarto, B. Z., K. Haley, D. Ortner, A. Bobr, M. Gerami-Nejad, B. T. Edelson, S. M. Zurawski, B. Malissen, G. Zurawski, J. Berman, and D. H. Kaplan. 2011. Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* 35: 260-272.
148. Lubber, C. A., J. Cox, H. Lauterbach, B. Fancke, M. Selbach, J. Tschopp, S. Akira, M. Wiegand, H. Hochrein, M. O'Keeffe, and M. Mann. 2010. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* 32: 279-289.
149. Beaty, S. R., C. E. Rose, Jr., and S. S. Sung. 2007. Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *Journal of immunology* 178: 1882-1895.
150. den Haan, J. M., and M. J. Bevan. 2002. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 196: 817-827.
151. Kim, T. S., and T. J. Braciale. 2009. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS one* 4: e4204.
152. Ballesteros-Tato, A., B. Leon, F. E. Lund, and T. D. Randall. 2010. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nature immunology* 11: 216-224.
153. Kastenmuller, K., U. Wille-Reece, R. W. Lindsay, L. R. Trager, P. A. Darrah, B. J. Flynn, M. R. Becker, M. C. Udey, B. E. Clausen, B. Z. Igyarto, D. H. Kaplan, W. Kastenmuller, R. N. Germain, and R. A. Seder. 2011. Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets. *The Journal of clinical investigation* 121: 1782-1796.

154. Idoyaga, J., C. Cheong, K. Suda, N. Suda, J. Y. Kim, H. Lee, C. G. Park, and R. M. Steinman. 2008. Cutting edge: langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II products in vivo. *Journal of immunology* 180: 3647-3650.
155. McLachlan, J. B., D. M. Catron, J. J. Moon, and M. K. Jenkins. 2009. Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin. *Immunity* 30: 277-288.
156. Massague, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* 67: 753-791.
157. Harrison, C. A., S. L. Al-Musawi, and K. L. Walton. 2011. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands. *Growth factors* 29: 174-186.
158. Weiss, A., and L. Attisano. 2013. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 2: 47-63.
159. Chang, H., C. W. Brown, and M. M. Matzuk. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocrine reviews* 23: 787-823.
160. Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura, and J. Massague. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370: 341-347.
161. Souchelnytskyi, S., P. ten Dijke, K. Miyazono, and C. H. Heldin. 1996. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *The EMBO journal* 15: 6231-6240.
162. Wieser, R., J. L. Wrana, and J. Massague. 1995. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *The EMBO journal* 14: 2199-2208.
163. Seeger, P., T. Musso, and S. Sozzani. 2015. The TGF-beta superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine & growth factor reviews*.
164. Gougos, A., and M. Letarte. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 265: 8361-8364.
165. Lastres, P., A. Letamendia, H. Zhang, C. Rius, N. Almendro, U. Raab, L. A. Lopez, C. Langa, A. Fabra, M. Letarte, and C. Bernabeu. 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *The Journal of cell biology* 133: 1109-1121.
166. Cheifetz, S., and J. Massague. 1991. Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *The Journal of biological chemistry* 266: 20767-20772.
167. Segarini, P. R., D. M. Rosen, and S. M. Seyedin. 1989. Binding of transforming growth factor-beta to cell surface proteins varies with cell type. *Molecular endocrinology* 3: 261-272.
168. Lewis, K. A., P. C. Gray, A. L. Blount, L. A. MacConell, E. Wiater, L. M. Bilezikjian, and W. Vale. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404: 411-414.
169. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes & development* 19: 2783-2810.
170. Kang, J. S., C. Liu, and R. Derynck. 2009. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends in cell biology* 19: 385-394.
171. Souchelnytskyi, S., T. Nakayama, A. Nakao, A. Moren, C. H. Heldin, J. L. Christian, and P. ten Dijke. 1998. Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *The Journal of biological chemistry* 273: 25364-25370.
172. Ishisaki, A., K. Yamato, S. Hashimoto, A. Nakao, K. Tamaki, K. Nonaka, P. ten Dijke, H. Sugino, and T. Nishihara. 1999. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic

- protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *The Journal of biological chemistry* 274: 13637-13642.
173. Ishisaki, A., K. Yamato, A. Nakao, K. Nonaka, M. Ohguchi, P. ten Dijke, and T. Nishihara. 1998. Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *The Journal of biological chemistry* 273: 24293-24296.
  174. Jung, B., J. J. Staudacher, and D. Beauchamp. 2017. Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 152: 36-52.
  175. McCullagh, D. R. 1932. Dual Endocrine Activity of the Testes. *Science* 76: 19-20.
  176. Cook, R. W., T. B. Thompson, T. S. Jardetzky, and T. K. Woodruff. 2004. Molecular biology of inhibin action. *Semin Reprod Med* 22: 269-276.
  177. Phillips, D. J., K. L. Jones, I. J. Clarke, J. P. Scheerlinck, and D. M. de Kretser. 2005. Activin A: from sometime reproductive factor to genuine cytokine. *Vet Immunol Immunopathol* 108: 23-27.
  178. Stenvers, K. L., and J. K. Findlay. 2010. Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrinol Metab* 21: 174-180.
  179. Namwanje, M., and C. W. Brown. 2016. Activins and Inhibins: Roles in Development, Physiology, and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8.
  180. Gray, A. M., and A. J. Mason. 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247: 1328-1330.
  181. Walton, K. L., Y. Makanji, M. C. Wilce, K. L. Chan, D. M. Robertson, and C. A. Harrison. 2009. A common biosynthetic pathway governs the dimerization and secretion of inhibin and related transforming growth factor beta (TGFbeta) ligands. *The Journal of biological chemistry* 284: 9311-9320.
  182. Mason, A. J., P. G. Farnworth, and J. Sullivan. 1996. Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Molecular endocrinology* 10: 1055-1065.
  183. Antenos, M., M. Stemler, I. Boime, and T. K. Woodruff. 2007. N-linked oligosaccharides direct the differential assembly and secretion of inhibin alpha- and betaA-subunit dimers. *Molecular endocrinology* 21: 1670-1684.
  184. Makanji, Y., C. A. Harrison, P. G. Stanton, R. Krishna, and D. M. Robertson. 2007. Inhibin A and B in vitro bioactivities are modified by their degree of glycosylation and their affinities to betaglycan. *Endocrinology* 148: 2309-2316.
  185. Antenos, M., J. Zhu, N. M. Jetly, and T. K. Woodruff. 2008. An activin/furin regulatory loop modulates the processing and secretion of inhibin alpha- and betaB-subunit dimers in pituitary gonadotrope cells. *The Journal of biological chemistry* 283: 33059-33068.
  186. Antenos, M., L. Lei, M. Xu, A. Malipatil, S. Kiesewetter, and T. K. Woodruff. 2011. Role of PCSK5 expression in mouse ovarian follicle development: identification of the inhibin alpha- and beta-subunits as candidate substrates. *PLoS one* 6: e17348.
  187. Licona-Limon, P., and G. Soldevila. 2007. The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights. *Immunology letters* 109: 1-12.
  188. Draper, L. B., M. M. Matzuk, V. J. Roberts, E. Cox, J. Weiss, J. P. Mather, and T. K. Woodruff. 1998. Identification of an inhibin receptor in gonadal tumors from inhibin alpha-subunit knockout mice. *The Journal of biological chemistry* 273: 398-403.
  189. Krummen, L. A., A. Moore, T. K. Woodruff, R. Covello, R. Taylor, P. Working, and J. P. Mather. 1994. Localization of inhibin and activin binding sites in the testis during development by in situ ligand binding. *Biology of reproduction* 50: 734-744.
  190. Woodruff, T. K. 1999. Hope, hypothesis, and the inhibin receptor. Does specific inhibin binding suggest there is a specific inhibin receptor? *Endocrinology* 140: 3-5.

191. Bernard, D. J., S. C. Chapman, and T. K. Woodruff. 2002. Inhibin binding protein (InhBP/p120), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor. *Molecular endocrinology* 16: 207-212.
192. Lebrun, J. J., and W. W. Vale. 1997. Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. *Molecular and cellular biology* 17: 1682-1691.
193. Bilezikjian, L. M., A. L. Blount, C. A. Campen, C. Gonzalez-Manchon, and W. Vale. 1991. Activin-A inhibits proopiomelanocortin messenger RNA accumulation and adrenocorticotropin secretion of AtT20 cells. *Molecular endocrinology* 5: 1389-1395.
194. Gray, P. C., L. M. Bilezikjian, and W. Vale. 2002. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. *Molecular and cellular endocrinology* 188: 254-260.
195. Drummond, A. E., M. T. Le, J. F. Ethier, M. Dyson, and J. K. Findlay. 2002. Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology* 143: 1423-1433.
196. Carroll, R. S., A. Z. Corrigan, S. D. Gharib, W. Vale, and W. W. Chin. 1989. Inhibin, activin, and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. *Molecular endocrinology* 3: 1969-1976.
197. Bilandzic, M., and K. L. Stenvers. 2011. Betaglycan: a multifunctional accessory. *Molecular and cellular endocrinology* 339: 180-189.
198. Aleman-Muench, G. R., and G. Soldevila. 2011. When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity. *Immunology and cell biology*.
199. Licona, P. 2008. Participación de las activinas en el desarrollo del linfocito T. In *Inmunología*. UNAM, Mexico.
200. Felker, P., K. Sere, Q. Lin, C. Becker, M. Hristov, T. Hieronymus, and M. Zenke. 2010. TGF-beta1 accelerates dendritic cell differentiation from common dendritic cell progenitors and directs subset specification toward conventional dendritic cells. *Journal of immunology* 185: 5326-5335.
201. Sere, K., P. Felker, T. Hieronymus, and M. Zenke. 2013. TGFbeta1 microenvironment determines dendritic cell development. *Oncoimmunology* 2: e23083.
202. Strobl, H., E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, W. F. Pickl, K. Rappersberger, O. Majdic, and W. Knapp. 1996. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *Journal of immunology* 157: 1499-1507.
203. Li, A. G., S. L. Lu, G. Han, K. E. Hoot, and X. J. Wang. 2006. Role of TGFbeta in skin inflammation and carcinogenesis. *Molecular carcinogenesis* 45: 389-396.
204. Schuster, C., C. Vaculik, C. Fiala, S. Meindl, O. Brandt, M. Imhof, G. Stingl, W. Eppel, and A. Elbe-Burger. 2009. HLA-DR+ leukocytes acquire CD1 antigens in embryonic and fetal human skin and contain functional antigen-presenting cells. *J Exp Med* 206: 169-181.
205. Yasmin, N., T. Bauer, M. Modak, K. Wagner, C. Schuster, R. Koffel, M. Seyerl, J. Stockl, A. Elbe-Burger, D. Graf, and H. Strobl. 2013. Identification of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) as an instructive factor for human epidermal Langerhans cell differentiation. *J Exp Med* 210: 2597-2610.
206. Musso, T., S. Scutera, W. Vermi, R. Daniele, M. Fornaro, C. Castagnoli, D. Alotto, M. Ravanini, I. Cambieri, L. Salogni, A. R. Elia, M. Giovarelli, F. Facchetti, G. Girolomoni, and S. Sozzani. 2008. Activin A induces Langerhans cell differentiation in vitro and in human skin explants. *PloS one* 3: e3271.
207. Antsiferova, M., M. Huber, M. Meyer, A. Piwko-Czuchra, T. Ramadan, A. S. MacLeod, W. L. Havran, R. Dummer, D. Hohl, and S. Werner. 2011. Activin enhances skin tumourigenesis

- and malignant progression by inducing a pro-tumourigenic immune cell response. *Nature communications* 2: 576.
208. Stoitzner, P., H. Stossel, M. Wankell, S. Hofer, C. Heufler, S. Werner, and N. Romani. 2005. Langerhans cells are strongly reduced in the skin of transgenic mice overexpressing follistatin in the epidermis. *Eur J Cell Biol* 84: 733-741.
  209. Robson, N. C., D. J. Phillips, T. McAlpine, A. Shin, S. Svobodova, T. Toy, V. Pillay, N. Kirkpatrick, D. Zanker, K. Wilson, I. Helling, H. Wei, W. Chen, J. Cebon, and E. Maraskovsky. 2008. Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 111: 2733-2743.
  210. Martinez, V. G., C. Hernandez-Lopez, J. Valencia, L. Hidalgo, A. Entrena, A. G. Zapata, A. Vicente, R. Sacedon, and A. Varas. 2011. The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunology and cell biology* 89: 610-618.
  211. Ohtani, T., M. Mizuashi, S. Nakagawa, Y. Sasaki, T. Fujimura, R. Okuyama, and S. Aiba. 2009. TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology* 126: 485-499.
  212. Geissmann, F., P. Revy, A. Regnault, Y. Lepelletier, M. Dy, N. Brousse, S. Amigorena, O. Hermine, and A. Durandy. 1999. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *Journal of immunology* 162: 4567-4575.
  213. Brown, R. D., B. Pope, A. Murray, W. Esdale, D. M. Sze, J. Gibson, P. J. Ho, D. Hart, and D. Joshua. 2001. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 98: 2992-2998.
  214. Seeger, P., D. Bosisio, S. Parolini, R. Badolato, A. Gismondi, A. Santoni, and S. Sozzani. 2014. Activin A as a mediator of NK-dendritic cell functional interactions. *Journal of immunology* 192: 1241-1248.
  215. Zhou, Z., W. Li, Y. Song, L. Wang, K. Zhang, J. Yang, W. Zhang, H. Su, and Y. Zhang. 2013. Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response. *PLoS one* 8: e78618.
  216. Unsicker, K., B. Spittau, and K. Kriegelstein. 2013. The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine & growth factor reviews* 24: 373-384.
  217. Segerer, S. E., N. Muller, J. Brandt, M. Kapp, J. Dietl, H. M. Reichardt, L. Rieger, and U. Kammerer. 2008. The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 17.
  218. Phillips, D. J., and T. K. Woodruff. 2004. Inhibin: actions and signalling. *Growth factors* 22: 13-18.
  219. Licona-Limon, P., G. Aleman-Muench, J. Chimal-Monroy, M. Macias-Silva, E. A. Garcia-Zepeda, M. M. Matzuk, T. I. Fortoul, and G. Soldevila. 2009. Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 229-235.
  220. Licona, P., J. Chimal-Monroy, and G. Soldevila. 2006. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Dev Dyn* 235: 1124-1132.
  221. Carbajal-Franco, E., M. de la Fuente-Granada, G. R. Aleman-Muench, E. A. Garcia-Zepeda, and G. Soldevila. 2015. Inhibins tune the thymocyte selection process by regulating thymic stromal cell differentiation. *J Immunol Res* 2015: 837859.
  222. Matzuk, M. M., M. J. Finegold, J. P. Mather, L. Krummen, H. Lu, and A. Bradley. 1994. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient

- mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8817-8821.
223. Olguín-Alor, R. 2014. Papel de las Inhibinas en la diferenciación y maduración de células dendríticas. In *Inmunología*. Universidad Nacional Autónoma de México. 56.
  224. Matzuk, M. M., M. J. Finegold, J. P. Mather, L. Krummen, H. Lu, and A. Bradley. 1994. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8817-8821.
  225. Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi, and Y. Nishimune. 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319.
  226. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* 223: 77-92.
  227. Rivas-Caicedo, A., G. Soldevila, T. I. Fortoul, A. Castell-Rodriguez, L. Flores-Romo, and E. A. Garcia-Zepeda. 2009. Jak3 is involved in dendritic cell maturation and CCR7-dependent migration. *PLoS one* 4: e7066.
  228. Burns, S., S. J. Hardy, J. Buddle, K. L. Yong, G. E. Jones, and A. J. Thrasher. 2004. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil Cytoskeleton* 57: 118-132.
  229. Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews. Immunology* 6: 476-483.
  230. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone. 2006. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108: 1435-1440.
  231. Dudek, A. M., S. Martin, A. D. Garg, and P. Agostinis. 2013. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol* 4: 438.
  232. Matzuk, M. M., and A. Bradley. 1994. Identification and analysis of tumor suppressor genes using transgenic mouse models. *Semin Cancer Biol* 5: 37-45.
  233. Idoyaga, J., C. Fiorese, L. Zbytnuik, A. Lubkin, J. Miller, B. Malissen, D. Mucida, M. Merad, and R. M. Steinman. 2013. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *The Journal of clinical investigation* 123: 844-854.
  234. Munz, B., H. Smola, F. Engelhardt, K. Bleuel, M. Brauchle, I. Lein, L. W. Evans, D. Huylebroeck, R. Balling, and S. Werner. 1999. Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *The EMBO journal* 18: 5205-5215.
  235. Nusing, R. M., and J. Barsig. 1999. Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. *British journal of pharmacology* 127: 919-926.
  236. Zhang, X. J., Y. Li, G. X. Tai, G. Y. Xu, P. Y. Zhang, Y. Yang, F. X. Lao, and Z. H. Liu. 2005. Effects of activin A on the activities of the mouse peritoneal macrophages. *Cellular & molecular immunology* 2: 63-67.
  237. Zhou, J., G. Tai, H. Liu, J. Ge, Y. Feng, F. Chen, F. Yu, and Z. Liu. 2009. Activin A down-regulates the phagocytosis of lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Cellular immunology* 255: 69-75.
  238. Ambriz-Pena, X., E. A. Garcia-Zepeda, I. Meza, and G. Soldevila. 2014. Jak3 enables chemokine-dependent actin cytoskeleton reorganization by regulating cofilin and Rac/Rhoa GTPases activation. *PLoS one* 9: e88014.

239. Yokosuka, T., M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, and T. Saito. 2012. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 209: 1201-1217.
240. Ramos, R. N., C. J. de Moraes, B. Zelante, and J. A. Barbuto. 2013. What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? *Clinical & developmental immunology* 2013: 806025.
241. Dai, S., R. Jia, X. Zhang, Q. Fang, and L. Huang. 2014. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cellular immunology* 290: 72-79.
242. Makanji, Y., J. Zhu, R. Mishra, C. Holmquist, W. P. Wong, N. B. Schwartz, K. E. Mayo, and T. K. Woodruff. 2014. Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. *Endocrine reviews* 35: 747-794.
243. De Nardo, D. 2015. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74: 181-189.
244. Sanin, D. E., C. T. Prendergast, and A. P. Mountford. 2015. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *Journal of immunology* 195: 1218-1232.
245. Xiao, W., D. R. Hodge, L. Wang, X. Yang, X. Zhang, and W. L. Farrar. 2004. NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. *Cancer biology & therapy* 3: 1007-1017.
246. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* 31: 563-604.
247. Gross, M., T. M. Salame, and S. Jung. 2015. Guardians of the Gut - Murine Intestinal Macrophages and Dendritic Cells. *Front Immunol* 6: 254.
248. Clausen, B. E., and P. Stoitzner. 2015. Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses. *Front Immunol* 6: 534.

## 16. ARTÍCULO DE PUBLICACIÓN

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

RESEARCH ARTICLE

### A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function

Roxana Olguín-Alor<sup>1</sup>, Marisol de la Fuente-Granada<sup>1</sup>, Laura C. Bonifaz<sup>2</sup>, Laura Antonio-Herrera<sup>2</sup>, Eduardo A. García-Zepeda<sup>1</sup>, Gloria Soldevila<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico city, Mexico, <sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunquímica. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico city, Mexico



RESEARCH ARTICLE

# A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function

Roxana Olguín-Alor<sup>1</sup>, Marisol de la Fuente-Granada<sup>1</sup>, Laura C. Bonifaz<sup>2</sup>, Laura Antonio-Herrera<sup>2</sup>, Eduardo A. García-Zepeda<sup>1</sup>, Gloria Soldevila<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico city, Mexico, **2** Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico city, Mexico

\* [soldevi@servidor.unam.mx](mailto:soldevi@servidor.unam.mx)



CrossMark  
click for updates

OPEN ACCESS

**Citation:** Olguín-Alor R, de la Fuente-Granada M, Bonifaz LC, Antonio-Herrera L, García-Zepeda EA, Soldevila G (2016) A Key Role for Inhibins in Dendritic Cell Maturation and Function. PLoS ONE 11(12): e0167813. doi:10.1371/journal.pone.0167813

**Editor:** Susan Kovats, Oklahoma Medical Research Foundation, UNITED STATES

**Received:** June 8, 2016

**Accepted:** November 21, 2016

**Published:** December 9, 2016

**Copyright:** © 2016 Olguín-Alor et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The study was funded by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM, Mexico; <http://dgapa.unam.mx>; Grant # IN209615. ROA was a student in the Ph.D program "Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México". ROA and MFG were recipients of pre-doctoral fellowships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

## Abstract

Inhibins are members of the TGFβ superfamily, which regulate many cellular processes including differentiation, proliferation, survival and apoptosis. Although initially described as hormones regulating the hypothalamus-pituitary-gonadal axis, based on their ability to antagonize Activins, our group has recently reported that they play a role in thymocyte differentiation and survival, as well as in thymic stromal cell maturation and nTreg generation. Here, we used Inhibin knock out mice ( $Inha^{-/-}$ ) to investigate the role of Inhibins in peripheral dendritic cell maturation and function. We first demonstrated that LPS treated  $Inha^{+/+}$  bone marrow derived dendritic cells (BMDC) were capable to produce significant levels of Inhibin A. Interestingly,  $Inha^{-/-}$  BMDC showed reduced MHCII and CD86 upregulation and increased PD-L1 expression in response to LPS compared to  $Inha^{+/+}$ , which correlated with reduced ability to induce proliferation of allogeneic T cells. The <sup>a</sup>semi-mature<sup>o</sup> phenotype displayed by  $Inha^{-/-}$  mBMDC correlated with increased levels of IL-10 and slightly decreased IL-6 production after LPS stimulation. In addition,  $Inha^{-/-}$  mBMDC showed impaired migration towards CCL19 and CCL21, assessed by *in vitro* chemotaxis and *in vivo* competitive homing experiments, despite their normal CCR7 expression. Furthermore, *in vivo* LPS-induced DC maturation was also diminished in  $Inha^{-/-}$  mice, specially within the LC (CD207+ CD11b+ CD103-) subpopulation. Finally, analysis of delayed type hypersensitivity responses in  $Inha^{-/-}$  mice, showed reduced ear swelling as a result of reduced cellular infiltration in the skin, correlating with impaired homing of CD207+ DCs to the draining lymph nodes. In summary, our data demonstrate for the first time that Inhibins play a key role in peripheral DC maturation and function, regulating the balance between immunity and tolerance.

## Introduction

Dendritic cells (DC) are a heterogeneous group of professional antigen presenting cells that are critical in the induction and regulation of immune responses. They originate in the bone marrow principally from myeloid progenitors (MP) that undergo differentiation to

(CONACYT), Mexico; <http://www.conacyt.gob.mx>, ROA # 339203; MFG # 344606. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

Macrophage-DC progenitors (MDP), then to Common DC progenitors (CDP) and finally, become Pre-DC that emigrate and seed peripheral tissues where they complete their differentiation to DC [1]. The main cytokines involved in DC differentiation are FLT3, M-CSF and GM-CSF, however, the Pre-DCs are target of the specific-tissue microenvironment. Under steady state conditions, peripheral DCs retain an immature phenotype (iDC) characterized by the low surface expression of MHCII and costimulatory molecules, and by high capacity to sense antigens. When iDCs capture an antigen in the presence of a pro-inflammatory microenvironment, they enter a maturation process. As a result, DC become mature and capable to activate T cells due to high expression of MHCII and costimulatory molecules and the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 and p70, among others. Otherwise, if the microenvironment lacks pro-inflammatory cytokines or in the presence of an anti-inflammatory milieu, the iDC becomes a tolerogenic DC leading to T cell anergy, T cell deletion and/or induction of regulatory T cells (Tregs) (reviewed in [2±4]). Members of the TGF $\beta$  superfamily, such as Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Activins and bone morphogenetic proteins (BMPs,) have been shown to influence these processes, (reviewed in [5]).

The TGF $\beta$  superfamily comprises soluble mediators that regulate cellular processes including differentiation, proliferation and apoptosis (reviewed in [6]). There is growing evidence on the role of TGF $\beta$ s, Activins and BMPs, as regulators of the immune system (reviewed in [7]), however very scarce information is available about the role of Inhibins. These are glycoprotein hormones that down-regulate follicle-stimulating hormone (FSH) production by the anterior pituitary whereas their counterparts, the Activins, up-regulate FSH production. Structurally, Inhibins are composed by two subunits, an  $\alpha$ - and a  $\beta$ -subunit, linked by a disulfide bridge, while Activins are homodimers of  $\beta$ -subunits (reviewed in [8,9]). The signaling pathway for members of TGF $\beta$  superfamily is shared among TGF $\beta$ , BMPs and Activins, in which the dimeric ligands bind type I and type II receptors with serine/threonine kinase activity, leading to the phosphorylation of cytoplasmic proteins known as receptor SMADs, which then heterodimerize with the common SMAD (co-SMAD) and translocate to the nucleus to regulate gene expression (reviewed in [8]). In contrast, Inhibins bind type II receptors through their  $\beta$ -subunit and, instead of type I receptors, bind betaglycan (BG), a non-signaling type III TGF $\beta$  receptor (T $\beta$ RIII), through their  $\alpha$  subunit, thereby excluding the type I receptor (ALK4) from the ternary receptor complex (reviewed in [8]). Thus, Inhibins were considered as ligands unable to induce signal transduction and through this mechanism they may antagonize Activin functions. However, several data have suggested the possibility that Inhibins may act through an independent receptor, although, an Inhibin-specific binding molecule has not yet been identified (reviewed in [9]).

Although initial findings described the antagonistic role of Inhibins on Activin-mediated functions, there is growing evidence demonstrating that Inhibins can mediate functions on different cell types, independently of Activins (reviewed in [10]). In this context, our group has demonstrated that Inhibins play a role in regulating specific checkpoints during thymocyte differentiation and shown that Inhibins do not always antagonize Activin functions during T cell development [11]. Moreover, we have recently reported that Inhibins play a role in controlling thymic stromal cell differentiation and maturation. In this context, the absence of Inhibins promoted medullary over cortical Thymic Epithelial Cell (TEC) differentiation and reduction of MHCII and CD86 expression on thymic conventional DCs (cDCs). [12].

Although some reports have demonstrated the role of Activins in DC maturation (reviewed in [13]), the specific role of Inhibins in DCs remains elusive. In addition, these ligands may exert different effects depending on the DC subset, maturation stimulus and tissue microenvironment. For this reason, here we investigated the role of Inhibins in DC maturation and function.

## Materials and Methods

### Mice

Wild type ( $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ ) and Inhibin  $\alpha$ -deficient ( $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ ) mice in C57BL/6 background, were generated and kindly gifted by Dr. Martin Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston TX) [14]. Actin-green fluorescent protein (GFP) transgenic mice on the C57BL/6 background were obtained from Dr M. Okawa [15] (Genome Information Research Center, Osaka University, Japan).  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$  knock in mice on the BALB/c background (Cg-Foxp3tm2Tch/J) were purchased from Jackson Laboratories. All mice were bred and maintained in SPF conditions in the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB, UNAM, México) according to ethics guidelines. The study was approved by the "Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)" of the IIB.

### Generation of bone marrow-derived DC

Bone marrow cells were obtained from femurs and tibias of 9-week-old  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  female mice as previously described [16]. The cells were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated FCS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin and immature bone marrow derived DC were differentiated in the presence of 5% supernatant of a GM-CSF producing cell line [17]. For DC maturation, on day 5, iBMDC were stimulated with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  E. coli 0111:B4 LPS (Sigma Aldrich) for 24 hours (mBMDC). On day 6, non-adherent cells (containing 50 $\pm$ 60% of CD11c+ MHCII+ DC) were harvested and used for *in vitro* and *in vivo* experiments.

### Preparation of DCs from peripheral lymphoid organs

Spleen (SP), and periphery lymph nodes (LN) from 3-week-old  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  female mice were chop into small pieces and digested with 5mg/ml of type IV Collagenase (GIBCO) and 25 U/ml DNase (Roche) in RPM 1640 supplemented with 5% heat inactivated FBS for 1 hour at 37°C. Subsequently, the remaining tissue was mechanically disaggregated. Cell suspensions were filtered using a 50  $\mu\text{m}$  mesh and washed with PBS. For the spleen, erythrocytes were lysed with ACK buffer during 2 minutes and washed with PBS. Finally, cells were resuspended in FACS buffer for flow cytometry analysis.

### Preparation of DCs from skin

Ears from 3 week-old  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice were cut off at the base and separated into dorsal and ventral halves. Skin tissue was digested with 0.25mg/ml Liberase TL (Roche) and 0.125mg/ml DNase grade II (Roche) in RPMI 1640 media for 45 minutes at 37°C. Subsequently, the skin was cut into small pieces and incubated for an extra 45 minutes at 37°C. Then, the digestion was stopped with 5  $\mu\text{M}$  of EDTA in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Cells were resuspended in 0.125mg/ml DNase RPMI 1640 10% FBS and incubated 5 minutes on ice. Finally, cells were washed and resuspended in RPMI 1640 10% FBS for flow cytometry analysis.

### Flow cytometry

For phenotypic analysis cells were incubated with primary antibodies for 20 min at 4°C, followed by two washes with FACS Buffer. When necessary, fluorochrome-coupled streptavidin was added, and incubated for 20 min at 4°C and washed. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde.

The BMDC were stained with anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2) and anti-CD80 PerCp/Cy5.5 (16-10A1) from Biolegend (San Diego, CA); anti-CD11c PE (N418), anti-CD11c PE Cy7 (N418) and anti-CD86 APC (GL-1) from Tonbo Biosciences (San Diego, CA); anti-CD40 PE (3/23), anti-CD274 PE (MIH5) and anti-CD273 PE (TY25) from BD Biosciences (San Jose, CA); a-TLR4/MD2 complex PE Cy7 (MTS510) and a-CD197 PerCp/Cy5.5 from eBiosciences (San Diego, CA).

For DC subpopulation staining *ex vivo* and after *in vitro* LPS stimulation, the cells were previously blocked with purified anti-CD16/32 (93), followed by staining with anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 (M5/114.15.2) and anti-CD11c Alexa Fluor 700 (N418) from Biolegend, anti-CD3 PE (145-2C11), anti-TER119 PE (TER-119), anti-CD8 $\alpha$  APC (53 $\pm$ 6.7), anti-CD11b Violet Fluor 450 (M1/70) and anti-CD11c PE Cy7 (N418) from Tonbo Biosciences, anti-CD19 PE (1D3), anti-NK PE (2B4) and Streptavidin APC Cy7 from BD Biosciences; anti-CD103 biotin (2E7), anti-CD207 (eBioRMUL2) from eBiosciences and anti-rat IgG Qdot 605 from Invitrogen (Eugene, OR).

All samples were acquired in an Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies) and were analyzed using FlowJo 10 software (Tree Star Inc.).

## Immunofluorescence and microscopy

BMDC. On day 5 of culture, the CD11c<sup>+</sup> cells were enriched by positive selection using anti-CD11c micro beads from Miltenyi Biotec and placed onto glass coverslips treated with fibronectin from Calbiochem for 24 hours with or without LPS (1 $\mu$ g/ml). The cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton-X100. Then, cells were blocked with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS and stained with anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 and Rhodamine-phalloidin. Coverslips were mounted with fluorescence mounting medium from DAKO (Denmark A/S). Cells were observed with a Zeiss LSM5 confocal microscope equipped with LSM5 PASCAL 2.8 software and image analysis of cell area based on Rhodamine-phalloidin staining was performed with ImageJ 1.46r software. A cell density that precluded the formation of cellular aggregates and allowed an accurate quantification of individual cells was used. Single cell analysis was performed from three independent experiments giving an *n* value of 60 per condition. Data were expressed as percent of cell spreading, normalized to mean value of *Inh* $\alpha^{+/+}$  iBMDC cells (100%).

Epidermal sheets were obtained from ears of 3-week-old *Inh* $\alpha^{+/+}$  and *Inh* $\alpha^{-/-}$  female mice. Ears were cut off at the base and the skin was separated into epidermis and dermis by using 5 mM EDTA incubation for 1 hour at 37°C. The epidermal sheets were rinsed with PBS, fixed in cold acetone, blocked with 1% BSA in PBS and stained with anti-I-A/I-E Alexa Fluor 488 and anti-CD80 Per CP/Cy5.5. Finally, epidermal sheets were mounted with Dako fluorescence mounting medium. Sheets were observed with a Zeiss LSM5 confocal microscope and an Olympus IX71 inverted microscope. Analysis of cell counts and fluorescence intensity was performed with ImageJ 1.16r software. At least three independent experiments were performed giving an *n* value of 60 micrographs using a 40x objective for cell counts. For *in vivo* maturation, single cell analysis was performed from each condition acquiring an average of 15 confocal micrographs using a 100x oil immersion objective and quantifying an average of 75 cells per condition. Data were obtained calculating the ratio between the mean fluorescence intensity (MFI) of stimulated cell divided by the MFI of non-stimulated cells and was expressed as relative increment (RI).

## Chemotaxis assays

Chemotaxis was performed as previously described [18]. Briefly Immature BMDC (iBMDC) and LPS-stimulated BMDC (mBMDC) were fluorescently labelled with calcein-AM from

Molecular Probes (Eugene, OR) and resuspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) 0.5% BSA at  $2 \times 10^6$  cells/ml. Chemotaxis assays were performed using a 48-well Boyden chamber, increasing concentrations ( $0 \pm 1000$  ng/ml) of CCL19 and CCL21 chemokines were placed in the lower wells of the chamber and in the upper wells  $1 \times 10^5$  cells allowed to migrate through fibronectin-coated  $5 \mu\text{m}$  pore polycarbonate membranes from Neuroprobe (Gaithersburg, MD). Chemotaxis index was calculated by dividing the fluorescence of chemokine stimulated cells by the fluorescence of wells with media alone (chemokinesis). After 1.5 hours, trans-migrated cells were quantified using a Typhoon Scanner 9400.

### Calcium mobilization

$2.5 \times 10^6$  cells/ml were resuspended in RPMI-1640 2% of FBS and stained with  $4.59 \mu\text{M}$  Fura-Red and  $2.6 \mu\text{M}$  Fluo-3 (Molecular Probes) for 45 minutes at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. Cells were washed twice in RPMI 2% FBS and incubated for an extra 45 min at room temperature. Then cells were washed and resuspended in 1ml RPMI 0% FBS prior FACS analysis. Cells were acquired for 100s for baseline  $\text{Ca}^{++}$  and then stimulated with pre-warmed CCL19 and CCL21 diluted in RPMI 0% FBS 300s. As positive control for dye loading samples were stimulated with PMA (40ng/ml) and Ionomycin (400ng/ml) The data were analyzed with FCS Express 5 Plus software (De Novo software) and expressed as the median  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence ratio (FL1H/FL3H).

### Erk phosphorylation

Phosphorylation of Erk was detected by flow cytometry after intracellular staining following a slightly modified phospho-flow (BD Biosciences) Briefly,  $10^6$  mBMDC were pre-stained with MHC II and CD11c antibodies and then stimulated with chemokines (300ng/ml CCL19 and CCL21) in RPMI 1640 medium supplemented with 0.2% SFB at  $37^\circ\text{C}$  for 30s, 1min, 3min and 5min. Activation was arrested by fixation with  $150 \mu\text{L}$  of Lyse/Fix buffer for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . To permeabilize, cells were incubated with  $100 \mu\text{L}$  Perm buffer II for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ , then washed and stained with PE-CF594 anti-pErk antibody (Biolegend). All data were analyzed with FlowJo 10 Tree Star software. Relative increment of pErk was calculated as MFI of stimulated cells/MFI of unstimulated cells.

### *In vivo* migration of BMDC

*In vivo* migration assays were performed as previously described [19]. Briefly, LPS-stimulated BMDC from Actin GFP knock in mice ( $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ ) and BMDC from  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice stained with Cell Trace Violet (CTV) (Life Technologies), according to manufacturer's instructions, were mixed 1:1 in sterile PBS. Viability of labeled cells previous to and after the *in vivo* transfer was  $85 \pm 90\%$ . A total of  $2 \times 10^6$  cells in  $50 \mu\text{l}$  were injected in left footpad and, as a control,  $50 \mu\text{l}$  of PBS in right footpad of  $6 \pm 9$  week-old female C57BL/6 mice. After 48 hours, popliteal lymph nodes were extracted and stained with viability dye Aqua Zombie (Invitrogen) and anti-CD11c PE (Tonbo).

### Cytokine quantification

Supernatants from BMDC cultures stimulated with LPS, LPS + Inhibin A or with media alone were collected 3, 6, 12, 18 and 24 hours after stimulation and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. IL-6, IL-10, TNF and CCL2 were quantified with the CBA kit of murine inflammatory cytokines (BD Biosciences, San Jose, CA) following the instructions of the manufacturer. Samples were acquired in a FACS Calibur cytometer from BD Biosciences and analyzed with FCAP Array

software. Activin A and Inhibin A were quantified using the Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine ELISA Kit (R&D systems) and Mouse InhA ELISA Kit (Elabscience) following the instructions of the manufacturer.

### Proliferation assays

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells from spleen and peripheral LN from Foxp3 GFP *knock in* female mice were sorted by flow cytometry (FACS Aria I, Becton & Dickinson) and labelled with CTV. 1.25 x 10<sup>5</sup> T cells were seeded into 96 well plates. CD11c microbead- enriched BMDCs were co-cultured with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells at 1:1, 1:2, 1:4; 1:10 and 1:20 ratios. After 3 and 5 days of culture, cells were stained with anti-CD4 PE (Tonbo) and Zombie Aqua (Biolegend). Proliferation was evaluated by CTV dilution within the live (zombie aqua<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> cells and calculated as % of divided cells, using the formula:

$$\% \text{ of divided cells} = \frac{\# \text{ cells that went into division}}{\# \text{ cells at start of culture}} \times 100$$

### *In vivo* LPS stimulation of DCs

Three-week-old female mice were inoculated with 1µg of LPS in the ear (left), as a control PBS (right) was inoculated in the opposite ear. After 6, 18 and 72 hours, MHCII, CD80, CD86 and PD-L1 were analyzed in DCs from the draining lymph node (dLN) by flow cytometry, as well as MHCII and CD80 in LCs from epidermal layers of the ear by immunofluorescence microscopy as describe above.

### Delayed Type Hypersensitivity (DTH)

Three week-old female mice were immunized with 100ng of ovalbumin (OVA) and 10µg of LPS subcutaneously in the back. Control mice were inoculated with PBS, 100ng of OVA or 10µg of LPS. Seven days later mice were challenged with 100ng OVA in one ear, and PBS in the other. After 24 hours, ear thickness was measured using an electronic digital micrometer and expressed as relative increment of the OVA challenged ear compared to PBS. Whole ears were embedded in paraffin, and sections taken for histochemical analysis, using Hematoxylin-Eosin staining. Twenty-seven fields from each ear section were analyzed for cellular infiltration and expressed as cells/mm<sup>2</sup>.

### Statistical analysis

Data are presented as mean values ± SEM. The significance of results was calculated by paired or unpaired, one or two-tailed Student T-test, utilizing GraphPad Prism 6 statistical software. *P* values <0.05 was considered as statistically significant. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.

## Results

### Impaired *in vitro* DC differentiation and maturation in the absence of Inhibins

We have previously demonstrated that in the absence of Inhibins, thymic cDCs display reduced levels of MHCII and CD86 [20]. On the other hand, it has been suggested that Activin A and Inhibin A, can promote tolerogenic DCs [21]. To investigate the role of Inhibins in DC biology, DCs were generated *in vitro* from BM progenitors from Inhα<sup>-/-</sup> and Inhα<sup>+/+</sup> mice in the presence of GM-CSF (immature BMDC: iBMDC), followed by 24h LPS stimulation to induce maturation (mature BMDC: mBMDC). Interestingly, although the percentage of DCs

in the culture was not altered in the absence of Inhibins, the absolute number of DCs was significantly reduced compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (Fig 1A). This reduction in DC numbers was not due to increased cell death in any of the subpopulations analyzed, as shown by Annexin V and 7-AAD staining (S1A and S1B Fig).

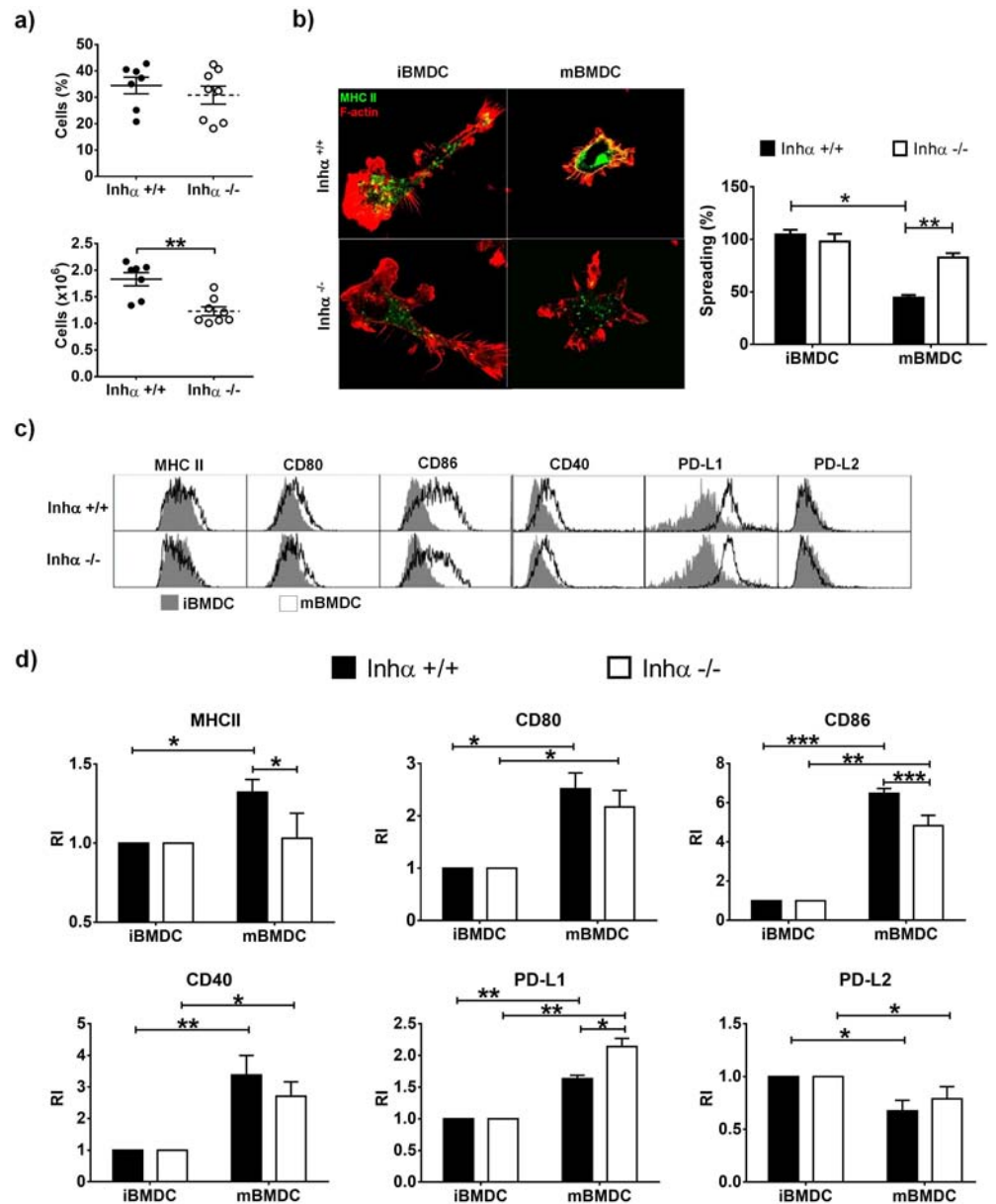
Immature DCs, characterized by an extended and adherent phenotype and presence of podosomes, change to a rounded and non-adherent migratory phenotype after maturation [22]. These morphological changes are accompanied by an increased surface expression of MHC Class II (MHCII) and co-stimulatory molecules such as, CD80, CD86, and CD40, among others [23]. As expected,  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  BMDC decreased their spreading when matured with LPS but in contrast,  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  LPS-stimulated BMDC, retained their spreaded morphology, resembling immature DCs (Fig 1B and S1C Fig). Furthermore, MHCII and CD86 levels were significantly diminished in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mBMDC compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mBMDC, and CD80 and CD40 also exhibited a trend towards a decrease, while PD-L1 showed a significant increased expression (Fig 1C). The impaired upregulation of the co-stimulatory molecules was not due to a reduction in TLR4 expression on the surface of  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC (S1D Fig). Interestingly, a slight decrease in MHCII upregulation was found in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  iBMDC in response to anti-CD40 and Poly I:C, suggesting that impaired maturation may be the result of an intrinsic defect in DC maturation rather than TLR4 deficient signaling pathway (S1E Fig).

### CCR7 dependent migration is impaired in $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ mBMDC

During DC maturation, the morphological changes to a round non-adherent cells combined with the upregulation of the chemokine receptor CCR7 allows a rapid migration of DCs to the lymph node, where naïve T cell activation takes place. As  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  DCs displayed an impaired maturation, we next evaluated the migration capacity of BMDC using *in vitro* chemotaxis assays towards CCL19 and CCL21, both CCR7 ligands. As expected,  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mBMDC showed efficient migration to both chemokines at concentrations ranging between 10 to 1000 ng/mL for CCL19 (Fig 2A, upper panels) and 10 to 500 ng/mL for CCL21 (Fig 2A, lower panels), in contrast to their immature counterparts, that migrated poorly towards these chemokines. In contrast, mBMDC from  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice were unable to migrate towards CCL19 or CCL21, similarly to iBMDC (Fig 2A). Furthermore, *in vivo* migration assays where a mixture of  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (GFP<sup>+</sup>) and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  (CTV<sup>+</sup>) mBMDCs were injected into the footpad of C57BL/6 mice, showed that  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mBMDC migrated poorly to the dLN evaluated as early as 4 hours after injection (data not shown) and up to 48 hours in comparison with  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  BMDCs (Fig 2B). To ensure that the staining process did not affect the viability or migration ability of  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC, parallel assays were performed using  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  BMDC and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC stained with CTV and CFSE, respectively, showing similar results (data not shown). This impaired migration was not explained by CCR7 expression, as there were no significant differences in CCR7 surface levels between  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mBMDCs (Fig 2C). In order to investigate the molecular mechanisms underlying the impaired migration of  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mBMDCs, we analyzed  $\text{Ca}^{++}$  mobilization (Fig 2D) and Erk phosphorylation (Fig 2E) in response CCR7 ligands. Although  $\text{Ca}^{++}$  fluxes induced by CCL19 and CCL21 did not show significant differences between  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDCs, unexpectedly, Erk phosphorylation was significantly increased in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDCs at different time points after chemokine stimulation.

### mBMDC from $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ mice show impaired allogeneic T cell stimulation capacity

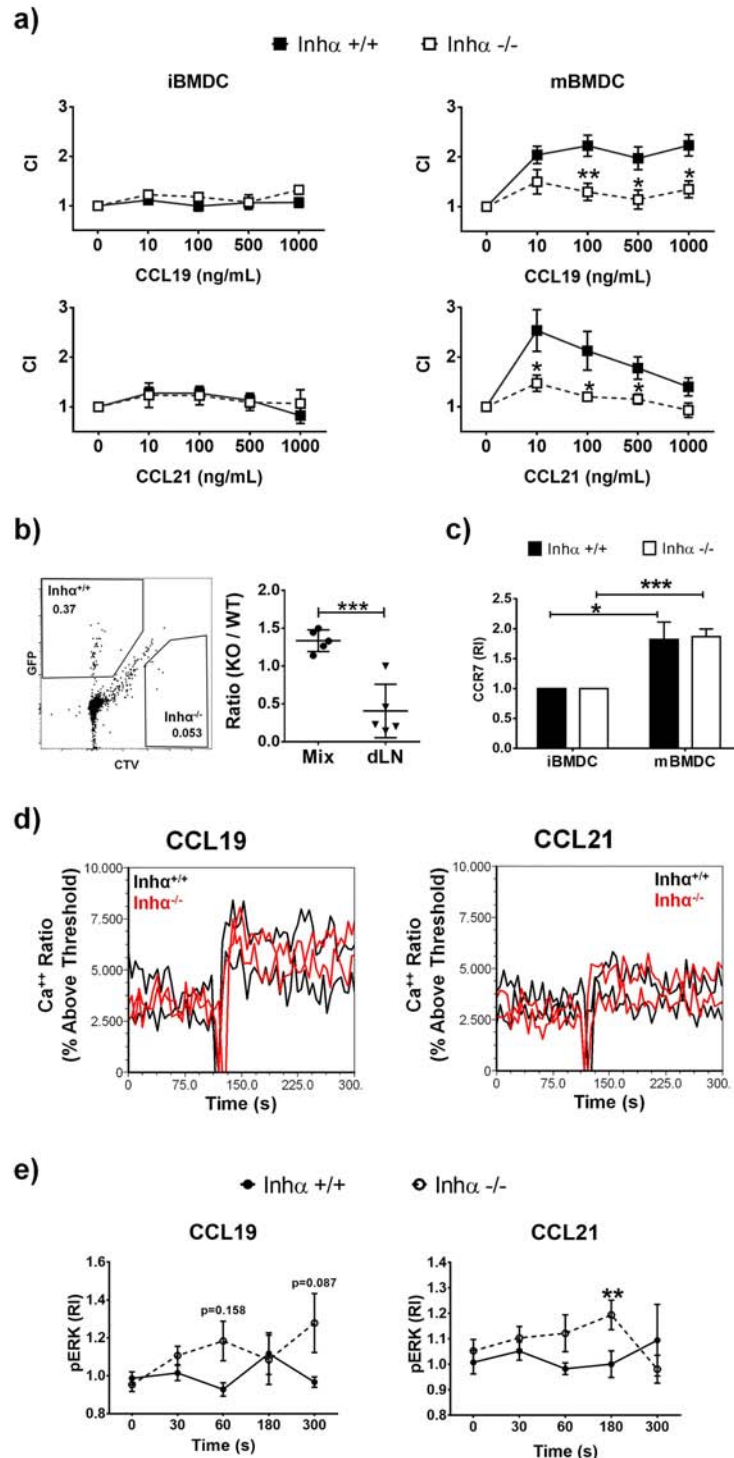
A characteristic of fully mature DC is their ability to activate naïve T lymphocytes [24]. Since  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mBMDCs appeared to display a "semi-mature" phenotype, we next evaluated their



**Fig 1. Impaired differentiation and maturation of  $\text{Inhibin } \alpha^{-/-}$  BMDC after LPS stimulation.** DCs were derived *in vitro* from bone marrow progenitors of  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  or  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice in the presence of GM-CSF. A. At day 6, BMDCs were harvested and percentages (top) and cell numbers (bottom) of DC ( $\text{CD}11c^+ \text{MHCII}^+$ ) were analyzed by flow cytometry. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments ( $n = 8$ ). B. BMDC were stained for F-actin (red) and MHCII (green) in a fibronectin-treated surface for morphology analysis by immunofluorescence. Bar graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. C-D. At day 5 of culture, the cells were stimulated with LPS ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to induce maturation. After 24h, BMDCs were harvested and expression of MHCII, CD40, CD80, CD86, PD-L1 and PD-L2 was analyzed by flow cytometry gated on DC population. Representative histograms of  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (top) or  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC (bottom) (C). MFI was determined and reported as relative expression compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice. Bar graphs show the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments (D). Asterisks denote statistical significance \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0167813.g001





**Fig 2. LPS-stimulated *Inha*<sup>-/-</sup> BMDC have impaired migration towards CCL19 and CCL21.** A. Chemotaxis towards CCL19 and CCL21 were performed with *Inha*<sup>+/+</sup> and *Inha*<sup>-/-</sup> unstimulated or 24h LPS-stimulated BMDCs. Graphs show the chemotaxis index expressed as mean ± SEM (n = 4 independent experiments). B. Mix of *Inha*<sup>+/+</sup> (GFP<sup>+</sup>) and *Inha*<sup>-/-</sup> (CTV<sup>+</sup>) BMDC (1:1) were inoculated in a C57BL/6 footpad and 48 hours later dLN were analyzed for the presence of BMDC. Graph represents the ratio of the mix inoculated and the ratio obtained in the dLN (mean ± SEM of 2 independent experiments; n = 5). C. CCR7 surface expression in BMDC. MFI was determined and reported as relative expression compared to *Inha*<sup>+/+</sup> mice. Bar graphs show mean ± SEM of 3 independent experiments. D) Calcium flux analysis of *Inha*<sup>+/+</sup> and

Inh $\alpha^{-/-}$  mBMDC stimulated with 300ng/ml of CCL19 and CCL21. E) Time course of Erk phosphorylation in response to CCR7 ligands in Inh $\alpha^{+/+}$  and Inh $\alpha^{-/-}$  mBMDC analyzed by flow cytometry. MFI was determined and reported as relative expression compared to unstimulated cells. Statistical significance was determined by a two-tailed unpaired Student t-Test. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ .

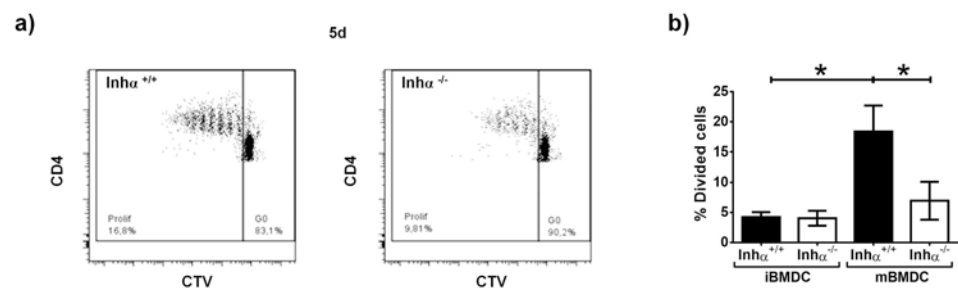
doi:10.1371/journal.pone.0167813.g002

ability to activate allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells. Immature or LPS-stimulated CD11c<sup>+</sup> BMDC were co-cultured with allogeneic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells pre-labelled with CTV and after 3 (not shown) and 5 days, proliferation was assessed by CTV dilution on live CD4<sup>+</sup> gated T cells. As shown in Fig 3, both Inh $\alpha^{+/+}$  and Inh $\alpha^{-/-}$  iBMDCs induced a negligible T cell proliferation at 5 days. Inh $\alpha^{+/+}$  mBMDC induced significant T cell proliferation compared to their iBMDCs counterparts. Interestingly, Inh $\alpha^{-/-}$  mBMDC did not induce a significant increase in T cell proliferation compared to Inh $\alpha^{-/-}$  iBMDCs and was significantly lower than Inh $\alpha^{+/+}$  mBMDC (ratio 1:10, Fig 3B).

### mBMDC from Inh $\alpha^{-/-}$ mice produce increased IL-10 levels in response to LPS

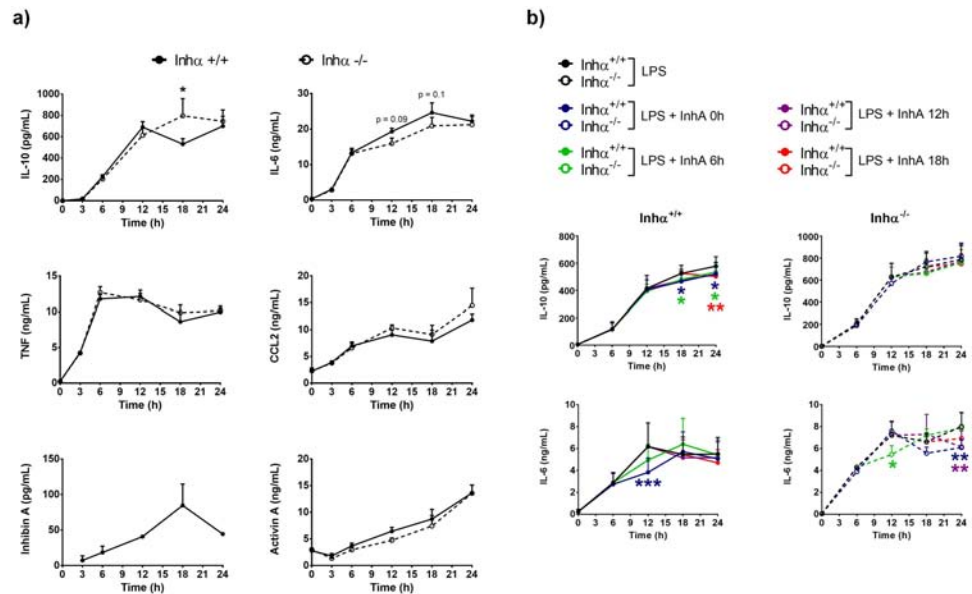
Since Inh $\alpha^{-/-}$  BMDC maturation was altered, we further investigated whether the absence of Inhibins affected their ability to secrete pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-6, which are associated with a proper T cell activation [23], as well as the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF $\beta$  which are associated to tolerance induction [25] We evaluated the production of TNF, IL-6, IL-12, CCL2, IFN $\gamma$  and IL-10 by CBA before and 3, 6, 12, 18 and 24 h after LPS stimulation in BMDC culture supernatants. IL-12 and IFN $\gamma$  were undetectable at all time points (data not shown). As shown in Fig 4, TNF and CCL2 were similarly produced by Inh $\alpha^{-/-}$  and Inh $\alpha^{+/+}$  mBMDC. Interestingly, Inh $\alpha^{-/-}$  mBMDC displayed significantly increased levels of IL-10, and a trend towards a decrease in IL-6 production at 18h after LPS stimulation, reaching the levels of Inh $\alpha^{+/+}$  BMDC at 24 hours. Although TGF $\beta$  was not detected in the BMDC cultures at any time point (data not shown) the disparity between down modulation of maturation markers and production of inflammatory cytokines resembles the "semi-mature" phenotype previously reported in tumor associated DCs which have been associated with anergy, Treg induction and impaired anti-tumor immunity [26].

A previous report showed that recombinant Activin A and Inhibin A can down modulate DC maturation *in vitro* [27]. In addition, it has been previously demonstrated that monocyte-



**Fig 3. BMDC Inh $\alpha^{-/-}$  showed poor allogeneic CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells stimulation capacity.** Unstimulated and 24h LPS-stimulated CD11c<sup>+</sup> cells were sorted at day 6 of culture and were co-cultivated with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells from Foxp3-GFP KI Balb/c. At day 5, proliferation of T cells was measured by CTV dilution. A. Representative dot plot of CTV dilution from Inh $\alpha^{+/+}$  BMDC (left) and Inh $\alpha^{-/-}$  BMDC (right). B. Graphs of divided T cells at 1:10 ratio represent mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. Statistical significance was determined by a two-tailed unpaired Student t-Test. \* $p \leq 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0167813.g003



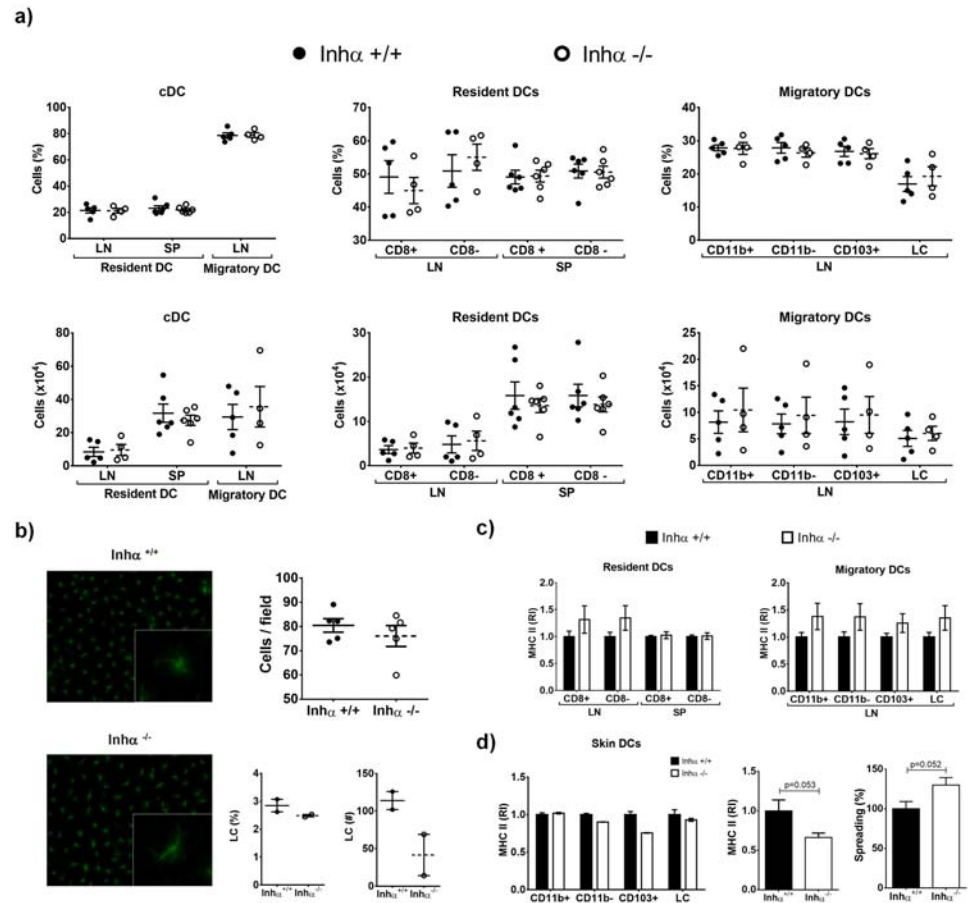
**Fig 4. *Inha*<sup>-/-</sup> BMDC produce increased IL-10 after LPS stimulation.** A) Time course of cytokines from supernatants of BMDC cultures were quantified by ELISA (Inhibin A and Activin A) and CBA (IL-6, IL-10, TNF and CCL2). Graphs represent mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments and 2 independent experiments for Inhibin A. b) Time course of IL-10 and IL-6 production by *Inha*<sup>+/+</sup> (left) and *Inha*<sup>-/-</sup> (right) BMDCs in the presence of exogenous recombinant Inhibin A (150pg/ml) at 0h, 6h, 12h and 18h post stimulation with LPS. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (n = 3 mice). Statistical significance was determined by using a two-tailed unpaired Student t-Test \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0167813.g004

derived DCs produce large amounts of Activin A after TLR stimulation, as early as 2 hours [28], while there are no reports on Inhibin production by these cells. Therefore, we investigated whether Activin A and Inhibin A could be produced during LPS-mediated BMDC maturation. Our results show that Activin A is produced after 6h of LPS stimulation and further increases up to 24h hours, while Inhibin A is secreted by BMDC after 6 hours of LPS stimulation, having a maximum concentration at 18 hours, which decreased at 24 hours (Fig 4). These data suggested that Inhibin A might act on BMDC in an autocrine manner. Interestingly, both *Inha*<sup>+/+</sup> and *Inha*<sup>-/-</sup> BMDC secreted equal amounts of Activin A, arguing against the possibility that the impaired maturation observed in *Inha*<sup>-/-</sup> BMDC was due to increased Activin A production. Interestingly, addition of exogenous recombinant Inhibin A during LPS stimulation (0h, 6h, 12h and 18h post-LPS treatment) led to a reduction of IL-6 production by both *Inha*<sup>+/+</sup> and *Inha*<sup>-/-</sup> BMDC, and a decrease in IL-10 production in *Inha*<sup>+/+</sup> BMDC, in agreement with data previously reported by Segerer et al. [27].

### *Inha*<sup>-/-</sup> mice have normal percentages and numbers of DC subsets under homeostatic conditions

The impaired DC differentiation observed *in vitro* (Fig 1) led us to investigate whether the absence of Inhibins may also affect DC differentiation *in vivo*. For this, we evaluated different DC subsets within LN, SP and skin of 3-week-old *Inha*<sup>-/-</sup> mice in homeostasis (S2 Fig), as it was reported that these mice have increased Activin A levels in peripheral blood and develop gonadal tumors after 4 weeks of age [14]. As shown in S2A Fig, at the time of these analyses levels of serum Activin A were not significantly increased compared to controls. We analyzed cDC as resident (Lin<sup>-</sup> CD11c<sup>hi</sup> MHCII<sup>lo</sup>) and migratory (Lin<sup>-</sup> CD11c<sup>lo</sup> MHCII<sup>hi</sup>) in LN and SP



**Fig 5. DCs percentages and numbers *in vivo* are not affected in absence of Inhibin  $\alpha$ , but LC have low MHCII expression.**  $Inh\alpha^{+/+}$  and  $Inh\alpha^{-/-}$  3 week-old mice were analyzed for cDCs ( $Lin^- CD11c^+ MHCII^+$ ), migratory DCs ( $Lin^- CD11c^+ MHCII^{hi}$ ) and resident DCs ( $Lin^- CD11c^{hi} MHCII^+$ ) in lymph nodes and spleen by flow cytometry. Right graph: further characterization of migratory LN subpopulations based on CD11b, CD103 and CD207 expression as described in S2 Fig. A. Graphs represent frequency (top) and total numbers (bottom) (mean  $\pm$  SEM) of at least 3 independent experiments ( $n = 4 \pm 6$  mice). Subpopulation analysis of resident and migratory DC was performed using the gate strategy described in S2 Fig. B. Ear epidermal layers were stained with MHCII Alexa Fluor 488 for LC analysis by immunofluorescence. Representative images at 20x (left) and graphs represent mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments expressed as cells/field. Lower panels show FACS analysis of LC (CD207+, CD11b+, CD103-) obtained after digestion of skin sheets under steady state conditions (left, percentages; right, total numbers). C. Analysis of MHCII expression from LN and SP DC subpopulations. Bar graphs represent relative expression of MHCII MFI in DC subpopulations compared to  $Inh\alpha^{+/+}$  mice (mean  $\pm$  SEM). D. Analysis of MHCII expression in skin DCs. Left: FACS analysis of MHCII surface expression ( $n = 2$ ). Middle: Immunofluorescence analysis of MHCII in epidermal sheets. Data are expressed as relative increment compared to  $Inh\alpha^{+/+}$ . Right: Analysis of cell spreading in LCs from epidermal layers of  $Inh\alpha^{-/-}$  mice compared to  $Inh\alpha^{+/+}$ . Statistical significance was determined by using a two-tailed unpaired Student t-Test.

doi:10.1371/journal.pone.0167813.g005

(S2B and S2C Figs), as previously reported by Idoyaga et al [29], and found no differences in numbers and percentages between  $Inh\alpha^{-/-}$  and  $Inh\alpha^{+/+}$  (Fig 5A). It has been reported that DC subsets can differentially shape the immune responses; for instance,  $CD8\alpha^+$  DCs and  $CD103^+$  DCs are specialized to induce a tolerogenic response under certain conditions, compared to their counterparts,  $CD8\alpha^-$  DCs and  $CD103^-$  DCs [29]. Analysis of these DC subpopulations showed no differences in the percentage or numbers of  $CD8\alpha^+$  and  $CD8\alpha^-$  resident DCs subset. In order to characterize migratory DCs CD207, CD11b and CD103 markers were used

following the gating strategy shown in [S2 Fig](#). As shown in [Fig 5A](#) neither the percentage nor the total cell numbers of CD11b+, CD11b-, CD103+ or LC (CD207+ CD11b+ CD103-) subsets were significantly different between  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice ([Fig 5A](#)).

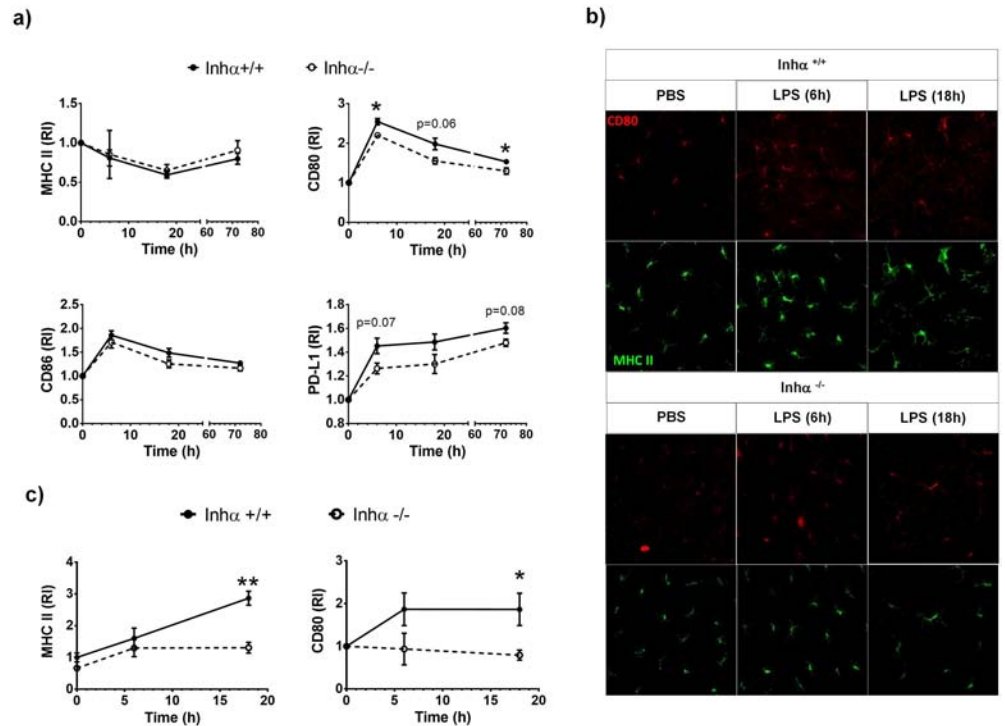
Since Activin A was shown to promote Langerhans cell (LC) differentiation from monocytes in the skin [30,31] and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice showed increased Activin A serum levels ([S2A Fig](#) and [14]), we also investigated whether the absence of Inhibins could impact the LC differentiation *in vivo*. However, as shown in [Fig 5B](#), there were no differences in the numbers of LC in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice. This result was further confirmed after digestion of skin sheets and analysis by flow cytometry ([Fig 5B](#) bottom panels). We have previously shown that thymic cDC from  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice express lower levels of MHCII in homeostasis [20]. As shown in [Fig 5C](#), the expression of MHCII in resident and migratory cDC is not altered in the LN and SP of the  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice. Interestingly, LCs in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice exhibited lower MHCII expression, as assessed by immunofluorescence staining of epidermal sheets and flow cytometry, which was accompanied by increased cell spreading compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  ([Fig 5D](#)).

### $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ DCs show impaired maturation *in vivo*

Although no differences were found in DC subpopulations under steady state conditions, we next evaluated the effect of the absence of Inhibins under inflammatory conditions. To analyze DC maturation *in vivo* we inoculated subcutaneously LPS or PBS in the ears of 3-week-old  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  and  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice, and analyzed expression of maturation markers in DCs from dLN after 6h, 18h and 72 h. As shown in [Fig 6A](#),  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  cDCs expressed lower levels of CD80 and PD-L1 after LPS inoculation compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  cDCs. CD86 expression was also slightly decreased in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  cDCs compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ , although differences were not statistically significant. As we previously found differences in LC phenotype under steady state conditions, we also evaluated MHCII and CD80 after LPS inoculation in epidermal sheets. As shown in [Fig 6B](#),  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  LCs increased MHCII and CD80 surface levels as early as 6 hours after LPS inoculation, whereas no changes were observed in LCs from PBS-inoculated ear ([Fig 6B and 6C](#)). In contrast, the upregulation of MHCII and CD80 was not observed in LPS-stimulated  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  LCs, strongly suggesting that, similarly to cDCs, LC maturation is impaired in the absence of Inhibins. To further characterize skin DCs we also used the CD207, CD11b and CD103 markers and analyzed LC, CD11b+, CD11c- and CD103+ subpopulations ([S3A Fig](#)) after digestion of skin sheets after 18h of LPS inoculation. As shown in [S3B Fig](#),  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  LC expressed lower levels of MHCII, and CD80 compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice.

### Impaired DTH responses in $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ mice

To investigate whether the impaired maturation of DCs in response to LPS may affect T cell activation, we next performed a DTH assay in response to OVA.  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  and  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice were inoculated subcutaneously with OVA using LPS as adjuvant (as described in [materials and methods](#)). As expected, cells recruited to the ear of  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice challenged with OVA led to ear swelling (1.4 fold compared to PBS) ([Fig 7A](#)), while  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice did not show a significant DTH response ([Fig 7B](#)). Furthermore, when ear swelling was measured every 12 hours up to 72 hours,  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice showed no inflammation through the time course ([S4 Fig](#)). The lack of ear swelling in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice correlated with a poor cellular infiltration within the ear ([Fig 7A](#)). Additionally, when DC subpopulations were evaluated at 24 hours,  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice showed lower numbers of cDCs compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice ([Fig 7C](#)). Furthermore, analysis of DC subpopulations, showed that the CD8 $\alpha^{-}$  CD207 $^{+}$  DC subpopulation, which is composed mainly by LC, was the most reduced subpopulation in dLN from  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice after OVA challenge.



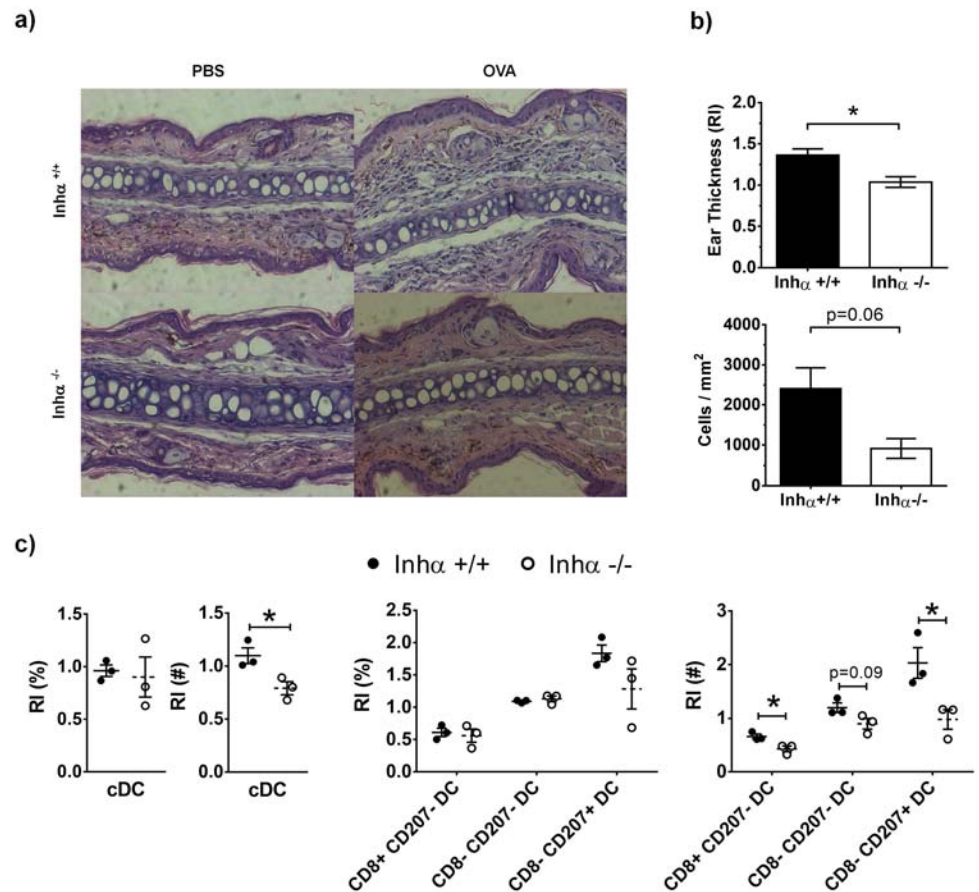
**Fig 6. LPS-induced DC maturation *in vivo* is impaired in  $Inh\alpha^{-/-}$  mice.**  $Inh\alpha^{+/+}$  and  $Inh\alpha^{-/-}$  3-week-old mice were inoculated intradermal with LPS (1 $\mu$ g) in left ear and PBS in right ear as control. After 6, 18 and 72 h, dLN and ear epidermal layers were obtained to evaluate DC maturation. A. Time course of MHCII, CD80, CD86 and PD-L1 expression in cDCs (CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>). B. Confocal microscopy micrographs of epidermal sheets stained for MHCII (green) and CD80 (red). C. MHCII and CD80 relative expression in LC from epidermal sheets. Graphs represent relative increment of LPS-ear versus PBS-ear mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. Statistical significance was determined by using a two tailed unpaired Student t-Test \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0167813.g006

Our data suggest that the lack of DHT responses in  $Inh\alpha^{-/-}$  mice may be due to a combination of impaired DC maturation and migration.

## Discussion

There is a growing evidence of the influence of Activins in the regulation of immunity, however, little is known about the role of Inhibins in these processes. Our group has previously demonstrated that Inhibins are required for DC maturation in the thymus and that in the absence of Inhibins, reduced levels of MHCII and CD86 on stromal DCs have an impact in thymocyte selection [12]. However, the role of Inhibins in DC maturation and function in the periphery had not been explored. Our results showed that the absence of Inhibins results in impaired BMDC maturation *in vitro*, evidenced by reduced expression of MHCII, CD80 and CD86, and increased levels of the co-inhibitory molecule PD-L1 in response to LPS. The low expression of MHCII and CD86 contradicts previously reported data showing that Inhibin A is capable of preventing the upregulation of HLA-DR expression during human Mo-DC maturation *in vitro* in response to pro-inflammatory cytokines, including as Prostaglandin E2, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  [27]. However, it is worth noting that Activin ligands may exert different effects on immune cells, depending on the developmental stage, under inflammatory [32,33] or steady state conditions [34] and in response to different stimuli [28].



**Fig 7.  $Inh\alpha^{-/-}$  mice exhibit impaired DTH response induced by OVA challenge.** Mice were immunized with 100ng OVA + 10 $\mu$ g LPS in the back. After 7 days mice were challenged with 100ng of OVA in the ear. A. H&E staining of ear sections at 24h after challenge from a representative experiment is shown. B. Ear thickness (top), expressed as relative increment between OVA-ear thickness divided by PBS-ear thickness, and quantification of infiltrating cells (bottom) in challenged ears after 24h. Graphs represent mean  $\pm$  SEM of 2 independent experiments (n = 3). C. Percentages and numbers of cDC subsets in dLN expressed as relative increment between challenged ears divided by PBS ears. Graphs represent mean  $\pm$  SEM of 2 independent experiments (n = 3). Asterisks denote statistical significance \*p $\leq$ 0.05; \*\*p $\leq$ 0.01; \*\*\*p $\leq$ 0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0167813.g007

Unexpectedly, CCR7 expression on mBMDC was not affected in the absence of Inhibins (Fig 2C), despite their reduced capacity to migrate towards CCL19 and CCL21 *in vitro* and their impaired homing to the LN *in vivo* (Fig 2A and 2B), which may imply alterations in CCR7-dependent signaling. Alternatively, the morphological alterations of mBMDC from  $Inh\alpha^{-/-}$  mice suggest possible differences in the expression and/or function of adhesion molecules. In an attempt to investigate the potential defects in CCR7 mediated signaling, Ca<sup>++</sup> fluxes and Erk phosphorylation in response to chemokines CCL19 and CCL21 were evaluated. Although Ca<sup>++</sup> mobilization was not significantly different between  $Inh\alpha^{+/+}$  and  $Inh\alpha^{-/-}$  mBMDC, Erk phosphorylation was enhanced in  $Inh\alpha^{-/-}$  mice compared to  $Inh\alpha^{+/+}$  (Fig 2). The functional relevance of this enhanced Erk phosphorylation remains unknown, however we cannot rule the possibility of a disbalance in signaling pathways downstream CCR7 being involved in the impaired cell migration. In this context, we previously reported that the impaired migration of Jak 3<sup>-/-</sup> T lymphocytes, correlated with an hyperactivation of cofilin, which is a target of Erk, resulting in altered actin cytoskeleton dynamics[35].

The altered phenotype displayed by  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  DCs suggested that they might also be impaired in their functions. Indeed, our data demonstrated that  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mBMDCs induced poor allogeneic T cell responses, possibly as a consequence of lower levels of MHCII and CD86 expression and increased PD-L1 expression. In this context, PD-L1 has been shown to down regulate T cell receptor (TCR) signaling by recruiting SHP-2 [36] and consequently, promotes T cell anergy and Treg induction [37,38]. Whether the impaired maturation of  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDCs has an impact on T cell polarization and Treg induction remains unclear and is currently being investigated.

A potential mechanism involved in the altered DC maturation observed in the absence of Inhibins may be the overproduction of Activins. Accordingly, the absence of  $\alpha$ -subunits would result in enhanced  $\beta$ -dimer assembly (over  $\alpha\beta$  heterodimer formation) leading to increased Activin expression [14]. In this context, Robson et al. previously demonstrated that Mo-DCs secrete Activin A in response to TLR ligands (LPS, R-848, Poly I:C and Pam3Cys), CD40L and Prostaglandin E2, acting as an autocrine negative feed-back mechanism to counteract DC maturation [28]. Interestingly, no significant differences were observed in Activin A secretion between  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDCs after LPS stimulation (Fig 4B), arguing against the involvement of Activin A in the altered maturation of  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDCs. Hence, although it was previously reported that recombinant Activin A and Inhibin A can down regulate DC maturation mediated by pro-inflammatory cytokines [27], our data indicate that Inhibins promote DC maturation in response to LPS.

Beyond the role of Inhibins as antagonists of Activin signaling, evidence has accumulated supporting a possible mechanism underlying Inhibin-mediated functions [9]. Indeed, there are reports suggesting that Inhibins may transduce signals through an independent receptor (reviewed in [10]). Therefore, Inhibins may have their own role in the regulation of DC maturation. Our results demonstrate that BMDC can secrete significant levels of Inhibin A upon LPS stimulation, showing a peak of secretion at 18h. Interestingly, at this time point,  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC produced higher levels of IL-10 and slightly lower levels of IL-6 compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  BMDCs (Fig 4), which may partially account for reduced stimulatory capacity of these cells (Fig 3). However, Inhibin mediated signals do not appear to directly regulate cytokine production in response the fact that exogenous addition of Inhibin A was unable to restore IL-10 and IL-6 levels  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC in response to LPS, suggests that Inhibins may modulate DC maturation through other mechanisms. In this context, recombinant Inhibin A was able to restore MHCII upregulation in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC when added at the time of LPS stimulation (data not shown).

The enhanced production of IL-10 and slightly reduced levels of IL-6 in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC might imply the activation of different signaling pathways downstream TLR stimulation. In this context, TLR stimulation leads the expression of  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -dependent pro-inflammatory cytokines, but also activates MAPK-dependent transcription factors AP-1 and CREB [39]. It has been shown that IL-10 is produced in a CREB-dependent manner in macrophages after TLR2/TLR4 activation, downstream the phosphorylation of p38 and other MAPKs [40]. On the other hand, in multiple myeloma, IL-6 production is down regulated by CREB binding to the CREB site within the IL-6 promoter region, independently of the  $\text{NF}\kappa\text{B}$  [41]. Therefore, one possible mechanism to explain the enhanced IL-10 and decreased IL-6 production by  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  BMDC might involve preferential activation of CREB over AP-1 in response to LPS.

Another cytokine that has been shown to down regulate DC maturation is  $\text{TGF}\beta$ . Indeed, DCs acquire a tolerogenic phenotype in the presence of  $\text{TGF}\beta$ , characterized by low expression of DC maturation markers such as CD83, CD80 and CD86, as well as MHCII, and down regulation of pro-inflammatory cytokines, such as  $\text{TNF}\alpha$ , IL-12 and  $\text{IFN}\alpha$ , with a promotion of regulatory cytokines release, such as  $\text{TGF}\beta$  [5].



Although in the absence of Inhibins mBMDC displayed a "semi-mature" phenotype, we were unable to detect significant levels of TGF $\beta$  in the supernatant of LPS stimulated cultures (data not shown), arguing against the possibility of this cytokine playing a role.

Whether Inhibins play a role in DC differentiation *in vivo* remains unclear. Our results show that *in vitro* DC differentiation from bone marrow progenitors is significantly diminished in the absence of Inhibins (Fig 1A), however no differences were found in the numbers or percentage of cDC in LN and spleen of  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice (Fig 5A). This discrepancy might be explained by the fact that *in vivo* arriving pre-DCs may be provided with a tissue-specific cytokine milieu that may compensate the DC generation in the absence of Inhibins (reviewed in [42,43]).

There is evidence showing that members of TGF $\beta$  superfamily promote LC differentiation in an autocrine manner [44]. In this context, Musso et al. demonstrated that transgenic overexpression of Activin A under the keratin promoter induced enhanced LC differentiation from circulating monocytes, while Follistatin (ligand trap for Activins), reduced their generation *in vivo* [30]. However, serum Activin A levels were not significantly different in 3 week-old  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (S2A Fig). Interestingly, although LC numbers in epidermal sheets were not altered compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  mice, LC phenotype was altered, showing decreased MHCII levels and increased cell spreading, suggesting a role for Inhibins in LC homeostasis. Under inflammatory conditions, LC increase MHCII and co-stimulatory molecules and, in parallel, lose their extended phenotype and acquire a round shape, that allows them to migrate to LN. These changes are accompanied by down regulation of E-cadherin and up-regulation of N-cadherin and CCR7 (reviewed in [45]). Interestingly, upregulation of costimulatory markers on LC was impaired after *in vivo* LPS stimulation in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice, which correlates with the *in vitro* results of BMDC maturation. In addition,  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  LC also displayed differences in morphology compared to  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$ , which may indicate an increase in adhesion molecule expression, such as E-cadherin.

Finally, to exert an immune response *in vivo*, DCs capture antigens in the periphery and migrate to dLN in order to present them and activate T cells. In DTH assays, both LC and dermal DCs are important to induce a T cell response [45]. The  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice showed poor DTH in response to OVA challenge, which could be the result of a decreased maturation and consequently reduced migration of CD8<sup>-</sup> CD207<sup>+</sup> DCs to the dLN. As this local immune response is dependent on skin DCs, it still remains to be evaluated the effect inhibin-mediated functions in systemic immune responses or in specific tolerogenic microenvironments, such as the intestinal tract, which may require the participation of other DC subpopulations.

In summary, here we provide the first evidence that Inhibins play a key role in promoting DC maturation and migration potentiating their function to induce T cell responses. Our data suggest that these ligands could be considered as potential targets to down modulate immune responses in specific inflammatory conditions.

## Supporting Information

**S1 Fig. *In vitro* differentiation, analysis of apoptosis and TLR4 expression in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  or  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  BMDC.** A. Total cell numbers at day 6 of BMDC culture (7 independent experiments). B. Percentage of Anxin V<sup>+</sup>, Anxin V<sup>+</sup> 7AAD<sup>+</sup> and 7AAD<sup>+</sup> of DC, CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup> and CD11c<sup>-</sup> analyzed by flow cytometry. (5 independent experiments). C) Representative confocal micrographs (100x) from iBMDCs and mBMDCs stained with phalloidin rhodamine from 3 individual  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  (left) and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  (right) mice, respectively, before and after LPS treatment. D). TLR4 expression gated on CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> population analyzed by flow cytometry. MFI values are shown and expressed as mean  $\pm$  SEM of 4 independent

experiments. E) Analysis of MHCII upregulation in response to different maturation stimuli at 24h. Data are expressed as relative expression compared to iDC expression. Mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiment (n = 5  $\pm$  6 mice).

(TIF)

**S2 Fig. Analysis of serum Activin and *ex vivo* analysis of DC subpopulations.** A. Activin A was measured in  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  3 week-old-mice by ELISA. Graph represents at least 3 independent mice. B-C. Gating strategy to define DC subsets in LN (B) and spleen (C) of  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice. B. Within the cells suspensions,  $\text{CD}19^{-}$   $\text{CD}3^{-}$   $\text{TER}119^{-}$   $\text{NK}1.1^{-}$  single live cells were selected for further analysis. The  $\text{CD}11\text{c}^{\text{hi}}$   $\text{MHC II}^{\text{Int}}$  population represents lymphoid resident DCs, and can be further divided into  $\text{CD}8\alpha^{+}$  and  $\text{CD}8\alpha^{-}$  DC.  $\text{CD}11\text{c}^{\text{Int}}$   $\text{MHC II}^{\text{hi}}$  population represents migratory DCs, that can be further divided into  $\text{CD}11\text{b}^{-}$ ,  $\text{CD}11\text{b}^{+}$   $\text{CD}103^{+}$  and LC ( $\text{CD}207^{+}$ ,  $\text{CD}11\text{b}^{+}$ ,  $\text{CD}103^{-}$ ). C. Splenic  $\text{CD}19^{-}$   $\text{CD}3^{-}$   $\text{TER}119^{-}$   $\text{NK}1.1^{-}$  single live cells were selected. The  $\text{CD}11\text{c}^{\text{hi}}$   $\text{MHC II}^{\text{Int}}$  population represents spleen resident DC, and can be further divided into  $\text{CD}8^{+}$  and  $\text{CD}8^{-}$  DCs.

(TIF)

**S3 Fig. Skin DCs display impaired maturation *in vivo*.**  $\text{Inh}\alpha^{+/+}$  and  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  3-week-old mice were inoculated intradermal with LPS (1  $\mu\text{g}$ ) in left ear and PBS in right ear as control. After 18h, ears were digested to evaluate skin DC subset maturation. A. Gating strategy to define DC subsets. The  $\text{CD}11\text{c}^{+}$   $\text{MHC II}^{+}$  population represents cDCs and can be further divided into four subpopulations based on the expression of  $\text{CD}11\text{b}$ ,  $\text{CD}207$  and  $\text{CD}103$  markers. B. Analysis of DC subpopulations from digested skin sheets. Expression of MHCII,  $\text{CD}80$ ,  $\text{PD-L}1$  and  $\text{CCR}7$  after 18h of LPS stimulation in  $\text{CD}11\text{b}^{-}$ ,  $\text{CD}11\text{b}^{+}$ ,  $\text{CD}103^{+}$  and LC (n = 2).

(TIF)

**S4 Fig. Impaired DTH response in  $\text{Inh}\alpha^{-/-}$  mice.** Mice were immunized with 100ng OVA + 10  $\mu\text{g}$  LPS in the back. After 7 days, mice were challenged with 100ng of OVA in one ear and PBS in the other ear for control. Ear thickness was measured through the time for up to 72 hours. Graphs represent mean  $\pm$  SEM of 2 independent experiments.

(TIF)

## Acknowledgments

We thank Dr. Martin Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) for providing the  $\text{Inh}\alpha$  knock out mice. We also thank the "Departamento de Biología celular y tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México", especially to Dr. Martha Ustarroz and Dr. Raquel Guerrero, for help in the preparation of tissue sections and the immunohistochemical analysis. Roxana Olguín-Alor was a student in the Ph.D program "Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas", Universidad Nacional Autónoma de México.

## Author Contributions

**Conceptualization:** GS LCB ROA.

**Data curation:** GS ROA.

**Formal analysis:** ROA.

**Funding acquisition:** GS.

**Investigation:** ROA MFG LAH.

**Methodology:** ROA MFG LAH.

**Project administration:** GS.

**Resources:** GS LCB EAGZ.

**Writing ± original draft:** GS ROA.

**Writing ± review & editing:** GS ROA MFG LCB EAGZ.

## References

1. Liu K, Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234: 45±54. doi: [10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x) PMID: [20193011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20193011/)
2. Maldonado RA, von Andrian UH (2010) How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 108: 111±165. doi: [10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5) PMID: [21056730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21056730/)
3. Kushwah R, Hu J (2011) Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci* 1: 20. doi: [10.1186/2045-3701-1-20](https://doi.org/10.1186/2045-3701-1-20) PMID: [21711933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21711933/)
4. Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G (2006) Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 235: 1124±1132.
5. Seeger P, Musso T, Sozzani S (2015) The TGF-beta superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev*.
6. Massague J (2012) TGFbeta signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology* 13: 616±630. doi: [10.1038/nrm3434](https://doi.org/10.1038/nrm3434) PMID: [22992590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22992590/)
7. Licona-Limon P, Soldevila G (2007) The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights. *Immunology letters* 109: 1±12. doi: [10.1016/j.imlet.2006.12.010](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.12.010) PMID: [17287030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17287030/)
8. Stenvers KL, Findlay JK (2010) Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrinol Metab* 21: 174±180. doi: [10.1016/j.tem.2009.11.009](https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.009) PMID: [20005735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20005735/)
9. Makanji Y, Zhu J, Mishra R, Holmquist C, Wong WP, et al. (2014) Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. *Endocr Rev* 35: 747±794. doi: [10.1210/er.2014-1003](https://doi.org/10.1210/er.2014-1003) PMID: [25051334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25051334/)
10. Phillips DJ, Woodruff TK (2004) Inhibin: actions and signalling. *Growth factors* 22: 13±18. PMID: [15176454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15176454/)
11. Licona-Limon P, Aleman-Muench G, Chimal-Monroy J, Macias-Silva M, Garcia-Zepeda EA, et al. (2009) Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 229±235. doi: [10.1016/j.bbrc.2009.02.029](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.029) PMID: [19338778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19338778/)
12. Carbajal-Franco E, de la Fuente-Granada M, Aleman-Muench GR, Garcia-Zepeda EA, Soldevila G (2015) Inhibins tune the thymocyte selection process by regulating thymic stromal cell differentiation. *Journal of immunology research* 2015: 837859. doi: [10.1155/2015/837859](https://doi.org/10.1155/2015/837859) PMID: [25973437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25973437/)
13. Aleman-Muench GR, Soldevila G (2011) When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity. *Immunology and cell biology*.
14. Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, et al. (1994) Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8817±8821. PMID: [8090730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8090730/)
15. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS letters* 407: 313±319. PMID: [9175875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9175875/)
16. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, et al. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77±92. PMID: [10037236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10037236/)
17. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, et al. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693±1702. PMID: [1460426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1460426/)
18. Garcia-Zepeda EA, Licona-Limon I, Jimenez-Solomon MF, Soldevila G (2007) Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs. *Immunology* 122: 247±260. doi: [10.1111/j.1365-2567.2007.02634.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02634.x) PMID: [17521370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17521370/)
19. Rivas-Caicedo A, Soldevila G, Fortoul TI, Castell-Rodriguez A, Flores-Romo L, et al. (2009) Jak3 is involved in dendritic cell maturation and CCR7-dependent migration. *PLoS One* 4: e7066. doi: [10.1371/journal.pone.0007066](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007066) PMID: [19759904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19759904/)

20. Carbajal-Franco E, de la Fuente-Granada M, Aleman-Muench GR, Garcia-Zepeda EA, Soldevila G (2015) Inhibins tune the thymocyte selection process by regulating thymic stromal cell differentiation. *J Immunol Res* 2015: 837859. doi: [10.1155/2015/837859](https://doi.org/10.1155/2015/837859) PMID: [25973437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25973437/)
21. Segerer SE, Muller N, Brandt J, Kapp M, Dietl J, et al. (2008) The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 17. doi: [10.1186/1477-7827-6-17](https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-17) PMID: [18460206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18460206/)
22. Burns S, Hardy SJ, Buddle J, Yong KL, Jones GE, et al. (2004) Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil Cytoskeleton* 57: 118±132. doi: [10.1002/cm.10163](https://doi.org/10.1002/cm.10163) PMID: [14691951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14691951/)
23. Lutz MB, Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23: 445±449. PMID: [12200066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12200066/)
24. Reis e Sousa C (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476±483. doi: [10.1038/nri1845](https://doi.org/10.1038/nri1845) PMID: [16691244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16691244/)
25. Rutella S, Danese S, Leone G (2006) Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108: 1435±1440. doi: [10.1182/blood-2006-03-006403](https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-006403) PMID: [16684955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16684955/)
26. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P (2013) Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol* 4: 438. doi: [10.3389/fimmu.2013.00438](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00438) PMID: [24376443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24376443/)
27. Segerer SE, Muller N, Brandt J, Kapp M, Dietl J, et al. (2008) The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 6: 17.
28. Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, et al. (2008) Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 111: 2733±2743. doi: [10.1182/blood-2007-03-080994](https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-080994) PMID: [18156495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18156495/)
29. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, et al. (2013) Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest* 123: 844±854. doi: [10.1172/JCI65260](https://doi.org/10.1172/JCI65260) PMID: [23298832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23298832/)
30. Musso T, Scutera S, Vermi W, Daniele R, Fornaro M, et al. (2008) Activin A induces Langerhans cell differentiation in vitro and in human skin explants. *PLoS ONE* 3: e3271. doi: [10.1371/journal.pone.0003271](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003271) PMID: [18813341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18813341/)
31. Munz B, Smola H, Engelhardt F, Bleuel K, Brauchle M, et al. (1999) Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *EMBO J* 18: 5205±5215. doi: [10.1093/emboj/18.19.5205](https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5205) PMID: [10508154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508154/)
32. Zhang XJ, Li Y, Tai GX, Xu GY, Zhang PY, et al. (2005) Effects of activin A on the activities of the mouse peritoneal macrophages. *Cell Mol Immunol* 2: 63±67. PMID: [16212913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16212913/)
33. Zhou J, Tai G, Liu H, Ge J, Feng Y, et al. (2009) Activin A down-regulates the phagocytosis of lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Cell Immunol* 255: 69±75. doi: [10.1016/j.cellimm.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.11.001) PMID: [19091310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19091310/)
34. Nusing RM, Barsig J (1999) Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. *Br J Pharmacol* 127: 919±926. doi: [10.1038/sj.bjp.0702626](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702626) PMID: [10433499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10433499/)
35. Ambriz-Pena X, Garcia-Zepeda EA, Meza I, Soldevila G (2014) Jak3 enables chemokine-dependent actin cytoskeleton reorganization by regulating cofilin and Rac/Rhoa GTPases activation. *PLoS One* 9: e88014. doi: [10.1371/journal.pone.0088014](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088014) PMID: [24498424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24498424/)
36. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, et al. (2012) Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 209: 1201±1217. doi: [10.1084/jem.20112741](https://doi.org/10.1084/jem.20112741) PMID: [22641383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22641383/)
37. Ramos RN, de Moraes CJ, Zelante B, Barbuto JA (2013) What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? *Clin Dev Immunol* 2013: 806025. doi: [10.1155/2013/806025](https://doi.org/10.1155/2013/806025) PMID: [23762097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23762097/)
38. Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L (2014) The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cell Immunol* 290: 72±79. doi: [10.1016/j.cellimm.2014.05.006](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.05.006) PMID: [24908630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24908630/)
39. De Nardo D (2015) Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74: 181±189. doi: [10.1016/j.cyto.2015.02.025](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025) PMID: [25846205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25846205/)
40. Sanin DE, Prendergast CT, Mountford AP (2015) IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *J Immunol* 195: 1218±1232. doi: [10.4049/jimmunol.1500146](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500146) PMID: [26116503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26116503/)

41. Xiao W, Hodge DR, Wang L, Yang X, Zhang X, et al. (2004) NF-kappaB activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NFkappaB regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. *Cancer Biol Ther* 3: 1007±1017. PMID: [15467434](#)
42. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A (2013) The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31: 563±604. doi: [10.1146/annurev-immunol-020711-074950](#) PMID: [23516985](#)
43. Gross M, Salame TM, Jung S (2015) Guardians of the Gut—Murine Intestinal Macrophages and Dendritic Cells. *Front Immunol* 6: 254. doi: [10.3389/fimmu.2015.00254](#) PMID: [26082775](#)
44. Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC (1996) A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184: 2417±2422. PMID: [8976197](#)
45. Clausen BE, Stoitzner P (2015) Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses. *Front Immunol* 6: 534. doi: [10.3389/fimmu.2015.00534](#) PMID: [26557117](#)