



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Medicina**



**Función de TIF1 $\gamma$  en poblaciones de linfocitos Th1 y CTL**

TESIS

que presenta:

**Diego Pérez Vázquez**

para obtener el título de:

**Licenciado en Investigación Biomédica Básica**

Tutora:

**Dra. Paula Licon Limón**

**Instituto de Fisiología Celular**

**Departamento de Biología Molecular y del Desarrollo**

Ciudad Universitaria, Cd.Mx. 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## **Agradecimientos Académicos**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Celular (LIMyC) del Instituto de Fisiología Celular, División de Ciencia Básica, Departamento de Biología Molecular y Celular. El apoyo de muchos académicos y trabajadores de distintas dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) fue imprescindible para realizar este proyecto de tesis.

En primer lugar, agradezco enormemente a la Dra. Paula Licona Limón por la asesoría constantemente brindada durante todos estos años para llevar a cabo esta tesis exitosamente. Muchas gracias por enseñarme no sólo las técnicas necesarias para realizar este proyecto de investigación, sino también un pensamiento crítico que contribuyó a mi formación académica y personal.

También, a los miembros de mi jurado: Dra. Marina Macías Silva, Dra. Paula Licona Limón, Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo, Dra. Gladis del Carmen Fragoso González y Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán por la revisión de esta tesis y por sugerir correcciones precisas y necesarias para publicar un escrito de gran calidad.

A todos los integrantes del LIMyC muchísimas gracias. Al Biol. José Luis Ramos Balderas por su asistencia técnica en los distintos experimentos realizados y su disposición a apoyar de cualquier forma en el laboratorio. A la auxiliar de laboratorio Rosa Bolaños Vidal por el incansable apoyo en el cuidado de los animales experimentales utilizados en este proyecto. A los estudiantes por las perennes discusiones científicas que me permitieron analizar y entender mejor mis resultados positivos y negativos. A todos los ratones que nos permitieron entender un poco mejor la biología del sistema inmunológico.

Agradezco a todas las dependencias de la UNAM donde estudié y/o participé en laboratorios de investigación y al personal dentro de las mismas:

Al Instituto de Fisiología Celular (IFC) por promover un ambiente óptimo para la ciencia donde los seminarios académicos están llenos de interesantes discusiones que permiten generar ciencia de calidad internacional. Al Bioterio del IFC y a todo su personal, especialmente a la Dra. Claudia Rivera Cerecedo y al Dr. Héctor Malagón Rivero, por el apoyo brindado en el cuidado de la colonia de ratones utilizada en este proyecto. Al personal de la Unidad de Biología Molecular del IFC, especialmente a la Dra. Laura Ongay Larios, por su apoyo técnico en el manejo correcto de los equipos de la Unidad.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) y a todos sus investigadores que me transmitieron un poco de su conocimiento. A Cynthia Lima Cruz y a Mayra Ocegüera Jiménez en la Secretaría de Enseñanza del IIB por su inmensa ayuda e infinita paciencia en todos los trámites necesarios para titularme de la manera más eficiente posible. Al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba por su apoyo en la operación del Irradiador autoblandado Gammacell-1000 del IIB.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo y a todo su personal por la atención y apoyo en el manejo de los citómetros utilizados para el análisis de las muestras experimentales.

A la Facultad de Medicina donde pude estudiar y desarrollarme profesionalmente. Al Dr. Rodolfo García Contreras por su amabilidad y apoyo al otorgarme un donativo (PAPIIT-IA201116) para realizar este proyecto de investigación.

A la Unidad de Movilidad Académica y Vinculación Interinstitucional de la Facultad de Medicina quienes me apoyaron para obtener la beca “SEP-UNAM-FUNAM Capacitación en Métodos de Investigación” y realizar una estancia corta de investigación en Alemania.

A la Universitätsklinikum Eppendorf en Hamburgo, Alemania. Al Dr. Nicola Gagliani de esa universidad por aceptarme en su laboratorio y transmitirme un poco de su conocimiento. A todos sus estudiantes y colaboradores por permitirme apoyar en diversos experimentos y hacer de mi estancia corta una gran y productiva experiencia.

Finalmente, debo agradecer el financiamiento brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CB-2015-01-255287 y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA202116 para realizar este proyecto de investigación.

## **Agradecimientos Personales**

Así como académicamente este proyecto hubiera sido imposible sin todo el apoyo brindado, debo agradecer a todas esas personas que, sin estar obligadas a ello, me apoyaron en mayor o menor medida durante mi formación académica.

En primer lugar debo agradecer a toda mi familia que siempre ha creído en mí y ha apoyado todas las decisiones que he tomado. A mis padres Amalia Vázquez y Gerardo Pérez y a mi hermano Erick por su apoyo incondicional; sin ellos no hubiera logrado nada. A mi tía Liliana Vázquez por ser toda la vida una segunda madre.

También quiero agradecer a todos los doctores que me permitieron participar en sus laboratorios durante mi desarrollo académico: A la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta y al Dr. Luis Felipe Montañón en cuyo laboratorio hice mis pininos en investigación y me introduje al mundo de la ciencia en México. Al Dr. Enrique Ortega Soto y a su laboratorio, donde descubrí mi pasión por la inmunología. Al Dr. Óscar Prospero García, quien me apoyó grandemente en mi desarrollo académico y en cuyo laboratorio maduré muchas ideas sobre la ciencia y la investigación. A la Dra. Paula Licona Limón quién además de permitirme realizar esta tesis en su laboratorio, me transmitió su pasión por la inmunología y su ambición por mejorar la ciencia de este país. Al Dr. Nicola Gagliani por la oportunidad de trabajar en su laboratorio de forma independiente.

Gracias a todas las personas que conocí en las clases de la carrera, en esos laboratorios y quienes más que mis compañeros de trabajo se volvieron grandes amigos: A Cecilia, Aldo, Alex, Nisa, Fabiola, Luis y Rodrigo por compartir las penas y alegrías de todas las clases. A Pris y Ana por ser mis primeras maestras en la ciencia. A Ofe, Lups, Andrea, Junior y Ely por el apoyo y la paciencia ante mis errores. A Toño, Alfonso, Daniel, Ricardo, Asaí y Bruno por discusiones tan interesantes pero nunca determinadas. A Raful, Aranzazú, Emmanuel, Ofelia, al compañero Enrique: gracias por hacer del laboratorio un gran espacio para discutir, reír y exponer todo tipo de ideas. A José Luis por ser siempre un gran apoyo; a Lups por ser siempre un ejemplo de dedicación y determinación; a Eugenio por los experimentos, las discusiones y las reflexiones de vida.

A esos muchachos de Prepa 6 con los que cuento siempre y cada vez formamos más recuerdos. Natalia, Armando, Javier, Paó, Anyel, Isaías: ha sido increíble crecer con ustedes todos estos años. A Fer, por las buenas pláticas y los mejores momentos. A Diana y Xanat por nunca perder la amistad y la confianza. Siempre gracias a Ameyalli; por darme tu infinito apoyo en los momentos difíciles y la tranquilidad para seguir adelante.

A todas esas personas que me han acompañado y apoyado a lo largo de esta vida. Gracias por toda su amistad, por estar en los buenos y en los malos momentos.

# ÍNDICE

<b>1. LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
2.1 Abstract.....	10
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
3.1. El sistema inmunológico .....	11
3.2 Los linfocitos .....	11
3.3 Linfocitos Th1, CTL e IFN- $\gamma$ .....	16
3.4 El sistema inmunológico durante el envejecimiento.....	17
3.5 TGF- $\beta$ en el sistema inmunológico .....	18
3.6 TIF1 $\gamma$ y la Familia de Proteínas TRIM .....	20
3.7 TIF1 $\gamma$ en el sistema inmunológico .....	22
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>25</b>
5.1 Objetivos Particulares .....	25
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
7.1 Ratones .....	26
7.2 Genotipificación de ratones. ....	26
7.3 Purificación de células CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD44 <sup>-</sup> “naïve” .....	28
7.4 Conteo celular por cámara de Neubauer .....	28
7.5 Preparación de esplenocitos irradiados .....	29
7.6 Cocultivo in vitro de linfocitos T .....	29
7. 7 Ensayo de inhibición por TGF- $\beta$ .....	29

7.8 Reestimulación de linfocitos T y tinción intracelular de citocinas. ....	30
7. 9 Anticuerpos utilizados .....	31
7.10 Producción basal de IFN- $\gamma$ en ratones jóvenes y viejos.....	31
7.11 Inoculación de Células de Melanoma Murino .....	32
7.14 Adquisición de muestras .....	33
7.15 Análisis estadístico.....	33
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
8.1 Fenotipo en homeostasis de linfocitos T de ratones jóvenes y viejos .....	34
8.2 Polarización <i>in vitro</i> hacia fenotipos Th1 y Th2 de linfocitos T cooperadores deficientes de TIF1 $\gamma$ . ....	40
8.3 Efecto de la inhibición por TGF- $\beta$ <i>in vitro</i> .....	42
8.4 Respuesta anti-tumoral de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ .....	46
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>11. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO I. EXTRACCIÓN DE CÉLULAS DE ÓRGANOS LINFOIDES .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO II. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T “NAÏVE” CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>..</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO III. CONTROLES DE FLUORESCENCIA MENOS UNO DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA ANALIZAR POBLACIONES DE LINFOCITOS DE LOS DISTINTOS ÓRGANOS.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO IV. ANÁLISIS DE IC50 DE LAS DISTINTAS POBLACIONES DE LINFOCITOS POLARIZADOS <i>IN VITRO</i>. .....</b>	<b>63</b>
<b>12. REFERENCIAS .....</b>	<b>64</b>

## 1. Lista de abreviaturas

- **ADN.** Ácido Desoxirribonucleico.
- **APC.** Del inglés: Antigen Presenting Cell.
- **BCR.** Del inglés: B cell Receptor
- **CD.** Del inglés: Cluster of Differentiation. \*
- **CTL.** Del inglés: Citotoxic T Lymphocyte.
- **IL-.** Interleucina. \*
- **ILC.** Del inglés: Innate Lymphoid Cell.
- **IFN-.** Interferón
- **IMF.** Intensidad Media de Fluorescencia
- **MHC.** Del inglés: Major Histocompatibility Complex. \*\*
- **mTEC.** Del inglés: Medullary Thymic Epithelial Cell.
- **NK.** Del inglés: Natural Killer cell.
- **PCR.** Del inglés: Polimerase Chain Reaction.
- **RA.** Del inglés: Retinoic Acid
- **RAR.** Del inglés: Retinoic Acid Receptor\*\*
- **SBE.** Del inglés: SMAD Binding Site.
- **TCR.** Del inglés: T Cell Receptor
- **TGF- $\beta$ .** Del inglés: Transforming Growth Factor beta
- **TGF- $\beta$ R.** Del inglés: TGF- $\beta$  Receptor.
- **Tfh.** Del inglés. T follicular helper cell.
- **Th.** Del inglés. T helper cell. \*\*
- **TIF.** Del inglés. Transcription Intermediary Factor. \*\*
- **Treg.** Del inglés. T regulatory cell.
- **TRIM.** Del inglés. Tripartite Motif. \*\*

\* Esta abreviatura siempre va acompañada de un número.

\*\*Esta abreviatura puede o no ir acompañada de un número o carácter.

## 2. Resumen

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  ó TGF- $\beta$  participa en procesos de tolerancia antigénica y regulación de la respuesta inflamatoria. El TGF- $\beta$  favorece la diferenciación de algunos linajes de linfocitos T mientras que inhibe otros. Se ha propuesto que ejerce estos efectos a través de diversas vías de señalización.

La señalización canónica del TGF- $\beta$  depende completamente de proteínas SMAD. TIF1 $\gamma$  es una proteína nuclear que reconoce modificaciones en la histona H3 y es capaz de modular la vía de señalización canónica a través de monoubiquitinar a SMAD4 y unirse al complejo activado de SMAD2/3 para modificar la expresión génica y la respuesta celular al TGF- $\beta$ . Se ha descrito que TIF1 $\gamma$  es importante durante el desarrollo y la diferenciación celular de progenitores hematopoyéticos.

Este proyecto buscó determinar si TIF1 $\gamma$  también regula la diferenciación de linfocitos T, particularmente la polarización de los fenotipos proinflamatorios Th1 y CTL, utilizando un modelo murino deficiente de esta proteína específicamente en células CD4<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos muestran que la ausencia de TIF1 $\gamma$  no afecta la población de linfocitos Th1 ni CTLs de ratones jóvenes en condiciones de homeostasis. No obstante, durante el envejecimiento las poblaciones Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>, que incrementan 50% en los ratones control, no cambian su frecuencia en ausencia de TIF1 $\gamma$ .

Además, experimentos *in vitro* mostraron que los linfocitos CD4<sup>+</sup> de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  cultivados en condiciones polarizantes a Th1 no generaban adecuadamente la población IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> pues en presencia o ausencia de TGF- $\beta$  la frecuencia de esta población no fue mayor al 2%. Esto muestra que los linfocitos deficientes de TIF1 $\gamma$  presentan defectos en la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, en un modelo de melanoma se observó que los ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  presentaban un mejor control del crecimiento tumoral a pesar de no observar diferencias en las frecuencias o números de linfocitos productores de IFN- $\gamma$ .

Las observaciones anteriores nos permiten sugerir que TIF1 $\gamma$  regula la expresión de CXCR3 pero no la producción de IFN- $\gamma$  en condiciones de inflamación. El mecanismo molecular por el cual TIF1 $\gamma$  regula este receptor de quimiocinas no se determinó y serán necesarias nuevas estrategias experimentales para responder esa pregunta. Los resultados obtenidos muestran que la deficiencia de TIF1 $\gamma$  favorece la inmunidad anti-tumoral. No obstante es posible que otros aspectos de la respuesta inmunológica como el control de infecciones o la regulación de la inflamación estén comprometidos en ausencia de TIF1 $\gamma$ .

## 2.1 Abstract

Transforming Growth Factor  $\beta$  or TGF- $\beta$  participates on antigen tolerance and the regulation of the inflammatory response. TGF- $\beta$  induces differentiation of some T cell lineages but inhibits others. It has been proposed that it exerts these effects through different signaling pathways.

Canonical TGF- $\beta$  signaling relies completely on SMAD proteins. TIF1 $\gamma$  is a nuclear protein that recognizes histone H3 modifications and is capable of modulating the canonical signaling pathway by monoubiquitinating SMAD4 and binding to the active SMAD2/3 complex to change the binding sites in the genome and cellular response to TGF- $\beta$ . It has been described that TIF1 $\gamma$  is important during development and cell differentiation of hematopoietic progenitors.

This project aimed to determine if TIF1 $\gamma$  also participates in T cell differentiation, especially on the proinflammatory Th1 and CTL lineages, using a mouse model deficient of this protein specifically on CD4<sup>+</sup> cells. The results show that TIF1 $\gamma$  deficiency does not affect Th1 or CTL populations of young mice in homeostasis. However, during ageing the 50% physiological increase of Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> populations observed in control mice is not observed in the absence of TIF1 $\gamma$ .

In addition, *in vitro* experiments showed that CD4<sup>+</sup> cells from mice lacking TIF1 $\gamma$  cultured in Th1 polarizing conditions did not produced the IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> population correctly because in presence or absence of TGF- $\beta$  the frequency of this population was never higher than 2%. This shows that lymphocytes lacking TIF1 $\gamma$  had defects in the expression of the chemokine receptor CXCR3 *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, in a melanoma model, mice lacking TIF1 $\gamma$  had improved control of tumor growth compared to the control group. However, there were no differences in frequencies or total numbers of IFN- $\gamma$  producing lymphocytes.

These observations let us suggest that TIF1 $\gamma$  regulates CXCR3 expression (but not IFN- $\gamma$  production) in inflammatory conditions. The molecular mechanism by which TIF1 $\gamma$  regulates this chemokine receptor was not determined and novel experimental strategies will be necessary to answer this question. The obtained results show that TIF1 $\gamma$  deficiency promotes anti-tumoral immunity. However, it is possible that other aspects of the immune response such as infection control or inflammation regulation are affected in the absence of TIF1 $\gamma$ .

### **3. Introducción**

#### *3.1. El sistema inmunológico*

El sistema inmunológico es un sistema de defensa que permite a los organismos reconocer agentes ajenos y responder activamente para eliminarlos. Este sistema puede componerse únicamente por barreras físicas y químicas que evitan la entrada de agentes infecciosos o incluir grupos de células especializadas que responden coordinadamente para mantener la integridad del organismo.

La respuesta inmunológica se clasifica en innata y adaptativa. La inmunidad innata genera una respuesta rápida contra el antígeno que reconoce, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, “Pathogen Recognition Receptor”), moléculas en la superficie de los agentes infecciosos. Esta respuesta depende de células mieloides, como monocitos, macrófagos, células dendríticas y células polimorfonucleares: neutrófilos, basófilos y células cebadas. También participa un grupo de proteínas solubles conocidas en conjunto como Complemento. Además, participan células linfoides innatas (ILCs, por sus siglas en inglés: Innate Lymphoid Cells) que son capaces de activarse en respuesta a alarminas en el microambiente y secretar citocinas que permitirán controlar la infección.

Por su parte, la respuesta adaptativa está conformada por células de origen linfocito llamadas linfocitos. Esta respuesta se desarrolla en el transcurso de varios días y permite reconocer al antígeno con alta especificidad pues los linfocitos expresan en su superficie receptores recombinados que les permiten distinguir con alta afinidad un solo tipo de antígeno. En estas poblaciones celulares reside la memoria inmunológica. Ésta depende de las poblaciones de linfocitos que fueron capaces de reconocer al antígeno y se mantienen en el organismo para actuar, de manera rápida y eficiente en caso de una segunda infección. Varias publicaciones recientes han sugerido que poblaciones celulares innatas también son capaces de generar memoria respondiendo de una mejor manera en una segunda infección (Pérez-Vázquez, Contreras-Castillo, & Licona-Limón, 2018). El conjunto de células de las respuestas inmunológicas actúa de manera orquestada espacial y temporalmente durante una infección para lograr la erradicación del patógeno y la protección del organismo.

#### *3.2 Los linfocitos*

Las células de origen linfocito participan tanto en la respuesta inmunológica innata como en la adaptativa. Las células que participan en la respuesta innata se conocen como ILCs mientras que las que participan en la respuesta inmunológica adaptativa se denominan linfocitos. Históricamente, los linfocitos fueron los primeros en describirse fenotípicamente y funcionalmente. A diferencia de los linfocitos las ILCs no expresan receptores antígeno específicos y son residentes de tejido (Colonna, 2018). No obstante, las subpoblaciones de ILCs que se han descrito

hasta ahora asemejan a los diferentes fenotipos que pueden adquirir los linfocitos T, aunque no son redundantes.

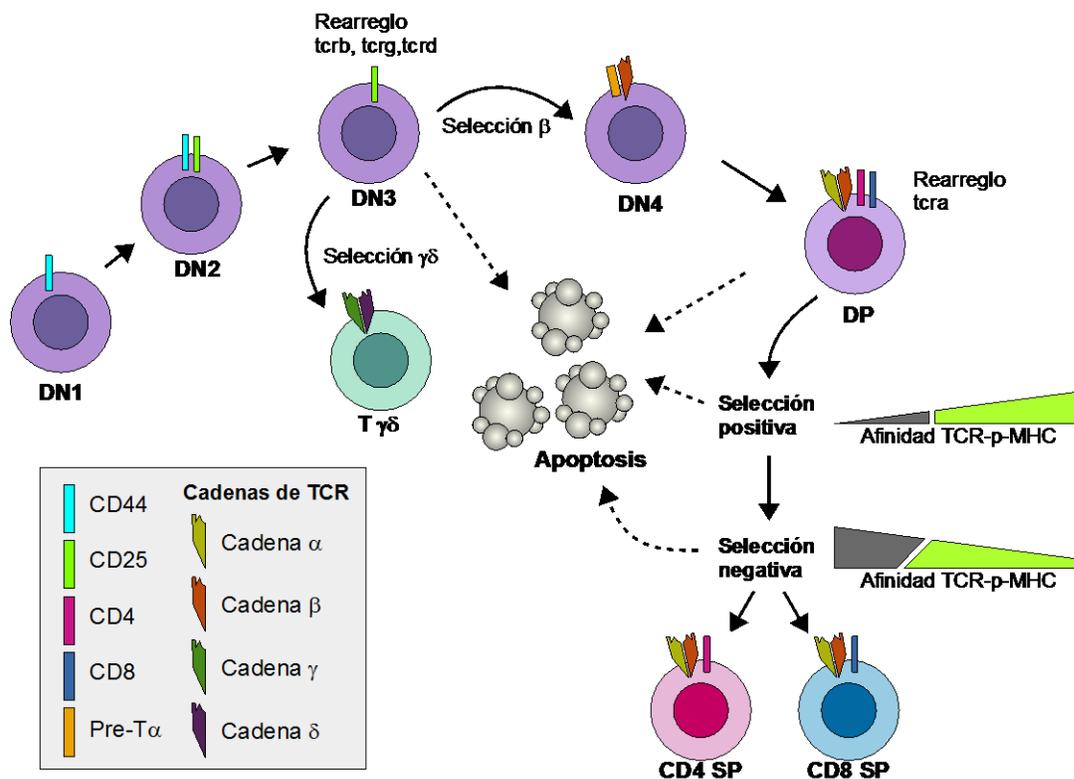
Los linfocitos B y T participan en la respuesta inmunológica adaptativa: Los linfocitos B maduran en la médula ósea y cuando egresan de ésta expresan un receptor específico para un antígeno en su superficie conocido como receptor de célula B (BCR, "B Cell Receptor"). Cuando los linfocitos B reconocen por primera vez un antígeno a través de su BCR, proliferan rápidamente y pueden diferenciarse a una célula B de memoria o una célula plasmática. Las células B de memoria mantienen la expresión superficial del BCR, pueden mantenerse quiescentes por años en el organismo y se activarán si vuelven a reconocer su antígeno afín. Las células plasmáticas por su parte, se especializan en secretar grandes cantidades de anticuerpo que expresaban en su superficie. Este anticuerpo marcará al antígeno presente en el estímulo patológico para que sea reconocido por otras células y moléculas del sistema inmunológico a fin de neutralizarlo y erradicarlo eficazmente (Murphy & Weaver, 2017).

Los linfocitos T también provienen de la médula ósea pero deben migrar al timo para madurar. Dentro del timo, los progenitores linfoides desarrollarán un receptor de célula T (TCR, "T Cell Receptor") capaz de reconocer un antígeno con alta especificidad y responder adecuadamente al mismo. Se han reconocido estadios de maduración en los timocitos nombrados por la expresión de los correceptores CD4 y CD8, como dobles negativos (DN), dobles positivos (DP) y simples positivos (SP) CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (Famili, Wiekmeijer, & Staal, 2017; Germain, 2002). A su vez, el estadio DN puede subdividirse en 4 estadios categorizados por la expresión de CD44 y CD25: DN1 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>), DN2 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>) y DN4 (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) (Divya, K. & Zuniga-Pflucker, J, 2014).

Durante el estadio DN ocurren los primeros eventos que permitirán la generación de un TCR funcional. Existen 2 tipos de TCR: TCR  $\alpha\beta$  y TCR  $\gamma\delta$  nombrados en función de las cadenas peptídicas que los componen. La primera decisión durante el desarrollo tímico es la expresión de uno de estos tipos de TCR (Kreslavsky, Gleimer, Garbe, & von Boehmer, 2010). Durante el estadio DN3, ocurre la recombinación de los loci *tcrb*, *tcr $\gamma$*  y *tcrd*. Un rearreglo exitoso de la cadena TCR  $\beta$  permitirá su unión con la cadena pre-T $\alpha$  e inducirá la proliferación, supervivencia y posterior diferenciación de esa clona de timocito hacia el estadio DP. Además, permitirá el silenciamiento del locus *tcr $\gamma$*  y el rearreglo del gen *tcr $\alpha$* . Por otro lado, cuando los timocitos expresan un TCR  $\gamma\delta$  funcional, se detiene el rearreglo del locus *tcrb* y se permite la maduración de linfocitos de linaje  $\gamma\delta$  (Kreslavsky et. al., 2010).

Cuando los timocitos han expresado correctamente una cadena de TCR  $\beta$  con la cadena pre T $\alpha$ , maduran al estadio DP. Durante este estadio ocurre el rearreglo de la cadena TCR  $\alpha$  y los timocitos pasan por procesos de selección positiva y

negativa (Famili *et. al.*, 2017). Estos procesos de selección ocurren por la interacción de los linfocitos con células que presentan diversos péptidos propios a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, “Major Histocompatibility Complex”) como células dendríticas y células epiteliales tímicas de la médula (mTECs, “medullary Thymic Epithelial Cells”). La selección positiva promueve la supervivencia de clones de timocitos que expresan TCRs capaces de reconocer moléculas de MHC propias mientras que aquellos que no, mueren por apoptosis. Por otro lado, si las clones de linfocitos que reconozcan, a través de su TCR, complejos de MHC con péptido propios con alta avidéz, serán seleccionadas negativamente y eliminados por apoptosis (Klein, Kyewski, Allen, & Hogquist, 2014). Ambos procesos de selección son necesarios para generar un repertorio de linfocitos T maduros que no reaccione contra el propio organismo y evite así el desarrollo de autoinmunidad (Murphy & Weaver, 2017), este mecanismo se conoce como tolerancia central. Los linfocitos que sobreviven ambos procesos de selección se convertirán en células SP maduras que migrarán a la periferia y serán capaces de reconocer específicamente antígenos externos presentados a través de moléculas de MHC e inducir una respuesta inmunológica acorde al antígeno reconocido (**Figura 1**).



**Figura 1. Desarrollo de timocitos.** Los linfocitos T, a diferencia de las demás células hematopoyéticas, maduran en el timo. Dentro de este órgano ocurren los procesos de rearreglo de TCR ( $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ) y selección positiva y negativa que generan linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> capaces de montar una respuesta inmunológica eficiente en el organismo.

Los linfocitos T se dividen en linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos (Th y CTLs respectivamente, “T helper” y “Cytotoxic T Lymphocytes”). Los CTLs se caracterizan por expresar en su membrana la glicoproteína CD8 y reconocer péptidos en el contexto de moléculas de MHC clase I. Estas células participan en la inmunidad antiviral y antitumoral. Cuando se reconoce un péptido de origen viral, los CTLs se encargan de inducir apoptosis en la célula infectada antes de que termine la replicación viral y los virus se diseminen.

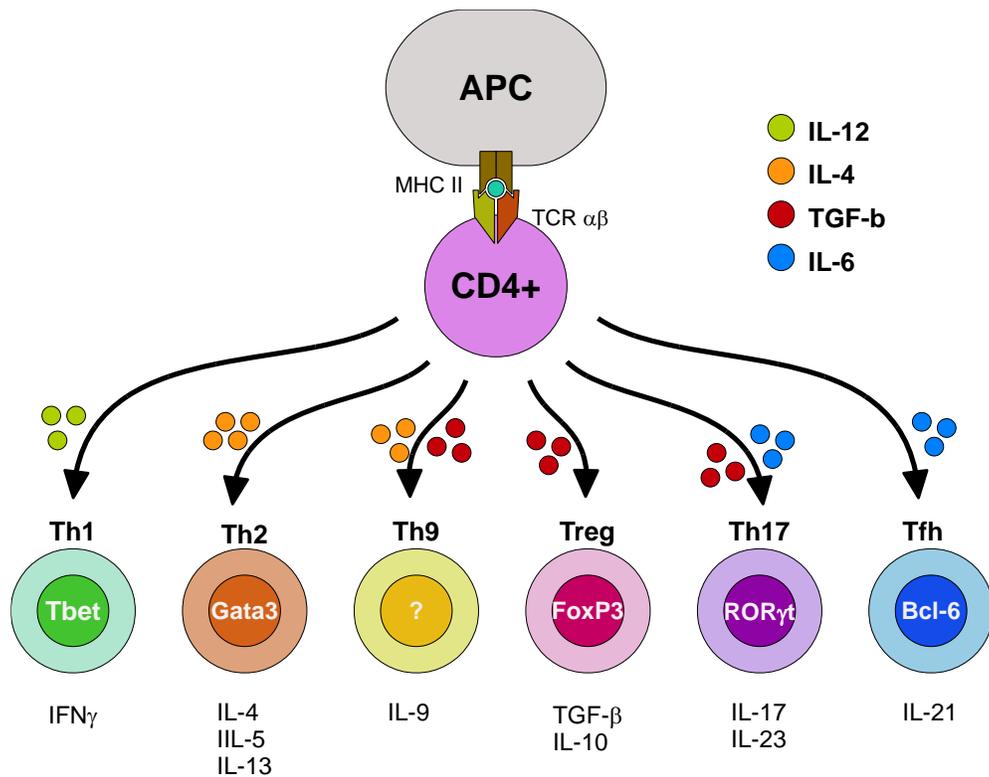
Los linfocitos Th reconocen antígenos peptídicos presentados en el contexto de moléculas de MHC clase II en la membrana de células presentadoras de antígeno (APCs, “Antigen Presenting Cells”): macrófagos, células dendríticas, linfocitos B e ILCs (Oliphant *et. al.*, 2014). Todos los linfocitos T cooperadores se caracterizan por la expresión de la glicoproteína de membrana CD4 y son capaces de polarizarse hacia diversos fenotipos dependiendo del antígeno que infecte al organismo. Cuando los Th reconocen un antígeno específico a su TCR, proliferan rápidamente y secretan citocinas específicas dependiendo del fenotipo que adquieran (**Figura 2**). Cada fenotipo de células Th se caracteriza por la expresión de un factor de transcripción específico que rige la expresión de marcadores de membrana y la secreción de citocinas específicas. Los diversos fenotipos a los que pueden polarizarse los linfocitos Th se detallan a continuación:

- Th1. Los linfocitos Th1 se caracterizan principalmente por la expresión del factor de transcripción T-bet y la secreción de Interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Szabo *et. al.*, 2000). Estas células se polarizan en respuesta a IL-12 generada en una infección por patógenos intracelulares, como algunas bacterias y virus (Hirahara & Nakayama, 2016). Además, éstas células expresan el receptor de quimiocinas CXCR3 en su superficie lo que les permite migrar hacia los sitios de inflamación (Collins, Tsui, & Shulman, 2002; Lord, 2005).
- Th2. Para diferenciarse, las Th2 requieren detectar Interleucina (IL-) 4 en el microambiente y expresar el factor de transcripción Gata3 (Josefowicz, 2013). Éste fenotipo celular secreta IL-4, IL-5 e IL-13 y promueve respuestas mediadas por eosinófilos, basófilos y células cebadas (Hirahara & Nakayama, 2016) para controlar infecciones por parásitos extracelulares como helmintos. No obstante, los linfocitos Th2 también están involucrados en el desarrollo de alergias y asma pues favorecen la generación de anticuerpos IgE.
- Th9. Las infecciones parasitarias de helmintos, además de inducir la polarización de linfocitos Th2, también permiten que los linfocitos se polaricen hacia el fenotipo Th9 y expresen IL-9 (Licona-Limón, Arias-Rojas, & Olguín-Martínez, 2017). Estas células se polarizan cuando hay IL-4 y TGF- $\beta$  en el microambiente. Actualmente no se conoce un factor de transcripción único que rija la diferenciación de los linfocitos Th9. Se han

propuesto varios candidatos pero todos ellos se comparten con otras poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>.

- Th17. Los linfocitos Th17 secretan principalmente la citocina IL-17 y participan en la inmunidad contra bacterias extracelulares y hongos (Annunziato, Romagnani, & Romagnani, 2015). Estos linfocitos requieren del factor de transcripción ROR $\gamma$ t para su diferenciación además de IL-6 y TGF- $\beta$  en el microambiente (Ivanov *et. al.*, 2006). Éste fenotipo celular es muy plástico y, dependiendo del microambiente de citocinas, puede adquirir un fenotipo proinflamatorio y secretar IFN- $\gamma$  o un fenotipo regulador, conocido como Tr1, y secretar IL-10 (Gagliani *et. al.*, 2015).
- Tfh. Durante el transcurso de una infección, por cualquier tipo de patógeno, las células T cooperadoras foliculares participan promoviendo la producción de anticuerpos de alta afinidad por células B. Las células Tfh requieren IL-6 para polarizarse y expresan CXCR5 y PD-1 en su superficie. (Deenick & Ma, 2011). Estas células expresan a Bcl6 como factor maestro de la transcripción y secretan IL-21 (Nurieva *et. al.* 2009).
- Treg. Las células T reguladoras se polarizan en presencia de TGF- $\beta$ . Este tipo de linfocitos se encarga de suprimir las respuestas de los fenotipos efectores previniendo así el desarrollo de autoinmunidad y manteniendo al sistema controlado en homeostasis (Ohkura, Kitagawa, & Sakaguchi, 2013). Estos linfocitos pueden generarse desde el timo o en periferia (Klein *et. al.*, 2018). Para generarse, los linfocitos Treg requieren del factor de transcripción FoxP3 (Rudensky, 2011). Dependiendo del subtipo de linfocito Treg, estas células pueden secretar TGF- $\beta$  o IL-10.

Se ha observado que estos fenotipos celulares pueden trans-diferenciarse a otros en respuesta a citocinas u otros factores solubles presentes en el microambiente como el ácido retinoico o los ácidos grasos de cadena corta (Zhou, Chong, & Littman, 2009).



**Figura 2. Polarización de Linfocitos CD4<sup>+</sup>.** Cuando el TCR de un linfocito CD4<sup>+</sup> reconoce un antígeno presentado por una APC a través de un MHC II, prolifera y puede polarizarse hacia distintos fenotipos celulares dependiendo del microambiente de citocinas en el medio. Cada uno de estos fenotipos secretará distintas citocinas que permitirán coordinar la respuesta inmunológica en respuesta a un agente extraño.

### 3.3 Linfocitos Th1, CTL e IFN- $\gamma$

La polarización de los linfocitos T cooperadores hacia los distintos fenotipos depende del microambiente de citocinas generado por el patógeno. Los patógenos intracelulares como algunas bacterias, virus y protozoarios inducen la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  que permitirán la polarización de linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia un fenotipo Th1 y CD8<sup>+</sup> a CTLs (Hirahara & Nakayama, 2016).

La IL-12 induce la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos Th1 y CTLs. Esta citocina pro-inflamatoria induce la expresión del factor de transcripción maestro T-bet que a su vez favorece la producción de IFN- $\gamma$  creando un ciclo de retroalimentación positiva y estabilizando el fenotipo de los linfocitos Th1 (Szabo *et. al.*, 2000). La presencia de IFN- $\gamma$  promueve un microambiente pro-inflamatorio que favorece la actividad de células asesinas naturales (NK, "Natural Killer Cells") y macrófagos pro-inflamatorios mientras que inhibe las poblaciones de células Th2 y Treg (Castro, F., *et. al.*, 2018).

Además de favorecer la producción de IFN- $\gamma$ , T-bet induce la transcripción de otros genes relacionados al fenotipo Th1 como el receptor de quimiocinas CXCR3. Este receptor se induce rápidamente luego de la activación de linfocitos Th1 y CTL y les

permite migrar hacia sitios de inflamación (Groom & Luster, 2011). Este receptor también se expresa por células NK, la contraparte innata de los linfocitos CD8<sup>+</sup> (Groom & Luster, 2011). CXCR3 no sólo permite la migración de linfocitos a sitios de inflamación, se ha mostrado que este receptor también está implicado en el balance entre células efectoras y células de memoria. La expresión de CXCR3 favorece la generación de células efectoras e inhibe la generación de células de memoria (Kurachi, M. *et. al.*, 2011, Hu, J.K. *et. al.*, 2011).

El IFN- $\gamma$ , además participar en el control de infecciones, tiene un papel muy importante en la inmunidad antitumoral. Esta citocina ejerce sus efectos no sólo en las células inmunológicas sino directamente en las células tumorales. Por un lado, se ha visto que favorece la motilidad y citotoxicidad de linfocitos T (Bhat, P., *et. al.*, 2017). Por el otro, el IFN- $\gamma$  puede inducir la expresión de las Caspasas -1, -3 y -8 en células tumorales y en consecuencia su apoptosis. Esta citocina también induce la expresión de las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, los ligandos de CXCR3, favoreciendo el reclutamiento de poblaciones proinflamatorias. Debido a sus variadas funciones, los niveles de IFN- $\gamma$  en los tumores se han utilizado como un marcador de buena prognosis (Castro, F., *et. al.*, 2018).

A pesar de su importancia en el control de infecciones y el desarrollo tumoral, la producción de IFN- $\gamma$ , cuando no es correctamente regulada, se ha relacionado con el desarrollo de autoinmunidad (Ivashkiv, 2018).

### *3.4 El sistema inmunológico durante el envejecimiento.*

Durante el envejecimiento, existe un incremento en la circulación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y sus receptores. Se ha reportado que los niveles de IFN- $\gamma$ , CXCR3 y sus ligandos se encuentran elevados durante la vejez en humano y ratón (G. Chen, Lustig, & Weng, 2013). El microambiente pro-inflamatorio causado, entre otras cosas, por el incremento de IFN- $\gamma$  durante el envejecimiento, además de afectar la respuesta inmunológica innata y adaptativa, también ha sido asociado a enfermedades relacionadas con la edad (Vasto *et. al.*, 2007). Además, niveles elevados de IFN- $\gamma$  también se han visto relacionados con la desregulación de ritmos circadianos y algunos desordenes psiquiátricos asociados con la edad (Cayetantot, Nygård, Perret, Kristensson, & Aujard, 2009; Oxenkrug, 2011).

Se ha propuesto que este estado de inflamación crónica de bajo grado es la causa del desarrollo de enfermedades asociadas con la edad como el síndrome metabólico y las enfermedades neurodegenerativas (Franceschi, *et. al.* 2017).

La composición celular del sistema inmunológico cambia durante la vejez. En particular, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentan una disminución en actividad: baja el número de células “naïve” (Gupta *et. al.*, 2004), baja su capacidad de activarse y expandirse, la señalización a través de TCR, presentan poca producción de IL-2 y baja capacidad de cooperar con las células B (Maue, *et. al.*, 2009). Por su parte,

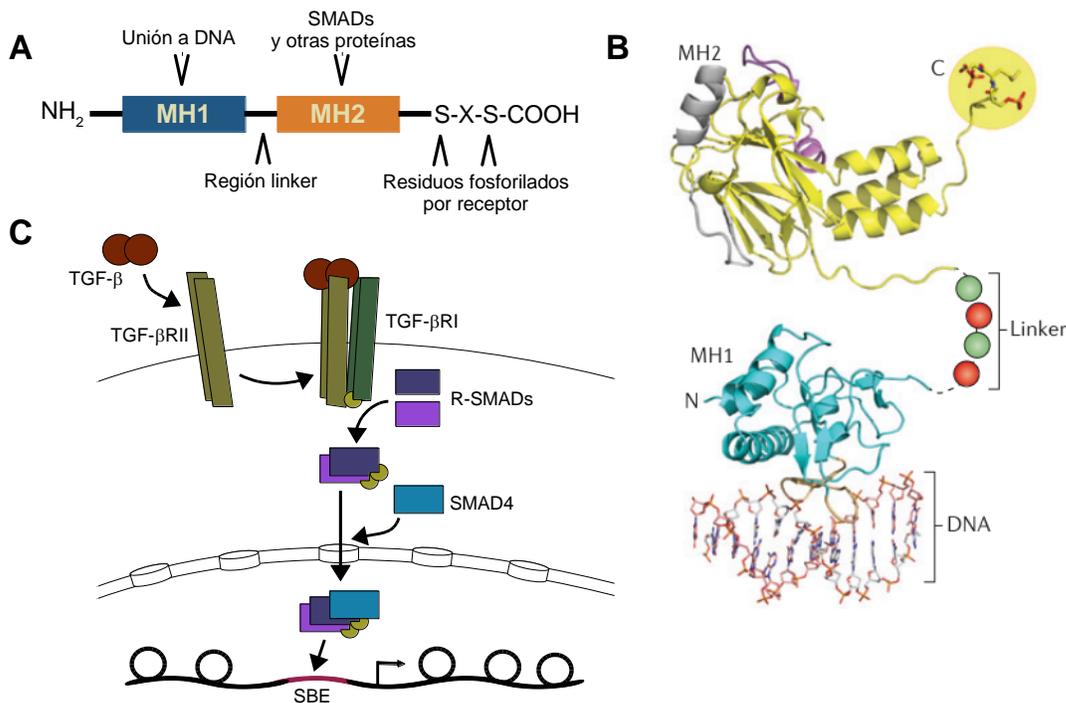
los linfocitos CD8<sup>+</sup> disminuyen su capacidad de responder a nuevos antígenos, presentan defectos en la generación de memoria y disminuye la diversidad en el repertorio de TCR (Maue, *et. al.*, 2009). Estos cambios afectan la capacidad de respuesta del sistema inmunológico y hacen al organismo propenso a enfermedades infecciosas, autoinmunes y crónicas degenerativas.

### 3.5 TGF- $\beta$ en el sistema inmunológico

El Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , “Transforming growth factor beta”) es una citocina pleiotrópica con efectos diversos y algunas veces hasta opuestos dependiendo del microambiente, el tipo y el contexto celular. Esta citocina pertenece a una superfamilia de proteínas con importantes y diversas funciones durante el desarrollo y la respuesta inmunológica. Existen 3 isoformas de TGF- $\beta$  en mamíferos TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3; de las cuales, el TGF- $\beta$ 1 es el más expresado por las células del sistema inmunológico.

El TGF- $\beta$  ejerce sus funciones a través de distintas vías de señalización. Su vía canónica tiene como efectores principales a proteínas de la familia SMAD. Las 8 proteínas que conforman esta familia en mamíferos tienen 2 dominios globulares, MH1 y MH2, unidos por una región “linker” (**Figura 3A**). El dominio MH1 permite a las proteínas SMAD interactuar con el DNA, reconociendo la secuencia palindrómica 5'-GTCTAGAC-3' conocida como elemento de unión a SMAD (SBE, “Smad Binding Element”). Por su parte, el dominio MH2 permite a las SMADs formar hetero-oligómeros e interactuar con otras proteínas como factores de transcripción, lectores de cromatina, coactivadores y correpresores (David & Massagué, 2018) (**Figura 3B**).

La señalización canónica inicia cuando un dímero de ligando extracelular (TGF- $\beta$ ) se une al receptor de TGF- $\beta$  tipo II (TGF- $\beta$ RII). Cuando esto ocurre, el receptor se oligomeriza con el receptor tipo I (TGF- $\beta$ RI) fosforilándolo y permitiendo su actividad de cinasa de residuos de Ser y Thr. Lo anterior le permite al TGF- $\beta$ RI reclutar y fosforilar a las proteínas SMAD2 y SMAD3 (conocidas en conjunto como R-SMADs) en sus residuos Ser del extremo carboxilo terminal. Las R-SMADs fosforiladas forman un dímero que es reconocido por SMAD4 y traslocado al núcleo donde interactúa con SBEs en el DNA para permitir la transcripción de genes en respuesta al TGF- $\beta$  (Gaarenstroom & Hill, 2014) (**Figura 3C**). Una vez en el núcleo las R-SMADs pueden ser desfosforiladas y/o ubiquitinadas para dar término a la señalización del TGF- $\beta$ .



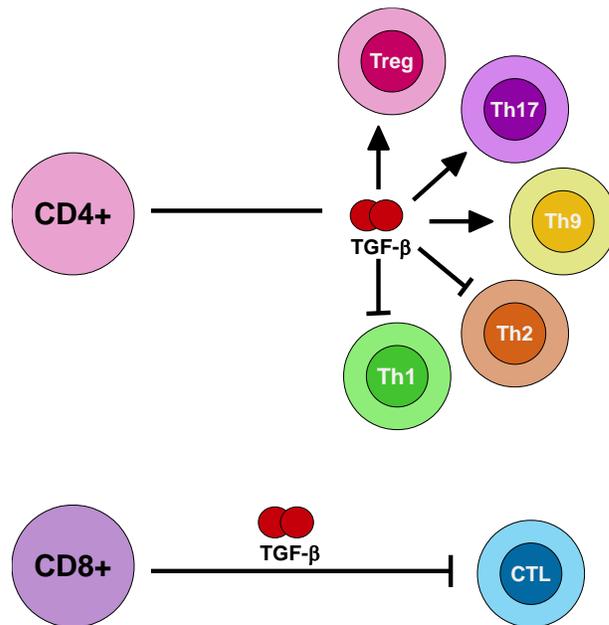
**Figura 3. SMADs y Señalización canónica de TGF- $\beta$ .** **A)** Estructura general de las proteínas R-SMAD. Estas proteínas presentan un dominio MH1 a través del cual reconocen SBEs en el DNA y un dominio MH2 que les permite oligomerizarse e interactuar con otras proteínas. Además, estas proteínas tienen la secuencia Ser-X-Ser (donde X puede ser cualquier aminoácido) en el extremo carboxilo terminal donde son fosforiladas por el TGF- $\beta$ RI. **B)** Estructura cristalográfica de los dominios MH1 (azul) y MH2 (amarillo) de SMAD3 fosforilado y unido a DNA. Tomado de Massagué, 2012. **C)** Esquema de la señalización canónica de TGF- $\beta$ . Cuando el ligando extracelular se une al TGF- $\beta$ RII, éste fosforila al TGF- $\beta$ RI induciendo un cambio conformacional que activa su actividad de Ser/Thr cinasa y permite que fosforile las proteínas R-SMAD. Las R-SMADs fosforiladas pueden interactuar con SMAD4 y trasladarse al núcleo donde se unirán a SBE induciendo o reprimiendo la transcripción génica.

Existen vías de señalización no canónicas, activadas por el TGF- $\beta$  a través de la vía de MEK/ERK, Rho y PI3K o de vías parcialmente dependientes de la vía canónica, como la vía de TIF1 $\gamma$  (He *et. al.*, 2006; Massagué, 2012). El TGF- $\beta$  es central en la regulación inmunológica entre la respuesta inflamatoria y la tolerancia inmunológica. Esta citocina regula, a través de distintos mecanismos, la diferenciación, supervivencia, proliferación y efectos de linfocitos T (David & Massagué, 2018) (**Figura 4**).

La señalización por TGF- $\beta$  puede inducir efectos estimuladores o inhibitorios dependiendo del estado de diferenciación y las condiciones de estimulación de las células T (Oh & Li, 2013). Por una parte, el TGF- $\beta$  es necesario para la diferenciación de linfocitos Treg de periferia y, en conjunto con el factor de transcripción ROR $\gamma$ t, de linfocitos Th17. Además en presencia de IL-4 puede promover diferenciación a linfocitos Th9. Por otra parte, a través de SMAD2/3 inhibe la diferenciación de linfocitos Th1, inhibiendo la expresión de T-bet (Gorelik,

Constant, & Flavell, 2002); de linfocitos Th2, induciendo la expresión de MSC y SOX4 que inhiben la expresión de citocinas relacionadas a este fenotipo (Kawahara *et. al.*, 2012; Wu *et. al.*, 2017); y de CTLs, cooperando con ATF1 para inhibir la producción de IFN- $\gamma$  y moléculas citotóxicas (David & Massagué, 2018)

El TGF- $\beta$  también participa en el control de las respuestas efectoras de linfocitos T: inhibe la producción autócrina de IL-2 limitando así la proliferación linfoide (Brabletz *et. al.*, 1993) y la producción de IFN- $\gamma$  previniendo así el desarrollo de autoinmunidad (Ishigame *et. al.*, 2013; Lin, Martin, Xia, & Gorham, 2005). El TGF- $\beta$  es necesario para la formación de poblaciones CD8<sup>+</sup> de memoria induciendo apoptosis en células efectoras y previniendo inflamación crónica (Ishigame *et. al.*, 2013).



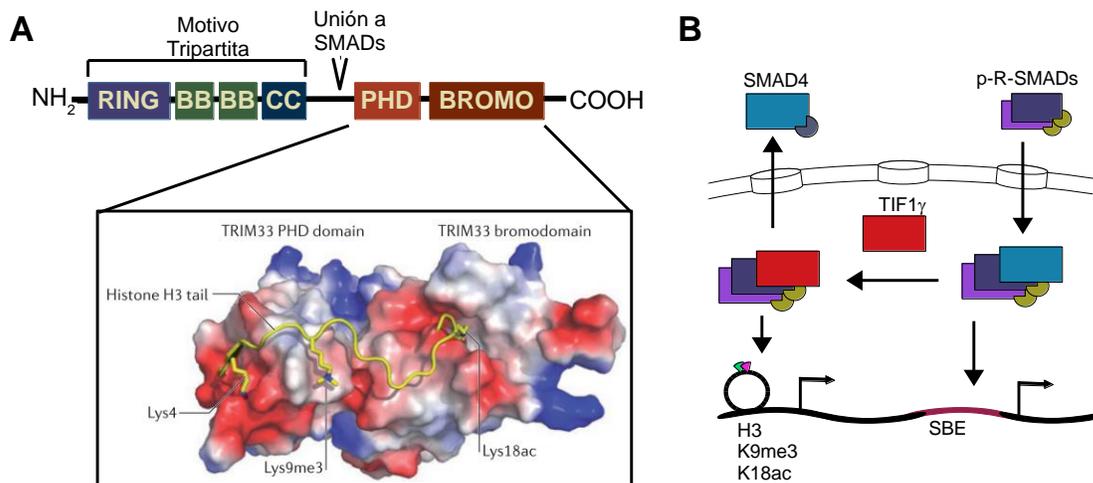
**Figura 4. Efectos del TGF- $\beta$  en poblaciones de linfocitos T.** El TGF- $\beta$  tiene distintos efectos en la polarización de diversos fenotipos celulares. Esta citocina es necesaria para la polarización de linfocitos Treg, Th17 y Th9 pero inhibe la polarización de Th1, Th2 y CTLs.

### 3.6 TIF1 $\gamma$ y la Familia de Proteínas TRIM

TIF1 $\gamma$ , también conocida como TRIM33, es una proteína nuclear que pertenece a la familia de proteínas de Factor Transcripcional Intermediario 1 (TIF1, "Transcriptional Intermediary Factor 1"). A su vez, ésta familia de proteínas pertenece a la superfamilia TRIM ("Tripartite Motif") cuyas proteínas se caracterizan por presentar un motivo tripartita en el extremo N-terminal compuesto por un dominio RING, uno o dos dominios de dedos de zinc llamados Cajas B (B-Box) y una región superenrollada (coiled-coil). El dominio RING le da a estas proteínas actividad de E3 ubiquitin ligasa mientras que los otros dominios permiten interacciones con ácidos nucleicos. En el extremo C-terminal, las proteínas TRIM cuentan con diversos dominios que les dan actividades específicas (**Figura 5A**). Además, se ha reportado que algunas de estas proteínas pueden formar homo y

hetero oligómeros lo cual aumenta la complejidad de las interacciones y las posibles actividades de estas proteínas (Hatakeyama, 2017). Esta superfamilia de proteínas está muy diversificada y en humanos existen 80 genes conocidos que codifican para proteínas TRIM.

En humanos la familia TIF1 está compuesta por 4 proteínas: TIF1 $\alpha$  (TRIM24), TIF1 $\beta$  (TRIM28), TIF1 $\gamma$  (TRIM33) y TIF1 $\delta$  (TRIM66). Las proteínas que forman parte de la familia TIF1 se caracterizan por presentar en su extremo C-terminal un dominio PHD y un bromodominio (Venturini *et al.*, 1999), lo cual les permite reconocer modificaciones epigenéticas en las histonas. TIF1 $\gamma$  es capaz de reconocer, en el extremo de la Histona 3, la lisina 4 sin modificar (H3K4), la lisina 9 trimetilada (H3K9me3) y la lisina 18 acetilada (H3K18ac) (Xi *et al.*, 2011). Esta proteína regula la señalización de TGF- $\beta$  a través de su vía canónica. Cuando ha iniciado la señalización de TGF- $\beta$ , TIF1 $\gamma$  puede competir en el núcleo con SMAD4 por la unión al complejo de R-SMADs (He *et al.*, 2006). Además, a través de su dominio RING, es capaz de monoubiquitinar a SMAD4 exportándola del núcleo y evitando que se una a sus sitios blancos en el genoma (**Figura 5B**) (Dupont *et al.*, 2005). No obstante, también se ha mostrado que estas dos vías de señalización actúan en conjunto para la expresión de diversos genes en células troncales embrionarias (Xi *et al.*, 2011) en donde el TGF- $\beta$  juega un papel muy importante en su desarrollo.



**Figura 5.** TIF1 $\gamma$  y su participación en la señalización de TGF- $\beta$ . **A)** Estructura de TIF1 $\gamma$ . Se esquematizan los componentes de su motivo tripartita y se señala la región con la cual interactúa con proteínas SMAD. Además se muestra la estructura cristalográfica de sus dominios PHD y Bromodominio que participan en el reconocimiento de marcas epigenéticas H3K9me3 y H3K18ac. Adaptado de Xi, *et al.* 2011. **B)** Esquema de la interacción de TIF1 $\gamma$  con la vía canónica de señalización de TGF- $\beta$ . Cuando el complejo de p-R-SMADs /SMAD4 se trasloca al núcleo, TIF1 $\gamma$  es capaz de monoubiquitinar a SMAD4 para exportarla del núcleo, unirse al complejo R-SMADs y modificar de esta forma la respuesta celular al TGF- $\beta$ .

La importancia de TIF1 $\gamma$  río abajo de la señalización de TGF- $\beta$  se ha mostrado durante la diferenciación de células pluripotentes y precursores hematopoyéticos.

Durante el desarrollo de *Xenopus* TIF1 $\gamma$  inhibe la señalización por TGF- $\beta$ /Nodal, que especifica a mesodermo, permitiendo que las células se diferencien a ectodermo (Dupont *et. al.*, 2005). Además, también es capaz de inhibir la señalización a través de BMPs (“Bone Morphogenetic Proteins”), otros ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  que señalizan a través de las R-SMAD 1, 5 y 8 pero que también utilizan SMAD4, promoviendo el desarrollo neural sobre el epitelial (Dupont *et. al.*, 2005). Por su parte, mutaciones en el ortólogo de TIF1 $\gamma$  en pez cebra (*moonshine*) generan defectos letales en la hematopoyesis embrionaria y definitiva debido a la apoptosis de células troncales hematopoyéticas (Ransom *et. al.*, 2004).

En mamíferos TIF1 $\gamma$  es esencial durante el desarrollo y la diferenciación celular. Ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  no son viables y presentan defectos en el desarrollo a partir del día E8.5 (Jieun & Kaartinen, 2008). Además, se ha observado que en progenitores hematopoyéticos humanos, la cantidad relativa de TIF1 $\gamma$  y SMAD4 dicta el destino celular en respuesta al TGF- $\beta$ . Una mayor cantidad de SMAD4 inhibe la proliferación y mantiene la troncalidad de las células. Por otro lado, una mayor cantidad de TIF1 $\gamma$  en el interior de la célula favorece la diferenciación hacia el linaje eritroide (He *et. al.*, 2006). No obstante, también existe cooperación entre la vía de TGF- $\beta$  dependiente de SMAD4 y la vía dependiente de TIF1 $\gamma$ . En células troncales embrionarias, la unión del complejo TIF1 $\gamma$ -R-SMAD a la cromatina desplaza factores de silenciamiento y permite la unión del complejo SMAD4-R-SMAD a genes involucrados en gastrulación, morfogénesis de mesendodermo y formación de endodermo (Xi *et. al.*, 2011). A su vez, el complejo SMAD4/R-SMAD favorece la modificación H3K18ac que es reconocida por TIF1 $\gamma$ . TIF1 $\gamma$  es un regulador importante de la señalización de TGF- $\beta$  capaz de dirigir la diferenciación celular compitiendo con SMAD4 por la unión al complejo SMAD2/3, pero también cooperando con la vía canónica para expresar distintos genes permitiendo así el correcto desarrollo y diferenciación celular.

### 3.7 TIF1 $\gamma$ en el sistema inmunológico

Hay una correlación positiva entre el nivel de complejidad del sistema inmunológico y la diversificación de la familia de proteínas TRIM. Se ha propuesto que conforme el sistema inmunológico fue adquiriendo complejidad, hubo la necesidad de una mayor regulación de sus funciones efectoras y la familia de proteínas TRIM, a través de su dominio de ligasa de ubiquitina, se diversificó para completar esa función (Versteeg, Benke, García-Sastre, & Rajsbaum, 2014).

Muchas proteínas de la familia TRIM funcionan como reguladores de la respuesta inmunológica, principalmente la respuesta innata. La mayoría de estas proteínas participa en la señalización del inflamasoma y de IFN- tipo I (Ferri *et. al.*, 2015). Además existen algunos reportes de proteínas TRIM involucradas en la regulación

de la respuesta adaptativa (Chikuma, Suita, Okazaki, Shibayama, & Honjo, 2012; Tanaka *et. al.*, 2018).

Se ha demostrado un papel importante de TIF1 $\gamma$  de manera directa e indirecta en la respuesta inmunológica. TIF1 $\gamma$  es necesario durante la hematopoyesis para la diferenciación correcta de precursores mieloides (Gallouet *et. al.*, 2017; Monteiro, Pouget, & Patient, 2011). Además, TIF1 $\gamma$  se requiere para la activación del inflammasoma por DNA de cadena sencilla e inhibe la producción de IFN- $\beta$  durante la fase tardía de la activación de macrófagos (Ferri *et. al.*, 2015) regulando genes asociados al metabolismo lipídico, metabolismo de macrófagos y la respuesta inflamatoria (Gallouet *et. al.*, 2017). Además, la diferenciación correcta de células T asesinas naturales (NKT, Natural Killer T cell) requiere de la señalización de TGF- $\beta$  a través de SMAD4 y TIF1 $\gamma$  donde cada una regula distintas partes de la diferenciación celular (Doisne *et. al.*, 2009).

TIF1 $\gamma$  también regula funciones de linfocitos de forma dependiente e independiente a la señalización por TGF- $\beta$ . En linfocitos B provenientes de un modelo murino de leucemia linfoblástica aguda se mostró que TIF1 $\gamma$  inhibe la apoptosis uniéndose a una región reguladora de Bim (Wang *et. al.*, 2015). Por otra parte, a pesar de que las células T no se ven afectadas por la deficiencia condicional de TIF1 $\gamma$  en estado basal (Doisne *et. al.*, 2009) recientemente se mostró que TIF1 $\gamma$  es necesario para la producción correcta de IL-17 y la inhibición de IL-10 (Tanaka *et. al.*, 2018).

#### 4. Justificación

El TGF- $\beta$  es capaz de inhibir la polarización de linfocitos Th1 y Th2 (Lúdvíksson, Seegers, Resnick, & Strober, 2000). Se ha visto que ejerce este efecto a través de su vía de señalización canónica, pues SMAD2 y SMAD3 son necesarios para inhibir la expresión de IFN- $\gamma$  por células T polarizadas hacia un fenotipo Th1 (Takimoto *et. al.*, 2010). No obstante, el complejo SMAD2/3 además de unirse a SMAD4 puede unirse a TIF1 $\gamma$  y esta decisión afecta directamente el destino celular (He *et. al.*, 2006).

Debido a esto, nos preguntamos si SMAD4 y TIF1 $\gamma$  pueden ejercer efectos celulares distintos en los linfocitos T en respuesta al TGF- $\beta$ . La eliminación condicional de TIF1 $\gamma$  no afecta las poblaciones totales de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en homeostasis (Doisne *et. al.*, 2009). Sin embargo, resultados preliminares de la Dra. Paula Licon Limón muestran que la eliminación condicional de TIF1 $\gamma$  induce cambios en la producción de IFN- $\gamma$  por células Th1 polarizadas *in vitro*. Además, recientemente se reportó que TIF1 $\gamma$  es necesario para la correcta polarización de células Th17 e inhibe la expresión de IL-10 en estas células (Tanaka *et. al.*, 2018). Por otro lado, la eliminación condicional de SMAD4 induce una desregulación en la producción de citocinas relacionadas al fenotipo Th2 (Kim *et. al.*, 2006) sin afectar la producción de IFN- $\gamma$ .

La evidencia anterior nos impulsó a caracterizar el efecto de la eliminación de TIF1 $\gamma$  específicamente en poblaciones de linfocitos T, enfocándonos en las poblaciones que producen IFN- $\gamma$  y expresan CXCR3 (Th1 y CTL), en un modelo murino deficiente de TIF1 $\gamma$  en las células T (Jieun & Kaartinen, 2008). Nos enfocamos en caracterizar los efectos de la ausencia de esta proteína en homeostasis y en contextos de inflamación como el envejecimiento y el desarrollo tumoral para entender la participación de TIF1 $\gamma$  en el control de poblaciones linfoides por el TGF- $\beta$  en distintos contextos inmunológicos.

## 5. Hipótesis

TIF1 $\gamma$  regula la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de CXCR3 de linfocitos Th1 y CTL en contextos inflamatorios.

## 6. Objetivo General

Determinar el papel de TIF1 $\gamma$  en la producción de IFN- $\gamma$  y expresión de CXCR3 de linfocitos Th1 y CTLs.

### 5.1 Objetivos Particulares

1. Analizar el fenotipo basal de poblaciones Th1 y CTLs de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  jóvenes y de edad avanzada.
2. Determinar si la ausencia de TIF1 $\gamma$  afecta la polarización de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia un fenotipo Th1 *in vitro*.
3. Evaluar la dependencia de la señal del TGF- $\beta$  y la sensibilidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> deficientes de TIF1 $\gamma$  en condiciones polarizantes hacia Th1.
4. Determinar si las células Th1 o CTLs deficientes de TIF1 $\gamma$  presentan defectos en la producción de IFN- $\gamma$  y/o la expresión de CXCR3 en un contexto de inflamación.

## 7. Metodología

### 7.1 Ratones

Los ratones utilizados en este trabajo fueron producidos en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular y sometidos a tratamientos aprobados por el comité de ética. La cepa de ratones Trim33 fx/fx (TIF1 $\gamma$  fx/fx) fue generada por el Dr. Vesa Kaartinen (Jieun & Kaartinen, 2008) quien donó los ratones para este proyecto. Los ratones CD4 Cre se obtuvieron del laboratorio del Dr. Richard Flavell en la Universidad de Yale, Estados Unidos. Ambas cepas de ratones se generaron en fondo C57BL/6J (Haplotipo: H2b) y fueron cruzadas para obtener los grupos de ratones experimentales. Para todos los experimentos del presente trabajo se utilizaron ratones CD4 CRE Trim33 fx/fx como grupo experimental (TIF1 $\gamma$  -/-) y ratones CD4 WT Trim33 fx/fx como grupo control.

### 7.2 Genotipificación de ratones.

Para genotipificar a los ratones utilizados en este proyecto, se tomó una biopsia de los dedos de las extremidades traseras los mismos entre los días 10 a 14 postnatales para obtener una muestra de ADN. Las biopsias también seguían un código numérico lo que también permitió identificar a los ratones una vez determinado el genotipo.

Las biopsias fueron digeridas añadiendo 150  $\mu$ L de Buffer de Lisis (Tris 50 mM pH 8.0, KCl 50 mM, EDTA 2.5 mM, NP40 0.45%, Tween 20 0.45%) e incubando por toda la noche a 65 °C. Al día siguiente, se centrifugaron a 13000 rpm por 3 min.

Para determinar el genotipo se realizaron 2 reacciones de distintas: uno para determinar si el gen de TIF1 $\gamma$  presentaba alelos silvestres o con sitios loxP (TIF1 $\gamma$  fx) y otro para determinar la presencia del transgen CD4 Cre (Cre). La Tabla 1 muestra las mezclas de primers (Primer mix) que se utilizaron para cada reacción.

Reacción de PCR:

Buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) – 2.5  $\mu$ L

MgCl<sub>2</sub> (50 mM) – 2  $\mu$ L

Primer Mix – 1  $\mu$ L

dNTPs – 0.5  $\mu$ L

H<sub>2</sub>O miliQ – 17.75  $\mu$ L

Taq Polimerasa (5 U/ $\mu$ l) – 0.25  $\mu$ L

Biopsia de ADN digerida – 1  $\mu$ L)

Las muestras se incubaron en un termociclador con los siguientes programas:

- TIF1 $\gamma$  fx
  1. 95°C 10'
  2. 94°C 1'
  3. 60°C 1'
  4. 72°C 1' ( regresar al paso 3 36 veces)
  5. 72°C 10'
  6. 4°C  $\infty$

Productos esperados:

TIF1 $\gamma$  +/+ : 237 pb

TIF1 $\gamma$  fx/fx : 180 pb

TIF1 $\gamma$  fx/+ : 180 pb, 237 pb

- Cre
  1. 94°C 4 min
  2. 94°C 45 seg
  3. 65°C 45 seg (-0.3°C c/ciclo)
  4. 72°C 1 min (regresar al paso 3 35 veces)
  5. 72°C 5 min
  6. 4°C  $\infty$

Productos esperados:

CD4 WT: 297 pb

CD4 Cre: 297 pb, 400 pb

Posteriormente, se corrieron geles de agarosa al 2% para determinar el peso de los productos amplificados y determinar el genotipo.

Reacción	Nombre	Secuencia	Concentración
	WT Rev	5'- TGGTCCCCAAGTCAGAAAAC-3'	10 $\mu$ M
<b>CD4 Cre</b>	WT Fwd	5'- TAGTTTGGCAGCACCTTTGG-3'	20 $\mu$ M
	KO Rev	5'- GCAAACGGACAGAAGCATTT-3'	10 $\mu$ M
<b>TIF1<math>\gamma</math> fx</b>	Rev	5'- CCATCTGGGAAAGGAAAACA-3'	10 $\mu$ M
	Fwd	5'- CCCCAGTTGTCCTGGAACTA-3'	10 $\mu$ M

Tabla 1. Primers utilizados para genotipificar los ratones experimentales

### 7.3 Purificación de células CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> “naïve”

La purificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> “naïve” (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>) se realizó con el kit de MagniSort™ Mouse CD4 Naïve T cell Enrichment Kit (Thermofisher, 8804-6824-74). Se obtuvieron células del bazo y los ganglios linfáticos axilares, braquiales e inguinales (**Anexo I**). Los órganos se suspendieron en 1 mL de Click's Suplementado (10% SFB, PSG 1:100, HEPES 25 μM, β-Mercaptoetanol 0.04 μM, pH = 7.4) y se pusieron en un tubo Falcon de 15 mL. Se tomó una alícuota de 20 μL para determinar la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> “naïve” basales y posteriormente compararla con la frecuencia de las mismas células una vez purificadas. Luego, las células se centrifugaron a 1500 rpm (300 g) por 5 min y posteriormente se decantó el sobrenadante. Se lisaron los eritrocitos añadiendo 1 mL de buffer ACK (NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 100μM) por 1 min y después se inactivó con 4 mL de Click's Suplementado. Luego de centrifugar y decantar se suspendió el pellet en 1 mL de FACS-EDTA (PBS, 2% SFB, 2% EDTA) y se agregaron 150 μL de anticuerpos biotinilados (MagniSort™, Thermofisher). Las células se incubaron 10 min a temperatura ambiente (TA) y se lavaron, llevando el volumen de células a 5 mL con FACS-EDTA, centrifugando y decantando. Posteriormente el pellet celular se suspendió en 1 mL de FACS-EDTA y se añadieron 100 μL de perlas magnéticas marcadas con estreptavidina (MagniSort™, ThermoFisher). Las células se incubaron por 5 min a TA. Posteriormente se llevó el volumen a 2.5 mL con FACS-EDTA y las células se pasaron a un tubo de FACS a través de una malla de organza. Luego, las células se colocaron en un imán para selección negativa (MagniSort™, ThermoFisher) y se incubaron por 5 min. Después se decantaron a un nuevo tubo Falcon con un solo movimiento. Se tomó otra alícuota de 20 μL para determinar el enriquecimiento de la población de interés (**Anexo II**). Después, las células se centrifugaron y decantaron para luego suspenderlas en 500 μL de Click's. Finalmente, se contaron los números totales utilizando una cámara de Neubauer.

### 7.4 Conteo celular por cámara de Neubauer

Para obtener los números de células totales se tomó una alícuota de 10 μL de la muestra y se diluyó en 90 μL de FACS (PBS, 2% SFB) para obtener una dilución 1:10. Luego se tomaron 10 μL de esta dilución y se mezclaron con 10 μL de Azul de Tripano (0.4%, Gibco) Se pusieron 10 μL de esta dilución en la cámara de Neubauer y se contaron los 4 cuadrantes de las esquinas completos. Para obtener el número total de células se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\text{cuenta celular}}{4} * 2 * 10 * 10000$$

### 7.5 Preparación de esplenocitos irradiados

Para irradiar los esplenocitos que se utilizarían en los cocultivos *in vitro*, se obtuvo el bazo de ratones control (CD4 WT Trim33 fx/fx) y antes de macerarlo, se llevó al Irradiador autoblandado Gammacell-1000, con fuente radiactiva sellada de Cs<sup>137</sup>. Ahí, con el apoyo metodológico del técnico académico Carlos Castellanos Barba, se irradió el bazo con 3000 rads. Posteriormente, el bazo se disgregó como se describió anteriormente y las células se diluyeron a 10<sup>7</sup> células/mL con medio Click's Suplementado.

### 7.6 Cocultivo *in vitro* de linfocitos T

Para polarizar las células T CD4<sup>+</sup> "naïve" hacia distintos fenotipos efectores se cultivaron por 5 días en presencia de esplenocitos irradiados como APCs y de diferentes cócteles de citocinas dependiendo del fenotipo deseado (**Tabla 2**).

Th0		Th1		Th2	
$\alpha$ IL-4	10 $\mu$ g/mL	IL-12	10 ng/mL	IL-4	20 ng/mL
$\alpha$ IFN $\gamma$	10 $\mu$ g/mL	$\alpha$ IL-4	10 $\mu$ g/mL	$\alpha$ IFN $\gamma$	10 $\mu$ g/mL
IL-2	40 U/mL	IL-2	40 U/mL	IL-2	40 U/mL
$\alpha$ CD3	2 $\mu$ g/mL	$\alpha$ CD3	2 $\mu$ g/mL	$\alpha$ CD3	2 $\mu$ g/mL

**Tabla 2. Condiciones de polarización *in vitro* hacia diversos fenotipos de linfocitos T.**

Las células se diluyeron para obtener una concentración de 4x10<sup>6</sup> células/mL. Por su parte, los esplenocitos se diluyeron para obtener una concentración de 8x10<sup>5</sup> células /mL. Por otra parte se prepararon las mezclas de citocinas necesarias 2X para obtener la concentración final luego de mezclarlos con las células a una dilución 1:1. Se sembraron 50  $\mu$ L de esplenocitos irradiados, 50  $\mu$ L de linfocitos T y 100  $\mu$ L de la mezcla de citocinas correspondiente en placas de 96 pozos. Los cocultivos se incubaron por 5 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al quinto día, las células se reestimularon para detectar la producción de IFN- $\gamma$  como se describe en la Sección 7.8.

### 7. 7 Ensayo de inhibición por TGF- $\beta$

Para los ensayos de inhibición por TGF- $\beta$  se siguió el mismo procedimiento descrito para la polarización *in vitro* pero únicamente se polarizaron células hacia el fenotipo Th1. Se agregaron 10  $\mu$ L de Click's Suplementado a cada pozo con distintas concentraciones de TGF- $\beta$  para obtener concentraciones finales desde 10<sup>-3</sup> hasta 1 ng/mL. Además, en otra condición neutralizó cualquier cantidad de TGF- $\beta$  presente constitutivamente en el medio de cultivo añadiendo 10  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-TGF- $\beta$ .

### *7.8 Reestimulación de linfocitos T y tinción intracelular de citocinas.*

Para medir la producción de citocinas por linfocitos T se utilizó el kit CitoFix/CitoPerm de BD Bioscience y se siguió el protocolo indicado por la compañía. Las muestras se colocaron en una placa de 96 pozos con fondo en "V". Se centrifugó la placa para retirar el exceso de medio y posteriormente se añadieron 100  $\mu$ L de medio de reestimulación (PMA 50 ng/mL, Ionomicina 1  $\mu$ g/mL y GolgiStop (BD, Bioscience) 1:1000) a cada pozo. Las células se incubaron 4 h a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Luego se centrifugaron y se realizó la tinción de los marcadores de superficie de interés con anticuerpos monoclonales acoplados a distintos fluoróforos. Los anticuerpos utilizados durante los experimentos se detallan en la siguiente sección de la metodología (**Sección 7.9**). Además, las células se tiñeron con el colorante Aqua Zombie el cual permite diferenciar entre células vivas y muertas. La tinción se realizó en 50  $\mu$ L de FACS/muestra incubando 30 min a 4°C. Luego de centrifugar y decantar, las células se fijaron con una solución de PBS con paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C por 10 minutos, luego de los cuales se volvió a centrifugar y decantar. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de FACS y se dejaron a 4 °C cubiertas de la luz para continuar con la tinción intracelular a la mañana siguiente.

Antes de continuar con la tinción intracelular, se preparó la solución Perm/Wash 1x (P/W) con Perm/Wash 10x (BD Bioscience) y H<sub>2</sub>Odd. Luego de centrifugar y decantar el sobrenadante de las muestras del día anterior, se permeabilizaron con 100  $\mu$ L de P/W por 15 min a 4 °C. Luego se realizó la tinción intracelular con anticuerpos acoplados a fluoróforos en 25  $\mu$ L de P/W por muestra (1 h, 4 °C). Finalmente, las células se lavaron 2 veces cada muestra con 150  $\mu$ L de P/W, se suspendieron en 150  $\mu$ L de FACS y se pasaron a microtubos de 2.2 mL añadiendo otros 150  $\mu$ L para obtener un volumen final de 300  $\mu$ L.

## 7. 9 Anticuerpos utilizados

Un resumen de los anticuerpos utilizados para realizar las tinciones superficiales e intracelulares de los distintos experimentos se muestra en la **Tabla 3**. Además de los anticuerpos enlistados, se utilizó el colorante Aqua Zombie (Invitrogen) para diferenciar la viabilidad de las células.

Anticuerpo	Fluoróforo	Clona
$\alpha$ -CD4	Brilliant Violet 605	GK1.5
$\alpha$ -CD4	Pacific Blue	GK1.5
$\alpha$ -CD8	Pacific Blue	53-6.7
$\alpha$ -CD44	FITC	IM7
$\alpha$ -CD45.2	AF 700	104
$\alpha$ -CD62L	PE	MEL-14
$\alpha$ -CXCR3	APC	CXCR3-173
$\alpha$ -CXCR3	PE	CXCR3-173
$\alpha$ -IFN $\gamma$	PE	XMG 1.2
$\alpha$ -IFN $\gamma$	PECy-7	XMG 1.2
FcBlock ( $\alpha$ -CD16/CD32)	No aplica	24G-2

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados para las tinciones celulares de superficie e intracelulares en los distintos experimentos.**

### 7.10 Producción basal de IFN- $\gamma$ en ratones jóvenes y viejos

Para analizar las poblaciones de linfocitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y CXCR3<sup>+</sup> en homeostasis se utilizaron ratones CD4 Cre Trim33 fx/fx y CD4 WT Trim33 fx/fx como control de 10 semanas (jóvenes) y de más de 40 semanas de edad (viejos). Se analizaron los ganglios linfáticos periféricos (axilares, braquiales e inguinales), los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo. Luego de disgregar los órganos, las células se procesaron como se describe en la **Sección 7.8**.

### 7.11 Inoculación de Células de Melanoma Murino

Para estos experimentos se utilizaron ratones CD4 Cre Trim33 fx/fx y CD4 WT Trim33 fx/fx como control, de 11 semanas de edad al inicio del experimento criados en una misma caja. Se utilizó la línea celular B16 de melanoma murino (Overwijk & Restifo, 2001). Las células se descongelaron y se expandieron por una semana en RPMI Suplementado (5% SFB, HEPES 25  $\mu$ M) a 37°C 5%CO<sub>2</sub>. Los ratones se rasuraron un día antes de inocular las células B16. El día del experimento, las células fueron tratadas con tripsina-EDTA 0.25% (Thermofisher, 25200072), se resuspendieron en PBS (5mL) y se contaron como se detalló anteriormente (**Sección 7.4**). Luego, las células se diluyeron a una concentración de 10<sup>6</sup> células/mL. Se inocularon 10<sup>5</sup> células/ratón en un volumen de 100  $\mu$ L subcutáneamente en el lomo del ratón.

A partir del día 5 se midió el tumor utilizando un Calibre de Vernier y se calculó el volumen tumoral utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{\pi}{6} * \text{Diámetro menor}^2 * \text{Diámetro mayor}$$

En el día 14 post-inoculación se sacrificaron los ratones. Se obtuvieron: ganglios linfáticos drenantes (inguinales), ganglios linfáticos no drenantes (axilares y braquiales), Bazo y el Tumor sin piel para aislar TILs (“Tumor Infiltrating Lymphocytes”). Los ganglios y el bazo se prepararon como se describe en el **Anexo I**. Los eritrocitos del bazo se lisaron con ACK (1mL/1 min) y se inactivó con 4 mL de RPMI Suplementado. Los órganos se resuspendieron en 1 mL. El tumor se pesó antes de procesarlo. Luego de pesarse, los tumores se cortaron en seco con tijeras de disección y se suspendieron en 1 mL de Medio de Digestión (RPMI Suplementado, Colagenasa 1mg/mL, DNAsa 100  $\mu$ g/mL) para pasar a tubos Falcon de 15 mL. Se lavó con otro mL si era necesario y se llevó a 5 mL de medio de digestión. Todos los tumores se pusieron a digerir a 37°C en agitación (250 rpm) durante 1 h.

Luego de eso se pasó el líquido a otro tubo Falcon por una malla. Lo que quedó en la malla se disgregó con el émbolo de 1 jeringa. Luego se resuspendió con el mismo medio y se incorporó al tubo Falcon. Se centrifugó a 1500 rpm (300 g) 5 min y se decantó. Se resuspendió en 1 mL de RPMI suplementado y se añadieron 4 mL de Medio de Gradiente (Optiprep 4.57 mL, Tricina 2.5 mL, PBS 3.13 mL para 10 mL). Se mezcló y luego se añadió 1 mL de RPMI Suplementado sobre la mezcla cuidando la separación de fases. Se centrifugó a 2750 rpm por 20 min sin freno. Posteriormente se tomaron las células en la interfase y se lavaron con 5 mL de RPMI suplementado. Se lisaron eritrocitos con ACK (1mL/1min) y se

inactivó con 4 mL de RPMI suplementado. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L para realizar la reestimulación y la tinción intracelular (**Sección 7.8**).

#### *7.14 Adquisición de muestras*

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Attune NxT (ThermoFisher) localizado en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El análisis de las mismas se llevó a cabo en el software FlowJo 10 para delimitar las poblaciones de interés y obtener así su frecuencia, intensidad media de fluorescencia y números totales. Las poblaciones positivas en los experimentos de fenotipo basal de 10 semanas se delimitaron utilizando controles de fluorescencia menos uno (**Anexo III**)

#### *7.15 Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa GraphPad Prism 8. Para comparar las frecuencias, intensidades media de fluorescencia y números totales, entre los grupos de ratones control y TIF1 $\gamma$   $-/-$ , de un mismo órgano se utilizaron pruebas de t de Student. Para comparar las diferencias entre ratones de 10 semanas y ratones de más de 40 semanas de edad y para analizar el crecimiento tumoral se utilizaron ANOVA de 2 vías. Los resultados se consideraron significativos con  $p < 0.05$ . . Para calcular los valores de IC50 se utilizó la calculadora en línea de AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) detallada en el **Anexo IV**.

## 8. Resultados

### 8.1 Fenotipo en homeostasis de linfocitos T de ratones jóvenes y viejos

Para conocer si la eliminación condicional de TIF1 $\gamma$  afecta las poblaciones de linfocitos Th1 y CTLs en homeostasis, se seleccionaron poblaciones de linfocitos T de los ganglios linfáticos periféricos (GLP), los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y el bazo de ratones CD4 Cre TIF1 $\gamma$  fx/fx (TIF1 $\gamma$  -/-) y CD4 WT TIF1 $\gamma$  fx/fx (Control) de 10 semanas de edad (jóvenes) (**Figura 6A**). Se analizaron las poblaciones IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, que expresaran o no CXCR3<sup>+</sup>, en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (**Figura 6B**). Además, también se analizaron las mismas poblaciones de ratones de más de 40 semanas de edad (viejos) (**Figura 6C**).

No se observaron diferencias en la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> ni CD8<sup>+</sup> totales entre los grupos de ratones jóvenes en ninguno de los órganos analizados (**Figura 6D, E**). Tampoco se observaron diferencias entre las poblaciones CD4<sup>+</sup> totales de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- viejos (**Figura 6D**). Por otro lado, la frecuencia de las poblaciones CD8<sup>+</sup> incrementó entre 10% y 20% en los distintos órganos de ratones control viejos con respecto a los ratones jóvenes del mismo genotipo. Sin embargo, el incremento de estas poblaciones en condiciones fisiológicas normales no pudo observarse en los ratones viejos TIF1 $\gamma$  -/- donde las frecuencias se mantuvieron similares a las de los ratones jóvenes TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 6E**).

Cuando analizamos específicamente la población CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> de los distintos grupos de ratones, no observamos diferencias entre los dos grupos de ratones jóvenes. No obstante, en los ratones control podemos observar que la frecuencia de esta población aumenta 50% en los GLP y el bazo del grupo de ratones viejos con respecto a la frecuencia en el grupo de ratones jóvenes (**Figura 6F**). También observamos que en ratones viejos TIF1 $\gamma$  -/- este incremento no está presente en ninguno de los órganos analizados (**Figura 76F**). Cuando analizamos la misma población (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>) de linfocitos CD8<sup>+</sup> observamos una vez más el mismo fenotipo: las frecuencias incrementan 50% aproximadamente en todos los órganos analizados durante la vejez en los ratones control y esto no se observa en los ratones TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 6G**).

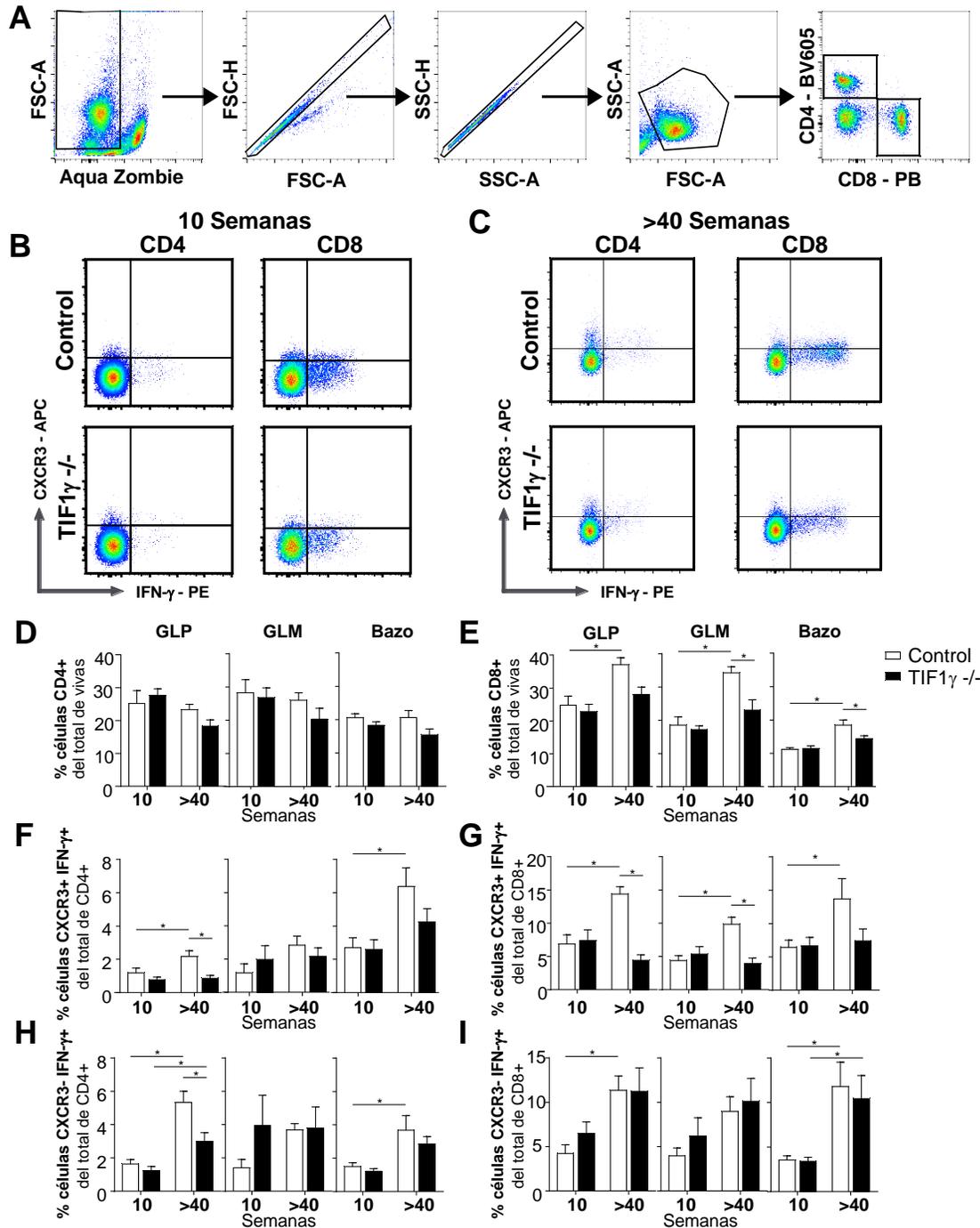
También se analizaron las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> (**Figura 6H, I**). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos de ratones jóvenes en esta población. Además, las células CD4<sup>+</sup> de esta población presentaron un fenotipo variable dependiendo del órgano analizado. Por un lado, en los GLP se recapituló el fenotipo observado en las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> pues la frecuencia incrementó de 2% en ratones control jóvenes a 6% en ratones control viejos. No obstante, en los GLM y en el bazo el incremento de esta población durante la vejez se observó tanto en los ratones control como en los ratones TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 6H**). Por su parte, las frecuencias de linfocitos CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> en todos los

órganos linfoides analizados también incrementaron 50% durante el envejecimiento en ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 6I**).

También analizamos el nivel de producción de IFN- $\gamma$  y expresión de CXCR3 en los grupos de ratones jóvenes (**Figura 7A**) El nivel de producción de IFN- $\gamma$  en las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> no cambió entre los grupos control y TIF1 $\gamma$  -/- de ratones jóvenes (**Figura 7B, C, F, G**). Por su parte, el nivel de expresión de CXCR3 en las poblaciones CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en general no fue diferente entre los ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- pero mostró un incremento moderado en la población CD4<sup>+</sup> del bazo de ratones TIF1 $\gamma$  -/- en comparación con la población control (**Figura 7D**) y disminuyó moderadamente en la población CD8<sup>+</sup> de GLM (**Figura 7E**).

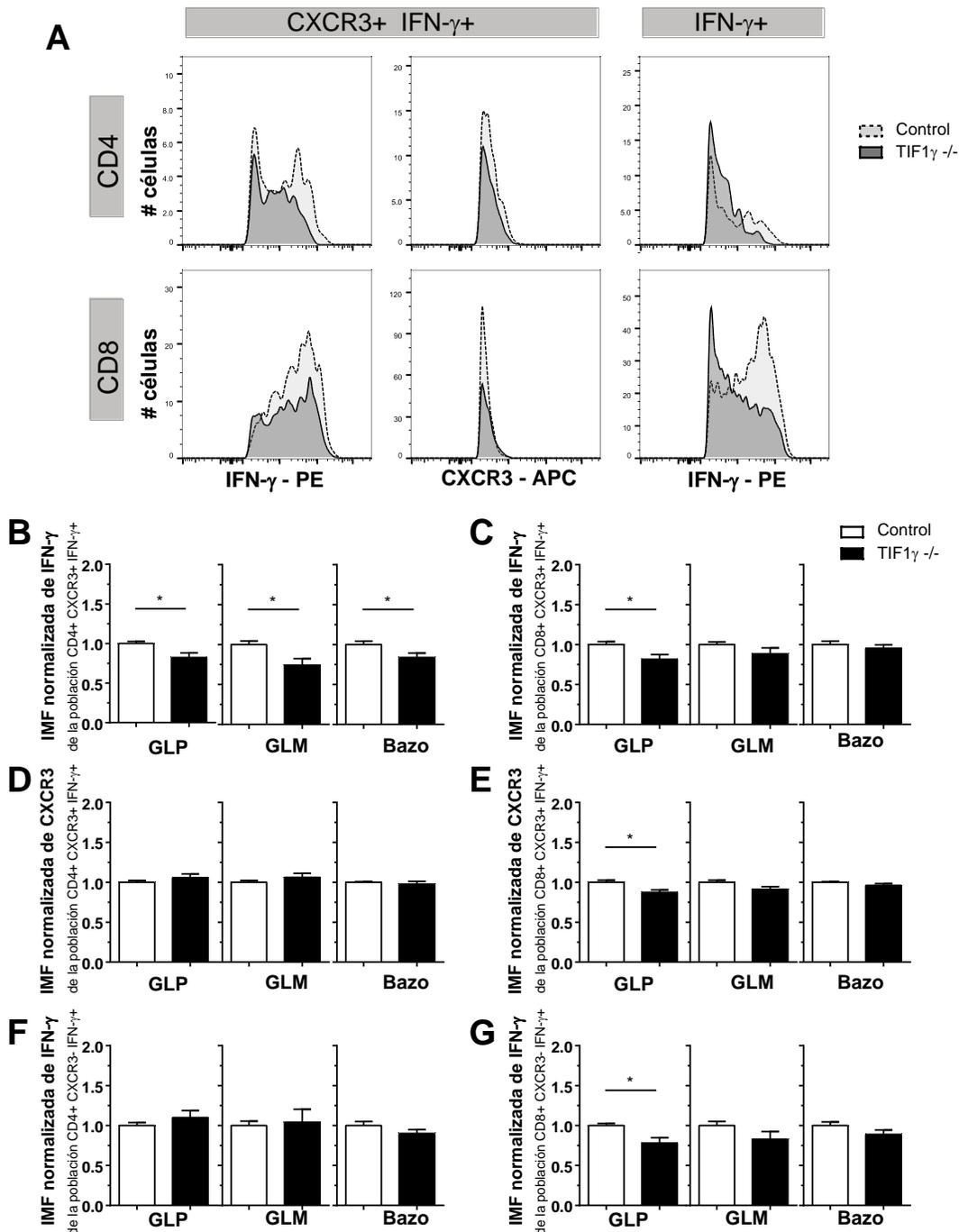
Cuando analizamos el nivel de producción de IFN- $\gamma$  y de expresión de CXCR3 comparando ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- viejos (**Figura 8 A**) observamos una disminución del 20 -25% en el nivel de producción de IFN- $\gamma$  de la población CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en todos los órganos analizados de los ratones TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 8 B**). Una disminución similar se observó en las poblaciones CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> y CXCR3<sup>-</sup> de los ganglios linfáticos periféricos de los ratones TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 8 B, F**) y con el nivel de expresión de CXCR3 en la población CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> del mismo órgano (**Figura 8 D**).

También se analizaron los números totales de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de las poblaciones de interés (**Figura 9A**). No se encontraron diferencias en los números de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> totales en ninguno de los órganos analizados en ratones de más de 40 semanas (**Figura 9 B, C**). Tampoco se observaron cambios significativos en los números de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> (**Figura 9 D**) ni CXCR3<sup>-</sup> (**Figura 9 F**) aunque hubo una tendencia a menor número celular en los GLP y bazo de los ratones TIF1 $\gamma$  -/- como se observó en las frecuencias celulares. Algo parecido se observó en las poblaciones CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> (**Figura 9 E**) y CXCR3<sup>-</sup> (**Figura 9 G**) pero en este caso, alcanzó significancia estadística para la población CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> de los GLP (**Figura 9 E**). Desafortunadamente, el dato de números totales de células en ratones jóvenes no se calculó y habrá que determinarlo en futuros experimentos.

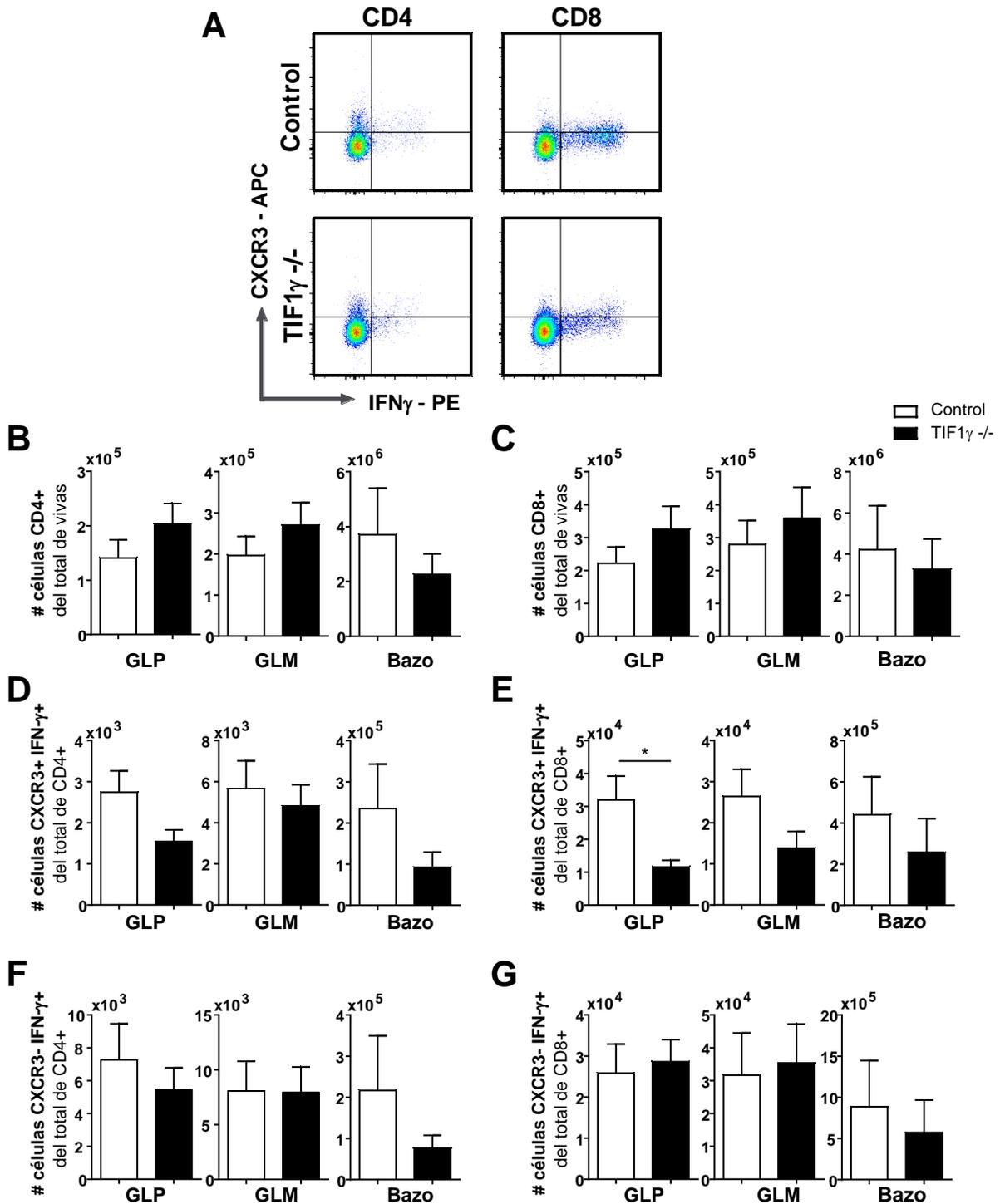


**Figura 6. Fenotipo en homeostasis de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- de 10 y >40 semanas de edad.** **A)** Estrategia de análisis de poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> **B, C)** Gráficas de puntos representativas de poblaciones pro-inflamatorias CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> en ratones control (paneles superiores) y deficientes de TIF1 $\gamma$  (TIF1 $\gamma$  -/-, paneles inferiores) de 10 semanas (**B**) y más de 40 semanas de edad (**C**). **D, F, H)** Frecuencia de células CD4<sup>+</sup> totales (**D**), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> (**F**) e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> (**H**) en distintos órganos linfoides en grupos de ratones control (barras claras) y TIF1 $\gamma$  -/- (barras oscuras) de 10 semanas y más de 40 semanas de edad. **E, G, I)** Frecuencia de células CD8<sup>+</sup> totales (**E**), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> (**G**) e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> (**I**) en distintos órganos linfoides en grupos de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- de 10 semanas y más de 40 semanas de edad. GLP, Ganglios linfáticos periféricos. GLM, Ganglios linfáticos mesentéricos. n=9-11 ratones por grupo. 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$





**Figura 8.** Análisis de producción de IFN $\gamma$  y expresión de CXCR3 en linfocitos CD4 y CD8 de ratones control y deficientes de TIF1 $\gamma$  de más de 40 semanas de edad en homeostasis. **A)** Histogramas representativos de la Intensidad media de fluorescencia (IMF) de IFN- $\gamma$  y CXCR3 en las poblaciones IFN- $\gamma$ + CXCR3+ e IFN- $\gamma$ + CXCR3-. **B - E)** IMF normalizada (con respecto al grupo de ratones control de cada órgano) de IFN- $\gamma$  (**B, C**) y CXCR3 (**D, E**) de la población IFN- $\gamma$ + CXCR3+ de células CD4+ (**B, D**) y CD8+ (**C, E**) en distintos órganos linfoides de ratones control (barras claras) y deficientes de TIF1 $\gamma$  (TIF1 $\gamma$  -/-, barras negras) de más de 40 semanas de edad. **F, G)** IMF normalizada de IFN- $\gamma$  de la población IFN- $\gamma$ + CXCR3- de células CD4+ (**F**) y CD8+ (**G**) en distintos órganos linfoides de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- de más de 40 semanas de edad. GLP, Ganglios linfáticos periféricos. GLM, Ganglios linfáticos mesentéricos. Cada barra representa: n = 9-10 ratones por grupo, 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$  entre ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- en el mismo órgano.



**Figura 9.** Cuantificación de poblaciones CD4 y CD8 totales, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> ó CXCR3<sup>+</sup> en ratones control y deficientes de TIF1 $\gamma$  de >40 semanas de edad. **A, B**) Números de linfocitos CD4<sup>+</sup> totales (**A**) y CD8<sup>+</sup> totales de ratones control (WT, barras claras) y deficientes de TIF1 $\gamma$  (KO, barras oscuras) en distintos órganos. **C, D**) Números de linfocitos IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en la población CD4<sup>+</sup> (**C**) y CD8<sup>+</sup> (**D**) de ratones WT y KO en distintos órganos. **E, F**) Números de linfocitos IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> en la población CD4<sup>+</sup> (**E**) y CD8<sup>+</sup> (**F**) de ratones WT y KO en distintos órganos. GLP, Ganglios Linfáticos Periféricos. GLM, Ganglios linfáticos mesentéricos. n=9-11 ratones por grupo. 3-4 experimentos independientes. \* = p < 0.05 entre ratones WT y KO en el mismo órgano.

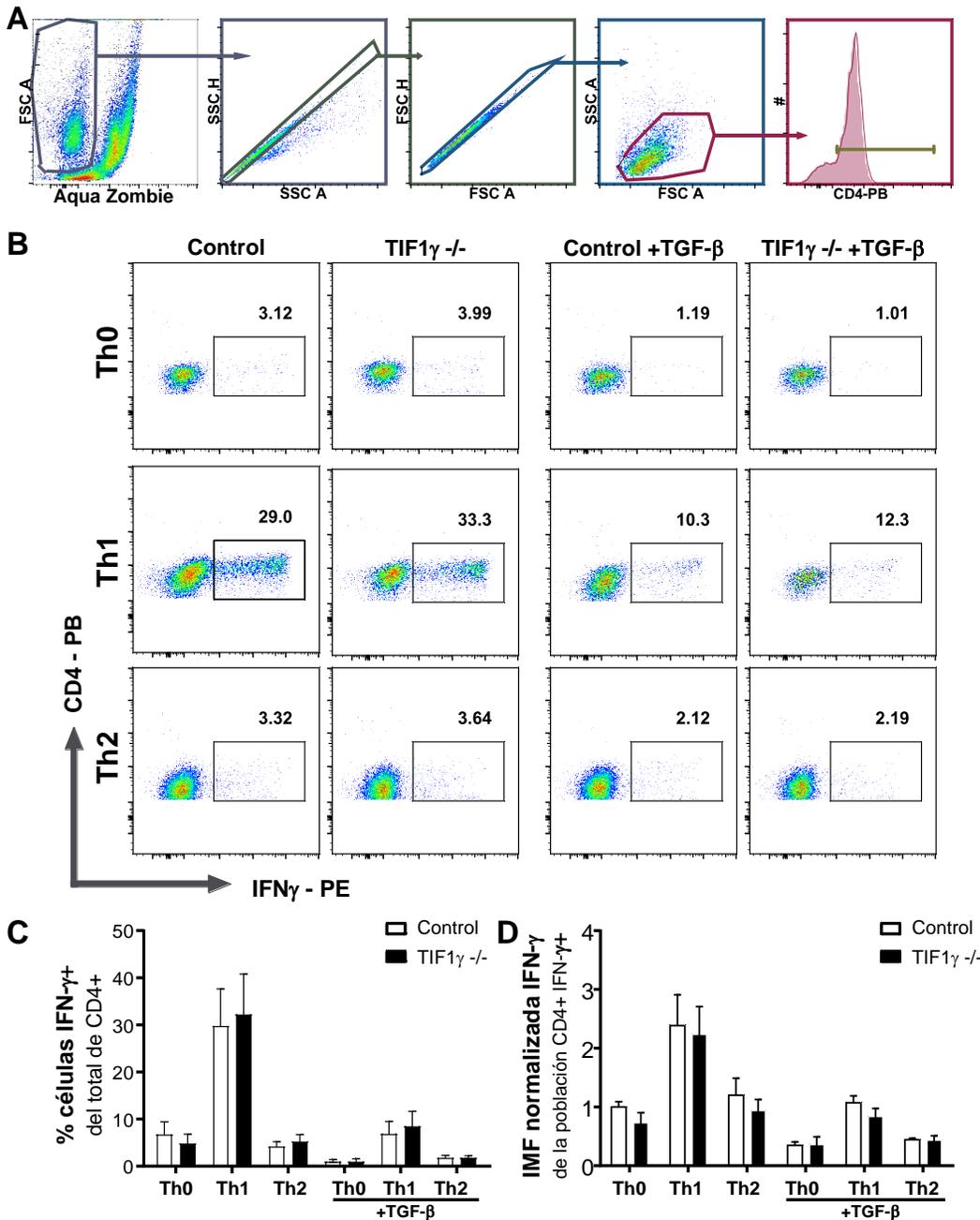
Estos resultados muestran que en ratones jóvenes la deficiencia de TIF1 $\gamma$  no tiene ningún efecto en las frecuencias de poblaciones de linfocitos IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. No obstante, el incremento fisiológico de las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) observado en ratones control viejos no ocurre en ratones de la misma edad TIF1 $\gamma$  -/-. Sin embargo, esto no es general de todas las células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. Las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> incrementaron durante el envejecimiento en ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- en casi todas las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> excepto en la población CD4<sup>+</sup> del GLP donde se recapituló lo observado en las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>. Estos resultados muestran que TIF1 $\gamma$  no regula el porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en homeostasis pero regula el incremento de poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> durante el envejecimiento.

### 8.2 Polarización *in vitro* hacia fenotipos Th1 y Th2 de linfocitos T cooperadores deficientes de TIF1 $\gamma$ .

Para averiguar si la deficiencia de TIF1 $\gamma$  afectaba la polarización de linfocitos T cooperadores (CD4<sup>+</sup>) y la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro* se purificaron linfocitos CD4<sup>+</sup> “naïve” (CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>) de GLP y bazo de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/-(**Anexo II**) y se polarizaron hacia los fenotipos Th1, Th2 y Th0. Se ha mostrado que el TGF- $\beta$  inhibe la polarización hacia estos fenotipos efectoros (David & Massagué, 2018), debido a ello, se probó si el TGF- $\beta$  en cultivo *in vitro* (1 ng/mL) era capaz de inhibir la producción de IFN- $\gamma$  de células CD4<sup>+</sup> deficientes de TIF1 $\gamma$ .

Se seleccionaron las células CD4<sup>+</sup> vivas excluyendo dobletes para su análisis (**Figura 10 A**). La polarización de las células CD4<sup>+</sup> hacia el fenotipo Th1 indujo un 30% de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**Figura 10 B, C**). No se observaron diferencias entre el grupo de células provenientes de ratones control y los ratones TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 10 B, C**). Además el TGF- $\beta$  inhibió en 60% la producción de IFN- $\gamma$  por células CD4<sup>+</sup> de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- (**Figura 10 B, C**). Tampoco se observaron diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  en los linfocitos polarizados hacia Th2 o Th0 y ninguno de estos grupos expresó más de 5% de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**Figura 10 B, C**). Además, no hubo diferencias en el nivel de producción de IFN- $\gamma$  entre el grupo de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/- en las distintas poblaciones analizadas aunque las células en condiciones polarizantes a Th1 siempre tuvieron un mayor nivel de producción que las otras poblaciones y el TGF- $\beta$  disminuyó en 50% el nivel de producción de todos los fenotipos analizados (**Figura 10 D**).

Estos resultados indican que la polarización *in vitro* hacia el fenotipo Th1, determinada por la producción de IFN- $\gamma$ , no se ve modificada por la ausencia de TIF1 $\gamma$  en las células CD4<sup>+</sup>. Además muestran que el TGF- $\beta$ , es capaz de inhibir la producción de IFN- $\gamma$  de manera independiente de la presencia de TIF1 $\gamma$ .



**Figura 10. Polarización in vitro de linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia fenotipos Th1 y Th2.** Cocultivo de linfocitos CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> con espenocitos irradiados, en condiciones polarizantes hacia Th0, Th1 o Th2 en presencia o ausencia de TGF- $\beta$  (1 ng/mL). **A)** Las células CD4<sup>+</sup> se seleccionaron por exclusión de células muertas, dobles y células CD4<sup>-</sup>. **B)** Gráficas de puntos representativas mostrando la producción de IFN- $\gamma$  de células CD4<sup>+</sup> en las diferentes condiciones de cultivo *in vitro*. **C)** Frecuencia de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> del total de CD4<sup>+</sup> en las diferentes condiciones probadas con los grupos de ratones control (barras claras) y TIF1 $\gamma$  -/- (barras oscuras). **D)** Gráfica mostrando la intensidad media de fluorescencia (IMF) normalizada (con respecto al grupo Th0 control sin TGF- $\beta$ ) de IFN- $\gamma$  en los grupos de ratones control y TIF1 $\gamma$  -/-. n = 7 ratones por grupo. 3 experimentos independientes.

### 8.3 Efecto de la inhibición por TGF- $\beta$ *in vitro*

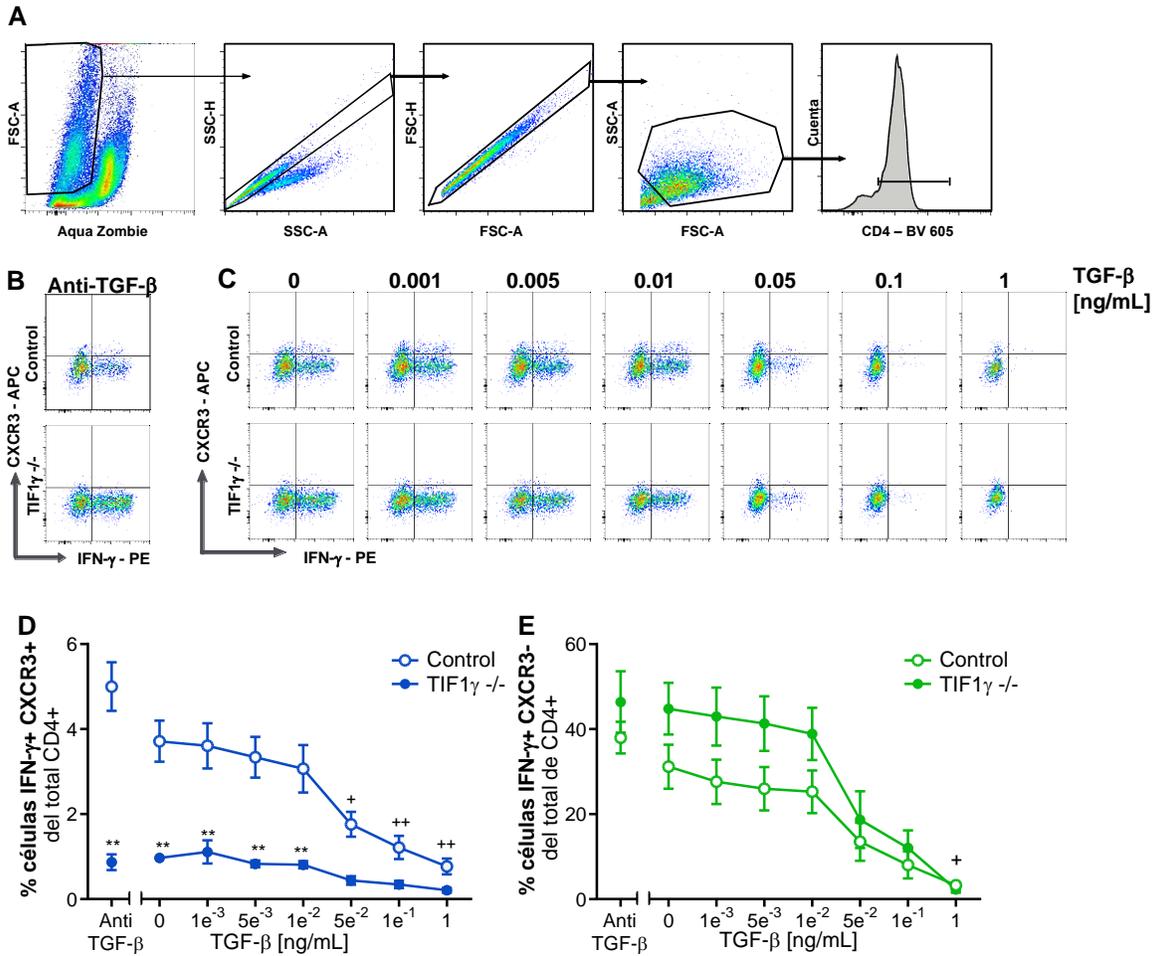
Se ha mostrado que TIF1 $\gamma$  regula la sensibilidad al TGF- $\beta$  en células troncales hematopoyéticas a través de ubiquitinar al TGF- $\beta$ RI (Quéré *et. al.*, 2014). Por ello, se analizó el efecto del TGF- $\beta$  en células CD4<sup>+</sup> en condiciones polarizantes hacia Th1 *in vitro* (**Figura 11 A**). Primero se realizó una condición de cultivo bloqueando cualquier cantidad de TGF- $\beta$  presente en el medio añadiendo un anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$  al cultivo *in vitro* (**Figura 11 B**). Luego, para averiguar si la ausencia de TIF1 $\gamma$  modifica la sensibilidad al TGF- $\beta$  de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, se realizó una curva dosis-respuesta con concentraciones de TGF- $\beta$  entre 0.001 ng/mL y 1 ng/mL además de una muestra control sin TGF- $\beta$  (0 ng/mL) (**Figura 11 C**). Las células CD4<sup>+</sup> se analizaron con base en la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de CXCR3 que presentaban (**Figura 11 B, C**).

Se observó que el TGF- $\beta$  inhibe de manera dependiente de la dosis la frecuencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en las células que expresan TIF1 $\gamma$ . Esta inhibición fue significativa estadísticamente a partir de 0.05 ng/mL (**Figura 11 D**). Al añadir el anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$  no aumentó significativamente la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> con respecto a la condición sin TGF- $\beta$  (**Figura 11 D**). Sin embargo, esta población no se expresó correctamente en células de ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> por lo que su frecuencia siempre fue menor a 1.5% independientemente de la concentración de TGF- $\beta$  presente en el cultivo e incluso neutralizando cualquier cantidad de TGF- $\beta$  presente en el medio (**Figura 11 B**), la frecuencia de esta población no se recuperó al nivel del grupo control (**Figura 11 D**).

Por otro lado, el TGF- $\beta$  inhibió la población de linfocitos CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> de manera dependiente de la dosis en ratones control y TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y no se encontró diferencia entre ambos grupos (**Figura 11 E**). En este caso, la frecuencia de la condición sin TGF- $\beta$  del grupo TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> fue mayor que la del grupo control (44.8% y 31.15%, respectivamente) aunque no alcanzó significancia estadística. Estos resultados sugieren que la deficiencia de TIF1 $\gamma$  no afecta la producción de IFN- $\gamma$  sino la expresión de CXCR3.

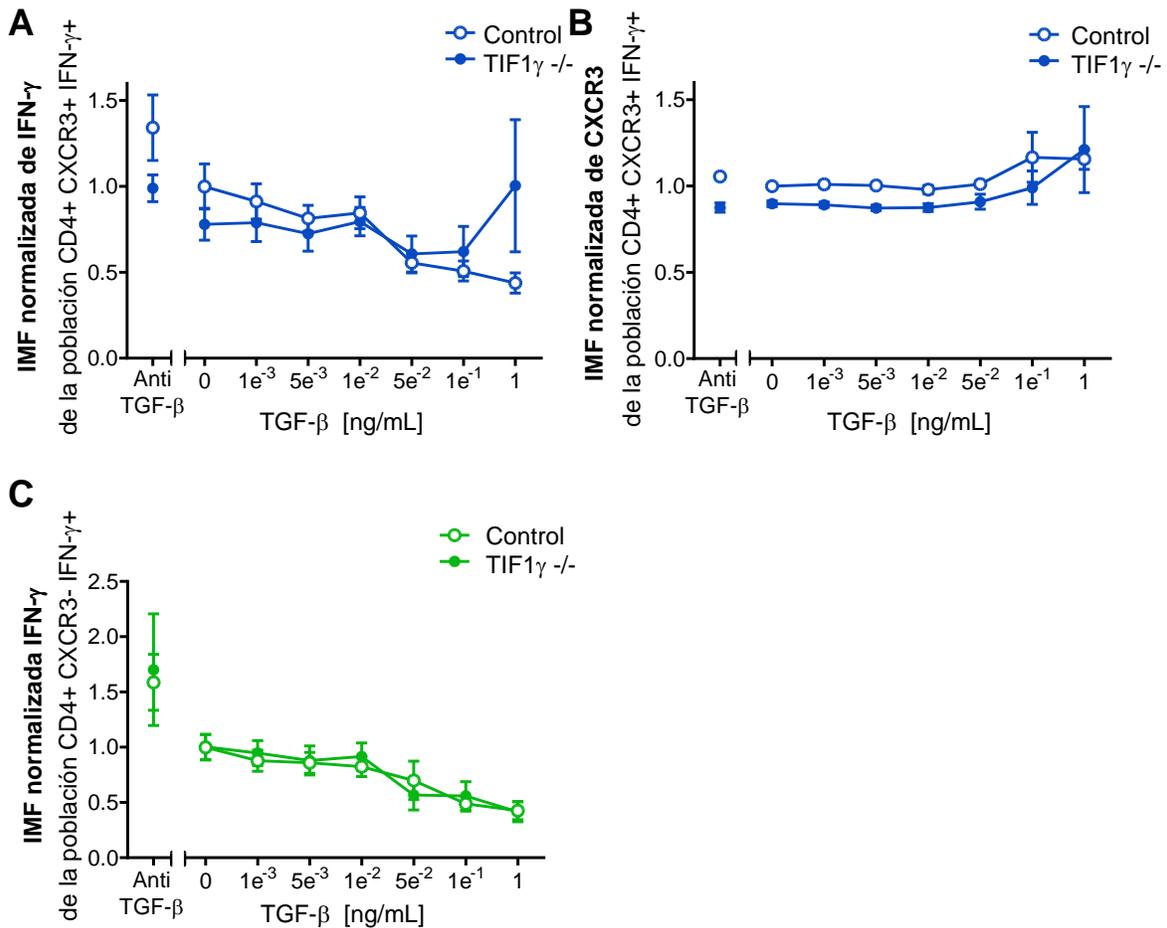
La concentración inhibitoria 50 (IC50) del TGF- $\beta$  fue similar entre las poblaciones y fenotipo analizados siendo menor para la población IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> (Control: 0.029 ng/mL; TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup>: 0.022 ng/mL) y mayor en la población IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> (Control: 0.035 ng/mL; TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup>: 0.039 ng/mL) (Valores calculados a partir de los datos mostrados en la **Figura 13 D, E** ajustados al modelo descrito en el **Anexo IV**). Esto confirma que la ausencia de TIF1 $\gamma$  en linfocitos CD4<sup>+</sup> no modifica la sensibilidad de estas células al TGF- $\beta$  pero afecta la expresión de CXCR3 en estas células.

El nivel de producción de IFN- $\gamma$  en ambas poblaciones celulares (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup>) disminuyó dependiendo de la concentración de TGF- $\beta$  presente en el medio en las células de ratones control (**Figura 12 A, C**). El nivel de producción de IFN- $\gamma$  en las células de ratones KO siguió la misma tendencia en la población IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> (**Figura 12 C**) pero se mantuvo estable en las células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> aunque en ninguna condición la diferencia entre las células control y TIF1 $\gamma$  <sup>-/-</sup> fue estadísticamente significativa (**Figura 12 A**). Por otra parte, a pesar de las diferencias en la frecuencia de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> entre ratones control y TIF1 $\gamma$  <sup>-/-</sup>, el nivel de expresión de CXCR3 en esta población se mantuvo estable en todas las condiciones analizadas (**Figura 12 B**).



**Figura 11. Inhibición de IFN- $\gamma$  y CXCR3 por TGF- $\beta$  en células deficientes de TIF1 $\gamma$ .** Cocultivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con esplenocitos irradiados en condiciones polarizantes hacia Th1 con anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$  (Anti TGF- $\beta$ ) o distintas concentraciones de TGF- $\beta$ . **A**) Estrategia de análisis de la población CD4<sup>+</sup>. Las células se seleccionaron realizando una exclusión de células muertas, dobletes y células CD4<sup>-</sup>. **B, C**) Gráficas de puntos representativas mostrando la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de CXCR3 de células CD4<sup>+</sup> de ratones control (fila superior) y TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> (fila inferior) polarizadas hacia el fenotipo Th1 con anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$  (**B**) o distintas concentraciones de TGF- $\beta$  (0-1 ng/mL) (**C**). **D**) Gráfica de dosis-respuesta de la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> de ratones control (círculos claros) y TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> (círculos oscuros) con anticuerpo neutralizante o distintas concentraciones de TGF- $\beta$ . **E**) Gráfica de dosis-respuesta de la frecuencia de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> de ratones control y TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup>, con anticuerpo neutralizante o distintas concentraciones de TGF- $\beta$ .

+=p<0.05; +=p<0.01, con respecto a la condición sin TGF- $\beta$  (0 ng/mL) del grupo control. \*=p<0.05; \*\*=p<0.01, entre grupo control y TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> con la misma concentración de TGF- $\beta$ . n= 7 ratones por grupo. 3 experimentos independientes.



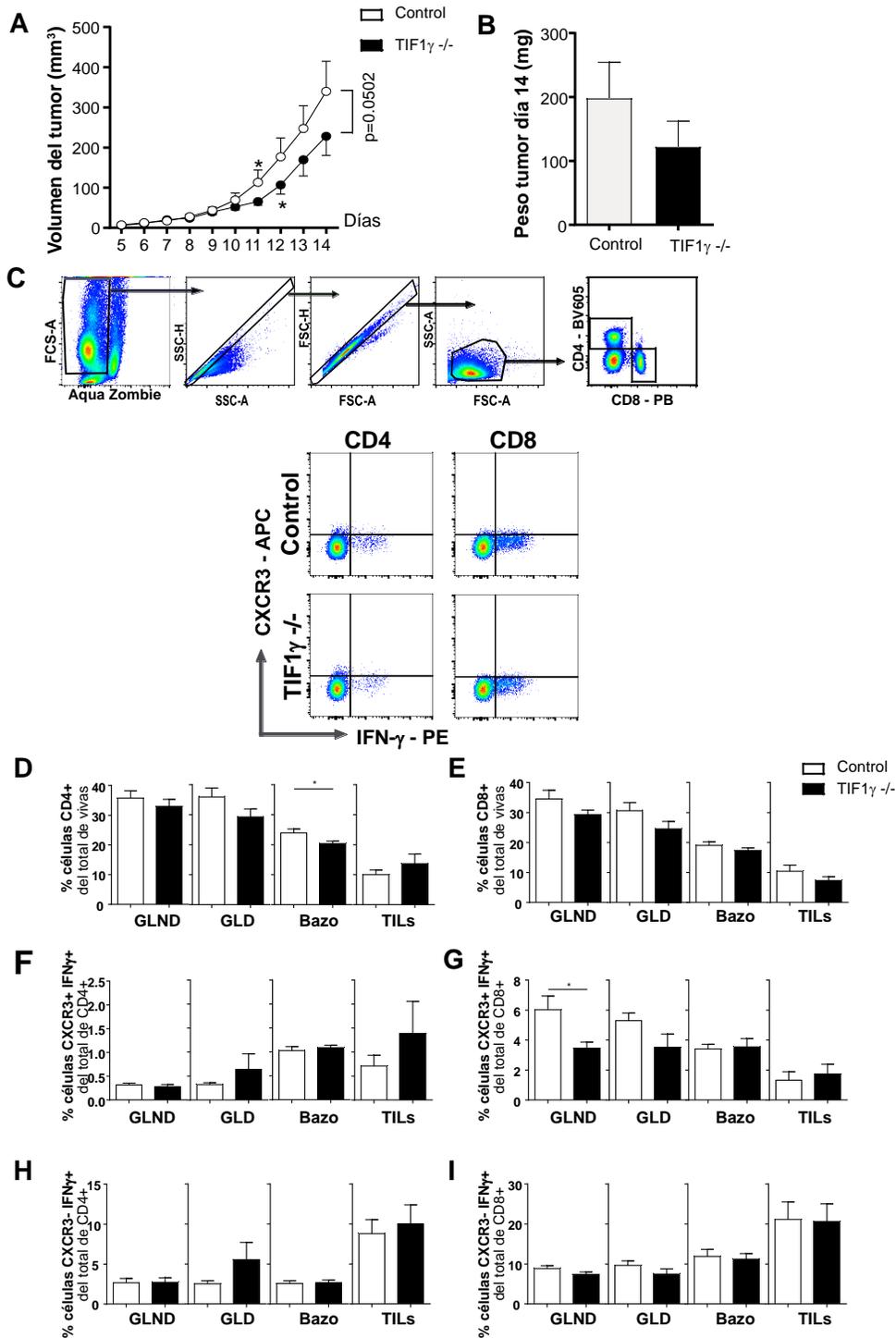
**Figura 12. Inhibición de IFN- $\gamma$  y CXCR3 por TGF- $\beta$  en células deficientes de TIF1 $\gamma$ .** Cocultivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con esplenocitos irradiados, en condiciones polarizantes hacia Th1 con anticuerpo contra TGF- $\beta$  (Anti TGF- $\beta$ ) o distintas concentraciones de TGF- $\beta$ . **A, B**) Gráfica de dosis-respuesta de la intensidad media de fluorescencia (IMF) normalizada (con respecto a la condición en ausencia de TGF- $\beta$  en células control) de IFN- $\gamma$  (**A**) y CXCR3 (**B**) de la población CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> de ratones control (círculos claros) y TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> (círculos oscuros), con distintas concentraciones de TGF- $\beta$ . **C**) Gráfica de dosis-respuesta de la intensidad media de fluorescencia (IMF) normalizada (con respecto a la condición en ausencia de TGF- $\beta$  en células control) de IFN- $\gamma$  de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> de ratones control y TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> con distintas concentraciones de TGF- $\beta$ . n = 7 ratones por grupo. 3 experimentos independientes.

Estos resultados muestran que el TGF- $\beta$  es capaz de inhibir casi totalmente la producción de IFN- $\gamma$  en las poblaciones analizadas. Únicamente el 2% de las células tratadas con 1 mg/mL de TGF- $\beta$  son capaces de producir IFN- $\gamma$ . Además, muestran que la expresión de CXCR3 en la población IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> depende de TIF1 $\gamma$  y es independiente de la concentración de TGF- $\beta$  presente en el medio. Lo anterior sugiere que TIF1 $\gamma$  podría estar actuando río abajo de otras vías de señalización distintas a la del TGF- $\beta$  para regular la expresión de CXCR3.

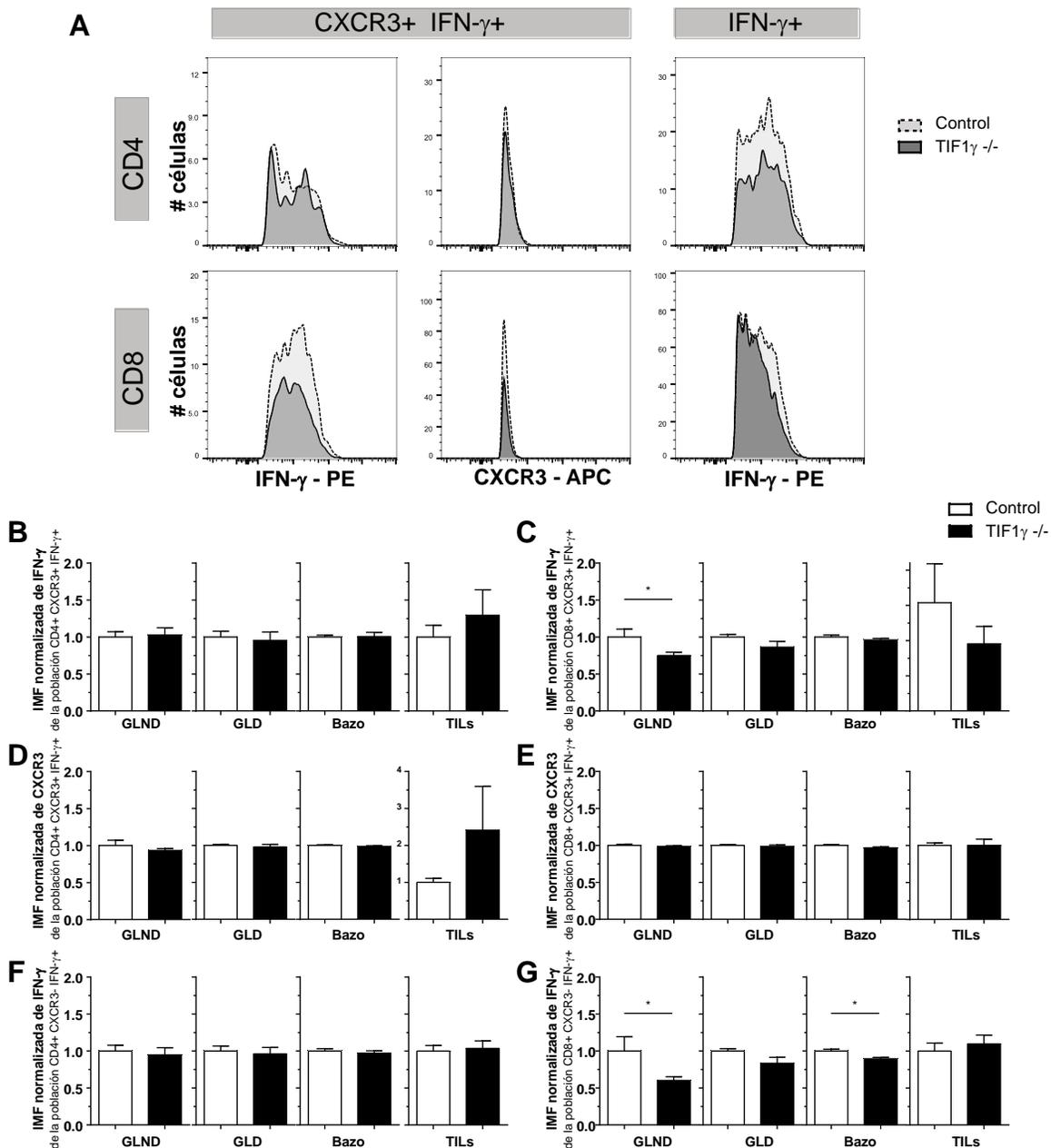
#### 8.4 Respuesta anti-tumoral de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$

Para analizar si las células T de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  presentaban defectos funcionales durante un proceso inflamatorio evaluamos su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de melanoma. Durante el desarrollo tumoral, la señalización por TGF- $\beta$  y la señalización por IFN- $\gamma$  tienen un papel central y antagónico. Por ello inoculamos a los ratones TIF1 $\gamma$   $-/-$  y ratones control con células B16. Estas células son una línea celular de un melanoma murino que surgió espontáneamente y constituyen uno de los principales modelos murinos para el estudio del desarrollo de cáncer (Overwijk & Restifo, 2001). Todos los ratones de cada repetición experimental se mantuvieron en una misma caja durante todo el experimento. Se monitoreó el tamaño tumoral cada día a partir del día 5 postinoculación (p.i.) donde todos los ratones excepto uno presentaron un tumor visible (**Figura 13 A**). En el día 14 p.i. los ratones fueron sacrificados. A partir del día 11 p.i. el volumen del tumor de los ratones control presentó un crecimiento significativo al compararlo con el volumen del mismo grupo al día 5 (**Figura 13 A**). Por su parte, el tumor de los ratones TIF1 $\gamma$   $-/-$  no presentó un crecimiento significativo sino hasta el día 12 lo cual representa un retraso de 1 día en el crecimiento tumoral del grupo de ratones TIF1 $\gamma$   $-/-$  (**Figura 13 A**). No obstante, la diferencia de volumen entre ratones control y TIF1 $\gamma$   $-/-$  no alcanzó significancia estadística aunque presentó una tendencia de mayor diferencia el último día analizado ( $p=0.0502$ ) (**Figura 13 A**). Tampoco se observó una diferencia significativa en el peso de los tumores de ambos fenotipos (**Figura 13 B**). Para analizar por citometría las poblaciones de linfocitos CD4 $^+$  y CD8 $^+$  productores de IFN- $\gamma$  y que expresaran CXCR3 se realizó la estrategia de análisis mostrada en la **Figura 13 C, D**.

La frecuencia de células CD4 $^+$  y CD8 $^+$  totales no fue distinta entre ratones control y TIF1 $\gamma$   $-/-$  inoculados con células de melanoma (**Figura 13 D, E**). Únicamente la población de linfocitos CD4 $^+$  totales del bazo de ratones TIF1 $\gamma$   $-/-$  mostró una disminución significativa con respecto al grupo de ratones control (**Figura 13 F**). Cuando analizamos las poblaciones IFN- $\gamma$  $^+$  CXCR3 $^+$  no encontramos diferencias en las células CD4 $^+$  (**Figura 15 F**) y en las células CD8 $^+$  solamente observamos diferencias en los ganglios linfáticos no drenantes (GLND) con una menor frecuencia en el grupo de ratones TIF1 $\gamma$   $-/-$  con respecto al grupo control (**Figura 15 G**). No se encontraron diferencias entre ratones control y TIF1 $\gamma$   $-/-$  en las frecuencias de poblaciones CD4 $^+$  IFN- $\gamma$  $^+$  CXCR3 $^-$  (**Figura 15 H**) y CD8 $^+$  IFN- $\gamma$  $^+$  CXCR3 $^-$  (**Figura 15 I**).



**Figura 13. Inmunidad antitumoral en ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ .** Análisis del crecimiento tumoral y poblaciones de linfocitos Th1 y CTLs al día 14 post-inoculación. **A)** Gráfica de crecimiento tumoral en ratones control (círculos claros) y TIF1 $\gamma^{-/-}$  (círculos oscuros). **B)** Peso del tumor de ratones control (barra clara) y TIF1 $\gamma^{-/-}$  (barra oscura) en el día 14 post-inoculación. **C)** Estrategia de análisis de poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y CXCR3<sup>+</sup> de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en distintos órganos. **D, F)** Frecuencias de células CD4<sup>+</sup> totales (**D**), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**E**) y CXCR3<sup>+</sup> (**F**) de ratones control (barras claras) y TIF1 $\gamma^{-/-}$  (barras oscuras) en distintos órganos. **G, I)** Frecuencias de células CD8<sup>+</sup> totales (**G**), IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**H**) y CXCR3<sup>+</sup> (**I**) de control y TIF1 $\gamma^{-/-}$  en distintos órganos. \* $p < 0.05$  entre ratones control y TIF1 $\gamma^{-/-}$  en el mismo órgano.  $n = 14-17$  ratones por grupo. 3 experimentos independientes.

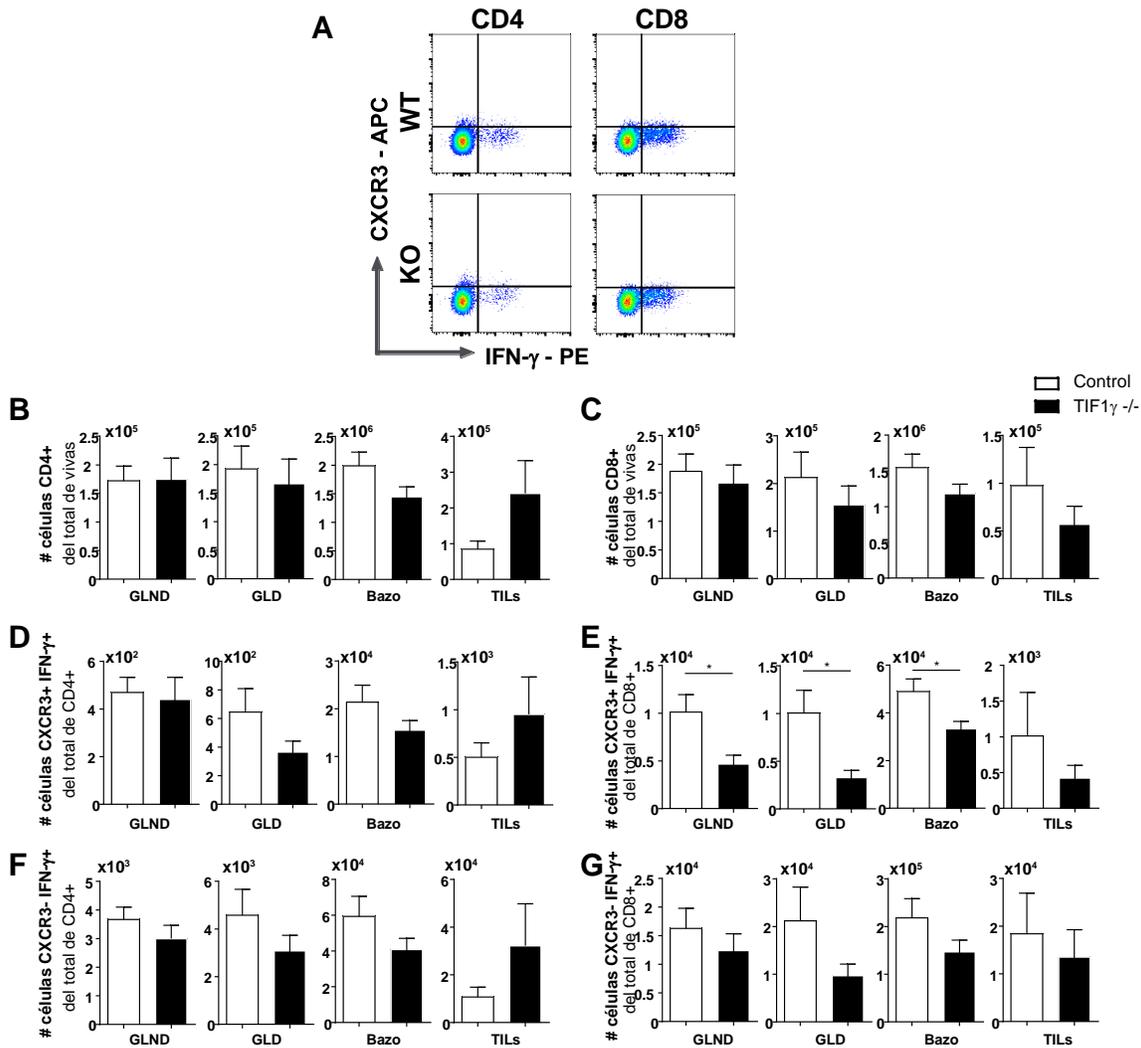


**Figura 14.** Inmunidad antitumoral en ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ . Análisis de poblaciones de linfocitos Th1 y CTLs al día 14 post-inoculación. **A - D)** Intensidad media de fluorescencia (IMF) normalizada (con respecto al grupo WT de cada órgano) de IFN $\gamma$  (**A, B**) y CXCR3 (**C, D**) de la población IFN $\gamma^+$  CXCR3 $^+$  de células CD4 $^+$  (**A, C**) y CD8 $^+$  (**B, D**) en distintos órganos linfoides de ratones silvestres (WT, barras claras) y deficientes de TIF1 $\gamma$  (KO, barras negras). **E, F** IMF normalizada (con respecto al grupo WT de cada órgano) de IFN $\gamma$  de la población IFN $\gamma^+$  CXCR3 $^-$  de células CD4 $^+$  (**E**) y CD8 $^+$  (**F**) en distintos órganos linfoides de ratones WT (barras claras) y KO (barras negras). GLND, Ganglios linfáticos no drenantes. GLD, Ganglios linfáticos drenantes. TILs, Linfocitos Infiltrados del Tumor. n = 14-17 ratones, 3 experimentos independientes. \*= $p < 0.05$  entre grupo WT y KO del mismo órgano.

Los niveles de producción de IFN- $\gamma$  y expresión de CXCR3 en las células CD4 $^+$  IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^+$  fueron similares entre ratones control y TIF1 $\gamma$   $^-/-$  (**Figura 14 A, B, D**). Lo mismo ocurrió con el nivel de producción de IFN- $\gamma$  de los linfocitos CD4 $^+$

IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^-$  (**Figura 14 F**). En las células CD8 $^+$  únicamente se encontraron cambios en los niveles de IFN- $\gamma$ . La producción de esta citocina en las poblaciones CD8 $^+$  IFN- $\gamma^+$  (CXCR3 $^+$  y CXCR3 $^-$ ) fue menor en los ganglios linfáticos no drenantes (GLND) del grupo de ratones TIF1 $\gamma^{-/-}$  con respecto al nivel de producción en el mismo órgano del grupo control (**Figura 14 C, G**). Este fenotipo también pudo observarse en la población CD8 $^+$  IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^-$  del bazo (**Figura 14 G**). Por su parte los niveles de expresión de CXCR3 en linfocitos CD8 $^+$  IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^+$  no cambiaron entre ratones control y TIF1 $\gamma^{-/-}$  en ninguno de los órganos analizados (**Figura 14 E**).

También se analizaron los números totales de las distintas poblaciones celulares (**Figura 15A**). El número de células CD4 $^+$  y CD8 $^+$  totales no se modificó por ausencia de TIF1 $\gamma$  en ninguno de los órganos analizados (**Figura 15 B, C**). El número total de células IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^+$  e IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^-$  de la población CD4 $^+$  no cambió significativamente entre los ratones control y TIF1 $\gamma^{-/-}$  (**Figura 15 D, F**) aunque en los órganos linfoides, hubo una tendencia a un menor número en los ratones TIF1 $\gamma^{-/-}$  y en el tumor el número tendió a ser mayor en el grupo TIF1 $\gamma^{-/-}$ . La tendencia observada en los órganos linfoides también se observó en la población CD8 $^+$  IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^+$  y fue significativa en todos los órganos linfoides (**Figura 15 E**). Esta tendencia también se observó en TILs y en la población CD8 $^+$  IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^-$  de todos los órganos analizados pero la diferencia no fue significativa (**Figura 15 G**).



**Figura 15. Inmunidad antitumoral en ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ .** Análisis de poblaciones de linfocitos Th1 y CTLs al día 14 post-inoculación. **A, B)** Números de linfocitos CD4<sup>+</sup> totales (**A**) y CD8<sup>+</sup> totales de ratones control (WT, barras claras) y deficientes de TIF1 $\gamma$  (KO, barras oscuras) en distintos órganos. **C, D)** Números de linfocitos IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en la población CD4<sup>+</sup> (**C**) y CD8<sup>+</sup> (**D**) de ratones WT y KO en distintos órganos. **E, F)** Números de linfocitos IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> en la población CD4<sup>+</sup> (**E**) y CD8<sup>+</sup> (**F**) de ratones WT y KO en distintos órganos. GLND, Ganglios linfáticos no drenantes. GLD, Ganglios linfáticos drenantes. TILs, Linfocitos Infiltrados del Tumor. n=14-17 ratones por grupo. 3 experimentos independientes. \* = p < 0.05 entre grupo WT y KO del mismo órgano.

Estos resultados muestran que la deficiencia de TIF1 $\gamma$  en células T afecta distintos aspectos de la respuesta inmunológica contra tumores y de las poblaciones de linfocitos IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. En primer lugar, disminuye el crecimiento tumoral pero no modifica las frecuencias de linfocitos CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. La deficiencia de TIF1 $\gamma$  únicamente disminuye la frecuencia de células CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en GLND. En segundo lugar, esta deficiencia afecta el nivel de producción de IFN- $\gamma$  de poblaciones específicas de GLND y bazo. En tercer lugar, induce una reducción significativa del número de linfocitos CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> y esta tendencia se mantiene en todas las poblaciones de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> excepto en las

células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (CXCR3<sup>+</sup> y CXCR3<sup>-</sup>) de TILs donde se observa el efecto inverso por ausencia de TIF1 $\gamma$ .

En conjunto, todos los resultados obtenidos en los distintos contextos experimentales muestran que los efectos y respuestas celulares dependientes de TIF1 $\gamma$  dependen del órgano analizado y el tipo de microambiente presente en el mismo pero la población más afectada en todos los casos es la de células, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>.

## 9. Discusión

Se ha mostrado que la familia de proteínas TRIM juega un papel central en la regulación de diversos procesos inmunológicos (Chikuma *et. al.*, 2012; Versteeg *et. al.*, 2014). TIF1 $\gamma$  en particular es una proteína sumamente interesante pues regula la respuesta celular al TGF- $\beta$  cooperando o compitiendo con su vía canónica de señalización dependiendo del contexto celular y la disponibilidad de SMAD4 (He *et. al.*, 2006; Xi *et. al.*, 2011). Esta proteína participa en el desarrollo y activación de distintas células inmunológicas (Demy *et. al.*, 2017; Doisne *et. al.*, 2009; Ferri *et. al.*, 2015; Tanaka *et. al.*, 2018). En este trabajo caracterizamos la participación de TIF1 $\gamma$  en la diferenciación de los linfocitos Th1 y los linfocitos CTLs a través de medir la producción de IFN- $\gamma$  y la expresión de CXCR3 en distintos contextos celulares.

En condiciones de homeostasis en ratones jóvenes, la deficiencia de TIF1 $\gamma$  no afectó las frecuencias de poblaciones de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Esto concuerda con una publicación donde muestran que la única población tímica afectada por la falta de TIF1 $\gamma$  son las células iNKT que muestran defectos en su maduración y supervivencia (Doisne *et. al.*, 2009). Tampoco se observaron defectos en el porcentaje de linfocitos IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de ratones jóvenes deficientes de esta proteína. Al comparar las mismas poblaciones en ratones control jóvenes con poblaciones de ratones viejos, fue posible observar que el incremento fisiológico de las frecuencias de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> que se ha reportado ampliamente en la literatura (Wakikawa, Utsuyama, Wakabayashi, Kitagawa, & Hirokawa, 1999; Yen, Lin, Huang, & Lin, 2000; Goronzy & Weyand, 2017). No obstante, este incremento no ocurrió en las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> del grupo de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ . Además, la menor frecuencia de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> viejos correlacionó con una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  en esta población de células CD4<sup>+</sup> en los distintos órganos analizados. También se pudo observar una tendencia a la baja en los números totales de esta población CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Ratones deficientes de SMAD4 específicamente en linfocitos T tienen una menor esperanza de vida que los ratones control y presentan inflamación colorectal (Kim

et. al., 2006). Nosotros observamos que el fenotipo inflamatorio asociado a la vejez está disminuido en los ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ . La hipótesis de que la señalización de TGF- $\beta$  a través de TIF1 $\gamma$  y SMAD4 puede inducir respuestas celulares diferentes, y en este caso antagónicas, concuerda con estos resultados. Es posible que los ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ , al expresar bajos niveles de IFN- $\gamma$  durante la vejez, tengan un fenotipo general semejante al de los ratones jóvenes control y opuesto a los ratones deficientes de SMAD4. Analizar si la esperanza de vida de ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> es mayor que la de los ratones control respaldaría esta hipótesis. Además, sería interesante averiguar si los niveles de otras citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias se encuentran disminuidos durante la vejez en este grupo de ratones con respecto a ratones control. También habría que realizar un análisis más minucioso donde se evalúe si la disminución de poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en ausencia de TIF1 $\gamma$ , promueven diferencias en la inflamación basal de tejidos en ratones viejos haciendo cortes histológicos de tejidos como colon, pulmón e hígado donde se esperaría observar un menor infiltrado linfocitario, o cambios en tejido adiposo como celularidad disminuída. Además, es necesario averiguar la susceptibilidad de los ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> viejos a otros retos inmunológicos como infecciones bacterianas o modelos de autoinmunidad.

No obstante, los ensayos realizados no nos permiten determinar las causas del fenotipo observado durante el envejecimiento. Hace falta determinar si el hecho de que las frecuencias de poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no aumentaran con la edad en ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  como lo hacen en ratones control, es consecuencia de problemas en el desarrollo y la activación de las células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en la vejez o por problemas en el mantenimiento y supervivencia de poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> generadas durante la juventud como poblaciones de memoria. Además, sería interesante averiguar si diversos procesos fisiopatológicos asociados con la vejez como enfermedades crónico-degenerativas, enfermedades autoinmunes y cáncer, mejoran o no son tan perjudiciales en ratones deficientes de TIF1 $\gamma$ . Lo anterior sería de gran utilidad en la clínica y posicionaría a TIF1 $\gamma$  como una molécula blanco para el tratamiento de éstas patologías.

Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que TIF1 $\gamma$  no participa en la polarización *de novo* de linfocitos T CD4<sup>+</sup> “naïve” hacia el linaje Th1 analizado por la producción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, estos resultados no coinciden con los resultados obtenidos por la doctora Paula Licona durante su estancia posdoctoral (datos no publicados) donde se encontraba un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  en ausencia de TIF1 $\gamma$ . Esto puede deberse a diferencias en la metodología utilizada.

Los resultados en este trabajo indican que la polarización *in vitro* hacia el fenotipo Th1, determinada por la producción de IFN- $\gamma$ , no se ve modificada por la ausencia

de TIF1 $\gamma$  en las células CD4<sup>+</sup>. Esto concuerda con lo observado *in vivo* en los ratones jóvenes donde no hay diferencias en las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> a las 10 semanas de edad. Sería interesante realizar cultivo *in vitro* con linfocitos proveniente de ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> de más de 40 semanas de edad donde observamos diferencias con respecto al grupo control de la misma edad.

Recientemente, Tanaka *et. al.* describió que la ausencia de TIF1 $\gamma$  induce una sobreexpresión de IL-10 en células Th17 (Tanaka *et. al.*, 2018). La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que podría estar inhibiendo *in vivo* e *in vitro* la activación celular de APCs y linfocitos. Es posible que en otros fenotipos efectoras como Th1 TIF1 $\gamma$  también se encargue de inhibir la expresión de IL-10 y por ello esté desregulada en las células Th1. Esto causaría que las APCs estuvieran expuestas a un microambiente diferente al cocultivarse con células control y deficientes de TIF1 $\gamma$  y ello indujera una capacidad diferente para polarizar a los linfocitos vírgenes. Lo anterior podría confirmarse con ensayos de ELISA en los sobrenadantes de los cultivos *in vitro*.

El TGF- $\beta$  es una citocina antiinflamatoria que actúa de varias maneras en diversos tipos celulares (Yoshimura, Wakabayashi, & Mori, 2010). Una de estas maneras es la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  en células CD4<sup>+</sup> (Lin *et. al.*, 2005; Park, Letterio, & Gorham, 2007). Además se ha reportado que las células troncales hematopoyéticas deficientes de TIF1 $\gamma$  son sensibles a menores concentraciones de TGF- $\beta$  (Quére *et. al.*, 2014). Los resultados de la curva de TGF- $\beta$  muestran que en linfocitos T CD4<sup>+</sup> la inhibición de la población IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> por TGF- $\beta$  ocurre de manera independiente de TIF1 $\gamma$ . Además, muestran que la deficiencia de TIF1 $\gamma$  no afecta la sensibilidad al TGF- $\beta$  de las poblaciones IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pues los IC50 del grupo control y el grupo TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> son similares. No obstante, nuestros experimentos demuestran que la presencia de TIF1 $\gamma$  es necesaria para la correcta expresión de la población IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en linfocitos polarizados hacia el fenotipo Th1 independientemente de la señalización por TGF- $\beta$ . Este resultado también concuerda con los resultados obtenidos *in vivo* pues en ratones viejos también observamos defectos en la expresión de CXCR3 en los ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup>. No obstante, en ratones jóvenes *in vivo* la frecuencia de linfocitos IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> no fue tan baja como en los experimentos *in vitro*. Esto sugiere que existen vías de señalización redundantes para la expresión de CXCR3 y TIF1 $\gamma$  no participa en todas ellas o que en condiciones de inflamación la regulación de CXCR3 sea independiente de TIF1 $\gamma$ .

Esto también sugiere que TIF1 $\gamma$  regula la expresión génica a través de otros mecanismos y no únicamente río abajo de la señalización de TGF- $\beta$ . Sin embargo, no podemos descartar la participación de otras proteínas de la superfamilia de TGF- $\beta$  como activinas o BMPs presentes en el suero que regulen CXCR3 a través

de TIF1 $\gamma$ . Sería necesario realizar este experimento con inhibidores del receptor TGF- $\beta$ RI o de las R-SMAD para verificar la participación de la vía canónica en la regulación de CXCR3. Este receptor de quimiocinas es necesario para la correcta infiltración de linfocitos Th1 y CTLs en sitios de inflamación (Groom & Luster, 2011; Hickman *et. al.*, 2015). Para averiguar si las células deficientes de TIF1 $\gamma$  presentan defectos en quimiotaxis sería necesario realizar ensayos de migración con los ligandos de CXCR3: CXCL9, CXCL10 y CXCL11.

Este receptor de quimiocinas también participa en la generación de poblaciones efectoras mientras que su ausencia favorece el desarrollo de poblaciones de memoria (Hu, Kagari, Clingan, & Matloubian, 2011; Kurachi *et. al.*, 2011). Esto sugeriría que los ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  tienen un mayor número de células de memoria que sus contrapartes silvestres. Durante la vejez, la generación de células de memoria está afectada (Maue, *et. al.*, 2009). Si esto depende del incremento de poblaciones CXCR3<sup>+</sup> los ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> viejos no presentarían estos defectos. Será necesario analizar marcadores de memoria o activación en ratones TIF1 $\gamma$ <sup>-/-</sup> de más de 40 semanas de edad para corroborar lo anterior.

La transcripción de CXCR3 es activada directamente por T-bet que también activa IFN- $\gamma$  (Beima *et. al.*, 2006; Lord, 2005). Sería interesante analizar si TIF1 $\gamma$  está regulando directamente los niveles de T-bet y por ello, en ausencia de TIF1 $\gamma$  la población IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> no se expresa adecuadamente. Otra posible explicación es que TIF1 $\gamma$  se una directamente a regiones reguladoras de CXCR3 o IFN- $\gamma$ , aunque para ello necesitaría de la asociación con otros factores de transcripción pues TIF1 $\gamma$  solamente reconoce marcas epigenéticas, y no induce transcripción génica por sí sólo.

El mecanismo por el cual TIF1 $\gamma$  podría regular a la población IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> independientemente de TGF- $\beta$  no está determinado. Se ha observado que la señalización por RA induce la diferenciación hacia el fenotipo Th1 durante la enfermedad de injerto contra huésped mientras que la inhibición de esta vía disminuye las poblaciones IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CXCR3<sup>+</sup> (Aoyama *et. al.*, 2019). Además, se ha reportado que TIF1 $\alpha$  regula negativamente la señalización de ácido retinoico (RA, "Retinoic Acid") a través de la interacción con el receptor de RA  $\alpha$  (RAR $\alpha$ , "Retinoic Acid Receptor alpha") (Khetchoumian *et. al.*, 2007) e inhibe la vía de señalización IFN/STAT (Tisserand, Khetchoumian, Thibault, Dembe, & Chambon, 2011). En suma a lo anterior, existen reportes que muestran que TIF1 $\alpha$  puede asociarse con TIF1 $\gamma$  (Herquel *et. al.*, 2011). Un posible mecanismo para explicar la inhibición de CXCR3 por deficiencia de TIF1 $\gamma$  es que esta proteína regule la interacción de TIF1 $\alpha$  con RAR $\alpha$  y de esta manera, al eliminar a TIF1 $\gamma$ , TIF1 $\alpha$  inhiba libremente la actividad de RAR $\alpha$  y la expresión de CXCR3.

Por otra parte, se reportó que la expresión de CCR6 disminuye en linfocitos Th17 deficientes de TIF1 $\gamma$  (Tanaka *et. al.*, 2018). Estos resultados sugieren que TIF1 $\gamma$  podría regular la migración de distintos grupos de linfocitos T a través de regular la expresión de sus receptores de quimiocinas.

Por otro lado, se ha demostrado que el TGF- $\beta$  inhibe la actividad anticancerígena de las CTLs suprimiendo la producción de moléculas citotóxicas e IFN- $\gamma$  a través de SMAD2 y SMAD3 (Thomas & Massagué, 2005). Los resultados obtenidos *in vivo* en el modelo de melanoma sugieren que la deficiencia de TIF1 $\gamma$  favorece la actividad anticancerígena de los linfocitos T e inhibe el crecimiento tumoral. Otros grupos de investigación han reportado el efecto contrario por la deficiencia de SMAD4; la eliminación condicional de SMAD4 en células T induce la generación espontánea de tumores gastrointestinales (Kim *et. al.*, 2006). De la misma forma, en un modelo antígeno específico de melanoma, la deficiencia de SMAD4 en las células CD4 $^{+}$  incrementa la frecuencia de incidencia de tumor en comparación con los ratones silvestres (Gu *et. al.*, 2015). Lo anterior respalda la hipótesis de que SMAD4 y TIF1 $\gamma$  compiten por el complejo SMAD2/3 durante la señalización por TGF- $\beta$  y cada complejo induce respuestas celulares antagónicas. Además sugiere que TGF- $\beta$  podría inhibir la respuesta inmunológica antitumoral de los linfocitos a través de TIF1 $\gamma$ .

No obstante, en nuestros experimentos no observamos diferencias entre el grupo de ratones TIF1 $\gamma$   $-/-$  y el grupo de ratones control en las frecuencias de células IFN- $\gamma$  $^{+}$  de los distintos órganos analizados. Únicamente observamos efectos moderados en la población IFN- $\gamma$  $^{+}$  CXCR3 $^{+}$  de los ganglios linfáticos no drenantes y en el nivel de producción de IFN- $\gamma$  en el mismo órgano. Además, observamos que el número total de células CD8 $^{+}$  IFN $\gamma$  $^{+}$  CXCR3 $^{+}$  en los distintos órganos linfoides fue menor en el grupo de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  que en grupo control. A pesar de que el IFN $\gamma$  $^{+}$  es necesario para inhibir el desarrollo tumoral (Böhm *et. al.*, 1998; Zhang, Zhu, McKinley, & Meadows, 2011; Zhang *et. al.*, 2011), se ha mostrado recientemente que el IFN- $\gamma$  también puede tener efectos protumorales pues la exposición crónica a esta citocina induce la expresión de inhibidores de las células T por las células tumorales (Benci *et. al.*, 2016). Esto podría explicar la distinta eficacia en el control tumoral entre nuestros 2 grupos experimentales. Además, sería necesario analizar la expresión de otras moléculas relacionadas con la inmunidad antitumoral en linfocitos deficientes de TIF1 $\gamma$  como GranzimaB, Perforina o factor de necrosis tumoral (TNF, "Tumor Necrosis Factor").

También es posible que otras poblaciones de linfocitos T como Treg, Th17 o Th9, que también se han visto involucradas en la inmunidad antitumoral, estén afectadas por la ausencia de TIF1 $\gamma$  (Lu *et. al.*, 2012; Nagarsheth, Kryczek, Wei, Frankel, & Zou, 2016; Tu, Chia, & Chen, 2014). Datos de la Dra. Paula Licon y

generados en el laboratorio por Eugenio Contreras Castillo sugieren que la deficiencia de TIF1 $\gamma$  también está afectando la estabilidad y funcionalidad de poblaciones de Tregs *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere que el fenotipo observado en el modelo de tumor no sólo depende de una población específica de linfocitos T sino que es la suma de varias poblaciones linfocitarias afectadas por la deficiencia de TIF1 $\gamma$ .

Se ha observado que la expresión de CXCR3 es necesaria para el reclutamiento de células Treg a sitios de inflamación. Defectos en la expresión de CXCR3 podrían afectar la migración e infiltración tumoral no solo de linfocitos Th1 y CTLs sino también de Tregs (Mueller, 2007). Datos generados por Eugenio Contreras Castillo muestran que al día 14 no hay diferencias en las poblaciones de Treg infiltradas en el tumor. No obstante, es posible que la cinética de llegada de esta población se más lenta en los ratones TIF1 $\gamma$   $-/-$  que en lo ratones control.

Para analizar que parte del fenotipo es dependiente de cada subtipo celular por separado se podrían utilizar cepas de ratones que expresen la Cre recombinasa bajo promotores de poblaciones específicas como FoxP3 CRE o IFN- $\gamma$  CRE. Adicionalmente, no podemos descartar el efecto conjunto de la deficiencia de TIF1 $\gamma$  en otras células, pues en este mismo modelo utilizando CD4 CRE se afecta la maduración de células iNKT (Doisne *et. al.*, 2009) mismas que también se han visto implicadas en el control tumoral (Kronenberg & Gapin, 2002).

La disminución de números totales en linfocitos CD8 $^+$  IFN $\gamma$  $^+$  CXCR3 $^+$  de ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  sugiere defectos en la supervivencia o la diferenciación celular. Varias publicaciones han reportado una implicación de esta proteína en la regulación de la apoptosis. La eliminación de TIF1 $\gamma$  en diversos tipos celulares aumenta la apoptosis de los mismos (Doisne *et. al.*, 2009; Dupont *et. al.*, 2005; Rajderkar, Panaretos, & Kaartinen, 2017). Además se ha mostrado que esta proteína participa en la reparación de DNA (Kulkarni *et. al.*, 2013). En el mismo sentido, en un modelo murino de leucemia linfoblástica aguda de células B, se mostró que TIF1 $\gamma$  inhibía la apoptosis de éstas células inhibiendo la expresión de un gen proapoptótico (Cao *et. al.*, 2015). Por otra parte, diversas publicaciones han reportado un papel importante de TIF1 $\gamma$  en la maduración de diversos tipos celulares (Doisne *et. al.*, 2009; He *et. al.*, 2006; Hesling *et. al.*, 2013; Rajderkar *et. al.*, 2017). Para elucidar lo anterior, sería necesario realizar ensayos de proliferación, apoptosis y averiguar a través de un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, si TIF1 $\gamma$  está uniéndose a regiones reguladoras de genes proapoptóticos.

Estudios de inmunoprecipitación de la cromatina acoplados a secuenciación masiva (ChIP-seq) en diversos tipos celulares han mostrado que TIF1 $\gamma$  es capaz de unirse a regiones de la cromatina ocupados por otros factores de transcripción,

como PU.1 y ROR $\gamma$ t (Tanaka *et. al.*, 2018; Wang *et. al.*, 2015). Estos estudios muestran que dependiendo del tipo celular, TIF1 $\gamma$  puede interactuar con diversas proteínas y regular su actividad. Sería necesario realizar experimentos de ChIP-seq de linfocitos Th1 y CTL purificados por FACS para determinar si TIF1 $\gamma$  colocaliza con T-bet u otros factores de transcripción asociados a poblaciones de linfocitos específicas y regula de esta manera la transcripción y expresión de IFN $\gamma$  o de otras moléculas efectoras de Th1 o CTLs. Además, estos estudios nos permitirían identificar los posibles genes blanco de TIF1 $\gamma$  de forma no sesgada y de esta manera elucidar de una manera más completa la función de esta proteína en la biología de linfocitos Th1 y CTL.

El estado de activación celular es un determinante importante para la función y actividad de TIF1 $\gamma$ . De acuerdo a un reporte reciente, en linfocitos T vírgenes, TIF1 $\gamma$  se localiza en el citoplasma y no es sino hasta la activación de éstas células a través de TCR que se trasloca al núcleo y puede modificar la respuesta celular al TGF- $\beta$  (Tanaka *et. al.*, 2018). La actividad de TIF1 $\beta$  también está regulada por la vía de señalización de TCR, por lo que esta familia de proteínas parece ser un blanco de regulación del receptor antigénico de células T. La interacción entre las vías de señalización de TCR y TGF- $\beta$  ha mostrado ser importante para la correcta diferenciación y función de los linfocitos T (Gabryšová *et. al.*, 2011; Li, Ebert, & Li, 2013; Tu *et. al.*, 2018). Si esto es cierto, TIF1 $\gamma$  se posicionaría como un factor central capaz de integrar ambas vías de señalización para inducir la correcta respuesta celular. Sería interesante variar las concentraciones de  $\alpha$ -CD3 mientras se bloquea la señalización por TGF- $\beta$  durante la diferenciación celular *in vitro* para analizar si existen defectos por la ausencia de TIF1 $\gamma$ . Si observamos diferencias en estos cultivos, podríamos realizar un modelo de inflamación *in vivo* administrando  $\alpha$ -CD3 de forma sistémica para medir el grado de activación y la diferenciación de linfocitos T deficientes de TIF1 $\gamma$ .

En este proyecto, hipotetizamos que TIF1 $\gamma$  ejerce sus funciones celulares en respuesta al TGF- $\beta$ . Sin embargo, es posible que esta proteína tenga funciones independientes de la señalización de TGF- $\beta$ . Es posible que TIF1 $\gamma$  también regule la señalización por RA interactuando con TIF1 $\alpha$ . También puede ser que actúe río abajo de la señalización por TCR regulando la sensibilidad a la señal y en consecuencia la activación y diferenciación de linfocitos. También es posible que TIF1  $\gamma$  regule otras vías de señalización no descritas hasta el momento. Analizar las regiones del ADN a las que se une esta proteína en los diversos subtipos de linfocitos en distintos momentos de su activación nos permitiría identificar las vías de señalización que requieren de TIF1 $\gamma$  para ser reguladas correctamente. Sin embargo, todas estas posibles hipótesis requieren de trabajo experimental adicional para confirmarlas o rechazarlas.

## 10. Conclusiones

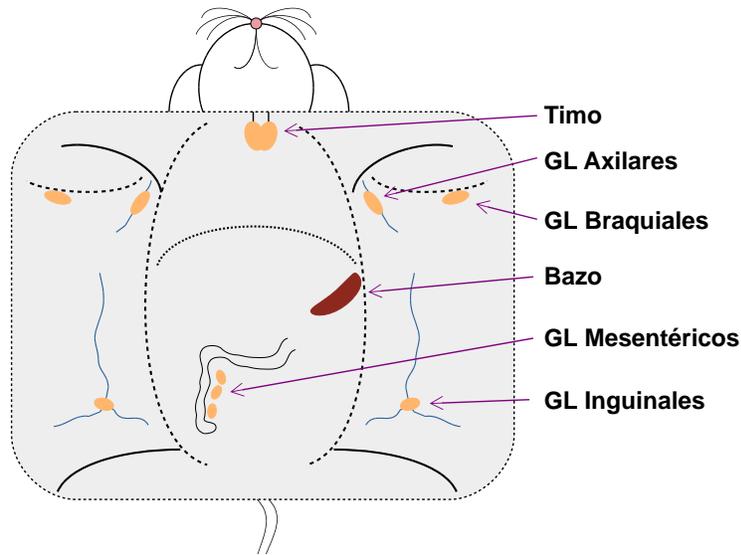
- TIF1 $\gamma$  no regula la frecuencia de linfocitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> e IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> en condiciones de homeostasis en ratones jóvenes.
- TIF1 $\gamma$  es importante para el incremento fisiológico de poblaciones linfocitarias CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en órganos linfoides durante el envejecimiento.
- TIF1 $\gamma$  no regula la polarización *in vitro* de linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia el fenotipo Th1 en presencia de células presentadoras de antígeno.
- TIF1 $\gamma$  regula la expresión de la población CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> *in vitro* de manera independiente de la señalización de TGF- $\beta$ .
- La señalización a través de TIF1 $\gamma$  en linfocitos T favorece el crecimiento tumoral por un mecanismo independiente de la regulación de IFN- $\gamma$ .

## 11. Perspectivas

- Analizar si el fenotipo observado en ratones deficientes de TIF1 $\gamma$  de edad avanzada correlaciona con cambios en su esperanza de vida y cambios en el microambiente de citocinas y en inflamación sistémica en distintos tejidos.
- Averiguar si la deficiencia de TIF1 $\gamma$  afecta la expresión de IFN- $\gamma$  y moléculas citotóxicas en linfocitos T CD8 $^{+}$  *in vitro*.
- Identificar el mecanismo por el cual TIF1 $\gamma$  inhibe la población IFN- $\gamma^{+}$  CXCR3 $^{+}$  *in vitro* e *in vivo*.
- Averiguar si los defectos en la población IFN- $\gamma^{+}$  CXCR3 $^{+}$  correlacionan con defectos en la quimiotaxis de los linfocitos deficientes de TIF1 $\gamma$  *in vitro* e *in vivo*.
- Averiguar si TIF1 $\gamma$  participa en la regulación de procesos de proliferación y apoptosis de linfocitos T *in vivo* e *in vitro*.
- Analizar el transcriptoma de linfocitos deficientes de TIF1 $\gamma$  e identificar las regiones del genoma a las que se une TIF1 $\gamma$  en linfocitos Th1 y CTLs para conocer qué otros genes (citocinas, factores de transcripción, receptores) podrían ser regulados por esta proteína por medio de ensayos de ChIP-seq.
- Averiguar si TIF1 $\gamma$  participa en la formación, mantenimiento o función de poblaciones de linfocitos T de memoria.
- Analizar la participación de TIF1 $\gamma$  en otras vías de señalización importantes para la diferenciación de linfocitos como el TCR.

## Anexo I. Extracción de células de órganos linfoides

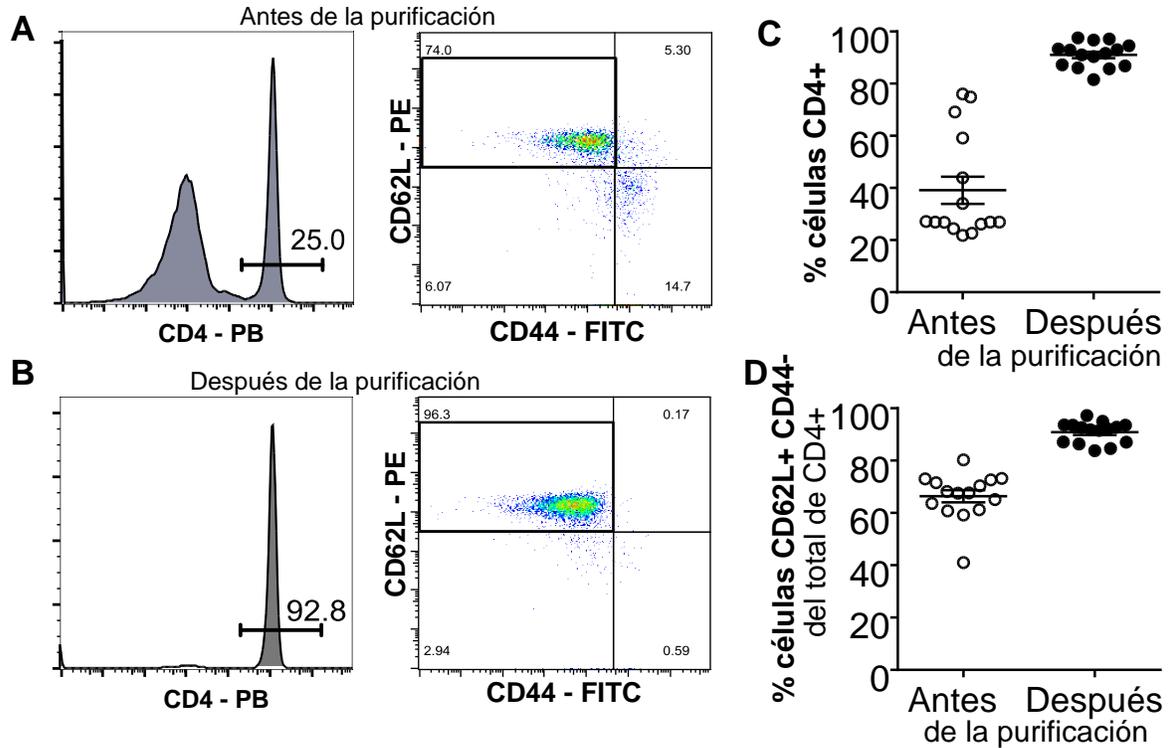
Para extraer células de los órganos linfoides que posteriormente se utilizarían para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, los ratones se sacrificaron por dislocación y se disecaron con ayuda de tijeras y pinzas quirúrgicas. La ubicación anatómica de los distintos órganos se muestra en la **Figura S1**. Para disgregar las células, los órganos se colocaron entre 2 trozos de organza y se maceraron con la parte trasera del émbolo de una jeringa. Posteriormente se suspendieron en medio celular (RPMI o Click's Suplementado) para su utilización.



**Figura S1.** Ubicación anatómica de los distintos órganos linfoides utilizados en los experimentos de este trabajo. Esquema de un ratón disectado donde se muestra la ubicación del Timo, Bazo y distintos ganglios linfáticos (GL).

## Anexo II. Purificación de linfocitos T “naïve” CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>

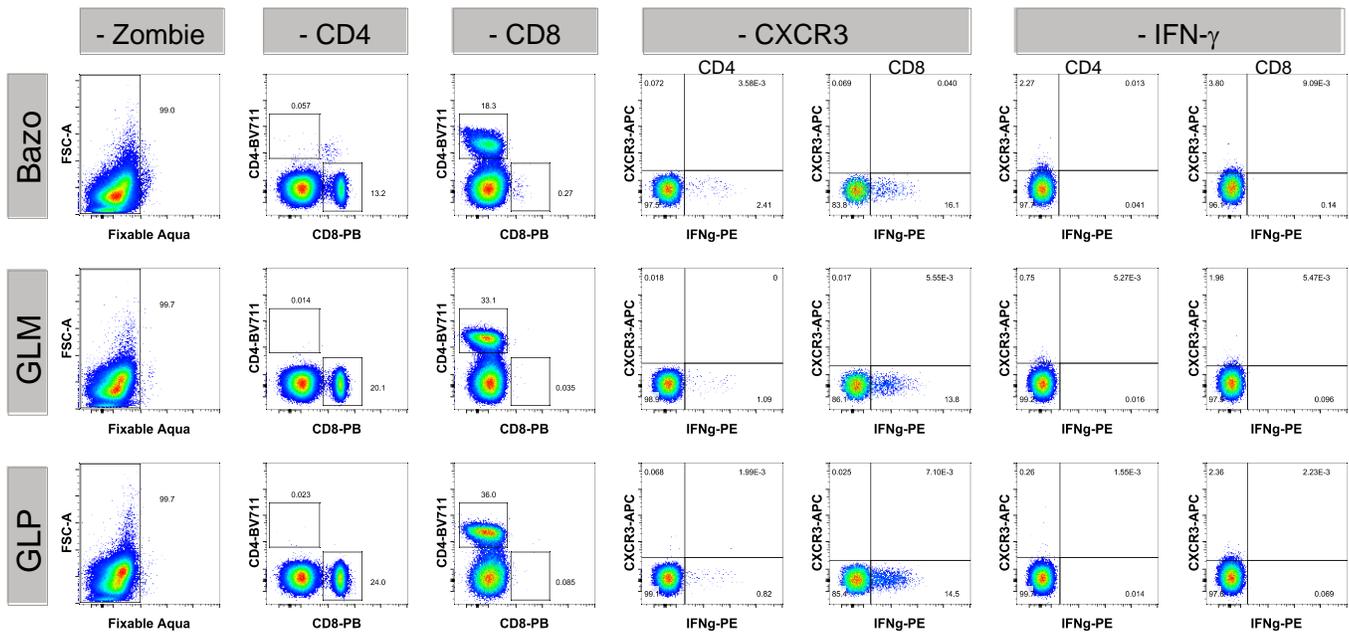
La purificación de linfocitos por selección negativa se verificó por citometría de flujo. La frecuencia de células CD4<sup>+</sup> incrementó del 40% al 91% luego del enriquecimiento con perlas magnéticas (**Figura S2 A, B, C**) mientras que el porcentaje de células CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> incrementó de 66% antes de la purificación a 90% después de la purificación (**Figura S2 A, B, D**).



**Figura S2. Purificación de linfocitos CD4<sup>+</sup> vírgenes.** Se purificaron células de ganglios linfáticos periféricos y bazo por selección negativa utilizando perlas magnéticas. **A)** Histogramas representativos del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> en las muestras antes (izquierda) y después (derecha) de la purificación. **B)** Gráficas de puntos representativas del porcentaje de células CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> antes (izquierda y después (derecha) de la purificación. **C)** Frecuencia de células CD4<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> antes (puntos claros) y después (puntos oscuros) de la purificación. Cada punto representa un ratón, n=13

### Anexo III. Controles de fluorescencia menos uno de los anticuerpos utilizados para analizar poblaciones de linfocitos de los distintos órganos.

Para el análisis de poblaciones por citometría de flujo se utilizaron controles de fluorescencia menos uno (FMU). Para realizarlos se tomaron alícuotas de los distintos órganos analizados y se tiñeron utilizando los mismos anticuerpos que en las muestras experimentales excepto uno. Se ajustaron las poblaciones de interés para que la señal del control FMU fuera menor que 0.1% (**Figura S3**).



**Figura S3. Controles de Fluorescencia de los distintos órganos linfoides analizados.** Gráficas de puntos representativas de células de Bazo, ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y ganglios linfáticos periféricos (GLP) teñidas con el cocktail de anticuerpos utilizado en los distintos experimentos excepto uno, mostrado en la parte superior.

## Anexo IV. Análisis de IC50 de las distintas poblaciones de linfocitos polarizados *in vitro*.

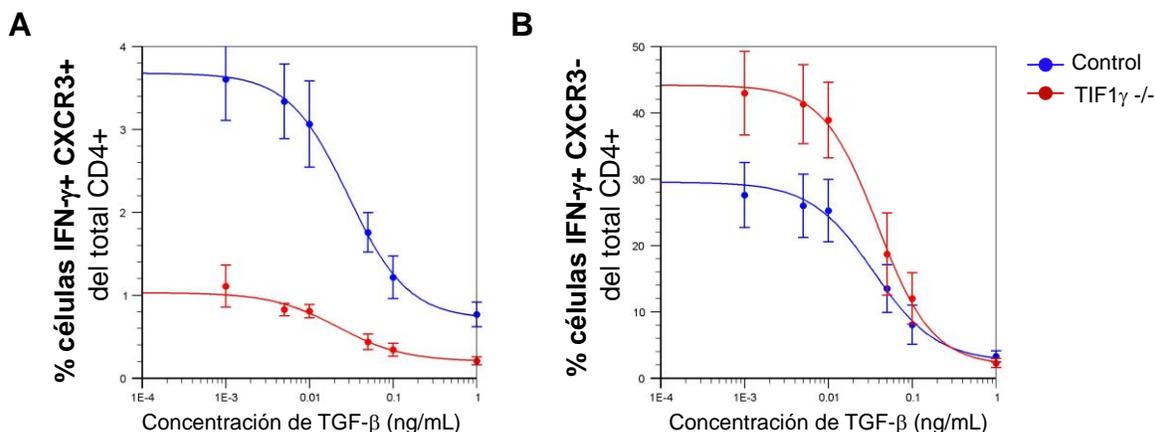
Para calcular la concentración inhibitoria 50 (IC50) los datos obtenidos de la curva dosis respuesta de inhibición por TGF- $\beta$  (**Sección 8.3**) se ajustaron utilizando un modelo de 4 parámetros utilizando la siguiente fórmula:

$$Y = Min + \frac{(Max - Min)}{1 + \left(\frac{X}{IC50}\right)^{Coeficiente\ de\ Hill}}$$

Donde Y es la respuesta celular, en este caso el porcentaje de células en la población de interés y X es la concentración del inhibidor, en este caso el TGF- $\beta$ . Mientras que Min es el valor mínimo obtenido y Max el máximo. Por su parte, el Coeficiente de Hill es una medida relacionada con la pendiente de la porción recta de la curva (AAT Bioquest, Inc., 2019, Sebaugh, 2010). De esta forma obtenemos las distintas curvas ajustadas a los valores experimentales (**Figura S4**) y los valores de IC50:

IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^+$ : Control = 0.029 ng/mL; TIF1 $\gamma$  -/-: 0.022 ng/mL

IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^-$ : Control = 0.035 ng/mL; TIF1 $\gamma$  -/-: 0.039 ng/mL



**Figura S4. Modelo de inhibición de TGF- $\beta$ .** Modelo de inhibición de las poblaciones IFN- $\gamma^+$  utilizando los datos mostrados en la Figura X. **A)** Inhibición de la población IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^+$  **A)** Inhibición de la población IFN- $\gamma^+$  CXCR3 $^-$ .

## 12. Referencias

- AAT Bioquest, Inc. (2019). Quest Graph™ IC50 Calculator.". Retrieved from <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>
- Annunziato, F., Romagnani, C., & Romagnani, S. (2015). The 3 Major Types of Innate and Adaptive Cell-Mediated Effector Immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), 626–635.
- Aoyama, K., Saha, A., Tolar, J., Riddle, M. J., Veenstra, R. G., Taylor, P. A., ... Blazar, B. R. (2019). Inhibiting Retinoic Acid Signaling Ameliorates Graft-Versus-Host Disease by Modifying T-cell Differentiation and Intestinal Migration. *Blood*, 122(12), 2125–2135.
- Beima, K. M., Miazgowicz, M. M., Lewis, M. D., Yan, P. S., Huang, T. H. M., & Weinmann, A. S. (2006). T-bet Binding to Newly Identified Target Gene Promoters is Cell Type-Independent but Results in Variable Context-Dependent Functional Effects. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11992–12000.
- Benci, J. L., Xu, B., Qiu, Y., Wu, T. J., Dada, H., Twyman-Saint Victor, C., ... Minn, A. J. (2016). Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell*, 167(6), 1540–1554.e12.
- Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., & Frazer, I. H. (2017). Interferon- $\gamma$  Derived From Cytotoxic Lymphocytes Directly Enhances Their Motility And Cytotoxicity. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2836.
- Böhm, W., Thoma, S., Leithäuser, F., Möller, P., Schirmbeck, R., & Reimann, J. (1998). T Cell-Mediated, IFN- $\gamma$ -Facilitated Rejection of Murine B16 Melanomas. *Journal of Immunology*, 161, 897–908.
- Brabletz, T., Pfeuffer, I., Schorr, E., Siebelt, F., Wirth, T., & Serflingl, E. (1993). Transforming Growth Factor  $\beta$ , and Cyclosporin A Inhibit the Inducible Activity of the Interleukin-2 Gene in T Cells Through a Noncanonical Octamer-Binding Site. *Molecular and Cellular Biology*.
- Cao, J., Zhang, X., Wang, Q., Qiu, G., Hou, C., Wang, J., ... Zhang, J. (2015). SMAD4 Represses the Generation of Memory-Precursor Effector T Cells but is Required for the Differentiation of Central Memory T Cells. *Cell Death & Disease*, 6(11), e1984.

- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon- $\gamma$  at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in Immunology*, 9(5), 1–19.
- Cayetanot, F., Nygård, M., Perret, M., Kristensson, K., & Aujard, F. (2009). Plasma Levels of Interferon- $\gamma$  Correlate with Age-Related Disturbances of Circadian Rhythms and Survival in a Non-Human Primate. *Chronobiology International*, 26(8), 1587–1601.
- Chen, G., Lustig, A., & Weng, N. ping. (2013). T Cell Aging: A Review of the Transcriptional Changes Determined from Genome-Wide Analysis. *Frontiers in Immunology*, 4(5), 1–11.
- Chen, J., Vistica, B. P., Takase, H., Ham, D. II, Fariss, R. N., Wawrousek, E. F., ... Gery, I. (2004). A Unique Pattern of Up- and Down-Regulation of Chemokine Receptor CXCR3 on Inflammation-Inducing Th1 Cells, *European Journal of Immunology*. 34(7), 2885–2894.
- Chikuma, S., Suita, N., Okazaki, I., Shibayama, S., & Honjo, T. (2012). TRIM28 Prevents Autoinflammatory T Cell Development *in vivo*. *Nature Immunology*, 13(6), 2–10.
- Chinn, I. K., Blackburn, C. C., Manley, N. R., & Sempowski, G. D. (2012). Changes in Primary Lymphoid Organs with Aging. *Seminars in Immunology*, 24(5), 309–320.
- Collins, C., Tsui, F. W. L., & Shulman, M. J. (2002). Induction of the Chemokine Receptor CXCR3 on TCR-Stimulated T Cells: Dependence on the Release from Persistent TCR-Trigging and Requirement for IFN- $\gamma$  Stimulation. *European Journal of Immunology*, 32(6), 1792–1801.
- Colonna, M. (2018). Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity. *Immunity*, 48(6), 1104–1117.
- David, C. J., & Massagué, J. (2018). Contextual determinants of TGF- $\beta$  Action in Development, Immunity and Cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7), 419–435.
- Deenick, E. K., & Ma, C. S. (2011). The Regulation and Role of T Follicular Helper Cells in Immunity. *Immunology*, 134(4), 361–367.
- Demy, D. Lou, Tauzin, M., Lancino, M., Le Cabec, V., Redd, M., Murayama, E., ... Herbolmel, P. (2017). Trim33 is Essential for Macrophage and Neutrophil

Mobilization to Developmental or Inflammatory Cues. *Journal of Cell Science*, 130(17), 2797–2807.

Divya K. Shah, and Juan Carlos Zuniga-Pflucker, J. C. (2014). T-Cell Development in the Thymus. *Nature*, 197(5969), 583–584.

Doisne, J.-M., Bartholin, L., Yan, K.-P., Garcia, C. N., Duarte, N., Le Luduec, J.-B., ... Marie, J. C. (2009). iNKT Cell Development is Orchestrated by Different Branches of TGF-beta Signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(6), 1365–1378.

Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M., & Piccolo, S. (2005). Germ-layer Specification and Control of Cell Growth by Ectodermin, a SMAD4 Ubiquitin Ligase. *Cell*, 121(1), 87–99.

Famili, F., Wiekmeijer, A.-S., & Staal, F. J. (2017). The Development of T Cells from Stem Cells in Mice and Humans. *Future Science OA*, 3(3), FSO186.

Ferri, F., Parcelier, A., Petit, V., Gallouet, A.-S., Lewandowski, D., Dalloz, M., ... Romeo, P.-H. (2015). TRIM33 Switches off *Ifnb1* Gene Transcription During the Late Phase of Macrophage Activation. *Nature Communications*, 6, 8900.

Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., & Salvioli, S. (2017). Inflammaging and 'Garb-aging.' *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(3), 199–212.

Gaarenstroom, T., & Hill, C. S. (2014). TGF-β Signaling to Chromatin: How SMADs Regulate Transcription During Self-Renewal and Differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 32, 107–118.

Gabryšová, L., Christensen, J. R., Wu, X., Kissenpfennig, A., Malissen, B., & O'Garra, A. (2011). Integrated T-Cell Receptor and Costimulatory Signals Determine TGF-β-dependent Differentiation and Maintenance of Foxp3+ Regulatory T Cells. *European Journal of Immunology*, 41(5), 1242–1248.

Gagliani, N., Vesely, M. C. A., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., ... Flavell, R. A. (2015). Th17 Cells Transdifferentiate into Regulatory T Cells During Resolution of Inflammation. *Nature*, 523(7559), 221–5.

Gajewski, T. F., & Fitch, F. W. (1988). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-γ Inhibits the Proliferation of Th2 but not Th1 Murine Helper T Lymphocyte Clones. *Journal of Immunology*.

- Gallouet, A.-S., Ferri, F., Petit, V., Parcelier, A., Lewandowski, D., Gault, N., ...  
Romeo, P.-H. (2017). Macrophage Production and Activation are Dependent  
on TRIM33. *Oncotarget*, 8(3), 5111–5122.
- Germain, R. N. (2002). T Cell Development and the CD4-CD8 Lineage Decision.  
*Nature Reviews Immunology*, 2(5), 309–322.
- Gorelik, L., Constant, S., & Flavell, R. A. (2002). Mechanism of Transforming  
Growth Factor Beta-Induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *The  
Journal of Experimental Medicine*, 195(11), 1499–505.
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2017). Successful and Maladaptive T Cell Aging.  
*Immunity*, 46(3), 364–378.
- Groom, J. R., & Luster, A. D. (2011). CXCR3 in T Cell Function. *Exp Cell Res*,  
317(5), 620–631.
- Gu, A.-D., Zhang, S., Wang, Y., Xiong, H., Curtis, T. A. A., & Wan, Y. Y. Y. (2015).  
A Critical Role for Transcription Factor Smad4 in T Cell Function that Is  
Independent of Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Signaling. *Immunity*,  
42(1), 68–79.
- Gupta, S., Bi, R., Su, K., Yel, L., Chiplunkar, S., & Gollapudi, S. (2004).  
Characterization of Naïve, Memory and Effector CD8+ T Cells: Effect of Age.  
*Experimental Gerontology*, 39(4), 545–550.
- Hatakeyama, S. (2017). TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and  
Carcinogenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, xx, 1–15.
- He, W., Dorn, D. C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Moore, M. A. S., &  
Massagué, J. (2006). Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 $\gamma$  and SMAD4  
Branches of the TGF- $\beta$  Pathway. *Cell*, 125(5), 929–941.
- Herquel, B., Ouararhni, K., Khetchoumian, K., Ignat, M., Teletin, M., Mark, M., ...  
Losson, R. (2011). Transcription Cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33  
Associate to Form Regulatory Complexes that Suppress Murine  
Hepatocellular Carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences  
of the United States of America*, 108(20), 8212–7.
- Hesling, C., Lopez, J., Fattet, L., Gonzalo, P., Treilleux, I., Blanchard, D., ...  
Rimokh, R. (2013). Tif1 $\gamma$  is Essential for the Terminal Differentiation of  
Mammary Alveolar Epithelial Cells and for Lactation Through SMAD4  
Inhibition. *Development*, 140(1), 167–175.

- Hickman, H. D., Reynoso, G. V., Ngudiankama, B. F., Cush, S. S., Gibbs, J., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2015). CXCR3 Chemokine Receptor Enables Local CD8+ T Cell Migration for the Destruction of Virus-Infected Cells. *Immunity*, 42(3), 524–537.
- Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4+T-Cell Subsets in Inflammatory Diseases: Beyond the Th1/Th2 Paradigm. *International Immunology*, 28(4), 163–171.
- Hu, J. K., Kagari, T., Clingan, J. M., & Matloubian, M. (2011). Expression of Chemokine Receptor CXCR3 on T Cells Affects the Balance Between Effector and Memory CD8 T-Cell Generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), E118–E127.
- Ishigame, H., Zenewicz, L. A., Sanjabi, S., Licona-Limon, P., Nakayama, M., Leonard, W. J., & Flavell, R. A. (2013). Excessive Th1 Responses Due to the Absence of TGF- $\beta$  Signaling Cause Autoimmune Diabetes and Dysregulated Treg Cell Homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6961–6966.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., ... Littman, D. R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+T Helper Cells. *Cell*.
- Ivashkiv, L. B. (2018). IFN $\gamma$ : Signalling, Epigenetics and roles in Immunity, Metabolism, Disease and Cancer Immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 1–14.
- Jieun, K., & Kaartinen, V. (2008). Generation of Mice With a Conditional Allele for TRIM33. *Genesis*, 51(7), 491–497.
- Josefowicz, S. Z. (2013). Regulators of Chromatin State and Transcription in CD4 T-Cell Polarization. *Immunology*, 139(3), 299–308.
- Khetchoumian, K., Teletin, M., Tisserand, J., Mark, M., Herquel, B., Ignat, M., ... Chambon, P. (2007). Loss of TRIM24 (Tif1 $\alpha$ ) Gene Function Confers Oncogenic Activity to Retinoic Acid Receptor Alpha. *Nature Genetics*, 39(12), 1500–1506.
- Kim, B.-G., Li, C., Qiao, W., Mamura, M., Kasperczak, B., Anver, M., ... Letterio, J. J. (2006). SMAD4 Signalling in T Cells is Required for Suppression of Gastrointestinal Cancer. *Nature*, 441(7096), 1015–1019.

- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and Negative Selection of the T Cell Repertoire: What Thymocytes See (and Don't See). *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 377–391.
- Klein, L., Robey, E. A., & Hsieh, C. S. (2018). Central CD4+ T Cell Tolerance: Deletion Versus Regulatory T Cell Differentiation. *Nature Reviews Immunology*.
- Kreslavsky, T., Gleimer, M., Garbe, A. I., & von Boehmer, H. (2010).  $\alpha\beta$  Versus  $\gamma\delta$  Fate Choice: Counting the T-Cell Lineages at the Branch Point. *Immunological Reviews*, 238(1), 169–181.
- Kronenberg, M., & Gapin, L. (2002). The Unconventional Lifestyle of NKT Cells. *Nature Reviews Immunology*.
- Kulkarni, A., Oza, J., Yao, M., Sohail, H., Ginja, V., Tomas-Loba, A., ... Ganesan, S. (2013). Tripartite Motif-Containing 33 (TRIM33) Protein Functions in the Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)-Dependent DNA Damage Response Through Interaction with Amplified in Liver Cancer 1 (ALC1) Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32357–32369.
- Kurachi, M., Kurachi, J., Suenaga, F., Tsukui, T., Abe, J., Ueha, S., ... Matsushima, K. (2011). Chemokine Receptor CXCR3 Facilitates CD8+ T Cell Differentiation into Short-Lived Effector Cells Leading to Memory Degeneration. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(8), 1605–1620.
- Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., ... Nakayama, T. (2012). The Transcription Factor Sox4 is A Downstream Target of Signaling by the Cytokine TGF- $\beta$  and Suppresses Th2 Differentiation. *Nature Immunology*. 13, 778 – 786.
- Li, C., Ebert, P. J. R., & Li, Q. J. (2013). T Cell Receptor (TCR) and Transforming Growth Factor - $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Signaling Converge on DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase to Control Forkhead Box Protein 3 (Foxp3) Locus Methylation and Inducible Regulatory T Cell Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 19127–19139.
- Licona-Limón, P., Arias-Rojas, A., & Olgún-Martínez, E. (2017). IL-9 and Th9 in Parasite Immunity. *Seminars in Immunopathology*, 39(1), 29–38.
- Lin, J. T., Martin, S. L., Xia, L., & Gorham, J. D. (2005). TGF- $\beta$ 1 Uses Distinct Mechanisms to Inhibit IFN- $\gamma$  Expression in CD4+ T Cells at Priming and at

- Recall: Differential Involvement of Stat4 and T-bet. *The Journal of Immunology*, 174(10), 5950–5958.
- Lord, G. M. (2005). T-bet Is Required for Optimal Proinflammatory CD4+ T-Cell Trafficking. *Blood*, 106(10), 3432–3439.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., ... Yi, Q. (2012). Th9 Cells Promote Antitumor Immune Responses *in vivo*. *Journal of Clinical Investigation*.
- Lúdvíksson, B. R., Seegers, D., Resnick, A. S., & Strober, W. (2000). The Effect of TGF- $\beta$ 1 on Immune Responses of Naive Versus Memory CD4+ Th1/Th2 T Cells. *European Journal of Immunology*, 30(7), 2101–2111.
- Massagué, J. (2012). TGF- $\beta$  Signalling in Context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630.
- Maue, A. C., Yager, E. J., Swain, S. L., Woodland, D. L., Blackman, M. A., & Haynes, L. (2009). T-Cell Immunosenescence: Lessons Learned From Mouse Models of Aging. *Trends in Immunology*, 30(7), 301–305.
- Monteiro, R., Pouget, C., & Patient, R. (2011). The GATA1/PU.1 Lineage Fate Paradigm Varies Between Blood Populations and Is Modulated by Tif1 $\gamma$ . *EMBO Journal*, 30(6), 1093–1103.
- Muller, M, Carter SL, Hofer, MJ, Manders P, Getts DR. (2007). CXCR3 Signaling Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis By Controlling the Parenchymal Distribution of Effector and Regulatory T Cells in the Central Nervous System. *Journal of Immunology*. 179:2774–86
- Murphy, K., & Weaver, C. (2017). *Janeway's Immunobiology*. *Janeway's Immunobiology*.
- Nagarsheth, N., Kryczek, I., Wei, S., Frankel, T., & Zou, W. (2016). Regulatory T Cells in Tumor Immunity. In *Encyclopedia of Immunobiology*.
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., ... Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science*.
- Oh, S. A., & Li, M. O. (2013). TGF- $\beta$ : Guardian of T Cell Function. *The Journal of Immunology*, 191(8), 3973–3979.

- Ohkura, N., Kitagawa, Y., & Sakaguchi, S. (2013). Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity*.
- Oliphant, C. J., Hwang, Y. Y., Walker, J. A., Salimi, M., Wong, S. H., Brewer, J. M., ... McKenzie, A. N. J. (2014). MHCII-Mediated Dialog Between Group 2 Innate Lymphoid Cells and CD4+T Cells Potentiates Type 2 Immunity and Promotes Parasitic Helminth Expulsion. *Immunity*, *41*(2), 283–295.
- Overwijk, W. W., & Restifo, N. P. (2001). B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. In *Current Protocols in Immunology*.
- Oxenkrug, G. (2011). Interferon- $\gamma$ - Inducible Inflammation: Contribution to Aging and Aging-Associated Psychiatric Disorders 156. *Aging Disease*, *2*(2152–5250 (Electronic)), 474–486.
- Park, I. K., Letterio, J. J., & Gorham, J. D. (2007). TGF- $\beta$ 1 Inhibition of IFN- $\gamma$ - Induced Signaling and Th1 Gene Expression in CD4+T Cells is SMAD3 Independent but MAP Kinase Dependent. *Molecular Immunology*, *44*(13), 3283–3290.
- Pérez-Vázquez, D., Contreras-Castillo, E., & Licona-Limón, P. (2018). Memoria Inmunológica Innata, La Pieza Faltante De La Respuesta Inmunológica. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *21*(6), 0–12.
- Quére, R., Saint-Paul, L., Carmignac, V., Martin, R. Z., Chrétien, M.-L., Largeot, A., ... Delva, L. (2014). Tif1 $\gamma$  Regulates the TGF- $\beta$ 1 Receptor and Promotes Physiological Aging of Hematopoietic Stem Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(29), 10592–7.
- Rajderkar, S., Panaretos, C., & Kaartinen, V. (2017). TRIM33 Regulates Early Maturation of Mouse Embryoid Bodies *in vitro*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *12*(8), 185–192.
- Ransom, D. G., Bahary, N., Niss, K., Traver, D., Burns, C., Trede, N. S., ... Zon, L. I. (2004). The Zebrafish Moonshine Gene Encodes Transcriptional Intermediary Factor 1 $\gamma$ , an Essential Regulator of Hematopoiesis. *PLoS Biology*, *2*(8).
- Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews*.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*, *100*(6), 655–669.

- Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., ... Yoshimura, A. (2010). SMAD2 and SMAD3 Are Redundantly Essential for the TGF- $\beta$ -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *The Journal of Immunology*, 185(2), 842–855.
- Tanaka, S., Jiang, Y., Martinez, G. J., Tanaka, K., Yan, X., Kurosaki, T., ... Dong, C. (2018). TRIM33 Mediates the Proinflammatory Function of Th17 Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, jem.20170779.
- Thomas, D. A., & Massagué, J. (2005). TGF- $\beta$  Directly Targets Cytotoxic T Cell Functions During Tumor Evasion of Immune Surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), 369–380.
- Tisserand, J., Khetchoumian, K., Thibault, C., Dembe, D., & Chambon, P. (2011). Tripartite Motif 24 (TRIM24 / Tif1 $\alpha$ ) Tumor Suppressor Protein Is a Novel Negative Regulator of Interferon ( IFN ) / Signal Transducers and Activators of Transcription ( STAT ) Signaling Pathway Acting through Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  (Rar $\alpha$ ). *The Journal of Biological Chemistry*. 286(38), 33369–33379.
- Tu, E., Chia, C. P. Z., Chen, W., Zhang, D., Park, S. A., Jin, W., ... Chen, W. J. (2018). T Cell Receptor-Regulated TGF- $\beta$  Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation. *Immunity*, 48(4), 745–759.e6.
- Tu, E., Chia, P. Z. C., & Chen, W. (2014). TGF- $\beta$  in T Cell Biology and Tumor Immunity: Angel or Devil? *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(4), 423–435.
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C. R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M. P., ... Caruso, C. (2007). Inflammatory Networks in Ageing, Age-Related Diseases and Longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), 83–91.
- Venturini, L., You, J., Stadler, M., Galien, R., Lallemand, V., Koken, M. H., ... de Thé, H. (1999). Tif1 $\gamma$ , a Novel Member of the Transcriptional Intermediary Factor 1 Family. *Oncogene*, 18, 1209–1217
- Versteeg, G. A., Benke, S., García-Sastre, A., & Rajsbaum, R. (2014). InTRIMsic Immunity: Positive and Negative Regulation of Immune Signaling by Tripartite Motif Proteins. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(5), 563–576.

- Wakikawa, A., Utsuyama, M., Wakabayashi, A., Kitagawa, M., & Hirokawa, K. (1999). Age-Related Alteration of Cytokine Production Profile By T Cell Subsets in Mice: a Flow Cytometric Study. *Experimental Gerontology*, *34*(2), 231–242.
- Wang, E., Kawaoka, S., Roe, J. S., Shi, J., Hohmann, A. F., Xu, Y., ... Kinney, J. B. (2015). The Transcriptional Cofactor TRIM33 Prevents Apoptosis in B Lymphoblastic Leukemia by Deactivating a Single Enhancer. *ELife*, (4), 1–17.
- Wu, C., Chen, Z., Dardalhon, V., Xiao, S., Thalhamer, T., Liao, M., ... Kuchroo, V. (2017). The Transcription Factor Musculin Promotes the Unidirectional Development of Peripheral Treg Cells by Suppressing the Th2 Transcriptional Program. *Nature Immunology*. *18*, 344–353.
- Xi, Q., Wang, Z., Zaromytidou, A. I., Zhang, X. H. F., Chow-Tsang, L. F., Liu, J. X., ... Massagué, J. (2011). A Poised Chromatin Platform for TGF- $\beta$  Access to Master Regulators. *Cell*, *147*(7), 1511–1524.
- Yen, C. J., Lin, S. L., Huang, K. T., & Lin, R. H. (2000). Age-Associated Changes in Interferon- $\gamma$  and Interleukin-4 Secretion by Purified Human CD4+ and CD8+ T Cells. *Journal of Biomedical Science*, *7*(4), 317–21.
- Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., & Mori, T. (2010). Cellular And Molecular Basis for the Regulation of Inflammation by TGF- $\beta$ . *Journal of Biochemistry*, *147*(6), 781–792.
- Zhang, H., Zhu, Z., McKinley, J. M., & Meadows, G. G. (2011). IFN- $\gamma$  Is Essential for the Inhibition of B16BL6 Melanoma Lung Metastasis In Chronic Alcohol Drinking Mice. *Clinical and Experimental Metastasis*, *28*(3), 301–307
- Zhou, L., Chong, M. M. W., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, *30*(5), 646–655.