



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**GENERACIÓN DE UNA LIBRERÍA GENÉTICA PARA LA DISECCIÓN
MOLECULAR DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF-B EN UNA
LÍNEA CELULAR MURINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

GIOVANNA DANIELA CHECA FLORES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Enrique Ortega Soto

VOCAL: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SECRETARIO: Dr. José Carlos Crispín Acuña

1er. SUPLENTE: Dra. Sonia Mayra Pérez Tapia

2° SUPLENTE: Dr. Luis Ángel Flores Mejía

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Carlos Crispín Acuña

SUSTENTANTE:

Giovanna Daniela Checa Flores

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Lista de abreviaturas | 2 |
| 1. Introducción..... | 3 |
| 2. Marco teórico..... | 5 |
| 2.1 Células Tregs..... | 6 |
| 2.1.1 Características fenotípicas de las Tregs..... | 6 |
| 2.1.2 Células tTregs..... | 7 |
| 2.1.3 Células pTregs e iTregs..... | 8 |
| 2.2 Factor de transcripción Foxp3..... | 10 |
| 2.3 TGF- β | 11 |
| 2.3.1 Papel en el sistema inmune..... | 13 |
| 2.3.2 Vías de señalización..... | 13 |
| 3. Información preliminar..... | 14 |
| 4. Hipótesis..... | 16 |
| 5. Objetivos..... | 17 |
| 5.1 Objetivo general..... | 17 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 17 |
| 6. Metodología..... | 18 |
| 6.1 Diseño de librería..... | 18 |
| 6.2 Análisis de posibles estrategias de edición génica a utilizar: CRISPR vs shRNA..... | 20 |

| | |
|---|----|
| 6.3 Estandarización de la metodología para la edición génica de una línea celular murina..... | 22 |
| 6.3.1 Cultivo celular..... | 22 |
| 6.3.2 Clonación..... | 22 |
| 6.3.3 Transducción de células EL-4..... | 25 |
| 6.3.4 Ensayo de expresión de Foxp3..... | 25 |
| 7. Resultados y discusión..... | 27 |
| 7.1 Diseño de librería..... | 27 |
| 7.2 CRISPR como estrategia para el estudio molecular de la vía de señalización de TGF- β | 42 |
| 7.3 Generación de guías de CRISPR..... | 47 |
| 7.4 Generación de líneas celulares editadas..... | 49 |
| 8. Conclusiones..... | 51 |
| 9. Perspectivas..... | 52 |
| 10. Referencias..... | 52 |
| Anexo I: Medios y soluciones | 81 |

Resumen

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citocina antiinflamatoria que interviene en la diferenciación de las células T reguladoras (Tregs), además de controlar una gran variedad de procesos. La deficiencia de cada una de las tres isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) genera fenotipos distintos, a pesar de señalar a través del mismo receptor, probablemente debido a su capacidad de activar vías de señalización diferentes. El objetivo del presente trabajo fue el diseño de una estrategia para el estudio de la vía de señalización de TGF- β . Se estandarizó la metodología de edición génica mediante la técnica de CRISPR-Cas9 de la línea celular EL4 y se obtuvieron clones deficientes en los receptores I y II de TGF- β , y Smad3; moléculas participantes en la vía de señalización de TGF- β que permitan dilucidar las diferencias en la cascada de señalización de cada isoforma en el contexto de diferenciación de Tregs.

La manipulación de la vía de señalización de TGF- β mediante la regulación transcripcional de las moléculas participantes, podría representar una innovación terapéutica que intervenga con la funcionalidad de las Tregs.

Lista de abreviaturas

| | |
|-----------------|---|
| GITR | Receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides |
| CTLA-4 | Antígeno 4 del linfocito T citotóxico |
| PD-1 | Proteína de muerte celular programada 1 |
| TCR | Receptor de linfocitos T |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| GALT | Tejido linfoide asociado a intestino |
| LAP | Polipéptido asociado a latencia |
| MAPK | Proteínas quinasas activadas por mitógeno |
| PI3K | Fosfoinositol 3-quinasa |
| PP2A | Proteína fosfatasa 2 |
| SAPK/JNK | Miembros de la familia MAPK |
| gRNA | Guía de ácido ribonucleico |
| Cas9 | Endonucleasa de DNA |
| CRISPR | Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas |
| PPAX | Fosfatasa |
| PMDG | Polimetil-D-glutamato |
| shRNA | RNA de horquilla corta |
| HDR | Reparación homóloga directa |
| NHEJ | Reparación no homóloga por unión de extremos |

1. Introducción

El sistema inmunológico es una red compleja de órganos, células y moléculas, que en conjunto protegen al hospedero de microorganismos patógenos. Para mantener su homeostásis, son necesarios mecanismos de regulación, que supriman el desarrollo de la respuesta inmunológica y permitan la generación de tolerancia, para evitar escenarios de autoinmunidad e inflamación excesiva (Dejaco et al., 2006).

Uno de los mecanismos encargados de modular la respuesta inmunológica, es el desarrollo de células T reguladoras (Treg), linfocitos T CD4⁺CD25⁺ que expresan Foxp3 y se clasifican en células tímicas o periféricas, dependiendo de su lugar de diferenciación. Su función inhibitoria la ejercen ya sea mediante la interacción célula-célula, donde participan receptores inhibitorios como CTLA-4 y LAG3, la liberación de granzima B, el bloqueo metabólico mediado principalmente por adenosina o la secreción de citocinas como IL-10, IL-35 y TGF- β . (Schmidt et al., 2012).

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), es una citocina antiinflamatoria que interviene en la diferenciación de las Treg y se ha demostrado que ratones deficientes de ésta citocina o su receptor desarrollan patologías autoinmunes. Existen tres isoformas de TGF- β en mamíferos (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), que señalizan a través de los mismos receptores (TGFBRI y TGFBRII). Sin embargo, existe evidencia de una posible señalización diferencial entre las isoformas dado que ratones deficientes de los genes que las codifican, presentan fenotipos distintos. Mientras que la ausencia de TGF- β 1 está relacionada a patologías autoinmunes, los ratones deficientes en TGF- β 2 y TGF- β 3, mueren en etapas embrionarias o perinatales. Además, existe evidencia de que la estimulación con TGF- β 1 y TGF- β 3 de células TCD4 genera

programas transcripcionales diferentes. (Peralta, 2001; Poniatowski et al., 2015)

Estos estudios en conjunto sugieren una funcionalidad específica dependiente de la isoforma de la citocina, la cual podría atribuirse a diferencias moleculares en la vía de señalización que inducen. En conjunto, estos datos nos llevaron a pensar que TGF- β 1 y TGF- β 3 podrían jugar papeles fisiológicos diferentes en la regulación del sistema inmune, en particular durante la diferenciación de las Tregs.

TGF- β 1 y TGF- β 3 señalizan a través de los mismos receptores de superficie, pero transducen una señal cualitativa y cuantitativamente diferente. Eso sugiere que ambas isoformas de TGF- β modulan en forma diferencial vías de señalización. Por lo anterior, el objetivo general de este proyecto es diseñar un sistema genético que permita dilucidar el papel de diferentes elementos de la vía de señalización de TGF- β y en particular definir si existen elementos moleculares necesarios para la señalización de cada isoforma de esta importante citocina.

2. Marco teórico

La supresión y modulación de la respuesta inmunológica representa una función indispensable para evitar patologías autoinmunes. La presencia de células reguladoras derivadas del timo y generadas en la periferia es vital para mantener el equilibrio inmunológico, siendo un tema ampliamente debatido desde su redescubrimiento en 1995, donde Sakaguchi y colaboradores, lograron una primera caracterización de las células Treg. En su trabajo demostraron, en un modelo murino, que la eliminación de una población de linfocitos $CD4^+CD25^+$, producía autoinmunidad y que la reconstitución de dicha población prevenía su desarrollo (Sakaguchi et al., 1995).

Una década después, se logró identificar el factor de transcripción maestro que caracteriza a estas células conocido como Foxp3 cuya inducción en células T $CD4^+$ vírgenes está mediada por TGF- β (Hori et al., 2017). Sin embargo, las diferentes vías de señalización en las que TGF- β participa, no han sido del todo estudiadas.

Dado que se ha comprobado que la desregulación de los mecanismos que frenan la respuesta inmune como la deficiencia de TGF- β , genera problemas autoinmunes, el interés por estudiar las Tregs aumentó por su posible uso terapéutico (Amoura et al., 2014). Existen diversos estudios que confirman la capacidad de las Tregs para prevenir el desarrollo de autoinmunidad o promover tolerancia a tejidos trasplantados (Kohm et al., 2010).

2.1 Células Tregs

2.1.1 Características fenotípicas de las Tregs

Las Treg son linfocitos T CD4⁺, que expresan constitutivamente la cadena alfa del receptor de la citocina IL-2 (CD25) y el factor de transcripción *forkhead box P3* (Foxp3). En la actualidad, se han identificado diferentes subpoblaciones involucradas en la regulación de la respuesta inmunológica y comúnmente se les clasifica en dos subtipos; naturales e inducidas (Shevach, 2014).

Abbas y colaboradores en el 2013, propusieron una nomenclatura para las subpoblaciones de Treg. 1) Las células derivadas de timo (tTreg), que constituyen entre el 5 al 10% de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica, 2) las generadas en la periferia (pTreg), que se clasifican a su vez en Tr1 y Th3, cuya característica diferencial es la secreción de IL-10 y TGF- β respectivamente; y 3) las células generadas *in vitro* bajo la estimulación con TGF- β (iTreg). (Abbas et al., 2013; Shevach & Thornton, 2014). Estas últimas, aunque son similares, presentan una pobre estabilidad, en la que la metilación del gen *Foxp3* está implicada (Boehmer et al., 2008).

Además, las Tregs presentan marcadores de superficie como el receptor de la familia de TNF α inducido por glucocorticoides (GITR), CTLA4, CCR4 y niveles bajos de CD45RB y CD127. Específicamente, las tTreg presentan una expresión mayor de PD-1, Nrp1, CD73 y Helios, lo que las distingue de las demás poblaciones. (Davini et al., 2012; Lin et al., 2013; Shevach & Thornton, 2014; Siachoque et al., 2013; Takahashi et al., 2000).

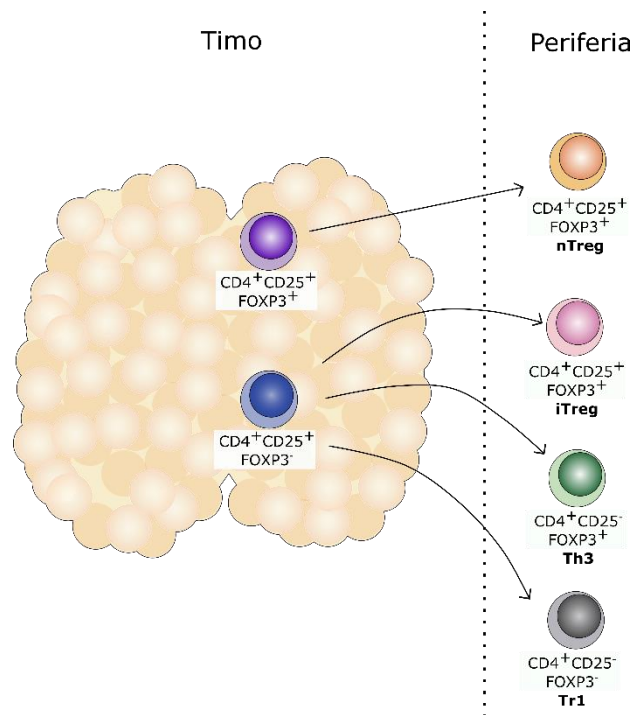


Figura 1. Generación de las células Treg. Flores Mendoza, 2020 (no publicado).

2.1.2 Células tTregs

Las tTregs representan del 5 al 10% del total de $CD4^+$ en la periferia en ratones y hasta un 2% en humanos, participan principalmente en procesos de tolerancia, rechazo de tejidos trasplantados y alergias. Experimentalmente se ha comprobado que su eliminación en modelos murinos genera el desarrollo de patologías autoinmunes (Shevach, 2014).

Estas células se generan en la médula del timo, ya que ahí se encuentra un microambiente más propicio para su desarrollo (Figura 1). Luego de su maduración, migran a la periferia para desarrollar sus funciones (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009). Para clarificar el proceso de generación de las tTregs en el timo, existe un modelo de dos pasos. En este modelo, se expone que un timocito necesita, como primer paso, una

señal fuerte a través de su TCR, que resulte en un aumento de la expresión de CD25 y otras moléculas de la vía de señalización de IL-2 que facilite la inducción de Foxp3 y por lo tanto, la estabilidad de las Tregs (Lio & Hsieh, 2008).

La fuerza de señalización del complejo TCR-MHC es uno de los factores mejor estudiados y demostrados experimentalmente, que influyen en el destino de una célula autorreactiva, ya sea la delección clonal o la diferenciación a Tregs, sin embargo, aún no se conoce el umbral de afinidad y avidéz necesario para la diferenciación a Tregs (Aschenbrenner et al., 2007; Jordan et al., 2002).

Finalmente, el número de encuentros con el antígeno y la presencia de señales coestimuladoras, como CD28 y citocinas como IL-2, son también importantes para el mantenimiento de las Tregs (Chen et al., 2012, Workman et al., 2009).

Es importante mencionar que, aunque todos ellos son cruciales para un desarrollo óptimo de las células, ninguno por sí solo es instructivo, sino que en conjunto determinan el rumbo que tomará la célula.

2.1.3 Células pTregs e iTregs.

Existe otra población de células reguladoras, que se genera fuera del timo, a partir de células T CD4⁺ vírgenes Foxp3⁻ en los nódulos linfáticos, bazo, GALT y tejidos inflamados, bajo estimulación antigénica *in vivo*, mediada por antígenos presentes en la flora intestinal u otros alérgenos. Se conocen como pTregs y surgen principalmente como una necesidad de mantener un ambiente no inflamatorio en el intestino, participando en la tolerancia inmune en las mucosas. Además, son importantes en el control

de la inflamación crónica severa y de la defensa contra tumores (Lin et al., 2013; Shevach & Thornton, 2014).

Al igual que las células tTreg, diversos factores contribuyen a su generación; tales como la especificidad del TCR, así como la presencia de moléculas coestimuladoras y citocinas en el microambiente necesarias para el mantenimiento y estabilidad de las células (Tabla 1). En este caso, el TGF- β se considera una citocina clave (Sanjabi et al., 2005; Schmitt & Williams, 2013). Sin embargo, para el desarrollo de este subtipo celular en comparación con las tTregs, se necesita de una estimulación de activación por su TCR menos fuerte (Workman et al., 2009).

Aunque pueden tener funciones complementarias con las tTregs, cada una tiene distintos mecanismos de regulación. Mientras que las células tTregs suprimen directamente a las T efectoras, las pTregs necesitan de citocinas para llevar a cabo su función (Lourenço & La Cava, 2011). Los principales subtipos de pTregs son: Tr1 inducidas y secretoras de IL-10; Th3 inducidas y secretoras de TGF- β . Estas últimas expresan Foxp3 (Workman et al., 2009).

Por otro lado, la estimulación *in vitro* de células T CD4⁺ vírgenes en presencia de coestimulación y TGF- β genera células supresoras que expresan Foxp3 y se conocen como iTregs. Éstas son menos estables en cuanto a la expresión de moléculas asociadas a su función, pero en un microambiente proinflamatorio logran una mejor regulación (Chen et al., 2012; Li et al., 2010), a diferencia de las tTregs, en presencia de IL-6, una citocina proinflamatoria, pueden diferenciarse a Th17 (Zheng et al., 2014). Por lo tanto, las iTregs son de particular interés, debido a su capacidad para contrarrestar deficiencias autoinmunes en tTreg, generando tolerancia o restaurando la regulación (Li et al., 2010; Schmitt & Williams, 2013).

Tabla 1. Características diferenciales de las células tTregs y pTregs

| | nTregs | pTregs | iTregs |
|-----------------------------------|---|---|---|
| Origen | Timo | Periferia | <i>In vitro</i> |
| Fenotipo | CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} | CD4 ⁺ CD25 ⁻ /CD4 ⁺ CD25 ⁺ | CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ |
| Otros marcadores | CTLA ⁻ GITR ⁺ Foxp3 ⁺ | CD45RB ^{low} Foxp3 ⁻ /CD25 ^{low-} variableCD45RB ^{low} Foxp3 ⁺ | CCR9 |
| Coestimulación | CD28 | CTLA-4 | CD28 |
| Expansión | Estímulo TCR/CD28, IL-2 | CD3 IL-10/TGF-β | CD3 IL-2 TGF-β Ácido retinóico |
| Papel en el sistema inmune | Supresión de células autoreactivas | Inmunidad en mucosas, respuesta inflamatoria | Inmunoterapia (?) |
| Mecanismo de supresión | Contacto, granzima B | IL-10/TGF-β | TGF-β |

(Chen et al., 2012; Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009; Shevach, 2002)

2.2 Factor de transcripción Foxp3

El gen *Foxp3* está localizado en la región cromosómica Xp11.23, se constituye por 11 exones que codifican una proteína de 431 aminoácidos. Es un factor de transcripción de la familia Forkhead, que se expresa principalmente en tejidos linfoides y en células CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi et

al., 2010). *Foxp3*, es un importante regulador de las Tregs, ya que determina su función como supresoras de la respuesta inmunológica y estudios realizados sugieren que las mutaciones en este gen, son las causantes de linfocitos autoreactivos característicos de múltiples enfermedades autoinmunes (Lee et al., 2014; González et al., 2007).

Por ejemplo, en humanos, la pérdida de la función de *Foxp3*, causa el síndrome de inmunodeficiencia, poliendocrinopatía y enteropatía, ligado al X (IPEX), y en ratones, genera el modelo murino *Scurfy*, que se caracteriza por la ausencia de Tregs (Rudensky et al., 2005). Se ha comprobado que los efectos que conlleva la deficiencia de *Foxp3* pueden revertirse, mediante la introducción de un vector que exprese dicho factor de transcripción (Masiuk et al., 2019; Wildin et al., 2000).

2.3 TGF- β

El TGF- β es una citocina multifuncional encargada de regular la proliferación celular. Además, está implicada en procesos hematopoyéticos, así como en la adhesión, diferenciación y apoptosis celular.*

En mamíferos existen tres isoformas conocidas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), que contienen regiones altamente conservadas (71-80% de similitud), son estructuralmente similares y cada una presenta distintos patrones de expresión (Kubiczkova et al., 2012). Cada una es codificada por un gen localizado en diferentes cromosomas, 19q13.1, 1q41, 14q24, respectivamente (Peralta, 2001; Poniatowski et al., 2015). Estructuralmente son similares, sin embargo se ha encontrado que el estado "abierto" o "cerrado" de la proteína se relaciona con su actividad biológica. (Huang, 2014).

Las tres isoformas tienen una función biológica similar, más no idéntica, ya que deficiencias de cada una en modelos *in vivo*, se asocia a diferentes

fenotipos (Memon et al., 2008). No obstante, la señalización diferencial entre las isoformas de la citocina, no ha sido estudiada con detalle.

Se piensa que los efectos biológicos de las diferentes isoformas de TGF- β están asociados a la disponibilidad de receptores presentes y a la vía de señalización que estos inducen. Se han identificado dos diferentes tipos de receptores T β RI y T β RII (Peralta, 2001).

El TGF- β 1, la isoforma más abundante, es sintetizado tanto por células del sistema inmunológico como linfocitos y macrófagos, como por otros linajes celulares, ya sea, fibroblastos, astrocitos, células epiteliales, plaquetas y algunas células tumorales. Ratones deficientes de TGF- β 1 desarrollan respuestas inflamatorias excesivas, necrosis celular y muerte (Shull & Doetschman, 1994; Shull et al., 1992).

El TGF- β 2, fue descrito por primera vez en células de glioblastoma, siendo denominada factor supresor de células T derivado de glioblastoma (G-TsF) y se expresa en tejido neural. Estudios *in vivo* en un modelo murino sugieren que la eliminación de TGF- β 2 causa anomalías cardiovasculares, en el tracto urogenital y muerte neonatal (Huang, Schor, & Hinck, 2014; Mohamad et al., 2012).

Finalmente, el TGF- β 3 se expresa en células mesenquimales y se ha descrito, en un modelo murino deficiente de dicha isoforma, una deficiencia en el desarrollo de células pulmonares y muerte prenatal. (Kaartinen et al., 1995). En modelos deficientes de TGF- β 1/TGF- β 3 existen alteraciones en el sistema ocular (Dünker & Kriegelstein, 2003). La muerte prematura en modelos *in vivo* deficientes en las isoformas 1 y 3, ha dificultado su estudio.

2.3.1 Papel en el sistema inmune

En el sistema inmunológico, el TGF- β cumple un papel crucial en la regulación y generación de la tolerancia. Una de sus funciones biológicas más importantes, es la diferenciación de las Tregs, mediante la inducción de Foxp3; se ha demostrado en células humanas el poder de TGF- β para diferenciar hacia Tregs mediante la inducción de Foxp3, lo cual ha sido comprobado también en modelos murinos (Becker et al., 2014; Liu et al., 2008; Wildin et al., 2000). El día de hoy sabemos que deficiencias en la vía de señalización de TGF- β impiden la expresión de Foxp3 (Chen & Konkel, 2010; Y. Liu et al., 2008).

2.3.2 Vías de señalización

La familia de TGF- β actúa mediante dos tipos de receptores: TGFBR1 que es activado por TGFBR2. Ambos son cinasas de serinas y treoninas, que se ensamblan en un complejo heterotetramérico en la superficie celular; donde, además se encuentran dos correceptores que regulan el acceso de la citocina; el receptor tipo III o betaglicano y la endogлина (Sanjabi et al., 2005).

La vía canónica de señalización de TGF- β depende de las proteínas Smad, las cuales se dividen en tres subfamilias: 1) R-Smads, que se activan por el receptor y son Smad2, Smad3, Smad1, Smad5 y Smad8; 2) Co-Smads (Smad4), la proteína común en las diferentes vías; y 3) las proteínas inhibitorias I-Smads, que son Smad6 y Smad7 (Itoh et al., 2000).

El mecanismo de activación empieza mediante la interacción de la citocina con el receptor tipo II (T β R2), que promueve el reclutamiento y la activación del receptor tipo I (T β R1/ALK5), formando un complejo de dos moléculas de cada receptor que induce la transducción de señales por las proteínas Smad.

Luego de la activación del complejo de receptores, Smad2 y Smad3, que actúan como factores de transcripción, son fosforiladas, para luego formar un complejo con Smad4. Este se transloca del citoplasma al núcleo, para regular la expresión de genes blanco de TGF- β (Song Guo Zheng, Wang, Gray, Soucier, & Horwitz, 2004).

Otras moléculas como LAP y decorina, modulan la vía de señalización regulando el acceso de la citocina a sus receptores. Así como también la presencia de activadores o represores de la transcripción y miRNAs, tienen un papel importante en el control de la señalización (Sanjabi et al., 2005).

Existen además, otras vías de señalización llamadas vías alternas, que son activadas por los mismos receptores pero independientes de las proteínas Smad, entre ellas se encuentran las vías de las MAPKs, PI3K, PP2A, Ras, Rho, entre otras, de las cuales sus efectos no están claramente dilucidados (Figura 2) (Y. E. Zhang, 2009).

3. Información preliminar

En el laboratorio del Dr. Crispín Acuña, se comparó la capacidad de cada isoforma de TGF- β para inducir la diferenciación de iTregs. Se observó un mayor porcentaje de células Foxp3+ cuando las células eran estimuladas con TGF- β 3. Además, se documentó que la exposición de TGF- β 3 induce un perfil transcripcional diferente al de la exposición con TGF- β 1 (Datos no publicados).

Por otra parte, la diferenciación *in vivo* analizada mediante un ensayo de tolerancia oral, arrojó resultados similares en donde la neutralización de

TGF- β 3 bloqueó la inducción de la tolerancia, lo que demuestra la importancia de TGF- β 3 para la generación de las Tregs *in vivo* (Datos no publicados).

En conjunto, estos datos sugieren que la isoforma 3 del TGF- β es más potente induciendo la expresión de Foxp3 y, por lo tanto, generando Tregs. Asimismo, TGF- β 3 es necesaria para la tolerancia oral en un modelo murino, lo cual nos indica una diferencia funcional y transcripcional, entre las diferentes isoformas de TGF- β . Lo anterior, sugiere que la activación de las vías si bien es similar, no es idéntica.

Ya que no se conoce con precisión cuales moléculas son indispensables en la señalización del TGF- β , que permiten la inducción de Foxp3 en células T CD4⁺, se diseñó este proyecto, en el que se planea la generación de una librería genética que identifique genes participantes en la vía de señalización y permita eliminarlos en sistemas *in vivo* e *in vitro*, para poder estudiar las diferencias entre las isoformas 1 y 3 de TGF- β y evaluar su participación en la diferenciación de las Tregs en una línea celular de linfocitos T CD4⁺ murina (EL-4).

Comprender esta vía, permitirá proponer estrategias para su control a futuro. El poder modificar la inducción de células Treg, manipulando la vía de señalización de TGF- β , podría ser una estrategia terapéutica importante en distintas enfermedades. Por ejemplo, regulando la funcionalidad o existencia de las Tregs, tales como: induciendo la tolerancia en el contexto de autoinmunidad o trasplantes, o inhibiéndolas en el contexto de cáncer, donde su inhibición permitiría restablecer la respuesta inmune contra el tumor.

4. Hipótesis

La señalización de cada isoforma de TGF- β demostrará diferencias cuantitativas y cualitativas que podrán ser identificadas a través de la delección y/o el silenciamiento de moléculas específicas.

5. Objetivo

5.1 Objetivo general

Diseñar una estrategia genética que permita interrogar las vías de señalización activadas por TGF- β 1 y TGF- β 3, con el fin de identificar moléculas clave para la señalización de cada isoforma.

5.2 Objetivos particulares

1. Diseñar una librería de genes involucrados en la señalización de TGF- β 1 y TGF- β 3.
2. Definir la mejor estrategia de perturbación que permita analizar la importancia de cada molécula en la señalización de TGF- β 1 y TGF- β 3.
3. Estandarizar la metodología en la línea celular EL-4.

6. Metodología

6.1 Diseño de librería

Identificación de genes involucrados en las vías de señalización de TGF- β

Se generó una lista con genes involucrados en la vía de señalización de TGF- β , su asociación funcional con la citocina y la referencia bibliográfica en la que se demostró su relación con la vía de TGF- β , preferentemente en un contexto inmunológico.

Para este fin, realizamos una búsqueda manual de genes, mediante una revisión de diferentes plataformas en línea, donde se pueden consultar esquemas de la vía de señalización de TGF- β con las moléculas hasta ahora identificadas.

Una vez identificada la vía de señalización canónica (dependiente de Smads) y las vías no canónicas (independientes de Smads), se procedió a la búsqueda de evidencia experimental sobre cada gen, donde se expusiera su participación en la regulación de la vía de TGF- β , principalmente en la base de datos PubMed del NCBI.

Para la revisión de las vías actualmente dilucidadas, se utilizaron las bases de datos que se indican en la Tabla 2. Cada base proporciona de manera visual e interactiva, diagramas de vías de señalización con las moléculas involucradas. En estos esquemas, se visualizan receptores, ligandos, inhibidores y factores de transcripción de la vía con sus respectivas interacciones. Si bien existen genes que se encuentran en la mayoría, hay algunas bases que difieren, ya sea presentando un mayor o un menor número de genes o interacciones nuevas.

Se realizó una recopilación de los genes obtenidos en todas las plataformas y se depuraron los genes repetidos. Se seleccionaron aquellos cuya evidencia de asociación funcional con la vía es más robusta.

Entre las rutas comunes encontradas están las vías dependientes de Smads (TGF- β /activina y BMP) y las vías independientes como MAPK/ERK y SAPK/JNK.

Tabla 2. Bases de datos utilizadas para la generación de la librería génica

| Base de datos | Página web |
|---------------|--|
| KEGG PATHWAYS | genome.jp/kegg/pathway.html |
| REACTOME | reactome.org |
| CST PATHWAYS | cellsignal.com/contents/science/cst-pathways/science-pathways |
| PathCards | pathcards.genecards.org/ |
| WIKIPATHWAYS | wikipathways.org |

Búsqueda de genes diferenciales entre TGF- β 1 y TGF- β 3

Ya que uno de los propósitos de la lista es identificar diferencias entre las vías activadas por las isoformas 1 y 3 de TGF- β , se buscó, además,

evidencia experimental donde se encontró una expresión o función diferencial entre ellas.

En el 2012, Lee y colaboradores, demostraron una diferencia en cuanto a la expresión de genes en células T CD4 estimuladas con TGF- β 1 y TGF- β 3 más IL-6, en el contexto de Th17, por lo tanto, a pesar de ser diferente el sistema de estudio, se compararon los datos publicados y se añadieron algunos genes.

Búsqueda de genes con posible feedback

Se buscó evidencia de genes *río abajo*, que probablemente regulaban la vía de manera positiva o negativa, interaccionando con alguna proteína efectora y se añadieron a la librería.

Clasificación de genes

Se clasificaron los genes depurados con base en su naturaleza en seis grupos; genes de las vías canónicas y alternas, genes de otros miembros de la familia de TGF- β , genes que inhiben la vía de señalización, genes de factores de transcripción, coactivadores y corepresores, miRNAs, y otros genes.

6.2 Análisis de posibles estrategias de edición génica a utilizar: CRISPR vs. shRNA

El estudio de los genes y sus vías de señalización, se ha realizado durante décadas, mediante la disrupción de su funcionalidad y la evaluación de los fenotipos resultantes en diferentes modelos experimentales. Para determinar la técnica óptima, que permita la disrupción de los genes

involucrados en la señalización de TGF- β en las condiciones posibles, se comparó la técnica novedosa de edición génica CRISPR, con una técnica más comúnmente utilizada: shRNA.

Los puntos que se tomaron en cuenta para su comparación se enlistan en la Tabla 3. Al finalizar la discusión, que se plantea más adelante, se concluyó el utilizar la técnica de CRISPR-Cas9.

Tabla 3. Comparación de los métodos de CRISPR y RNAi.

| | RNAi | CRISPR Cas9 |
|-------------------------------------|---------------------|--|
| Mecanismo | Nivel transcriptoma | Nivel DNA |
| Fenotipo | Knockdown | Knockout |
| Duración del fenotipo | Transitorio | Permanente y heredable |
| Número de off-target effects | Alto | Medio. Puede disminuir empleando Nickasa (Satomura, 2017). |
| Eficiencia | ~75% | 10-40% |
| Sitio de acción | Citoplasma | Núcleo |
| Maquinaria | Endógena | Exógena |
| Transgenes | shRNA | gRNA, Cas9, |
| Aislamiento clonal | No necesario | Necesario |

De manera previa en el laboratorio, con el fin de estandarizar las condiciones óptimas y verificar la funcionalidad del sistema, se generaron las guías de Tgfbr1, Tgfbr2, Smad2, Smad3, Jun y Fos, además de clonas editadas deficientes del receptor I, II y Smad3.

6.3.3 Estandarización de la metodología para la edición génica de una línea celular murina.

6.3.1. Cultivo celular

Línea celular y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular EL-4, linfocitos T CD4⁺ generados a partir de un linfoma murino (*Mus musculus*), que expresan Foxp3 cuando son estimulados en presencia de TGF- β (Ogawa et al., 2014; Tone et al., 2008). En todos los casos las células fueron mantenidas a 37°C para su expansión en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo empleado fue RPMI con SFB al 10%.

Almacenamiento y conservación

La conservación de la línea celular, se realizó congelando alícuotas de 1 mL de células EL-4 con DMSO, un criopreservante en relación 1:10.

En caso de expansión, los viales se descongelaron en un baño a 37° C, se realizaron 2 lavados con PBS estéril, se reconstituyó el botón celular en medio RPMI y se depositó en un frasco de cultivo. El medio se revisó cada 48 h aproximadamente para cambio de medio.

6.3.2 Clonación

Construcción de guías

Cada par de oligonucleótidos (100 uM) fue alineado con la enzima T4 PNK y ligado con 5 μ g del plásmido lentiCRISPRv2 (Addgene #49535) previamente digerido con BsmBI por 30 min a 37°C y purificado con Zymoclean Gel DNA Recovery Kit.

Generación de gRNA

Utilizando la plataforma CHOPCHOP, una herramienta en línea que facilita la generación de secuencias blanco. Con base en sus valores de eficiencia se diseñaron RNAs guía para los genes Tgfbr1 (exón 3 y 4), Tgfbr2 (exón 1 y 4), Jun (exón 1 y 1.1), Fos (exón 1 y 3), Fosb (exón 3 y 4), Smad 2 (exón 3 y 4) y Smad 3 (exón 2 y 3).

Fosforilación y alineación de oligonucleótidos

Se reconstituyeron a una concentración final de 100mM y se utilizó 1 μ L de cada oligonucleótido. Se incubaron por 30 min a 37°C. Posteriormente, 10 min a 95°C con la enzima PNK y la DNA ligasa T4. Finalmente, se diluyeron 1:200 con ddH₂O.

Purificación de plásmido

El plásmido lentiCRISPR contiene un gen que codifica para la proteína Cas9, genes de resistencia a la ampicilina y puromicina y sitios de corte para BsmBI. Se digirieron 5 μ g de plásmido con la quinasa PNK y CIP por 30 min a 37°C.

El producto de la digestión se dejó 3 horas en el termociclador a 37°C, para luego correr la muestra con 10 μ l de Loading Buffer en un gel de agarosa al 1% y bromuro por 45 min a 110 V.

Posteriormente, se observó el gel en luz UV y se cortó la banda pesada de aproximadamente 11 kb.

Se purificó el plásmido lentiCRISPR siguiendo el protocolo Zymoclean Gel DNA Recovery Kit Cat. No. D4008. Se cuantificó la concentración en ng/ μ utilizando el programa NanoDrop.

Ligación

Se ligaron 50.0 ng del plásmido con 1 μ l de los oligonucleótidos (1:200) a 37° C por 10 min utilizando Quick Ligase.

Transformación de bacterias

3.0 μ l del producto de ligación, se mezcló en hielo con 1.5 ml de bacterias competentes Top10 por 30 min y se sometieron a un choque térmico a 12 °C por 40 s. Luego de esto, se sembró en una placa de Agar LB con ampicilina.

Selección de clonas resistentes a ampicilina

Las colonias que crecieron en las placas, se sembraron en medio líquido LB con ampicilina, y se dejaron en agitación 16 h a 37°C para su expansión. Se realizó miniprep siguiendo el protocolo PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit Cat. No. K210002.

Secuenciación y análisis

Se aplicó la técnica de secuenciación de Sanger en los equipos del Instituto de Ciencias Genómicas (INMEGEN), 20 μ l de producto de ligación a una concentración de 100 ng/ μ l.

El resultado de la secuenciación se analizó utilizando los programas SeqScanner para la visualización de electroferogramas y SerialCloner con el que se verificó la correcta alineación de la guía correspondiente con el producto de ligación.

6.3.3 Transducción de células EL-4

Se utilizaron células adherentes HEK293T a una confluencia del 60 al 80% expandidas en medio DMEM. Luego de lavar con PBS estéril, se resuspendieron en medio Optimem.

Para la generación de los lentivirus, se incubó por 30 min 5 µg de DNA lentiviral, 3.25 µl de PPAX, 1.75 µl de PMDG y 15 µl de lipofectamina con 100 µl de medio Optimem.

El producto se colocó gota a gota en las placas con 2 ml de células HEK. Se dejaron incubando 24 h a 37°C. A las 24 h se cambió el medio a DMEM y se dejaron incubando con las condiciones mencionadas. Luego de 24 h, se recolectó el sobrenadante que contiene los virus. Se dejó incubando a 4°C.

Al transcurrir las siguientes 24 h, se centrifugaron, decantaron y se añadió PEG 1X para dejar incubando en el cuarto frío toda la noche. Finalmente, se centrifugaron y el pellet con 100 µl de medio, se resuspendió en 500 µl de PBS estéril. Los 600 µl resultantes se dividieron en tubos Eppendorf conteniendo 100 µl cada uno.

6.3.4 Ensayo de expresión de Foxp3

Curva de puromicina

En una placa de 48 pozos, se cultivaron 500,000 células en 1 ml de medio RPMI con distintas concentraciones de puromicina (1, 3, 5, 7, 10 y 13 µg/ml). A las 48 h se contó el número de células en la cámara de Neubauer, se cambió el medio y se agregó de nuevo la puromicina. A las 72 y 96 h, se contaron las células vivas para identificar la concentración más baja que mata a la mitad de la población celular.

Infección

Se mezcló 1 µl de Polibene 1000X con los 100 µl del tubo con lentivirus. Dicha mezcla se añadió a pozos de una placa de 48, que contenían 1ml de células EL-4 a una concentración de 5×10^7 células por ml.

Selección de clonas resistentes a puromicina mediante FACS

Se administraron dos dosis de puromicina 5 µg/µl separadas por 48 h luego de la infección. 96 h después se separaron las células vivas o resistentes a la puromicina.

Se utilizó Sytox Orange Dead Cell Stain para sortear células EL-4 previamente infectadas y seleccionadas con puromicina. En el equipo FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter), ubicado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se sorteó una célula por pozo en una placa de 96.

Expansión y mantenimiento de las clonas

Los conglomerados de células correspondientes a las clonas editadas observados en los pozos de la placa de 96, se pasaron a placas de 48 con nuevo medio y se analizó por PCR y electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, la delección del gen correspondiente a la guía que se transfectó, lo cual se visualizó mediante la ausencia de banda con respecto al control.

7. Resultados y discusión

7.1 Diseño de librería

Se diseñó una base con 150 genes involucrados en la vía de señalización de TGF- β , participantes tanto en la vía canónica como en vías alternas.

En cuanto a la vía canónica, TGF- β actúa mediante dos tipos de receptores: TGFBR1 que es activado por TGFBR2, ambos quinasas de serinas y treoninas. La vía canónica de señalización depende de las proteínas Smad, también incluidas en la lista. El mecanismo de activación empieza con la interacción de la citocina con el receptor tipo II, que promueve el reclutamiento y la activación del dominio cinasa del receptor tipo I, lo que forma un complejo heterotetramérico, que consta de dos moléculas de cada receptor en la superficie. Tras la activación del complejo, Smad2 y Smad3 son fosforiladas, lo que promueve la formación del complejo con Smad4, que se transloca del citoplasma al núcleo, para regular la expresión de genes blanco de TGF- β .

A pesar de ser Smad2 y Smad3 las principales proteínas activadas, la citocina también es capaz de activar Smad1 y Smad5 a través del receptor tipo II, motivo por el que se añadieron al grupo de genes de la vía canónica y vías alternas.

Para las vías alternas, se añadieron los genes involucrados en las vías independientes a las proteínas Smad, como lo son MAPKs, PI3K, PP2A y Ras, dado que pueden ser diferencialmente activadas por cada isoforma de la citocina.

Además, existen otros receptores pertenecientes a la misma familia capaces de señalizar mediante TGF- β y otras moléculas que modulan la vía de señalización ya sea positiva o negativamente mediante la

interacción con los receptores u otras proteínas participantes de la vía, inclusive secuestrando la propia citocina.

Por ejemplo, LAP, decorina y alpha2-macroglobulina son moléculas solubles que al acoplarse con TGF- β regulan el acceso a sus receptores, o las proteínas Ski, SnoN, Smurf1 y Smurf2 capaces de inhibir a las proteínas Smad.

Finalmente, otro grupo que se consideró importante dentro de la clasificación, fue el de miRNAs.

Los microRNAs, mejor conocidos como miRNAs son moléculas de RNA endógenas, de cadena sencilla, con una longitud entre 19 y 22 nucleótidos, y no codificantes, y se encargan de la regulación postranscripcional de genes. Mediante proteínas como DROSHA, DICER y el complejo RISC, inhiben la expresión de los genes que regulan. Se ha estudiado la relación entre miRNAs y el fenotipo y estabilidad de las células Tregs en función de su expresión de Foxp3, por lo que se incluyeron algunos de los ya dilucidados.

En la Tabla 4, se encuentran enlistados los genes mencionados junto con su mecanismo relacionado a la señalización de TGF- β y clasificados en grupos dependiendo su naturaleza.

Se clasificaron en los siguientes rubros: genes de la vía canónica; genes de las vías alternas conocidas; genes de otros miembros de la superfamilia de TGF- β ; factores de transcripción con sus coactivadores; y, corepresores, inhibidores en general de la vía, miRNAs y otros.

Tabla 4. Librería de genes involucrados en la señalización de TGF- β .

| GEN | PRODUCTO | MECANISMO | REFERENCIA |
|--|--|--------------------------------|------------------------------|
| Genes de las vías canónica y alternas | | | |
| AKT1 | AKT Serine/Threonine Kinase 1 | Regula expresión de Foxp3 | (Remy et al., 2004) |
| MAP2K1 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1 | Activa Erk 1/2; Estabiliza RII | (Chen et al., 2011) |
| MAP2K2 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2 | Activa Erk 1/2 | (Xie et al., 2004) |
| MAP2K3 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3 | Activa p38 MAPK | (Huber et al., 2008) |
| MAP2K4 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 | Activa JNK | (Bao et al., 2016) |
| MAP2K6 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6 | Activa p38 MAPK | (Huber et al., 2008) |
| MAP3K1 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1 | Activa vía MAPK | (Hammaker et al., 2004) |
| MAP3K2 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2 | Activa vía MAPK | (Hammaker et al., 2004) |
| MAP3K7 | Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7 | Activa vía MAPK | (Sato et al., 2006) |
| MAPK1 | Mitogen-Activated Protein Kinase 1 | Induce pSmad1/5/8 | (Hayashida & Schnaper, 2003) |

| | | | |
|---------------|--|---------------------------|------------------------|
| MAPK10 | Mitogen-Activated Protein Kinase 10 | Regula expresión de Foxp3 | (Bao et al., 2016) |
| MAPK14 | Mitogen-Activated Protein Kinase 14 | Regula expresión de Foxp3 | (Huber et al., 2008) |
| MAPK3 | Mitogen-Activated Protein Kinase 3 | Induce pSmad1/5/8 | de (Luo et al., 2008) |
| MAPK8 | Mitogen-Activated Protein Kinase 8 | Regula expresión de Foxp3 | (Bao et al., 2016) |
| MAPK9 | Mitogen-Activated Protein Kinase 10 | Regula expresión de Foxp3 | (Bao et al., 2016) |
| MTOR | Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase | Regula expresión de Foxp3 | (Sauer et al., 2008) |
| PARD3 | Par-3 family cell polarity regulator | Unión con PARD6 | (Ruan et al., 2017) |
| PARD6 | Par-6 family cell polarity regulator alpha | Unión con RI | (Ruan et al., 2017) |
| PIK3CA | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha | Regula expresión de Foxp3 | (Sauer et al., 2008) |
| RAC1 | Rac Family Small GTPase 1 | Regula vía de JNK | (Meriane et al., 2002) |

| | | | |
|---------------|--|---------------------------------------|---------------------------|
| RHOA | Ras homolog family member A | Estabiliza del complejo de receptores | (Chen et al., 2006) |
| ROCK1 | Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1 | Estabiliza Smad2 | (Ji et al., 2014) |
| SMAD1 | SMAD family member 1 | Inhibe transcripción | (Tsukamoto et al., 2014) |
| SMAD2 | SMAD family member 2 | Promueve trnascricción | (Hasegawa et al., 2010) |
| SMAD3 | SMAD family member 3 | Promueve transcripción | (Hasegawa et al., 2010) |
| SMAD5 | SMAD family member 5 | Inhibe transcripción | (Du et al., 2018) |
| SMAD8 | SMAD family member 8 | Inhibe transcripción | (Du et al., 2018) |
| TAB1 | TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1 | Activa Tak1 | (Kim et al., 2009) |
| TAB2 | TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 2 | Activa Tak1 | (Kim et al., 2009) |
| TGFBR1 | Transforming growth factor, beta receptor 1 | Activa Smad2/3 | (Li et al., 2011) |
| TGFBR2 | Transforming growth factor, beta receptor 2 | Activa Smad2/3 | (Ramalingam et al., 2012) |
| TGFBR3 | Transforming growth factor, beta receptor 1 | Promueve la señalización | (Ortega et al., 2017) |

| | | | |
|---|--|-----------------------|----------------------------|
| TRAF4 | TNF Receptor Associated Factor 4 | Inhibe Smuf2 | (Zhang et al., 2013) |
| TRAF6 | TNF Receptor Associated Factor 6 | Degrada RI | (Sorrentino et al., 2008) |
| Genes de otros miembros de la familia de TGF-β | | | |
| ACVLR1 | Activin A Receptor Like Type 1 | Induce pSmad 1/5/8 | de (Mummery et al., 2003) |
| ACVR1 | Activin A Receptor Type 1 | Induce pSmad 1/5/9 | de (Rigueur et al., 2015) |
| ACVR1B | Activin A Receptor Type 1B | Induce pSmad 1/5/10 | de (Rigueur et al., 2015) |
| ACVR1C | Activin A Receptor Type 1C | Induce pSmad 1/5/11 | de (Rigueur et al., 2015) |
| ACVR2A | Activin A Receptor Type 2A | Induce pSmad 1/5/12 | de (Jung et al., 2004) |
| ACVR2B | Activin A Receptor Type 2B | Induce pSmad 1/5/13 | de (Jung et al., 2004) |
| AMH | Anti-Mullerian Hormone | Induce pSmad 1/5/14 | de (Beck et al., 2016) |
| AMHR2 | Anti-Mullerian Hormone Receptor Type 2 | Induce pSmad 1/5/15 | de (Beck et al., 2016) |
| BMP2 | Bone Morphogenetic Protein 2 | Activa vía Smad 1/5/8 | (Lu et al., 2010) |
| BMP4 | Bone Morphogenetic Protein 4 | Activa vía Smad 1/5/8 | (Lu et al., 2010) |
| BMP5 | Bone Morphogenetic Protein 5 | Activa vía Smad 1/5/8 | (Holtzhausen et al., 2014) |

| | | | |
|---------------|---|--------------------------|----------------------------|
| BMP6 | Bone Morphogenetic Protein 6 | Activa vía Smad 1/5/8 | (Holtzhausen et al., 2014) |
| BMP7 | Bone Morphogenetic Protein 7 | Activa vía Smad 1/5/8 | (Holtzhausen et al., 2014) |
| BMP8A | Bone Morphogenetic Protein 8a | Activa vía Smad 1/5/8 | (Holtzhausen et al., 2014) |
| BMP8B | Bone Morphogenetic Protein 8b | Activa vía Smad 1/5/8 | (Holtzhausen et al., 2014) |
| BMPR1A | Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A | Activa vía Smad 1/5/8 | (Rahman et al., 2015) |
| BMPR1B | Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B | Activa vía Smad 1/5/8 | (Rahman et al., 2015) |
| BMPR2 | Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2 | Activa vía Smad 1/5/8 | (Rahman et al., 2015) |
| INHBA | Inhibin Subunit Beta A | Forma Activina/Inhibin a | (Huber et al., 2009) |
| INHBB | Inhibin Subunit Beta B | Forma Activina/Inhibin a | (Canali et al., 2016) |
| INHBC | Inhibin Subunit Beta C | Forma Activina/Inhibin a | (Kristensen et al., 2014) |
| INHBE | Inhibin Subunit Beta E | Forma Activina/Inhibin a | (Kristensen et al., 2014) |

| Genes inhibidores de la señalización | | | | | |
|--------------------------------------|--|---------------|-----------------------------------|--|--------------------------------------|
| BAMBI | BMP And Membrane Inhibitor | Activin Bound | Inhibe la vía | | (Onichtchouk et al., 1999) |
| CHRD | Chordin | | Inhibición de vía BMP | | (J. li Zhang et al., 2008) |
| CUL1 | Cullin 1 | | Degrada Smad3 | | (T. Abbas et al., 2013) |
| DCN | Decorin | | Unión con citocina | | (X. Li, McFarland, & Velleman, 2006) |
| FKBP12 | FK506 binding protein 12 | | Recluta Smad7/Smurf | | (Chen et al., 1997) |
| HDAC5 | Histone deacetylase 5 | | Regula activación | | (Xiao et al., 2016) |
| IFNG | Interferon Gamma | | Regula niveles de Smad7 | | (Ishida et al., 2004) |
| KLF14 | Krüppel-like factor 14 | | Silencia RII | | (Truty et al., 2009) |
| KLF2 | Krüppel-like factor 2 | | Induce Smad7 | | (Boon et al., 2007) |
| LEFTY | Left-Right Determination Factor 1 | | Impide la fosforilación de R-Smad | | (Ulloa & Tabibzadeh, 2001) |
| LTBP1 | Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1 | | Secuestra citocina | | (Tritschler et al., 2009) |

| | | | |
|---------------|--|--------------------------|-----------------------------|
| MTMR4 | Myotubularin related protein 4 | Desfosforila Smad2/Smad3 | (J. Yu et al., 2010) |
| NBL1 | NBL1, DAN Family BMP Antagonist | Antagonista | (Hung et al., 2012) |
| NEDD4L | Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like | Degrada TGFBR | (Gao et al., 2009) |
| NEDD8 | Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8 | Degrada TGFBR | (Zuo et al., 2013) |
| NOG | Noggin | Inhibe vía BMP | (Haudenschild et al., 2004) |
| PDPK1 | 3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1 | Complejo con STRAP | (Seong et al., 2005) |
| PMEPA1 | Prostate transmembrane protein, androgen induced 1 | Secuestra Smad3/Smad2 | (Fournier et al., 2016) |
| PPM1A | Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1A | Desfosforila Smad2/Smad3 | (Lin et al., 2006) |
| PPP1CA | Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha | Inhibe RI | (Liu & Feng, 2010) |
| PRDM16 | PR/SET Domain 16 | Inactiva Smad3 | (Zazzo et al., 2013) |

| | | | |
|---------------|--|--|-------------------------|
| RBX1 | Ring-Box 1 | Degrada Smad3 | (Fukuchi et al., 2001) |
| SKP1 | S-Phase Kinase Associated Protein 1 | Degrada Smad3 | (Wang et al., 2015) |
| SMAD4 | SMAD family member 4 | Feedback positivo | (Du et al., 2018) |
| SMAD6 | SMAD family member 6 | Inhibe Smad 1/5/8 | (Ishida et al., 2000) |
| SMAD7 | SMAD family member 7 | Inhibe Smad 2/3 | (Ishida et al., 2000) |
| SMURF1 | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 | Degrada Smad 7 | (Fukunaga et al., 2008) |
| SMURF2 | SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 | Degrada Smad 4 | (Fukunaga et al., 2008) |
| STRAP | Serine/threonine kinase receptor associated protein | Estabiliza unión de Smad7 con RI / degrada RII | (Datta & Moses, 2000) |
| STUB1 | STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase | Degrada Smad3 | (Shang et al., 2014) |
| TDGF-1 | Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1 | Unión con citocina | (Gray et al., 2008) |
| TNF | Tumor Necrosis Factor | Disminuye expresión de RII | (Yamane et al., 2003) |

| | | | |
|---|--|----------------------|---------------------------|
| UCHL5 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 | Unión Smad7 | (Wicks et al., 2005) |
| USP15 | Ubiquitin specific peptidase 15 | Estabiliza RI | (Eichhorn et al., 2012) |
| Genes de factores de transcripción, coactivadores y corepresores | | | |
| CBL | Cbl Proto-Oncogene | Degrada Smad7 | (Gruber et al., 2013) |
| CBP | CREB-binding protein | Cofactor de Smad | (Inoue et al., 2007) |
| EP300 | E1A Binding Protein P300 | Interactúa con Smad3 | (Inoue et al., 2007) |
| FOS | Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit | Interactúa con Smad4 | (Wang et al., 2016) |
| FOSB | FosB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit | Interactúa con Smad5 | (Wang et al., 2016) |
| FOSL1 | FOS Like 1, AP-1 Transcription Factor Subunit | Interactúa con Smad6 | (Y. Zhang et al., 1998) |
| FOSL2 | FOS Like 2, AP-1 Transcription Factor Subunit | Interactúa con Smad7 | (Zhang et al., 1998) |
| JUN | Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit | Feedback negativa | (Verrecchia et al., 2001) |
| JUNB | Jun B proto-oncogene | Feedback negativa | (Verrecchia et al., 2001) |

| | | | |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| NCOR1 | Nuclear receptor corepressor 1 | Inhibe Smad4 | (Wu et al., 2003) |
| NCOR2 | Nuclear receptor corepressor 2 | Inhibe Smad4 | (Wu et al., 2003) |
| RUNX | Runt Related Transcription Factor 1 | Regula expresión de Foxp3 | (Rudra et al., 2009) |
| SKI | SKI Proto-Oncogene | Codifica a correpresor SNON | (Liu et al., 2001) |
| SKIL | SKI-like proto-oncogene | Correpresor | (Tecalco-Cruz et al., 2012) |
| TGIF1 | TGFB-induced factor homeobox 1 | Correpresor Smad | (Hneino et al., 2012) |
| TGIF2 | TGFB-induced factor homeobox 2 | Correpresor Smad | (Melhuish et al., 2001) |
| ZNF451 | Zinc Finger Protein 451 | Correpresor Smad | (Feng et al., 2014) |
| miRNAS | | | |
| miR-100 | Micro RNA 100 | Inhibe Smad2/3 | (Hippen et al., 2018) |
| miR-146B | Micro RNA 146B | Inhibe Traf6 | (Hippen et al., 2018) |
| miR-15-16 | Micro RNA 15-16 | Inhibe MTOR | (Hippen et al., 2018) |
| miR-17 | Micro RNA 17 | Inhibe RII | (Hippen et al., 2018) |
| miR-210 | Micro RNA 210 | Inhibe Foxp3 | (Hippen et al., 2018) |

| | | | |
|--------------------|--|-------------------|--------------------------|
| miR-24 | Micro RNA 24 | Inhibe Foxp3 | (Hippen et al., 2018) |
| Otros genes | | | |
| ADAM10 | Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 | Activa citocina | (Ramdas et al., 2013) |
| ADAM17 | Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 | Activa citocina | (Malapeira et al., 2011) |
| APPL1 | Adaptor Protein Phosphotyrosine Interacting with PH Domain | Complejo con RI | (Song et al., 2016) |
| APPL2 | Adaptor Protein Phosphotyrosine Interacting with PH Domain and Leucine | Complejo con RI | (Song et al., 2016) |
| ARHGEF18 | Rho/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 18 | Recluta RhoA | (Tsapara et al., 2010) |
| ARHGEF2 | Rho/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 2 | Recluta RhoA | (Tsapara et al., 2010) |
| ATF2 | Activating Transcription Factor 2 | Coopera con Smad3 | (Ionescu et al., 2003) |
| ATF3 | Activating Transcription Factor 2 | Coopera con Smad3 | (Mallano et al., 2016) |

| | | | |
|---------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| CD109 | Antigen | Promueve degradación de receptores | (Bizet et al., 2011) |
| ENG | Endoglin | Activa vía Smad | (Lee et al., 2008) |
| FKBP1A | FK506 Binding Protein 1A | Unión con receptores | (Chen et al., 1997) |
| FST | Follistatin | Neutraliza Activinas, BMP, TGFb3 | (Nogai et al., 2008) |
| GDF9 | Growth Differentiation Factor 9 | Fosforila Smad2/Smad3 | (Pangas et al., 2004) |
| ITGB3 | Integrin Subunit Beta 3 | Activa citocina | (Rapisarda et al., 2017) |
| ITGB5 | Integrin Subunit Beta 5 | Activa citocina | (Tatler et al., 2011) |
| ITGB6 | Integrin Subunit Beta 6 | Activa citocina | (Aluwihare et al., 2009) |
| ITGB8 | Integrin Subunit Beta 8 | Activa citocina | (Worthington et al., 2015) |
| KLF10 | Krüppel-like factor 10 | Inhibe Smad7, induce Smad2 | (A. Memon & Lee, 2018) |
| MECOM | MDS1 And EVI1 Complex Locus | Inactiva Smad3 | (Di Zazzo et al., 2013) |
| MEN1 | Multiple endocrine neoplasia I | Regula Smad3 | (Kaji et al., 2001) |
| MMP2 | Matrix Metallopeptidase 2 | Activa citocina | (Annes et al., 2003) |

| | | | |
|---------------|--|-------------------------------|-------------------------|
| MMP9 | Matrix Metallopeptidase 9 | Activa citocina | (Annes et al., 2003) |
| PARP1 | Poly (ADP-ribose) polymerase 1 | Se une a receptores | (Zhang et al., 2013) |
| PTPN14 | Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 14 | Regula translocación de Smad4 | (Wyatt et al., 2007) |
| RhoB | Ras homolog family member B | Reprime RII | (Adnane et al., 2002) |
| RNF111 | Ring finger protein 111 Arcadia | Degrada Smad7 | (Malonis et al., 2017) |
| SIRT1 | Sirtuin 1 | Activa vía Smad | (Kume et al., 2007) |
| SP1 | Sp1 transcription factor | Regula expresión de R | (Baugé et al., 2011) |
| Sp3 | Sp1 transcription factor | Unión con Sp1 | (Ihn et al., 2006) |
| SPSB1 | Spry domain-containing Socs box protein | Ubiquitinación de RII | (Liu et al., 2015) |
| TAZ | Tafazzin | Regula complejo Smad2/3/4 | (Varelas et al., 2008) |
| TRIM33 | Tripartite motif containing 33 | Forma complejo con Smad2/3 | (Massagué & Xi, 2012) |
| TSP1 | Thrombospondin 1 | Activa citocina | (Nör et al., 2005) |
| USP9X | Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked | Deubiquitina Smad4 | (Eichhorn et al., 2012) |

| | | | |
|---------------|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| VASN | Vasorin | Unión con ADAM7/10 | (Malapeira et al., 2011) |
| ZFYVE9 | Zinc Finger FYVE-Type Containing 9 | Regula Smad2/Smad3 | (Runyan et al., 2009) |
| ZNF451 | Zinc Finger Protein 451 | Estabiliza receptores | (Feng et al., 2014) |

La cantidad total de genes que pueden involucrarse en la señalización de TGF- β es muy extensa; sin embargo, solo se incluyeron los más relevantes para cada grupo. Aunque la supresión de la mayoría resulta, como se puede verificar en sus referencias, en un efecto a nivel de sistema inmune, los efectos de algunos de ellos han sido estudiados en otros modelos. Cabe mencionar, que lo anterior no excluye la posibilidad de que exista alguna relación con los procesos inmunológicos que aún no han sido estudiados, sobre todo en el contexto de la diferenciación de las Tregs dependiente de la isoforma de TGF- β .

Finalmente, se realizó un esquema visual de la vía de señalización que relaciona los 150 genes enlistados como se muestra en la Figura 2.

7.2 CRISPR como estrategia para el estudio molecular de la vía de señalización de TGF- β

Esta nueva herramienta de ingeniería genética, es un sistema descrito en bacterias y arqueas como un mecanismo de defensa inmune adaptativo. Existen hasta ahora tres tipos de sistema CRISPR identificados; I-III, de los cuales, el sistema tipo II ha sido el mejor caracterizado y está compuesto por; genes "Cas" que codifican para la proteína Cas9, una endonucleasa capaz de dirigirse a cualquier secuencia blanco que cuente con un motivo conocido como "PAM", una guía (gRNA) y una secuencia

de repetidos. El proceso incluye la incorporación del material genético de bacteriófagos o plásmidos, reconocimiento específico y degradación de la secuencia extraña mediante el complejo gRNA:Cas9. Así es como esta técnica permite la edición génica, lo que facilita enormemente la evaluación molecular en sistemas biológicos.

En la actualidad, existe una amplia variedad de modificaciones en la metodología que aumentan la eficiencia del método (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013).

Por otro lado, el RNA de interferencia (RNAi) es un proceso natural en eucariontes, que se encarga de la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Este mecanismo emplea el complejo de silenciamiento inducido por el RNA (RISC), que es el encargado de silenciar los mRNA complementarios a la hebra antisentido de los shRNA transfectados, de manera exógena o los miRNAs propios de la célula. (Mohr et al., 2014; Ortiz-Quintero, 2009)

Ambas tecnologías tienen similitudes. Sin embargo, existen ventajas y desventajas, con base en las que se puede tomar una decisión dependiendo de los resultados que se busca obtener.

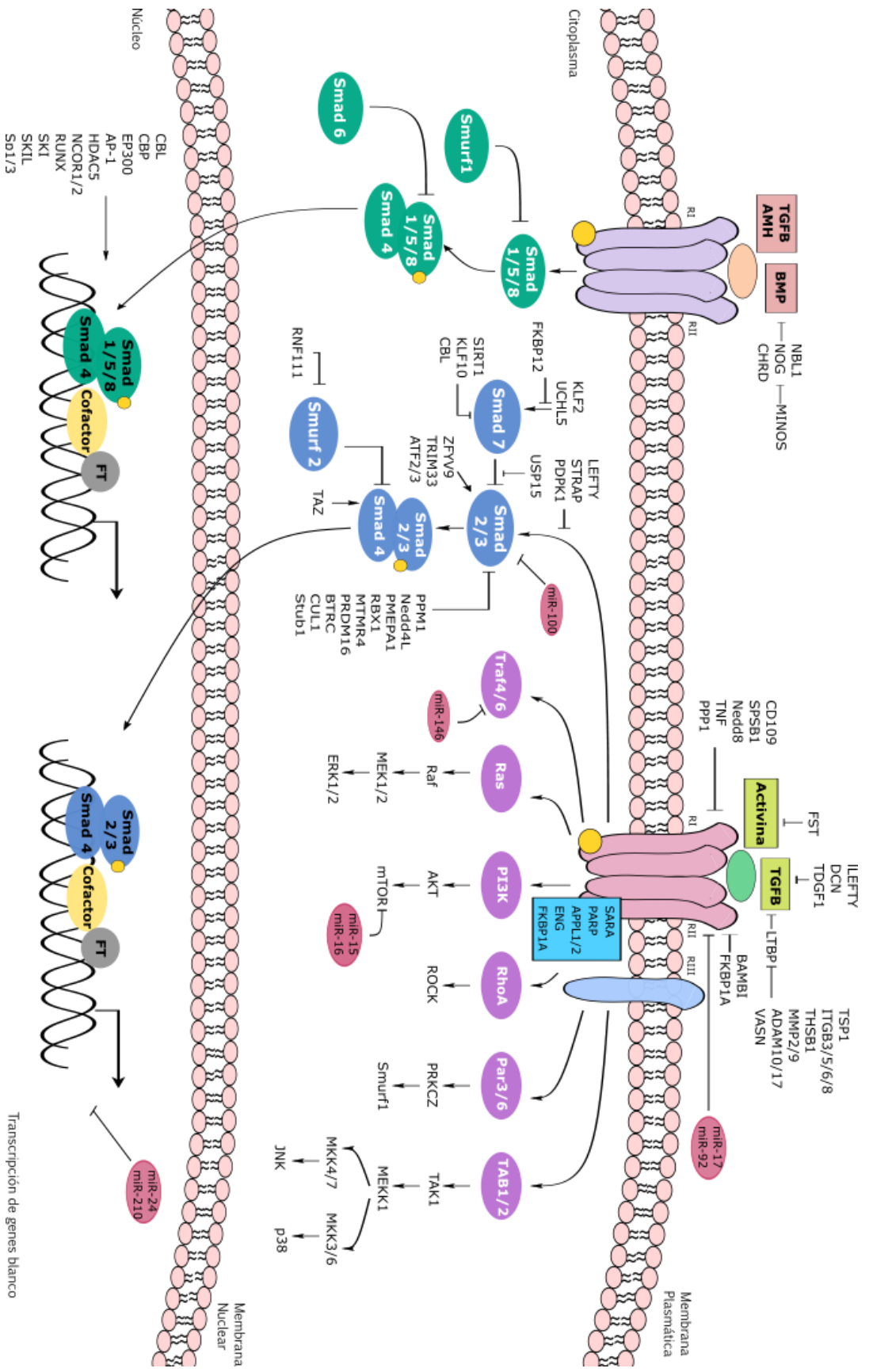


Figura 2. Esquema global de las interacciones de los 150 genes descritos en la librería génica.

En el núcleo, CRISPR causa mutaciones directamente en el gen que codifica la proteína. Por otro lado, el RNAi actúa en el citoplasma y únicamente disminuye la expresión del gen. Lo anterior, no asegura la pérdida de funcionalidad de la proteína. Por otro lado, una desventaja de eliminar un gen, es que se podría afectar la viabilidad celular si este pertenece a una vía de señalización esencial para la célula. Sin embargo, no siempre es así, además para algunas existen vías alternas que podrían compensar la deficiencia del gen ausente.

En cuanto a la duración del efecto, una ventaja de CRISPR sobre RNAi, es la permanencia y heredabilidad del resultado, lo cual es necesario, si se quiere mantener el fenotipo en las células editadas.

Otra característica que vale la pena resaltar, es que la técnica de RNAi es la más usada, ya que no se requiere de maquinaria adicional, dado que las células cuentan con las proteínas necesarias para llevar a cabo el proceso, únicamente es necesaria la transfección del shRNA.

En contraste, para CRISPR, es necesario un sistema exógeno y la secuencia PAM, además del gRNA. Otro punto que complica ésta técnica, es la validación del silenciamiento resultante. Mientras que para RNAi, basta con un ensayo de enriquecimiento con proteínas fluorescentes transfectando un vector que exprese el shRNA y la proteína que permita diferenciar a las células transfectadas; para CRISPR, es necesaria la expansión clonal, la selección de células y la secuenciación (Boettcher & McManus, 2015; Mohr et al., 2014).

La especificidad del sistema y el número de *off-targets* son rubros importantes para considerar. Mientras que RNAi presenta un mayor número de *off-targets*, debido a complementariedad en la región UTR con otros mRNAs; CRISPR es más específico, dado que únicamente se une a secuencias con un PAM adyacente (Boettcher & McManus, 2015).

Finalmente, la versatilidad del sistema ha permitido modificaciones en la técnica que aumentan la especificidad y disminuyen el número de *off-targets*; la más común es la transformación de la nucleasa a nickasa, lo cual se logra mutando un dominio de la nucleasa para forzar la reparación directa por homología. Así como también, la variación de la Cas9 con el dominio de nucleasa mutado, permite llevar al sitio específico ciertas proteínas que activen o inhiban la transcripción génica, o que permitan la regulación epigenética o a nivel cromosómico (Lupiáñez et al., 2015; Satomura et al., 2017).

Por lo tanto, con base en su especificidad y estabilidad se eligió el sistema CRISPR-Cas9, para realizar el silenciamiento de 7 de los 150 genes blanco involucrados en la vía de señalización de TGF- β y descritos en el presente trabajo. Se decidió comenzar a estudiar la vía canónica silenciando los siguientes genes: Tgfbr1, Tgfbr2, Smad2, Smad3, Fos, Fosb y Jun.

La edición mediada por plásmidos ha sido subestimada los últimos años con el uso de otras técnicas que resultan más eficientes; sin embargo, se eligió dicha técnica ya que ha generado en las Tregs resultados exitosos. Esta involucra la transfección de un vector que expresa la Cas9 a las células EL-4 y la entrega del gRNA mediante partículas lentivirales (Su et al., 2016).

A pesar de la existencia de otras técnicas que mejoran la eficiencia de la edición como modelos murinos que expresan constitutivamente la Cas9, Kornete y colaboradores, demostraron en el 2018, que la edición de células EL-4 mediante la utilización de un plásmido que expresa Cas9, GFP y gRNA (px458), alcanzaba una eficiencia hasta de 90%, dirigiendo una reparación tipo HDR, la cual lograban añadiendo un inhibidor de la vía NHEJ como la vainillina. De igual manera, generar brazos largos homólogos en el templete aumentaba la probabilidad de HDR y, aunque

los investigadores utilizan un templete de doble cadena, otros estudios confirman que uno de cadena simple genera mejores resultados (Sangjin Kim et al., 2013; Kornete et al., 2018; Mali et al., 2013; Satomura et al., 2017).

Por lo tanto, este trabajo demuestra que una técnica viable, como la edición genética mediada por vectores plasmídicos, sí es una opción para obtener una mejor eficiencia.

Otra variación, que pudiera generar mejores resultados es la transfección de la proteína Cas9 pura. En el 2015, un estudio confirmó la eficiencia de editar células Jurkat mediante este método, utilizando Lipofectamina 2000 y electroporación, además de ser un método más rápido (Liang et al., 2015). Estudios posteriores han considerado a la Lipofectamina 3000 una mejor opción (X. Yu et al., 2016).

7.3 Generación de guías de CRISPR

Siguiendo la metodología descrita, se generaron satisfactoriamente las siguientes guías de CRISPR (Tabla 6), verificando la clonación en el plásmido lentiCRISPRv2 mediante la alineación de la secuencia del producto final con la secuencia teórica de la guía, obtenidas mediante secuenciación de Sanger en el Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Se decidió comenzar con algunos genes de la vía canónica de señalización para estandarizar el método. Los receptores se eligieron ya que son los responsables del desencadenamiento de señales en la vía. Las proteínas Smad2 y Smad3, se eligieron debido a que son las primeras proteínas en activarse, y además con ellas se puede diferenciar si la señalización es vía canónica. Los genes de Fos, Fosb y Jun, son subunidades del factor de transcripción AP-1, un importante regulador de la transcripción de genes

que activa Smad4 y que le da a TGF- β su capacidad supresora en células Treg.

Tabla 6. Guías de CRISPR diseñadas en el programa CHOP-CHOP con eficiencia y off-targets.

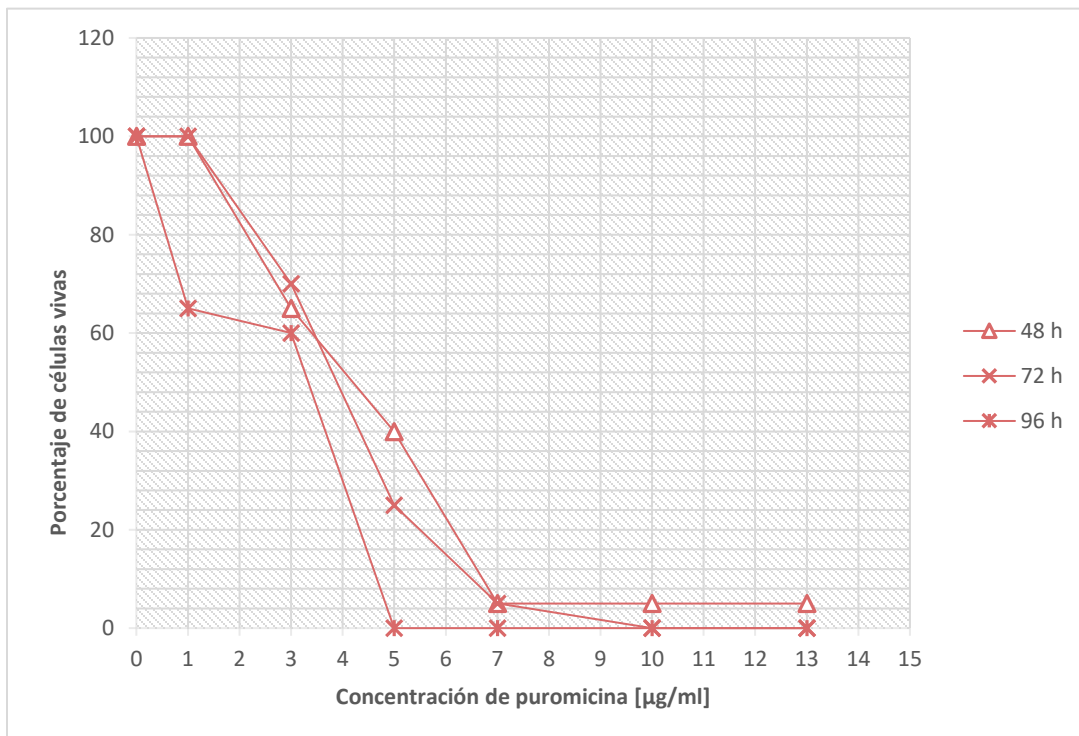
| Gen | Blanco | Localización | Exón | Off-target | | | | Eficiencia |
|---------------|---------------------------------|----------------|------|------------|---|---|---|------------|
| | | | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| <i>Tgfbr1</i> | AAGTTTGGC GAGGCAAAT GGCGG | chr4:47396433 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.71 |
| <i>Tgfbr2</i> | GTCCACAGG ACGATATGC AGCGG | chr9:116174985 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.77 |
| <i>Tgfbr2</i> | AACAGCGGG CAGGTAAGT GGAGG | chr9:116109493 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.77 |
| <i>Jun</i> | TCGTTCTCC AGTCCGAGA GCGG | chr4:95051071 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.59 |
| <i>Jun</i> | CGACGTCGG GCTGCTCAA GCTGG | chr4:95051058 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.55 |
| <i>Fos</i> | GGGTTTCAA CGCCGACTA CGAGG | chr12:85474051 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.55 |
| <i>Smad2</i> | AGCAAATAC GGTAGATCA GTGGG | chr18:76286890 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.46 |
| <i>Smad3</i> | TCTACTGCC GCCTGTGGC GATGG | chr9:63667847 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0.62 |
| <i>Smad3</i> | GCCACGCCA CACCGAGAT CCCGG | chr9:63667565 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0.48 |

7.4 Generación de líneas celulares editadas

Curva de puromicina

El plásmido con el que se infectará a las células EL-4, contiene un gen de resistencia a la puromicina, por lo que para la selección de clonas editadas, resistentes a la puromicina, fue necesario estandarizar la concentración ideal.

La curva de puromicina se realizó para determinar la menor concentración de puromicina a la cual las células EL-4 no editadas mueren. Como se muestra en la gráfica 1, en la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la población celular disminuye al menos a la mitad, por lo que se eligió dicha concentración para la selección de clonas editadas.



Grafica 1. Curva de muerte celular para dosis puromicina a las 48h, 72h y 96h en células EL-4.

Selección de las clonas editadas

Luego del análisis de la electroforesis en agarosa del producto de PCR de las células infectadas con las partículas lentivirales que contenían las guías de CRISPR, se obtuvieron los geles de las figuras 3, 4 y 5.

Antes de realizar la secuenciación de las clonas que se expandieron, se decidió optar por un análisis previo de PCR que permitiera visualizar la expresión del gen correspondiente en estas mismas. Las clonas editadas, al recibir el sistema de CRISPR/Cas9, presentarían ausencia de la banda del gen blanco, ya que la proteína Cas9 al realizar su función de nucleasa, trunca el gen evitando su expresión o generando una banda de expresión con menor número de pares de bases.

Como control para la PCR de los genes de los cuales se obtuvieron clonas; *Tgfrb1*, *Tgfrb2* y *Smad3*, se utilizó un gen que se expresara constitutivamente en las células como lo es la β -actina, y además un control de células EL-4 que permitiera ver la banda de expresión del gen sin editar.

Como se aprecia en las figuras 3, 4 y 5, las clonas editadas fueron las siguientes; C10 y B11 para *Tgfrb1*, G10 y B6 para *Tgfrb2* y G10 para *Smad3*.

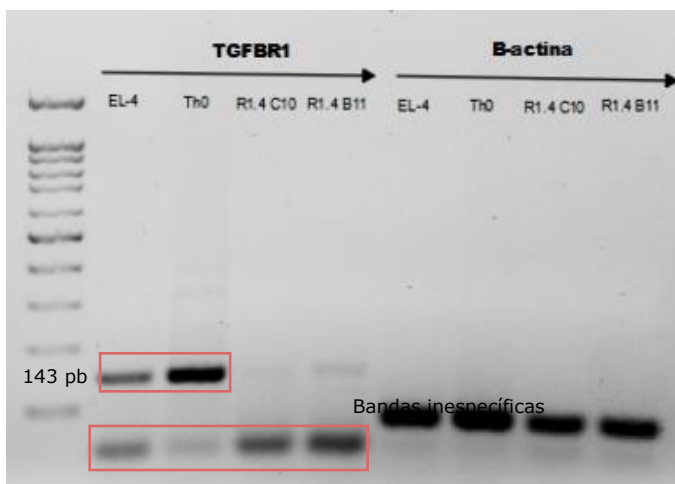


Figura 3. Expresión del receptor 1 de TGF- β (143 pb) en células EL-4 y clonas editadas C10 y B11. La β -actina se utilizó como control.

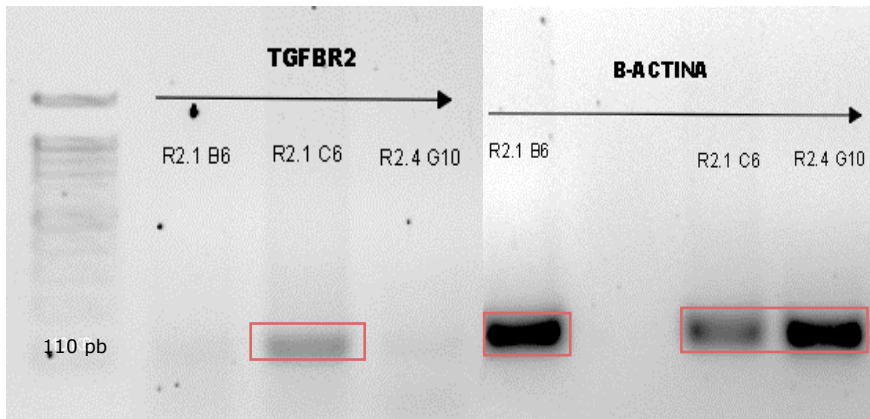


Figura 4. Expresión del receptor 2 de TGF- β (110 pb) en células EL-4 y clonas editadas C6 y G10. La β -actina se utilizó como control.

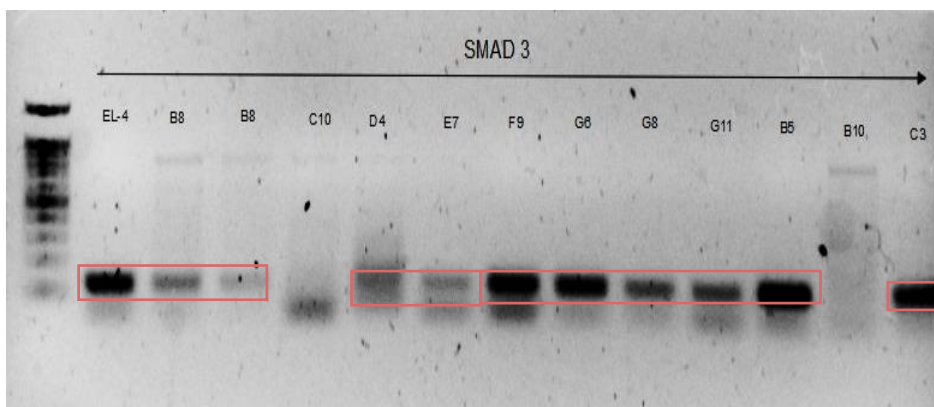


Figura 5. Expresión de Smad3 (136 pb) en células EL-4 y las clonas editada B10 y C10.

Las líneas celulares deficientes de las moléculas elegidas involucradas en la vía de señalización de TGF- β , permitirán estudiar las diferencias de las isoformas 1 y 3 en la inducción de Foxp3, mediante un ensayo que permita identificar o no la expresión de dicho gen en presencia o ausencia de las moléculas elegidas como blanco.

8. Conclusiones

Se realizó un análisis bioinformático para identificar las moléculas involucradas en la señalización de TGF- β que permitiera estudiar los genes diferenciales que inducen las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 3.

Se generó una librería que permitió mediante la técnica de CRISPR/Cas9 el silenciamiento de las moléculas seleccionadas.

Se generaron líneas celulares EL-4 deficientes en los receptores I y II de TGF- β y la proteína Smad3 implicada en la vía canónica que representan algunas de las principales moléculas de la vía de señalización.

9. Perspectivas

Con las líneas celulares generadas se pretende estudiar la expresión del factor de transcripción Foxp3, lo que permitirá entender las diferencias en las vías de señalización que inducen ambas isoformas en la activación de las células Treg, y con lo anterior, definir la isoforma más eficiente.

10. Referencias

- Abbas, A. K., Benoist, C., Bluestone, J. A., Campbell, D. J., Ghosh, S., Hori, S., Ziegler, S. F. (2013). Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature. *Nature Immunology*, 14, 307–308. <https://doi.org/10.1038/ni.2554>
- Abbas, T., Keaton, M., Dutta, A. (2013). Regulation of TGF- β signaling, exit from the cell cycle, and cellular migration through cullin cross-regulation: SCF-FBXO11 turns off CRL4-Cdt2. *Cell Cycle*, 12(14), 2175–2182. <https://doi.org/10.4161/cc.25314>
- Adnane, J., Seijo, E., Chen, Z., Bizouarn, F., Leal, M., Sebti, S. M., Muñoz-Antonia, T. (2002). Rhob, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor β type II receptor by a mechanism involving activator protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8500–8507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104367200>
- Aluwihare, P., Mu, Z., Zhao, Z., Yu, D., Weinreb, P. H., Horan, G. S.,

- Munger, J. S. (2009). Mice that lack activity of $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ - and $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ -integrins reproduce the abnormalities of Tgfb1- and Tgfb3-null mice. *Journal of Cell Science*, 122(2), 227–232.
<https://doi.org/10.1242/jcs.035246>
- Amoura, Z., Trad, S., Badoual, C., Dorgham, K., Piette, J.-C., Parizot, C., Miyara, M. (2014). Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8392>
- Annes, J. P., Munger, J. S., Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGF β activation. *Journal of Cell Science*, 116(2), 217–224.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00229>
- Aschenbrenner, K., D’Cruz, L. M., Vollmann, E. H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L. K., Klein, L. (2007). Selection of Foxp3+regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1444>
- Bao, R., Hou, J., Li, Y., Bian, J., Deng, X., Zhu, X., Yang, T. (2016). Adenosine promotes Foxp3 expression in treg cells in sepsis model by activating JNK/AP-1 pathway. *American Journal of Translational Research*, 8(5), 2284–2292.
- Baugé, C., Cauvard, O., Leclercq, S., Galéra, P., Boumédiène, K. (2011). Modulation of transforming growth factor beta signalling pathway genes by transforming growth factor beta in human osteoarthritic chondrocytes: Involvement of Sp1 in both early and late response cells to transforming growth factor beta. *Arthritis Research and Therapy*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/ar3247>
- Beck, T. N., Korobeynikov, V. A., Kudinov, A. E., Georgopoulos, R.,

- Solanki, N. R., Andrews-Hoke, M., Golemis, E. A. (2016). Anti-Müllerian hormone signaling regulates epithelial plasticity and chemoresistance in lung cancer. *Cell Reports*, 16(3), 657–671. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.043>
- Becker, C., Galle, P. R., Monteleone, G., Neurath, M. F., Fantini, M. C., Pallone, F. (2014). Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5149>
- Bizet, A. A., Liu, K., Tran-Khanh, N., Saksena, A., Vorstenbosch, J., Finsson, K. W., Philip, A. (2011). The TGF- β co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF- β receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(5), 742–753. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.028>
- Boettcher, M., McManus, M. T. (2015). Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular Cell*, 58(4), 575–585. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.028>
- Boon, R. A., Fledderus, J. O., Volger, O. L., Van Wanrooij, E. J. A., Pardali, E., Weesie, F., Horrevoets, A. J. G. (2007). KLF2 suppresses TGF- β signaling in endothelium through induction of Smad7 and inhibition of AP-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(3), 532–539. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000256466.65450.ce>
- Canali, S., Core, A. B., Zumbrennen-Bullough, K. B., Merkulova, M., Wang, C. Y., Schneyer, A. L., Babitt, J. L. (2016). Activin B induces noncanonical SMAD1/5/8 signaling via BMP type I receptors in hepatocytes: Evidence for a role in hepcidin induction by inflammation in male mice. *Endocrinology*, 157(3), 1146–1162.

<https://doi.org/10.1210/en.2015-1747>

Chen, G., Ghosh, P., Longo, D. L. (2011). Distinctive mechanism for sustained TGF- β signaling and growth inhibition: MEK1 activation-dependent stabilization of type II TGF- β receptors. *Molecular Cancer Research*, 9(1), 78–89. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0216>

Chen, M., Lan, Q., Wang, J., Yang, Z., Zheng, S. G., Su, W., ... Conti, P. S. (2012). Induced T regulatory cells suppress osteoclastogenesis and bone erosion in collagen-induced arthritis better than natural T regulatory cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201052>

Chen, S., Crawford, M., Day, R. M., Briones, V. R., Leader, J. E., Jose, P. A., Lechleider, R. J. (2006). RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor- β -induced smooth muscle differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1765–1770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507771200>

Chen, W., Konkel, J. E. (2010). TGF- β and 'adaptive' Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp004>

Chen, Y. G., Liu, F., Massagué, J. (1997). Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *EMBO Journal*, 16(13), 3866–3876. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3866>

Curotto de Lafaille, M. A., Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: More of the same or a division of labor? *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>

Datta, P. K., Moses, H. L. (2000). STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Molecular*

and Cellular Biology, 20(9), 3157–3167.

<https://doi.org/10.1128/mcb.20.9.3157-3167.2000>

Davini, D., Weiss, D., Yadav, M., Martinez-Llordella, M., Bluestone, J. A., Gardner, J. M., Sverdrup, F. M. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets *in vivo*. *The Journal of Experimental Medicine*.

<https://doi.org/10.1084/jem.20120822>

Dejaco, C., Duftner, C., Grubeck-Loebenstein, B., Schirmer, M. (2006). Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases.

Immunology. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02317.x>

Di Zazzo, E., De Rosa, C., Abbondanza, C., Moncharmont, B. (2013).

PRDM proteins: Molecular mechanisms in signal transduction and transcriptional regulation. *Biology*, 2(1), 107–141.

<https://doi.org/10.3390/biology2010107>

Du, X., Pan, Z., Li, Q., Liu, H., Li, Q. (2018). SMAD4 feedback regulates the canonical TGF- β signaling pathway to control granulosa cell

per<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0205-2>

Dünker, N., Krieglstein, K. (2003). Reduced programmed cell death in the retina and defects in lens and cornea of Tgf β 2 $^{-/-}$ -Tgf β 3 $^{-/-}$

double-deficient mice. *Cell and Tissue Research*, 313(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1007/s00441-003-0761-x>

Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Piccolo, S. (2009). FAM/USP9x, a deubiquitinating

enzyme essential for TGF β signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*, 136(1), 123–135.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.051>

Eichhorn, P. J. A., Rodón, L., González-Juncà, A., Dirac, A., Gili, M.,

- Martínez-Sáez, E., Seoane, J. (2012). USP15 stabilizes TGF- β 2 receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- β 2 signaling in glioblastoma. *Nature Medicine*, 18(3), 429–435. <https://doi.org/10.1038/nm.2619>
- Feng, Y., Wu, H., Xu, Y., Zhang, Z., Liu, T., Lin, X., Feng, X. H. (2014). Zinc finger protein 451 is a novel smad corepressor in transforming growth factor- β signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 2072–2083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.526905>
- Fournier, P. G. J., Juárez, P., Jiang, G., Clines, G. A., Kim, H. S., Walton, H. W., Guise, T. A. (2016). The TGF- β signaling regulator PMEPA1 suppresses prostate cancer metastases to bone. *Cancer Metastases to Bone*. 27(6), 809–821. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.009>
- Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K., Miyazono, K. (2001). Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), 1431–1443. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1431>
- Fukunaga, E., Inoue, Y., Komiya, S., Horiguchi, K., Goto, K., Saitoh, M., Imamura, T. (2008). Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35660–35667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710496200>
- Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., ... Massagué, J. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF- β signaling. *Molecular Cell*, 36(3), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.043>

- Gray, P. C., Shani, G., Aung, K., Kelber, J., Vale, W. (2008). Cripto binds transforming growth factor (TGF- β) and inhibits TGF- β signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 28(23), 7260–7260. <https://doi.org/10.1128/mcb.01609-08>
- Gruber, T., Hinterleitner, R., Hermann-Kleiter, N., Meisel, M., Kleiter, I., Wang, C. M., Baier, G. (2013). Cbl-b mediates TGF β sensitivity by downregulating inhibitory SMAD7 in primary T cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(6), 358–368. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt017>
- Hammaker, D. R., Boyle, D. L., Chabaud-Riou, M., Firestein, G. S. (2004). Regulation of c-Jun N-terminal kinase by MEKK-2 and mitogen-activated protein kinase kinase kinases in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*, 172(3), 1612–1618. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1612>
- Haudenschild, D. R., Palmer, S. M., Moseley, T. A., You, Z., Reddi, A. H. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP)-6 signaling and BMP antagonist noggin in prostate cancer. *Cancer Research*, 64(22), 8276–8284. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2251>
- Hayashida, T., Schnaper, H. W. (2003). Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad-signaling pathways enhances TGF- β dependent responses in human mesangial cells. *FASEB J*; 17(6), 1576-8.
- Hippen, K. L., Loschi, M., Nicholls, J., MacDonald, K. P. A., & Blazar, B. R. (2018). Effects of MicroRNA on regulatory T Cells and implications for adoptive cellular therapy to ameliorate graft-versus-host disease. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.02014>
- Hneino, M., François, A., Buard, V., Tarlet, G., Abderrahmani, R.,

- Bilirando, K., Milliat, F. (2012). The TGF- β /smad repressor TG-interacting factor 1 (TGIF1) plays a role in radiation-induced intestinal injury independently of a smad signaling pathway. *PLoS ONE*, 7(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035672>
- Holtzhausen, A., Golzio, C., How, T., Lee, Y. H., Schiemann, W. P., Katsanis, N., Blobe, G. C. (2014). Novel bone morphogenetic protein signaling through Smad2 and Smad3 to regulate cancer progression and development. *FASEB Journal*, 28(3), 1248–1267. <https://doi.org/10.1096/fj.13-239178>
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2017). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Journal of Immunology*, 198(3), 981–985. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Huang, T., Schor, S. L., Hinck, A. P. (2014). Biological Activity Differences between TGF- β 1 and TGF- β 3 Correlate with Differences in the Rigidity and Arrangement of Their Component Monomers. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi500647d>
- Huber, S., Schrader, J., Fritz, G., Presser, K., Schmitt, S., Waisman, A., Schramm, C. (2008). P38 MAP kinase signaling is required for the conversion of CD4+CD25 - T cells into iTreg. *PLoS ONE*, 3(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003302>
- Huber, S., Stahl, F. R., Schrader, J., Lüth, S., Presser, K., Carambia, A., Schramm, C. (2009). Activin A promotes the TGF- β -induced conversion of CD4 + CD25 – T cells into Foxp3 + induced regulatory T cells . *The Journal of Immunology*, 182(8), 4633–4640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803143>
- Hung, W.-T., Wu, F.-J., Wang, C.-J., Luo, C.-W. (2012). DAN (NBL1)

Specifically antagonizes BMP2 and BMP4 and modulates the actions of GDF9, BMP2, and BMP4 in the rat ovary. *Biology of Reproduction*, 86(5), 1–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096172>

Ihn, H., Yamane, K., Asano, Y., Jinnin, M., Tamaki, K. (2006). Constitutively phosphorylated Smad3 interacts with Sp1 and p300 in scleroderma fibroblasts. *Rheumatology*, 45(2), 157–165. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei124>

Inoue, Y., Itoh, Y., Abe, K., Okamoto, T., Daitoku, H., Fukamizu, A., ... Hayashi, H. (2007). Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. *Oncogene*, 26(4), 500–508. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209826>

Ionescu, A. M., Schwarz, E. M., Zuscik, M. J., Drissi, H., Puzas, J. E., Rosier, R. N., O'Keefe, R. J. (2003). ATF-2 cooperates with Smad3 to mediate TGF- β effects on chondrocyte maturation. *Experimental Cell Research*, 288(1), 198–207. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00181-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00181-2)

Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Miyazono, K. (2000). Smad6 Is a Smad1/5-induced Smad Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6075–6079. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6075>

Ishida, Y., Kondo, T., Takayasu, T., Iwakura, Y., Mukaida, N. (2004). The essential involvement of cross-talk between IFN- γ and TGF- β in the skin wound-healing process. *The Journal of Immunology*, 172(3), 1848–1855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1848>

Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J., Dijke, P. Ten. (2000). Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6954–6967.

<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01828.x>

Ji, H., Tang, H., Lin, H., Mao, J., Gao, L., Liu, J., Wu, T. (2014). Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- β /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Biomedical Reports*, 2(6), 787–792. <https://doi.org/10.3892/br.2014.323>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Jordan, M. S., Bensinger, S. J., Bandeira, A., Caton, A. J., Laufer, T. M. (2002). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of Cd4+25+ immunoregulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.194.4.427>

Jung, B., Doctolero, R. T., Tajima, A., Nguyen, A. K., Keku, T., Sandler, R. S., Carethers, J. M. (2004). Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers. *Gastroenterology*, 126(3), 64–659. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.008>

Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1295-415>

Kaji, H., Canaff, L., Lebrun, J. J., Goltzman, D., Hendy, G. N. (2001). Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks

transforming growth factor type β signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3837–3842. <https://doi.org/10.1073/pnas.061358098>

Kim, S., Kwak, J. H., Na, H. J., Kim, J. K., Ding, Y., Choi, M. E. (2009). Transforming growth factor- β (TGF- β 1) activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF- β receptor kinase activity in mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (33), 22285–22296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007146>

Kim S., Broströmer, E., Xing, D., Jin, J., Chong, S., Ge, H., Xie, X. S. (2013). Probing allostery through DNA. *Science*, 339(6121), 816–819. <https://doi.org/10.1126/science.1229223>

Kohm, A. P., Carpentier, P. A., Anger, H. A., Miller, S. D. (2014). Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4712>

Kong, N., Lan, Q., Chen, M., Wang, J., Shi, W., Horwitz, D. A., Zheng, S. G. (2012). Antigen-specific transforming growth factor β -induced treg cells, but not natural treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/treg cell balance from Th17 predominance to treg cell predominance. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.34513>

Kornete, M., Marone, R., Jeker, L. T. (2018). Highly efficient and versatile plasmid-based gene editing in primary T cells. *The Journal of Immunology*, 200(7), 2489–2501. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701121>

- Kristensen, S. G., Andersen, K., Clement, C. A., Franks, S., Hardy, K., Andersen, C. Y. (2014). Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries. *Molecular Human Reproduction*, 20(4), 293–308. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat089>
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S. (2012, September 3). TGF- β - an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*, 10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>
- Kume, S., Haneda, M., Kanasaki, K., Sugimoto, T., Araki, S. I., Isshiki, K., Koya, D. (2007). SIRT1 inhibits transforming growth factor β -induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 151–158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605904200>
- Lee, C., Xia, Z., Liu, V., Zhang, Q., Pothoven, K. L., Luo, X. (2014). Cutting Edge: TGF- β induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2757>
- Lee, N. Y., Ray, B., How, T., & Blobe, G. C. (2008). Endoglin promotes transforming growth factor β -mediated Smad 1/5/8 signaling and inhibits endothelial cell migration through its association with GIPC. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32527–32533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803059200>
- Li, Q., Agno, J. E., Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Nagashima, T., Matzuk, M. M. (2011). Transforming growth factor β receptor type 1 is essential for female reproductive tract integrity and function. *PLoS Genetics*, 7(10), 21–26.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002320>

Li, X., McFarland, D. C., Velleman, S. G. (2006). Effect of transforming growth factor- β on decorin and β 1 integrin expression during muscle development in chickens. *Poultry Science*, 85(2), 326–332.

<https://doi.org/10.1093/ps/85.2.326>

Li, Xianpei, Zhou, X., Kong, N., Zheng, S. G., Zou, H., Liu, Z., Brand, D. (2010). Therapeutic potential of TGF- β -induced CD4 + Foxp3 + regulatory T cells in autoimmune diseases . *Autoimmunity*.

<https://doi.org/10.3109/08916931003782163>

Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Chesnut, J. D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.024>

Lin, Xia, Duan, X., Liang, Y. Y., Su, Y., Wrighton, K. H., Long, J., Feng, X. H. (2006). PPM1A Functions as a Smad phosphatase to terminate TGF β signaling. *Cell*, 125(5), 915–928.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.044>

Lin, Xiaohong, Chen, M., Liu, Y., Guo, Z., He, X., Brand, D., Zheng, S. G. (2013). Review article advances in distinguishing natural from induced Foxp3 + regulatory T cells. In *Int J Clin Exp Patho*, 6.

Retrieved from www.ijcep.com/

Lio, C. W. J., Hsieh, C. S. (2008). A Two-Step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.021>

Liu, S., Nheu, T., Luwor, R., Nicholson, S. E., Zh, H. J. (2015). SPSB1, a novel negative regulator of the transforming growth factor- β signaling pathway targeting the type II receptor. *Journal of*

Biological Chemistry, 290(29), 17894–17908.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607184>

Liu, T., Feng, X. H. (2010). Regulation of TGF- β signalling by protein phosphatases. *Biochemical Journal*, 430(2), 191–198.

<https://doi.org/10.1042/BJ20100427>

LIU, X., SUN, Y., WEINBERG, R., LODISH, H. (2001). Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(1), 1–8.

[https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(00\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(00)00031-9)

Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., Chen, W. J. (2008). A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 9(6), 632–640. <https://doi.org/10.1038/ni.1607>

Lourenço, E. V., La Cava, A. (2011). Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity*.

<https://doi.org/10.3109/08916931003782155>

Lu, L., Ma, J., Wang, X., Wang, J., Zhang, F., Yu, J., Zheng, S. G. (2010). Synergistic effect of TGFbeta superfamily members on the induction of Foxp3⁺ regulatory cells. *European Journal of Immunology*, 40(1), 142–152. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Luis González Parias, J., Duque Giraldo, V. E., Velásquez-Lopera, M. M. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales FOXP3: Master gene controlling the development and function of regulatory cells. In *Abril-Junio* (Vol. 29).

Luo, X., Zhang, Q., Liu, V., Xia, Z., Pothoven, K. L., Lee, C. (2008). Cutting Edge: TGF- β -induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK. *The Journal of Immunology*,

180(5), 2757–2761. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2757>

Lupiáñez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Mundlos, S. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, 161(5), 1012–1025.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004>

Malapeira, J., Esselens, C., Bech-Serra, J. J., Canals, F., Arribas, J. (2011). ADAM17 (TACE) regulates TGF β signaling through the cleavage of vasorin. *Oncogene*, 30(16), 1912–1922.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.565>

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826.
<https://doi.org/10.1126/science.1232033>

Mallano, T., Palumbo-Zerr, K., Zerr, P., Ramming, A., Zeller, B., Beyer, C., Distler, J. H. W. (2016). Activating transcription factor 3 regulates canonical TGF β signalling in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(3), 586–592.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206214>

Malonis, R. J., Fu, W., Jelcic, M. J., Thompson, M., Canter, B. S., Tsikitis, M., Sánchez, I. (2017). RNF11 sequestration of the E3 ligase SMURF2 on membranes antagonizes SMAD7 down-regulation of transforming growth factor β signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18), 7435–7451.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.783662>

Masiuk, K. E., Laborada, J., Roncarolo, M. G., Hollis, R. P., Kohn, D. B. (2019). Lentiviral gene therapy in HSCs restores lineage-specific

- Foxp3 expression and suppresses autoimmunity in a mouse model of IPEX syndrome. *Cell Stem Cell*, 24(2), 309-317.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.003>
- Massagué, J., Xi, Q. (2012). TGF- β control of stem cell differentiation genes. *FEBS Letters*, 586(14), 1953–1958.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.023>
- Melhuish, T. A., Gallo, C. M., Wotton, D. (2001). TGIF2 interacts with histone deacetylase I and represses transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 32109–32114.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103377200>
- Memon, A., Lee, W. K. (2018). KLF10 as a tumor suppressor gene and its TGF- β signaling. *Cancers*, 10(6).
<https://doi.org/10.3390/cancers10060161>
- Memon, M. A., Anway, M. D., Covert, T. R., Uzumcu, M., Skinner, M. K. (2008). Transforming growth factor beta (TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.08.017>
- Meriane, M., Charrasse, S., Comunale, F., Gauthier-rouvière, C. (2002). *TGF β activates Rac1 and Cdc42 in skeletal muscle.pdf*. 94, 535–543.
- Mohamad, A., Speer, C. P., Doetschman, T., Gittenberger-de Groot, A. C., Sanford, L. P., Wisse, L. J., Molin, D. G. M. (2012). Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF- β 2 –knockout mice . *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.22.2745>
- Mohr, S. E., Smith, J. A., Shamu, C. E., Neumüller, R. A., Perrimon, N.

- (2014). RNAi screening comes of age: Improved techniques and complementary approaches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 15, pp. 591–600. <https://doi.org/10.1038/nrm3860>
- Mummery, C., Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., ten Dijke, P. (2003). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Molecular Cell*, 12(4), 817–828. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580334>
- Nogai, H., Rosowski, M., Grün, J., Rietz, A., Debus, N., Schmidt, G., Lauster, R. (2008). Follistatin antagonizes transforming growth factor-β3-induced epithelial-mesenchymal transition in vitro: Implications for murine palatal development supported by microarray analysis. *Differentiation*, 76(4), 404–416. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00223.x>
- Nör, J. E., Dipietro, L., Murphy-Ullrich, J. E., Hynes, R. O., Lawler, J., Polverini, P. J. (2005). Activation of latent TGF-β1 by thrombospondin-1 is a major component of wound repair. *Oral Biosciences & Medicine : OBM*, 2(2), 153–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822445><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3150167>
- Ogawa, C., Tone, Y., Tsuda, M., Peter, C., Waldmann, H., Tone, M. (2014). TGF-β-mediated Foxp3 gene expression is cooperatively regulated by Stat5, Creb, and AP-1 through CNS2. *The Journal of Immunology*, 192(1), 475–483. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301892>
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 401(6752), 480–485.

<https://doi.org/10.1038/46794>

Ortega-Francisco, S., de la Fuente-Granada, M., Alvarez Salazar, E. K., Bolaños-Castro, L. A., Fonseca-Camarillo, G., Olguin-Alor, R., Soldevila, G. (2017). T β RIII is induced by TCR signaling and downregulated in Foxp3+ regulatory T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(1–2), 82–87.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.081>

Ortiz-Quintero, B. (2009). RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista de Investigacion Clinica*, Vol. 61, pp. 412–427.

Pangas, S. A., Jorgez, C. J., Matzuk, M. M. (2004). Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32281–32286.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M403212200>

Peralta-Zaragoza, Oscar, Lagunas-Martínez, A., Madrid-Marina, Vicente. (2001). Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de México*, 43(4), 340-351. Recuperado en 30 de octubre de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342001000400011&lng=es&tlng=es.

Poniatowski, L. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor beta family: Insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of Inflammation*.
<https://doi.org/10.1155/2015/137823>

Rahman, M. S., Akhtar, N., Jamil, H. M., Banik, R. S., Asaduzzaman, S.

- M. (2015). TGF- β /BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research*, 3. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.5>
- Ramalingam, R., Larmonier, C. B., Thurston, R. D., Midura-Kiela, M. T., Zheng, S. G., Ghishan, F. K., Kiela, P. R. (2012). Dendritic cell-specific disruption of TGF- β receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 189(8), 3878–3893. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201029>
- Ramdas, V., McBride, M., Denby, L., Baker, A. H. (2013). Canonical transforming growth factor- β signaling regulates disintegrin metalloprotease expression in experimental renal fibrosis via miR-29. *American Journal of Pathology*, 183(6), 1885–1896. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.027>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rapisarda, V., Borghesan, M., Miguela, V., Encheva, V., Snijders, A. P., Lujambio, A., O’Loghlen, A. (2017). Integrin beta 3 regulates cellular senescence by activating the TGF- β pathway. *Cell Reports*, 18(10), 2480–2493. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.012>
- Remy, I., Montmarquette, A., Michnick, S. W. (2004). PKB/Akt modulates TGF- β signalling through a direct interaction with Smad3. *Nature Cell Biology*, 6(4), 358–365. <https://doi.org/10.1038/ncb1113>
- Rigueur, D., Brugger, S., Anbarchian, T., Kim, J. K., Lee, Y., Lyons, K.

- M. (2015). The type 1 BMP receptor ACVR1/ALK2 is required for chondrogenesis during development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(4), 733–741. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2385>
- Ruan, L., Shen, Y., Lu, Z., Shang, D., Zhao, Z., Lu, Y., Liu, H. (2017). Roles of partitioning-defective protein 6 (Par6) and its complexes in the proliferation, migration and invasion of cancer cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(9), 909–913. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12794>
- Rudensky, A. Y., Dooley, J. L., Farr, A. G., Fontenot, J. D., Williams, L. M., Rasmussen, J. P. (2005). Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.016>
- Rudra, D., Egawa, T., Chong, M. M. W., Treuting, P., Littman, D. R., Rudensky, A. Y. (2009). Runx-CBF β complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nature Immunology*, 10(11), 1170–1177. <https://doi.org/10.1038/ni.1795>
- Runyan, C. E., Hayashida, T., Hubchak, S., Curley, J. F., Schnaper, H. W. (2009). Role of SARA (SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25181–25189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032847>
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(3), 1151–1164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184>

- Sakaguchi, Shimon, Miyara, M., Costantino, C. M., Hafler, D. A. (2010). FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2785>
- Sanjabi, S., Flavell, R. A., Robertson, A.-K. L., Li, M. O., Wan, Y. Y. (2005). Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
- Sato, S., Sanjo, H., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Akira, S. (2006). TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells. *International Immunology*, 18(10), 1405–1411. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl082>
- Satomura, A., Nishioka, R., Mori, H., Sato, K., Kuroda, K., Ueda, M. (2017). Erratum: Precise genome-wide base editing by the CRISPR Nickase system in yeast. *Scientific Reports*, Vol. 7, p. 12354. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09606-2>
- Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Merckenschlager, M. (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), 7797–7802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800928105>
- Schmidt, A., Oberle, N., Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated cell suppression. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>
- Schmitt, E. G., & Williams, C. B. (2013). Generation and function of induced regulatory T cells. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00152>

- Seong, H. A., Jung, H., Choi, H. S., Kim, K. T., Ha, H. (2005). Regulation of transforming growth factor- β signaling and PDK1 kinase activity by physical interaction between PDK1 and serine-threonine kinase receptor-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42897–42908.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M507539200>
- Shang, Y., Xu, X., Duan, X., Guo, J., Wang, Y., Ren, F., Chang, Z. (2014). Hsp70 and Hsp90 oppositely regulate TGF- β signaling through CHIP/Stub1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(1), 387–392.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.124>
- Shevach, E. M. (2002). Regulatory T Cells in Autoimmunity. *Annual Review of Immunology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.423>
- Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and differences. *Immunological Reviews*.
<https://doi.org/10.1111/imr.12160>
- Shull, M. M., & Doetschman, T. (1994). Transforming growth factor-p1 in reproduction and development. In *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* (Vol. 39).
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Doetschman, T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease [14]. *Nature*, 359(6397), 693–699.
<https://doi.org/10.1038/359693a0>
- Siachoque, H., Satisteban, N., Iglesias-Gamarra, A. (2013). Linfocitos T reguladores: Subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia

en el control de la autoinmunidad. *Revista Colombiana de Reumatología*. [https://doi.org/10.1016/s0121-8123\(11\)70054-8](https://doi.org/10.1016/s0121-8123(11)70054-8)

Song, J., Mu, Y., Li, C., Bergh, A., Miaczynska, M., Heldin, C. H., Landström, M. (2016). APPL proteins promote TGF β -induced nuclear transport of the TGF β type I receptor intracellular domain. *Oncotarget*, 7(1), 279–292. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6346>

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., Von Bulow, V., Schuster, N., Landström, M. (2008). The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature Cell Biology*, 10(10), 1199–1207. <https://doi.org/10.1038/ncb1780>

Su, S., Hu, B., Shao, J., Shen, B., Du, J., Du, Y., Liu, B. (2016). CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20070>

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S. (2000). Brief definitive report immunologic self-tolerance maintained by CD25 CD4 regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. In *J. Exp. Med* (Vol. 192). Retrieved from <http://www.jem.org/cgi/current/full/192/2/303>

Tatler, A. L., John, A. E., Jolly, L., Habgood, A., Porte, J., Brightling, C., Jenkins, G. (2011). Integrin $\alpha\beta 5$ -Mediated TGF- β Activation by Airway Smooth Muscle Cells in Asthma. *The Journal of Immunology*, 187(11), 6094–6107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003507>

Tecalco-Cruz, A. C., Sosa-Garrocho, M., Vázquez-Victorio, G., Ortiz-

- García, L., Domínguez-Hüttinger, E., Macías-Silva, M. (2012). Transforming growth factor- β /SMAD target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26764–26776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386599>
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M. L., Greene, M. I., Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature Immunology*, 9(2), 194–202. <https://doi.org/10.1038/ni1549>
- Tritschler, I., Gramatzki, D., Capper, D., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Saharinen, J., Weller, M. (2009). Modulation of TGF- β activity by latent TGF- β -binding protein 1 in human malignant glioma cells. *International Journal of Cancer*, 125(3), 530–540. <https://doi.org/10.1002/ijc.24443>
- Truty, M. J., Lomberk, G., Fernandez-Zapico, M. E., Urrutia, R. (2009). Silencing of the transforming growth factor- β (TGF β) receptor II by Krüppel-like factor 14 underscores the importance of a negative feedback mechanism in TGF β signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6291–6300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807791200>
- Tsapara, A., Luthert, P., Greenwood, J., Hill, C. S., Matter, K., Balda, M. S. (2010). The RhoA activator GEF-H1/Lfc is a transforming growth factor- β target gene and effector that regulates α -smooth muscle actin expression and cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 21(6), 860–870. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0567>
- Tsukamoto, S., Mizuta, T., Fujimoto, M., Ohte, S., Osawa, K., Miyamoto, A., Katagiri, T. (2014). Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Scientific*

Reports, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep07596>

Ulloa, L., Tabibzadeh, S. (2001). Lefty inhibits receptor-regulated Smad phosphorylation induced by the activated transforming growth factor- β receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21397–21404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010783200>

van der Vliet, H. J. J., Nieuwenhuis, E. E. (2007). IPEX as a Result of Mutations in FOXP3. *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/10.1155/2007/89017>

Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B. M., Dembowy, J., Wrana, J. L. (2008). TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nature Cell Biology*, 10(7), 837–848. <https://doi.org/10.1038/ncb1748>

Verrecchia, F., Tacheau, C., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., Mauviel, A. (2001). Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF- β /Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene*, 20(18), 2205–2211. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204347>

Von Boehmer, H., Garbe, A., Polansky, J. K., Olek, S., Hamann, A., Freyer, J., Floess, S. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.200838105>

Wang, H., Pan, J. Q., Luo, L., Ning, X. jie X., Ye, Z. P., Yu, Z., Li, W. S. (2015). NF- κ B induces miR-148a to sustain TGF- β /Smad signaling activation in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-14-2>

Wang, Y. M., Ghali, J., Zhang, G. Y., Hu, M., Wang, Y., Sawyer, A., Alexander, S. I. (2016). Development and function of Foxp3+

- regulatory T cells. *Nephrology*. <https://doi.org/10.1111/nep.12652>
- Wicks, S. J., Haros, K., Maillard, M., Song, L., Cohen, R. E., Ten Dijke, P., Chantry, A. (2005). The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF- β signalling. *Oncogene*, *24*(54), 8080–8084. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208944>
- Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.-L.-R., Buist, N., Brunkow, M. E. (2000). Syndromes caused by mutations of human Fox-protein genes. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 66). Retrieved from <http://genetics.nature.com>
- Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R., Vignali, D. A. A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*(16), 2603–2622. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0026-2>
- Worthington, J. J., Kelly, A., Smedley, C., Bauché, D., Campbell, S., Marie, J. C., Travis, M. A. (2015). Integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation by effector regulatory T cells is essential for suppression of T-cell-mediated inflammation. *Immunity*, *42*(5), 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.012>
- Wu, K., Yang, Y., Wang, C., Davoli, M. A., D'Amico, M., Li, A., Pestell, R. G. (2003). DACH1 inhibits transforming growth factor- β signaling through binding Smad4. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(51), 51673–51684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310021200>
- Wyatt, L., Wadham, C., Crocker, L. A., Lardelli, M., Khew-Goodall, Y. (2007). The protein tyrosine phosphatase Pez regulates TGF β , epithelial-mesenchymal transition, and organ development. *Journal of Cell Biology*, *178*(7), 1223–1235. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705035>

- Xiao, H., Jiao, J., Wang, L., O'Brien, S., Newick, K., Wang, L. C. S., Beier, U. H. (2016). HDAC5 controls the functions of Foxp3+ T-regulatory and CD8+ T cells. *International Journal of Cancer*, 138(10), 2477–2486. <https://doi.org/10.1002/ijc.29979>
- Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., Moses, H. L. (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF- β 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*, 6(5), 603–610. <https://doi.org/10.1593/neo.04241>
- Yamane, K., Ihn, H., Asano, Y., Jinnin, M., Tamaki, K. (2003). Antagonistic effects of TNF- α on TGF- β signaling through down-regulation of TGF- β receptor type II in human dermal fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3855–3862. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3855>
- Yoshimura Eiichi Hasegawa, A., Shizuya, S., Hara, T., Takahashi, M., Asakawa, M., Muto, G., Sekiya, T. (2010). Th1 development regulation of regulatory T plasticity and mediated TGF- β essential for the TGF- Smad2 and Smad3 are redundantly. *Journal of Immunology*, 185, 842–855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904100>
- Yu, J., Pan, L., Qin, X., Chen, H., Xu, Y., Chen, Y., Tang, H. (2010). MTMR4 attenuates transforming growth factor β (TGF β) signaling by dephosphorylating R-smads in endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8454–8462. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075036>
- Yu, X., Liang, X., Xie, H., Kumar, S., Ravinder, N., Potter, J., ... Chesnut, J. D. (2016). Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnology Letters*, 38(6), 919–929. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2064-9>

- Zhang, J. li, Qiu, L. yan, Kotzsch, A., Weidauer, S., Patterson, L., Hammerschmidt, M., Mueller, T. D. (2008). Crystal structure analysis reveals how the chordin family member crossveinless 2 Blocks BMP-2 receptor binding. *Developmental Cell*, 14(5), 739–750. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.02.017>
- Zhang, L., Zhou, F., GarcíadeVinuesa, A., deKruif, E. M., Mesker, W. E., Hui, L., tenDijke, P. (2013). TRAF4 Promotes TGF- β Receptor Signaling and Drives Breast Cancer Metastasis. *Molecular Cell*, 51(5), 559–572. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.014>
- Zhang, P., Nakatsukasa, H., Tu, E., Kasagi, S., Cui, K., Ishikawa, M., Chen, W. J. (2013). PARP-1 regulates expression of TGF- β receptors in T cells. *Blood*, 122(13), 2224–2232. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-503250>
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
- Zhang, Y., Xin-Hua, F., Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription. *Nature*, 394(1994).
- Zheng, S. G., Wang, J., Horwitz, D. A. (2014). Cutting Edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF- β are resistant to Th17 conversion by IL-6. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7112>
- Zheng, Song Guo, Wang, J. H., Gray, J. D., Soucier, H., & Horwitz, D. A. (2004). Natural and induced CD4 + CD25 + cells educate CD4 + CD25 – cells to develop suppressive activity: The role of IL-2, TGF- β , and IL-10 . *The Journal of Immunology*, 172(9), 5213–5221. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5213>

Zuo, W., Huang, F., Chiang, Y. J., Li, M., Du, J., Ding, Y., ... Chen, Y. G. (2013). C-Cbl-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF- β type II receptor. *Molecular Cell*, 49(3), 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.002>

ANEXO I: Medios y soluciones

PBS estéril

NaCl [138 mM]

KCl [3nM]

Na₂HPO₄ [8.1 mM]

KH₂PO₄ [1.5 mM]

RPMI-1640 (SIGMA Cat.R4130-1L)

SFB (Gibco Cat.26140-079) [10%]

Penicilina [100 U/mL] + Estreptomicina [10µg/mL] (Gibco Cat. 15140-122)

Piruvato de sodio (Gibco Cat. 11360-070) [1mM]

Bicarbonato de sodio [2g/L]

B-Mercaptoetanol [55uM]

DMEM (Gibco Cat.12800-017)

SFB (Gibco Cat.26140-079) [10%]

Penicilina [100 U/mL] + Estreptomicina [10µg/mL] (Gibco Cat. 15140-122)

Bicarbonato de sodio [3.7g/L]

Opti-MEM (Gibco Cat. 31985-054)

HEPES

Hipoxantina

L-Glutamina

Rojo de fenol

Bicarbonato de sodio [2400 mg/L]

Timidina