



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“El papel de CD73 en la regulación de la cadena alfa del receptor de interleuquina 7 (CD127) en Timocitos”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Pilar Leonor Hörmann Cornejo

Directora del Seminario de Título

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Mayo, 2022

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

Pilar Leonor Hörmann Cornejo

“El papel de CD73 en la regulación de la cadena alfa del receptor de interleuquina 7 (CD127) en Timocitos”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Daniela Sauma Mahaluf
Directora Seminario de Título

COMISIÓN REVISADORA Y EVALUADORA

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Dr. Elías Utreras Puratich
Evaluador

Santiago,.....

AGRADECIMIENTOS

Ya ha pasado mucho tiempo desde que estaba en el colegio y había elegido química como electivo, no sabía por qué, pero la ciencia podía entenderla rápidamente, recién en octavo básico empecé a sacarme buenas notas, fue super difícil que me empezara a ir bien en el colegio. Recuerdo como mi papá me ayudaba en las tareas de matemáticas, lenguaje y muchas otras asignaturas para que yo aprendiera, fue difícil. Cuando entré a la universidad fue un cambio de mundo totalmente, me quedaba muy lejos y viajaba más de 4 horas para estar allá. No veía casi nunca a mi familia porque mi día entero estaba en la u, recuerdo levantarme a las 5am y llegar a las 10pm a mi casa, cansadísima. Hoy veo donde estoy y aún no creo todo lo que he logrado. Quiero agradecer infinitamente a mi mamá por trabajar para darme todo, por apoyarme en lo que decida y por siempre sin importar qué estar para mí. Quiero agradecer a mi papá por sentarse conmigo a enseñarme cuando era pequeña y amarme tan a su manera. A mis abuelos por siempre creer en mí, a mis hermanos por estar y decir que me admiran. También agradezco a mis amigos, por darme ánimos y recordarme que soy capaz de lograr las cosas. A la Angie, que fue mi apoyo más fundamental en la universidad. Y a todos y cada uno de los profesores que tuve a lo largo de este camino, no podría haber llegado acá sin ellos. También a mi tutora y laboratorio, por siempre ayudarme y corregirme para mejorar como profesional. En especial a Brian, por siempre tener la disposición de ayudarme en lo que necesitara. Por todo eso y más, muchas gracias.

Índice de Contenidos

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	2
Índice de Contenidos	3
Índice de Tablas	5
Índice de Figuras	6
Abreviaturas	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
Desarrollo de los Linfocitos T	14
Interleuquina-7 y su papel en la sobrevivencia de los timocitos.....	17
Señalización de IL-7 y regulación de CD127	19
Ectonucleotidasas CD39/CD73 y adenosina	20
Regulación de CD127 por CD73 y adenosina	23
Hipótesis	25
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo General.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Animales	26
Extracción de células desde el timo	26
Citometría de flujo	26
Análisis Estadístico	27
4. RESULTADOS	28
Expresión de CD127 y CD73 en células CD73 WT	30
Expresión de CD127 en células deficientes para CD73	33
Expresión de CD73 y CD127 en la población DP	35
Expresión de CD73 y CD127 en poblaciones SP	35
Porcentaje de las poblaciones tímicas en animales deficientes para CD73.....	38
4. DISCUSIÓN.....	41

5. CONCLUSIONES.....	47
6. BIBLIOGRAFÍA.....	48

Índice de Tablas

Tabla I: Fenotipo correspondiente a cada población tímica.....	27
---	----

Índice de Figuras

Figura 1. Señalización de IL-7 en células T.....	21
Figura 2. Estrategia de gating utilizada para determinar las poblaciones presentes en el timo utilizando la aplicación FlowJo v10.....	29
Figura 3. Expresión de CD127 en las poblaciones de timocitos DN provenientes de un ratón WT.....	30
Figura 4. Expresión de CD73 en las poblaciones de timocitos DN provenientes de un ratón WT (C57BL/6).....	31
Figura 5. Análisis de la expresión de CD127 y CD73 en la población DN que expresa CD3.....	32
Figura 6. Expresión de CD127 en las poblaciones de timocitos DN provenientes de un ratón WT y CD73 KO.....	33
Figura 7. Gráficos de expresión de CD127 en las poblaciones de timocitos DN provenientes de animales WT y CD73 KO.....	34
Figura 8. Expresión de CD127 en la población de timocitos DP provenientes de un ratón WT y CD73 KO.....	35
Figura 9. Expresión de CD127 y CD73 en la población de timocitos SP CD4 provenientes de un ratón WT y CD73 KO.....	37
Figura 10. Gráfico de expresión de CD127 en la población de timocitos SP CD4 provenientes de animales WT y CD73 KO.....	37

Figura 11. Expresión de CD127 y CD73 en la población SP CD8 de un ratón WT y CD73 KO.....	38
Figura 12. Gráficos de expresión de CD127 en la población SP CD8 en un ratón CD73 WT y CD73 KO.....	39
Figura 13. Frecuencia de cada población tímica en un ratón CD73 y CD73 KO.....	40
Figura 14. Esquema del timo que expone los distintos subsets de células T con su respectiva expresión de CD127, A2AR, CD3, CD73 y TCR.....	41

Abreviaturas

A2AR	Receptor A2A de adenosina
ADA	Adenosina deaminasa
ADP	Adenosín difosfato
AKT	Proteína quinasa B
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2	Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B
CD	Clúster de diferenciación
CD127	Cadena alfa del receptor de IL-7
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa
DN	Doble negativo
DP	Doble positivo
FOXO1	Forkhead Box O1
FRC	Células reticulares fibroblásticas
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GC	Glucocorticoides
Gfi-1	<i>Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor</i>
HIF-1	Factor inducido por hipoxia 1
IL-7	Interleuquina 7
IL-7R	Receptor de interleuquina 7
Klf2	Factor de Kruppel 2
Mcl-1	Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida 1
MHC	Complejo Principal de histocompatibilidad

OLS	Órgano linfoide secundario
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinositol 1
PI3K	Fosfatidilinositol- 3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
SP	<i>Single Positive</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TCR	Receptor del linfocito T (T cell receptor)

RESUMEN

Los linfocitos T son células especializadas del sistema inmune que sufren procesos de diferenciación y selección en el timo antes de salir a la circulación. En este proceso de diferenciación, los precursores de las células T en el timo (timocitos) transitan por varios estadios y pueden ser clasificados en doble negativos (DN1, DN2, DN3 o DN4), doble positivos (DP) o simple positivos (SP CD4, SP CD8) en base a diferentes marcadores. Un factor clave en la supervivencia y proliferación de los timocitos es la interleuquina 7 (IL-7), la cual ejerce su función gracias a su receptor compuesto por CD127 y CD132. Por su parte, la adenosina es una importante molécula de señalización purinérgica. En el timo, la concentración de adenosina es más alta que en resto del cuerpo y se encuentra principalmente regulada por las enzimas adenosina deaminasa (ADA) y CD73 (ecto-5'-nucleotidasa). Antecedentes de la literatura han demostrado que la señalización de adenosina mediante su receptor A2AR previene la regulación negativa de la expresión de CD127 en timocitos y linfocitos T vírgenes. Además, resultados de nuestro laboratorio indican que CD73 se expresa en linfocitos T vírgenes y sugieren que, a través de la producción de adenosina, estaría regulando positivamente la expresión de CD127 en estas células. Los objetivos de este seminario de título fueron estudiar la expresión de CD73 y CD127 en las diferentes poblaciones de timocitos y evaluar el efecto de la deficiencia de CD73 en la expresión de CD127 y en la frecuencia de las diferentes poblaciones. Los resultados indican que CD127 se expresa principalmente en poblaciones de timocitos DN2 y DN3 y en poblaciones SP CD4 y CD8+. Por otra parte, la expresión de CD73 resultó ser mayor en la población DN1, demostrando que no existe una clara correlación entre la expresión de CD73 y CD127 en timocitos DN. Interesantemente, encontramos una alta expresión de CD73 y CD127 en una población

de células DN que poseen CD3 y por tanto podrían corresponder a células T gama delta ($\gamma\delta$). Al analizar el efecto de la deficiencia de CD73 utilizando células provenientes de ratones *knockout* para CD73 (CD73KO), demostramos que la expresión de CD127 no se ve afectada en estos timocitos en comparación con timocitos de animales control. Finalmente, al analizar el efecto de la deficiencia de CD73 en las poblaciones de timocitos, determinamos que en ausencia de CD73 existe un aumento en la frecuencia de células SP CD8 y una reducción de las células T $\gamma\delta$. En conclusión, estos resultados indican que la expresión de CD73 no se relaciona directamente con la expresión de CD127 en timocitos y la población de células con mayor expresión de CD73 son células que están en las últimas etapas de diferenciación (incluyendo una población de linfocitos maduros con características de linfocitos T $\gamma\delta$). Estos datos sugieren que CD73 podría afectar la diferenciación y/o supervivencia de las células SP CD8 y $\gamma\delta$ en el timo.

ABSTRACT

T-lymphocytes are specialized cells of the immune system that undergo differentiation and selection processes in the thymus before being released into circulation. In this differentiation process, T-cell precursors in the thymus (thymocytes) go through several stages and can be classified as double-negative (DN1, DN2, DN3 or DN4), double-positive (DP), or single-positive (SP CD4, SP CD8) based on different markers. A critical factor in thymocyte survival and proliferation is interleukin 7 (IL-7), which exerts its function through its receptor composed of CD127 and CD132. Adenosine is an essential purinergic signaling molecule, and the thymus harbors a high concentration of this nucleoside. Adenosine concentration is mainly regulated by the enzymes adenosine deaminase (ADA) and CD73 (ecto-5'-nucleotidase). Previous data have shown that adenosine signaling via the A2A receptor prevents the down-regulation of CD127 expression in thymocytes and naive T cells. In addition, results from our laboratory indicate that CD73 is expressed on naive lymphocytes and suggest that, through adenosine production, it positively regulates CD127 expression on these cells. This work aimed to study CD73 and CD127 expression in different thymocyte populations and evaluate the effect of CD73 deficiency on CD127 expression and frequency of the different thymocyte populations. Our results indicate that CD127 is mainly expressed in DN2, DN3, and SP populations. On the other hand, CD73 expression was found to be higher in the DN1 population, demonstrating that there is no clear correlation between CD73 and CD127 expression in DN thymocytes. Interestingly, we found a high expression of CD73 and CD127 in a population of DN cells that express CD3 and that could represent gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells. By analyzing the effect of CD73 deficiency using cells from CD73 knockout mice (CD73KO), we show that CD127 expression is not

affected in these thymocytes compared to thymocytes from control animals. Finally, when analyzing the effect of CD73 deficiency on the frequency of thymocyte populations, we determined that in the absence of CD73, there is an increase in the frequency of CD8 SP cells and a reduction in putative $\gamma\delta$ T cells. In conclusion, these results indicate that CD73 expression is not directly related to CD127 expression in thymocytes. Moreover, only cells in the late stages of differentiation (including putative $\gamma\delta$ T cells) express high levels of CD73. These data suggest that CD73 may affect the differentiation or survival of CD8 SP and $\gamma\delta$ T cells in the thymus.

1. INTRODUCCIÓN

Desarrollo de los Linfocitos T

Los linfocitos T son células especializadas del sistema inmune que juegan un papel central como mediadores de la respuesta inmune celular dirigida principalmente contra agentes extraños para nuestro cuerpo. Los precursores de los linfocitos T ingresan al timo desde la médula ósea como una célula madre hematopoyética y comienzan a interactuar con el estroma tímico. Para comprender cómo estas células son generadas en el cuerpo, es necesario saber las etapas en su desarrollo y diferenciación.

Los timocitos o precursores de linfocitos T en el timo, se clasifican en base a la expresión de ciertos marcadores como CD4 y CD8 en diferentes poblaciones. Así, en el timo encontramos poblaciones doble negativas (DN, que no expresan CD4 ni CD8), poblaciones doble positivas (DP, que expresan CD4 y CD8) y poblaciones CD4 o CD8 (SP, *single positive*) (Hernandez et al., 2010). La población de timocitos doble negativa (DN) es la primera etapa de desarrollo de los linfocitos T. Esta población se encuentra en la corteza tímica, y puede ser subclasificada en base a la expresión de CD25 y CD44 en: DN1, DN2, DN3 y DN4 (Hernandez et al., 2010). Uno de los hechos más relevantes para la supervivencia de los timocitos es la beta selección en la subpoblación DN3. La beta-selección es la generación de la cadena beta funcional junto con la generación de una cadena alfa sustituta del receptor del linfocito T o TCR (por *T cell receptor*). La señalización a través de la cadena beta es la que les permite a los timocitos sobrevivir y transitar a la etapa DN4. En DN4 ocurre la generación de un TCR funcional (Hong et al., 2012) y la señalización a través de éste define si los timocitos viven o mueren (Hong et al., 2012).

La etapa doble positiva (DP) de desarrollo de los timocitos está marcada por la muerte por negligencia y al proceso denominado selección positiva. Luego de la generación de un receptor funcional en DN4, los timocitos pasan a formar parte de la población DP, la cual representa el 80% de las células presentes en el timo (Kiss et al., 2006). Esta etapa se denomina así debido a que los timocitos expresan CD4 y CD8, y se encuentran espacialmente en la corteza tímica (Hong et al., 2012). Debido a que los timocitos ya poseen un TCR, ahora éstos prueban su receptor mediante la presentación péptidos propios unidos a moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II) en las células epiteliales tímicas (Francelin & Verinaud, 2012).

La selección que sufren los timocitos se basa en el modelo propuesto de la "fuerza de la señalización", el cual habla de que los atributos cuantitativos de la señalización de TCR. Por lo que, los péptidos provenientes del mismo organismo, de baja afinidad y relativamente raros presentados por el MHC, inducen la supervivencia y la diferenciación, permitiendo la selección positiva de los timocitos DP (Mandal et al., 2008). Los timocitos DP que no pueden expresar un TCR funcional no pueden madurar y mueren debido a la falta de "señales de supervivencia" entregadas a través de la señalización de TCR, en un proceso denominando "muerte por negligencia" (Hernandez et al., 2010; Francelin & Verinaud., 2012). En la muerte por negligencia, se ha propuesto que los glucocorticoides (GC) son los principales actores, regulando la diferenciación y selección de timocitos en su desarrollo en esta etapa de maduración. Se ha reportado que los timocitos DP son la subpoblación tímica más sensible a la apoptosis inducida por GC y que las células del estroma tímico producen GC localmente (Zilberman et al., 2004). Junto con esto, también hay antecedentes que demuestran que la adenosina junto con otras moléculas provenientes de los macrófagos, genera señales inductoras para la

muerte celular de los timocitos en ausencia de la señalización del TCR (Szondy et al., 2012). Contribuyendo así a la formación de un medio tímico que asegure la inducción efectiva de la "muerte por negligencia" (Szondy et al., 2012)

Para que los timocitos DP se diferencien en células que expresan tan solo CD4 o CD8 (SP CD4 o SP CD8), ellos deben pasar por un proceso de selección positiva en la médula tímica. Cuando los timocitos DP son seleccionados positivamente, se diferencian y pasan a formar parte de la última etapa de desarrollo denominada SP (*single positive* por su sigla en inglés). En esta etapa los timocitos expresan solo uno de los co-receptores (CD8 o CD4), y se ha propuesto que su expresión depende de la interacción que ocurrió con las células del estroma tímico. De tal forma que si un timocito DP interactúa con una célula del estroma tímico que le presenta un péptido en una molécula de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), se convertirá en un timocito SP CD4. Por el contrario, si la presentación del péptido ocurre en una molécula de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), el timocito expresará el co-receptor CD8 en la etapa SP (Staton et al., 2011).

Antes de ser liberados a la periferia, los timocitos SP son expuestos al proceso de selección negativa. La selección negativa consiste en la presentación de péptidos propios en moléculas de histocompatibilidad por células epiteliales medulares tímicas, células dendríticas y macrófagos (Francelin & Verinaud, 2012). Cabe recordar que los timocitos SP CD4 interactuarán con el complejo de péptido propio/ MHC-II, y los timocitos SP CD8 con el complejo péptido propio/MHC-I. Si la interacción de los timocitos es fuerte y prolongada dará como resultado la eliminación de timocitos por apoptosis. Este suceso, es un mecanismo crucial para la eliminación de células que podrían reconocer autoantígenos en la periferia al presentar receptores autorreactivos. La eliminación de

estas células por selección negativa es clave para la tolerancia central del sistema inmune y así evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Love & Bhandoola, 2011).

Como resultado del proceso de selección negativa en el timo, se genera un repertorio periférico de células T que reconocen los complejos de péptido propio/MHC con muy baja afinidad. La retención de una afinidad débil por los complejos generalmente se ha considerado un requisito para que las células T reconozcan de manera óptima los antígenos extraños en el contexto de las moléculas MHC propias. Sin embargo, la autorreactividad de bajo nivel tiene un propósito adicional; mantener la supervivencia y la homeostasis de las células T vírgenes (Goldrath & Bevan, 1999).

Una vez que los linfocitos han completado su proceso de diferenciación en el timo, son liberados a la periferia como linfocitos T vírgenes para formar parte del repertorio de linfocitos T que posee un individuo. La diversidad del repertorio de diferentes TCR se establece por la selección positiva de baja afinidad en el timo y la selección periférica. La selección periférica se basa en las señales de supervivencia mediadas por el TCR resultantes del contacto de un repertorio de ligandos de complejos péptidos/MHC propios (Surh & Sprent, 2008).

Interleuquina-7 y su papel en la supervivencia de los timocitos

Hoy en día se reconoce que la IL-7 es la principal citoquina homeostática que apoya la supervivencia de varias poblaciones de células T. Gracias a estudios en ratones con deficiencia congénita de IL-7 o en su receptor, se demostró el papel de la IL-7 en el desarrollo y supervivencia de la mayoría de los linajes de linfocitos T periféricos (Peschon et al., 1994; Surh & Sprent, 2008). El receptor de la IL-7 (IL-7R) está

compuesto por una cadena alfa (CD127) y por la cadena gama común CD132 expresados en la superficie celular (Hong et al., 2012). La IL-7 es producida por un subconjunto de células reticulares fibroblásticas (FRC) dentro de órganos linfoides secundarios (OLS) y se conserva en estos sitios debido a su unión a la matriz extracelular (Surh & Sprent, 2008). En la actualidad es aceptado que la IL-7 es la principal citoquina que regula la homeostasis de linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes y de memoria, junto con su proliferación inducida por linfopenia (Surh & Sprent, 2008).

En el contexto tímico, las poblaciones DN2 y DN3 expresan CD127, permitiendo a estos timocitos responder a través de la señalización de CD127 a IL-7 y finalmente sobrevivir (Hernandez et al., 2010). Existen teorías de que las demás poblaciones en la corteza tímica no expresan CD127 por ser “altruistas”, otorgando la baja disponibilidad de IL-7 en la corteza tímica a las poblaciones DN, ya que carecen de respuesta a otros factores para su supervivencia (Hernandez et al., 2010).

Posteriormente CD127 se vuelve a expresar en la transición desde células DP a SP durante el desarrollo de los timocitos en la zona medular del timo. Esta zona posee una concentración intermedia de IL-7. Durante esta transición, la señalización a través de CD127 es necesaria para generar el linaje CD8 y a la vez inhibe la diferenciación hacia el linaje CD4. Aún no se tiene claro el mecanismo a través del cual los timocitos SP CD4 evitan la señalización de IL-7 (Hong et al., 2012). En resumen, la señalización de IL-7 en la corteza tímica permite la supervivencia de los timocitos DN2 y DN3, mientras que, en la médula tímica, la IL-7 permite la diferenciación de los timocitos SP CD8.

En la periferia, las células T vírgenes post-tímicas en homeostasis permanecen en un estado quiescente durante períodos prolongados. Estas se mantienen mediante

la señalización de IL-7, la cual es esencial para su supervivencia y proliferación (Goldrath et al., 2002; Cekic et al., 2013).

Señalización de IL-7 y regulación de CD127

La señalización de IL-7 desencadena la activación de la vía PI3K-AKT. La activación mediante TCR de la vía PI3K/AKT es mucho mayor que la activación de esta mediada por IL-7 (E. H. Kim & Suresh, 2013). La activación del TCR o la señalización de IL-7 desencadena la activación de PI3K, y este fosforila el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 interactúa con AKT y la proteína quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1) en la capa interna de la membrana plasmática. La interacción entre el dominio PH de AKT y PIP3 da como resultado importantes cambios conformacionales en AKT, que permiten modificaciones posteriores de AKT por PDK1. (Han et al., 2012; Kim & Suresh, 2013). Akt activada por completo se transloca al núcleo fosforilando e inactivando a FOXO1. FOXO1 es un factor de transcripción que está involucrado en la expresión de genes relacionados con la proliferación, la motilidad y el metabolismo en células T (Li et al., 2007). Dentro de los genes que promueve FOXO1 se encuentran CD127, Bcl-2 y Klf2 (Kim & Suresh, 2013; Shi et al., 2017).

Junto con esto, se debe considerar que la IL-7 se encuentra en cantidades limitadas en condiciones fisiológicas, y que la unión de IL-7 a su receptor regula negativamente la expresión de CD127 (Cekic et al., 2013). Las moléculas de señalización descritas río debajo de IL-7R son los pertenecientes a la vía Jak/STAT. Las cadenas CD127 y CD132 del receptor de IL-7 están asociadas a Jak1 y Jak3 respectivamente. Luego de la unión de IL-7 a IL-7R, Jak 1 y Jak3 se transfosforilan y se activan. Una vez fosforilados, Jak 3 o Jak 1 pueden fosforilar a CD127, lo cual recluta al

factor de transcripción STAT5 (Jiang et al., 2005). Este último se transloca al núcleo y controla la expresión de genes diana asociados con supervivencia y proliferación como se observa en la Figura 1 (Jiang et al., 2005).

IL-7 mantiene la supervivencia de las células T a través de un mecanismo de regulación de la expresión de la familia de moléculas de linfoma 2 de células B en particular, Bcl-2 y Mcl-1, los cuales inhiben la vía apoptótica mitocondrial (Surh & Sprent, 2008). Por su parte, en células T efectoras / de memoria humanas, la ausencia de IL-7 induce la apoptosis por la regulación negativa de la expresión de Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-xL, lo cual se expone en la Figura 1 (Carrette & Surh, 2012).

Ectonucleotidasas CD39/CD73 y adenosina

Las ectonucleotidasas CD39 y CD73 son cruciales para la generación de adenosina extracelular. CD39 (NTPDase-1) y CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) son dos enzimas de superficie celular que hidrolizan el ATP en ADP, AMP y adenosina, en un proceso regulado (Beavis et al., 2012). Estas ectoenzimas son actores activos en varias enfermedades (cáncer, diabetes y alergias entre otras) y antecedentes de nuestro laboratorio sugieren que también están involucradas en la supervivencia homeostática de las células T vírgenes y la supervivencia y diferenciación de las células T de memoria (Bono et al., 2015; Briceño et al., 2021; Roseblatt et al., 2021) . Un actor relevante involucrado en la regulación de la concentración de adenosina extracelular es la adenosina deaminasa (ADA). ADA transforma la adenosina intracelular a inosina y luego lo transforma a ácido úrico (da Rocha Lapa et al., 2014). Esto contrarresta el efecto de la adenosina extracelular generada por CD73, ya que disminuye la concentración de adenosina extracelular y con esto, su señalización.

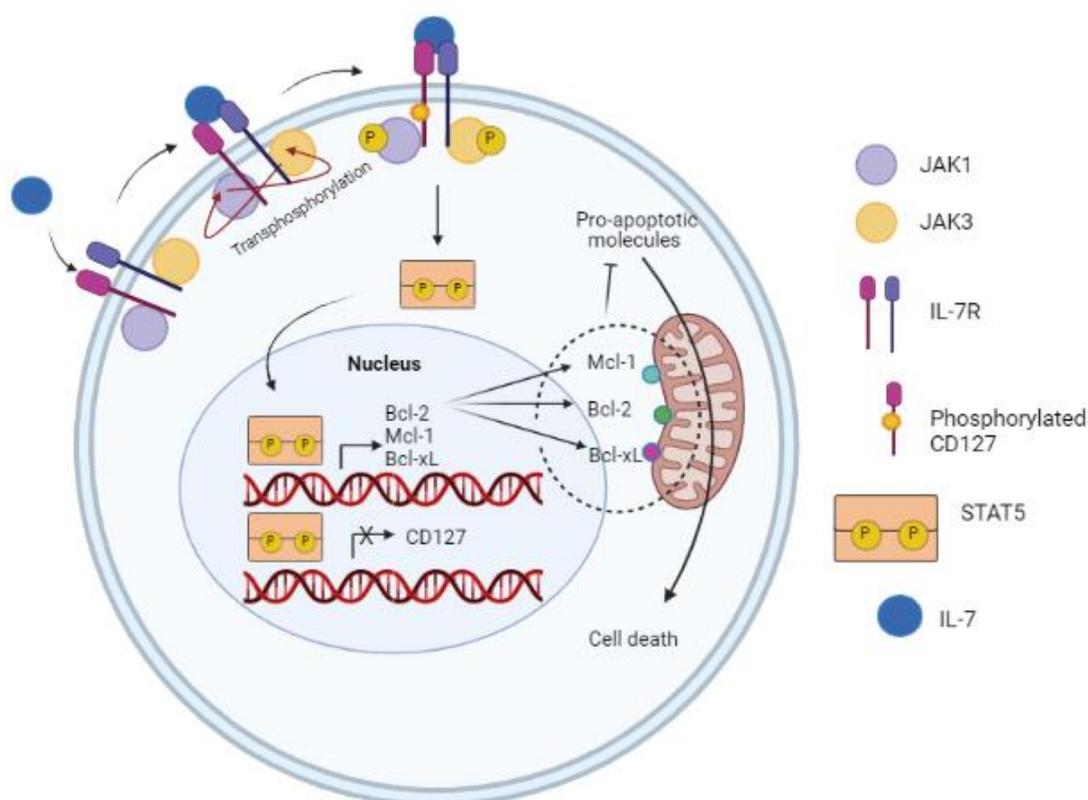


Figura 1. Señalización de IL-7 en células T. Al unirse IL-7 a su receptor, las proteínas Jak1 y Jak 3 se transfosforilan y activan. Cuando Jak 1 y Jak 3 se activan, Jak1 o Jak3 fosforila a CD127 reclutando a STAT5 (Jiang et al., 2005). Este último se transloca al núcleo y controla la expresión de genes asociados a la supervivencia y proliferación de la célula. STAT5 promueve la expresión de Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xL, los cuales inhiben la vía de apoptosis mitocondrial (Surh & Sprent, 2008). A su vez, STAT5 inhibe la expresión de CD127, concluyendo que la unión de IL-7 a su receptor regula negativamente la expresión de CD127 (Cekic et al., 2013).

La adenosina es una molécula de señalización purinérgica que se produce de forma constitutiva y está presente en todos los tejidos. La concentración de adenosina extracelular es mucho más alta en el timo que en resto del cuerpo alcanzando una concentración aproximada de 1,4 μM (Resta et al., 1997; Cekic et al., 2011). La adenosina media su señalización celular a través de cuatro receptores acoplados a proteína G: A1, A2A, A2B y A3 (Fredholm et al., 2011). La concentración de adenosina extracelular varía entre 30-200 nM en condiciones fisiológicas, pero puede alcanzar niveles muy altos (más de 100 μM) durante la inflamación y la hipoxia (Haskó & Cronstein, 2004). Esto debido a que en hipoxia o bien una inflamación, hay múltiples

células que liberan nucleótidos de adenina en forma de ATP, ADP y AMP a modo de respuesta. Por lo que la hipoxia afecta la expresión de CD39 y CD73, aumentando su expresión y actividad enzimática (Synnestvedt et al., 2002). Específicamente para el caso de CD73, el promotor del gen de esta enzima posee un sitio de unión para el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), lo cual tiene como resultado un aumento de la expresión de CD73 a nivel de ARN en este contexto, existiendo una mayor concentración de adenosina extracelular (Synnestvedt et al., 2002).

En el timo existe una alta concentración de adenosina en comparación con el resto del cuerpo debido a la alta tasa de muerte celular, lo cual conlleva a una alta liberación de ATP al medio externo, causada por la selección positiva y negativa de los timocitos. La concentración de adenosina en el timo depende principalmente de la expresión de CD73 y ADA en los timocitos (Köröskényi et al., 2017). En la corteza tímica, sitio donde existe una mayor muerte celular debido a la selección positiva, ADA está regulada positivamente y CD73 negativamente existiendo una menor concentración de adenosina que en la médula tímica (Köröskényi et al., 2017). Por el contrario, en la médula tímica, donde ocurre la selección negativa, ADA está regulada negativamente y CD73 positivamente existiendo una mayor concentración de adenosina que en la corteza (Köröskényi et al., 2017).

El receptor de adenosina más expresado en linfocitos T es A2AR (Cekic et al., 2013). El receptor A2AR está acoplado a una proteína G, lo cual desencadena la activación de la adenilil ciclasa y aumenta la actividad de PKA (S. Kim et al., 2001; Lou et al., 2002). PKA por su parte, inhibe la vía PI3K/AKT, la cual es activada cuando hay estimulación del TCR. En la siguiente sección se discutirá la importancia de A2AR en la expresión de CD127 en linfocitos T y timocitos.

Regulación de CD127 por CD73 y adenosina

El receptor A2AR es el principal receptor de adenosina expresado en linfocitos T y timocitos (Su et al., 2004; Cekic et al., 2013), el cual puede activarse en condiciones fisiológicas (Su et al., 2004). El receptor A2AR es expresado en todas las subpoblaciones de timocitos, pero lo hace en mayor proporción en la etapa DN2 (Apasov et al., 2000; Cekic et al., 2013; Hong et al., 2012). Se ha demostrado que la activación de A2AR previene la regulación negativa de la expresión de CD127 en timocitos y linfocitos T vírgenes (Cekic et al., 2013). Esto ocurre mediante la activación de PKA y la consiguiente inhibición de AKT, la cual reduce la expresión de CD127 río abajo de la estimulación del TCR. Por su parte, cuando PKA está activa inhibe a AKT, evitando la supresión que esta ejerce sobre CD127 (Barata et al., 2004; Hand et al., 2010).

La deficiencia de A2AR disminuye el número de linfocitos T vírgenes pero el número de linfocitos T de memoria no se ve afectado. Se ha reportado que la delección de A2AR tiene un alto impacto en la expresión de CD127 en linfocitos vírgenes (Cekic et al., 2013). En esta línea, nuestros resultados indican que al co-transferir células CD8 deficientes para CD73 y WT en animales linfopénicos Rag1 ^{-/-}, se observa que el porcentaje de células CD73KO disminuye en comparación con células WT, lo que sugiere que CD73 puede promover la supervivencia de células T CD8 vírgenes (Roseblatt et al., 2021). Esto concuerda con evidencia previa que demuestra la relación de la señalización de adenosina e IL-7, en donde la adenosina induce la expresión de CD127 a través de la señalización del receptor A2AR (Cekic et al., 2013). En conclusión, se puede sugerir un modelo donde la expresión de CD73 provoca la producción de adenosina extracelular, y la señalización de esta mediante el receptor A2AR favorece la supervivencia debido a la prevención de la regulación negativa de CD127 en linfocitos T

CD8 vírgenes y de memoria. En base a los antecedentes planteados y debido a que no existe evidencia de un papel de CD73 en la regulación de CD127 y sobrevivencia de timocitos. Por lo que, debido a que dentro de las poblaciones tímicas DN2, DN3 y SP se ha descrito que existe expresión de CD127, decidimos evaluar en estas poblaciones la expresión de CD73 y su efecto en la expresión de CD127. Proponiendo la siguiente hipótesis.

Hipótesis

CD73 regula positivamente la expresión de CD127 en timocitos DN2, DN3 y SP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar el papel de CD73 en la expresión de CD127 en los diferentes estadios de desarrollo de los timocitos.

2.2. Objetivos Específicos

1. Analizar la expresión de CD73 y CD127 en las diferentes poblaciones de timocitos
2. Analizar el efecto de la deficiencia de CD73 en la expresión de CD127 y en la frecuencia de diferentes poblaciones de timocitos
3. Generar un mini-review que recopile los antecedentes de la literatura en cuanto a la señalización mediada por IL-7 en timocitos y células T maduras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este trabajo se utilizaron ratones CD73KO (B6.129S1-Nt5etm1Lft/J) y C57BL/6 los cuales se obtuvieron desde Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Todos los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida en condiciones libres de patógenos específicos. Para los experimentos se utilizaron 6 ratones macho entre 8 – 16 semanas de edad. Los experimentos se realizaron siguiendo las normas del comité de bioética de la Fundación Ciencia & Vida y del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile.

Extracción de células desde el timo

Para la obtención de timocitos a partir de animales C57BL/6 y CD73KO, luego de la eutanasia del animal, se extrajo el timo y se disgregó mecánicamente con una tijera. La suspensión celular se filtró por una malla metálica de 90 μm , y se llevó a un volumen de 5 mL con RPMI + 10% FCS. Para determinar el número de células obtenidas, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se contaron las células en una cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán.

Citometría de flujo

La caracterización fenotípica de las distintas poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo multiparamétrica (FACS Aria III, BD Biosciences). Para esto, 1×10^6 células obtenidas desde el timo se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes, FcBlock (para bloquear los receptores Fc) y Fixable Viability Dye eFluor780 (eBioscience) para descartar las células muertas, en PBS + 2% SFB durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS + 2% SFB,

se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 300 µL de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro. Los datos de citometría se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

Tabla I: Fenotipo correspondiente a cada población tímica. La expresión de las distintas proteínas de superficie que se utilizaron para determinar las poblaciones tímicas mediante citometría de flujo.

Población tímica	Fenotipo
DN1	CD3 ⁻ CD44 ⁺ CD25 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻
DN2	CD3 ⁻ CD44 ⁺ CD25 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
DN3	CD3 ⁻ CD44 ⁻ CD25 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
DN4	CD3 ⁻ CD44 ⁻ CD25 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻
DP	CD3 ⁻ CD4 ⁺ CD8 ⁺
SP CD4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻
SP CD8	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺
T Gamma delta	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos para la comparación entre 2 grupos de la intensidad media de fluorescencia y frecuencia de células se realizaron con un test paramétrico t-Test de dos colas no pareado, utilizando la corrección de Welch. Se consideró la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Para determinar la expresión de CD127 y CD73, junto con el efecto de la deficiencia de CD73 en las distintas poblaciones tímicas, se procedió a realizar una citometría de flujo multiparamétrica utilizando timos extraídos a partir de animales C57BL/6 (WT) y *knockout* para CD73 (CD73KO).

Lo primero que se procedió a realizar fue la determinación de cada población tímica con los datos obtenidos de la citometría de flujo utilizando el programa FlowJo v10. Lo anterior está representado en la Figura 2 y 3, donde se expone la estrategia de gating utilizada en ratones WT y CD73KO respectivamente. Como se observa en estas figuras, lo primero que se realizó es la determinación de la población correspondiente a los linfocitos a través de los parámetros de *forward* y *side scatter* (FSC/SSC). Posteriormente se procedió a descartar los dobletes utilizando la altura (H), área (A) y ancho (W) de los parámetros de FSC y SSC, para así poder analizar células individuales. A continuación, se descartaron las células muertas (utilizando la tinción Viability Dye) para finalmente determinar las poblaciones doble negativas (DN), doble positivas (DP), simple positivas (SP) CD4 y SP CD8, según la expresión de CD4 y CD8. Posteriormente, dentro de la población DN, se generó una ventana o gate correspondiente a la población negativa para CD3, ya que la población DN no expresa esta proteína perteneciente al complejo molecular del receptor del linfocito T. Finalmente se determinó las subpoblaciones DN en base a la expresión de CD44 y CD25 para posteriormente analizar la expresión de CD127 y CD73 (Ver Tabla I).

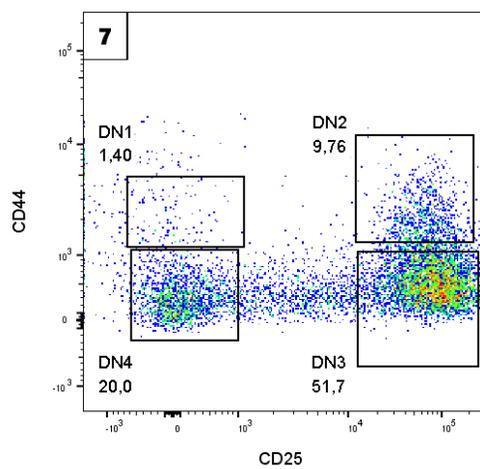
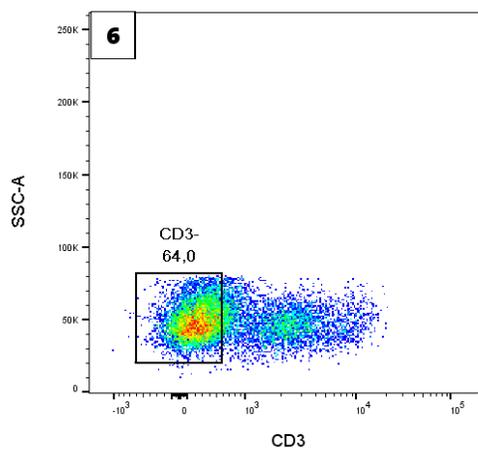
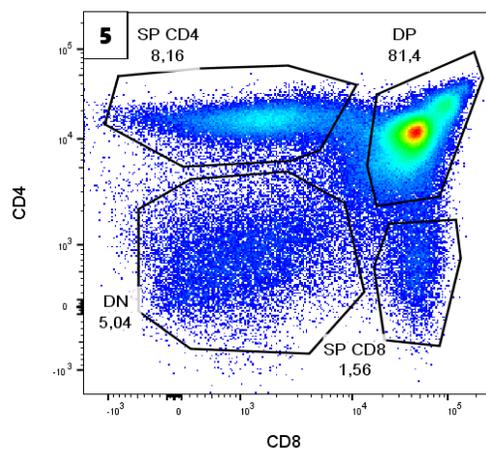
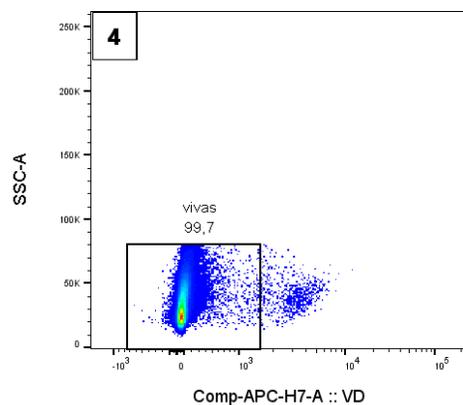
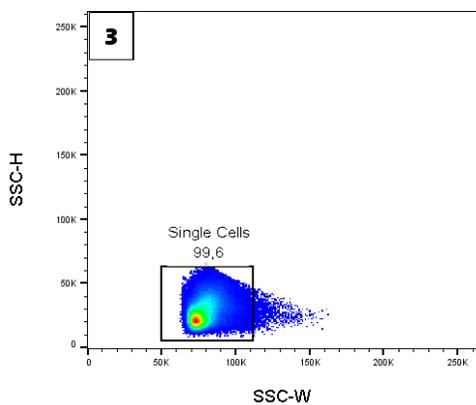
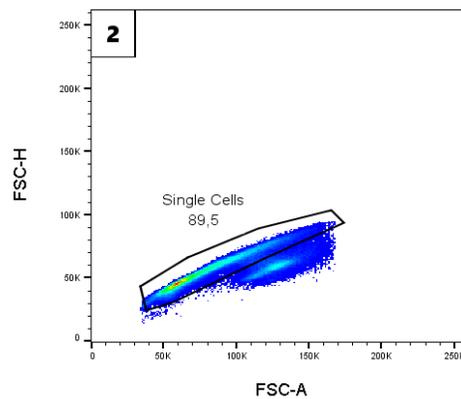
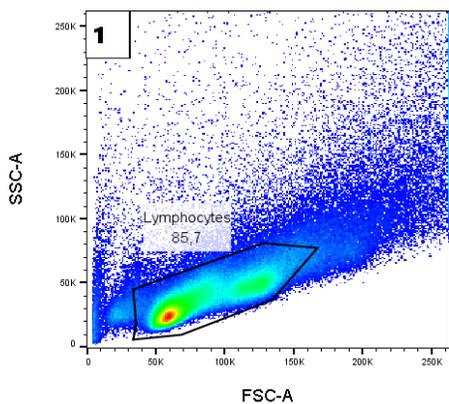


Figura 2. Estrategia de gating utilizada en ratón WT para determinar las poblaciones presentes en el timo utilizando la aplicación FlowJo v10. La enumeración expone el orden en el que se realizó cada gate para obtener finalmente las poblaciones típicas de interés. Primero se determinó la población linfocitaria mediante los parámetros de SSC-A (Side Scatter- Area) y FSC-A (Forward Scatter- Area), en donde SSC-A determina la complejidad celular y FSC-A el tamaño celular utilizando el parámetro de área. Posteriormente para obtener las células típicas de interés, se descartan los dobletes utilizando los parámetros FSC-H (Forward Scatter- Height) y FSC-A, basándose en la altura de la señal y el área de esta determinado por la desviación frontal de la luz en el Forward Scatter. Posteriormente para seguir descartando dobletes se utilizan los parámetros de SSC-H (Side Scatter- Height) y SSC-W (Side Scatter- Width), basándose en el alto y ancho de la señal determinada por la desviación lateral de la luz en el Side Scatter. Después se descartan las células muertas mediante el SSC-A y un marcador de viabilidad. Finalmente se determinan las poblaciones del timo por la expresión de CD4 y CD8, en donde a la población DN además se le realizó una gate para descartar la expresión de CD3 y determinar las subpoblaciones en base a la expresión de CD44 y CD25.

Expresión de CD127 y CD73 en células CD73 WT

La primera población típica que se analizó corresponde a la población DN, por lo que para analizar la expresión de CD127 y CD73 se generaron histogramas determinados por citometría de flujo, los cuales incluyen el valor de la media de fluorescencia.

Lo que se desprende, es que la expresión de CD73 es muy baja en las células DN, pero es mayor en DN1 y DN2. Y que la expresión de CD127 se incrementa en las poblaciones DN2 y DN3 (Ver Figura 4).

En el análisis de las poblaciones DN, detectamos una población celular que expresa CD3 y altos niveles de CD127 y CD73 (Ver Figura 5). Al analizar los datos de la literatura, se determinó que esta población podría corresponder a linfocitos T $\gamma\delta$ puesto que también se diferencian en el timo, expresan CD3 y carecen de CD4 y CD8 (Coffey et al., 2014).

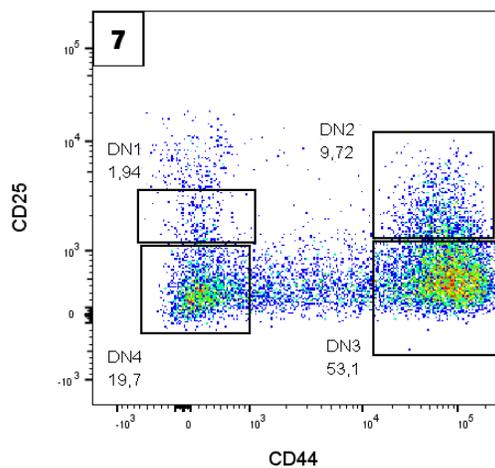
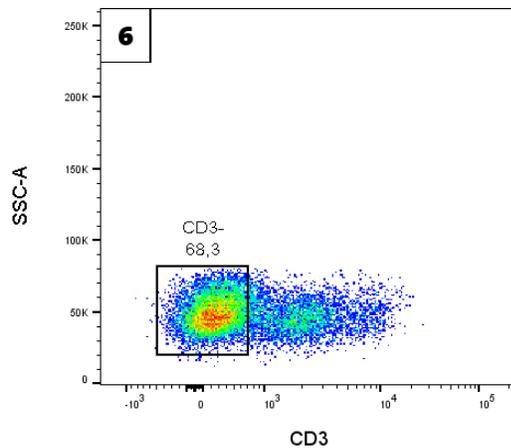
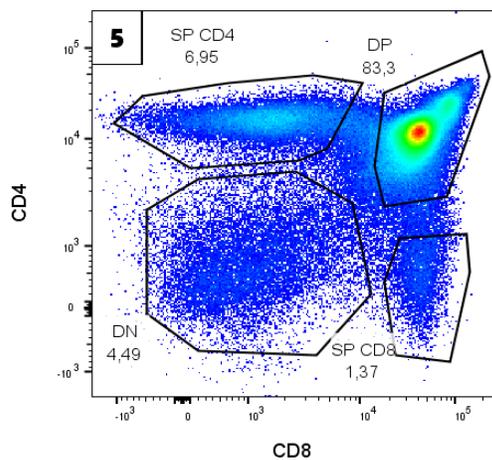
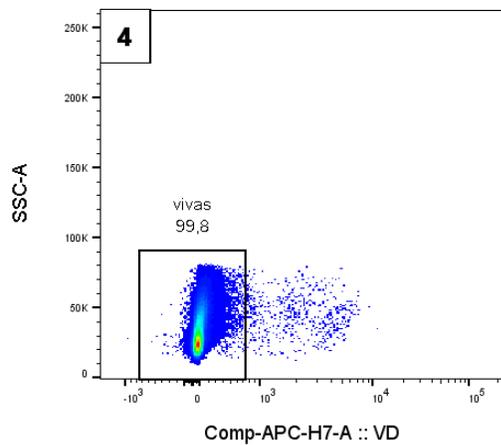
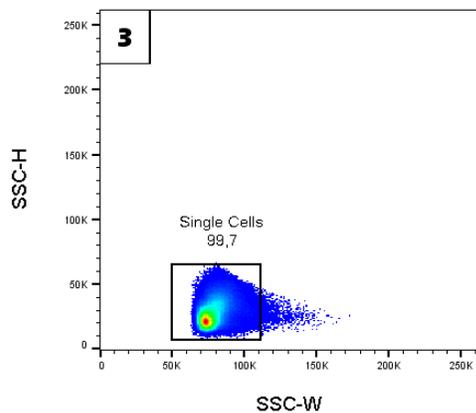
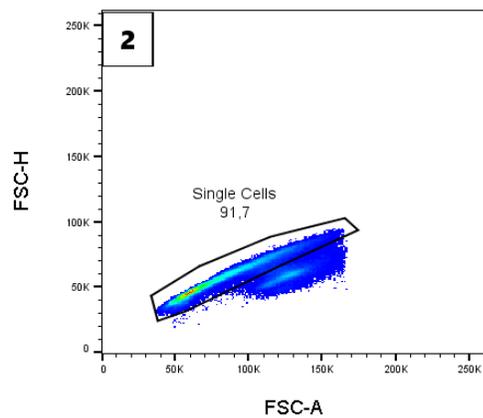
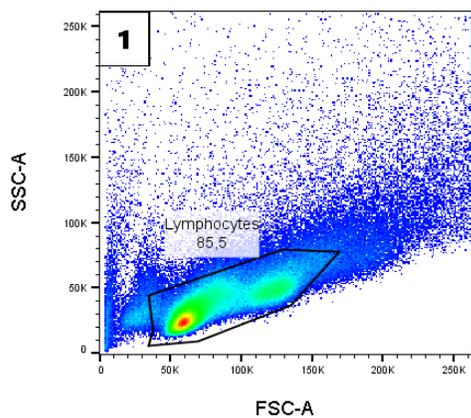


Figura 3. Estrategia de gating utilizada en ratón CD73KO para determinar las poblaciones presentes en el timo utilizando la aplicación FlowJo v10. La enumeración expone el orden en el que se realizó cada gate para obtener finalmente las poblaciones tímicas de interés. Primero se determinó la población linfocitaria mediante los parámetros de SSC-A (Side Scatter- Area) y FSC-A (Forward Scatter- Area), en donde SSC-A determina la complejidad celular y FSC-A el tamaño celular utilizando el parámetro de área. Posteriormente para obtener las células tímicas de interés, se descartan los dobletes utilizando los parámetros FSC-H (Forward Scatter- Height) y FSC-A, basándose en la altura de la señal y el área de esta determinado por la desviación frontal de la luz en el Forward Scatter. Posteriormente para seguir descartando dobletes se utilizan los parámetros de SSC-H (Side Scatter- Height) y SSC-W (Side Scatter- Width), basándose en el alto y ancho de la señal determinada por la desviación lateral de la luz en el Side Scatter. Después se descartan las células muertas mediante el SSC-A y un marcador de viabilidad. Finalmente se determinan las poblaciones del timo por la expresión de CD4 y CD8, en donde a la población DN además se le realizó una gate para descartar la expresión de CD3 y determinar las subpoblaciones en base a la expresión de CD44 y CD25.

	Sample	Population	CD127 mean	CD73 mean
	Control	DN	25,2	50,8
	WT	DN1	285	436
	WT	DN2	1490	440
	WT	DN3	804	311
	WT	DN4	341	284

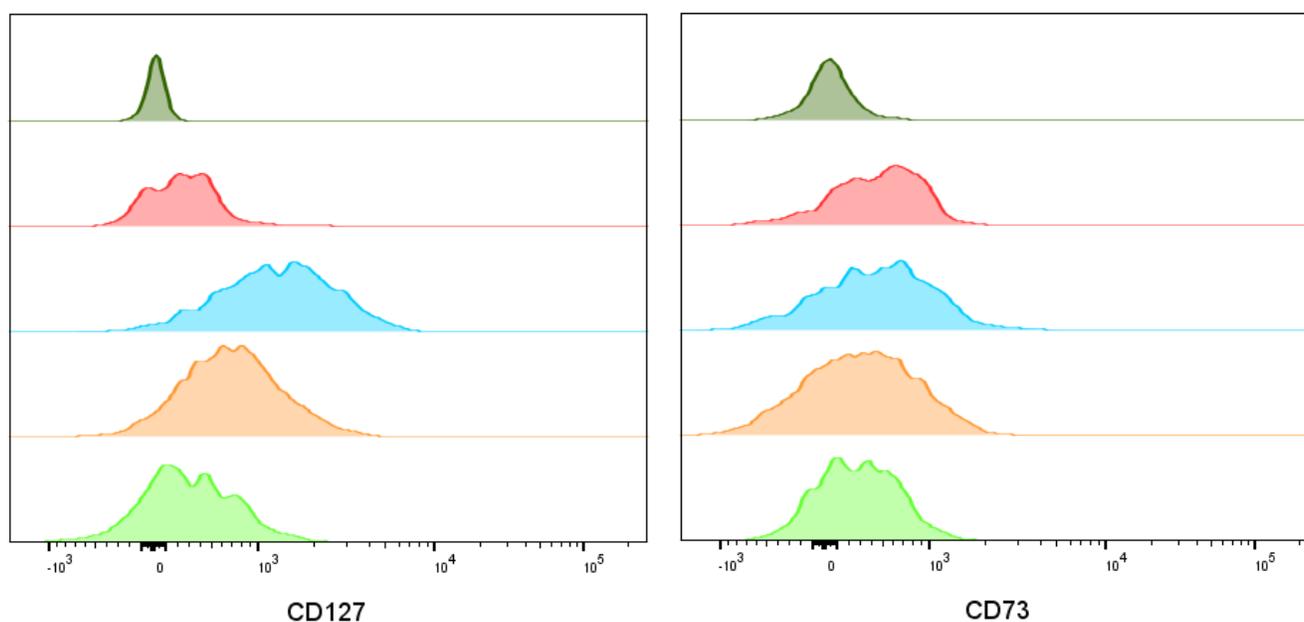


Figura 4. Expresión de CD127 y CD73 en las poblaciones de timocitos DN provenientes de un ratón WT(C57BL/6). Expresión de CD127 y CD73 determinado por citometría de flujo. En rojo representa a la población DN1, en azul a la población DN2, en naranja la población DN3, en verde a la población DN4 y en verde oscuro el control. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

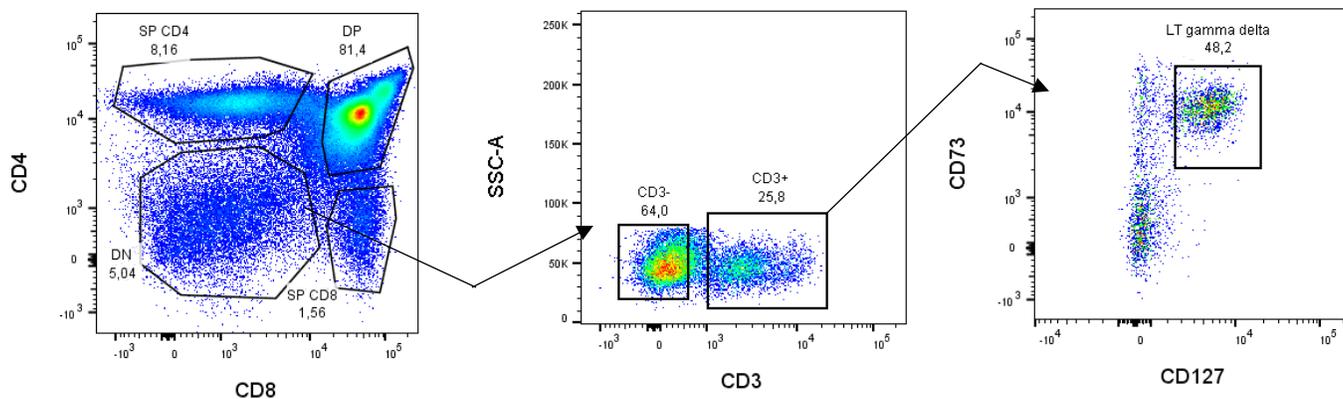


Figura 5. Análisis de la expresión de CD127 y CD73 en la población DN que expresa CD3. En la figura se exponen 3 density plot, en el de la izquierda se expone la gate utilizada que es DN, y a continuación, se analizó la expresión de CD3 en esta población y finalmente se analizó la expresión de CD127 y CD73 en la población CD3+. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Expresión de CD127 en células deficientes para CD73

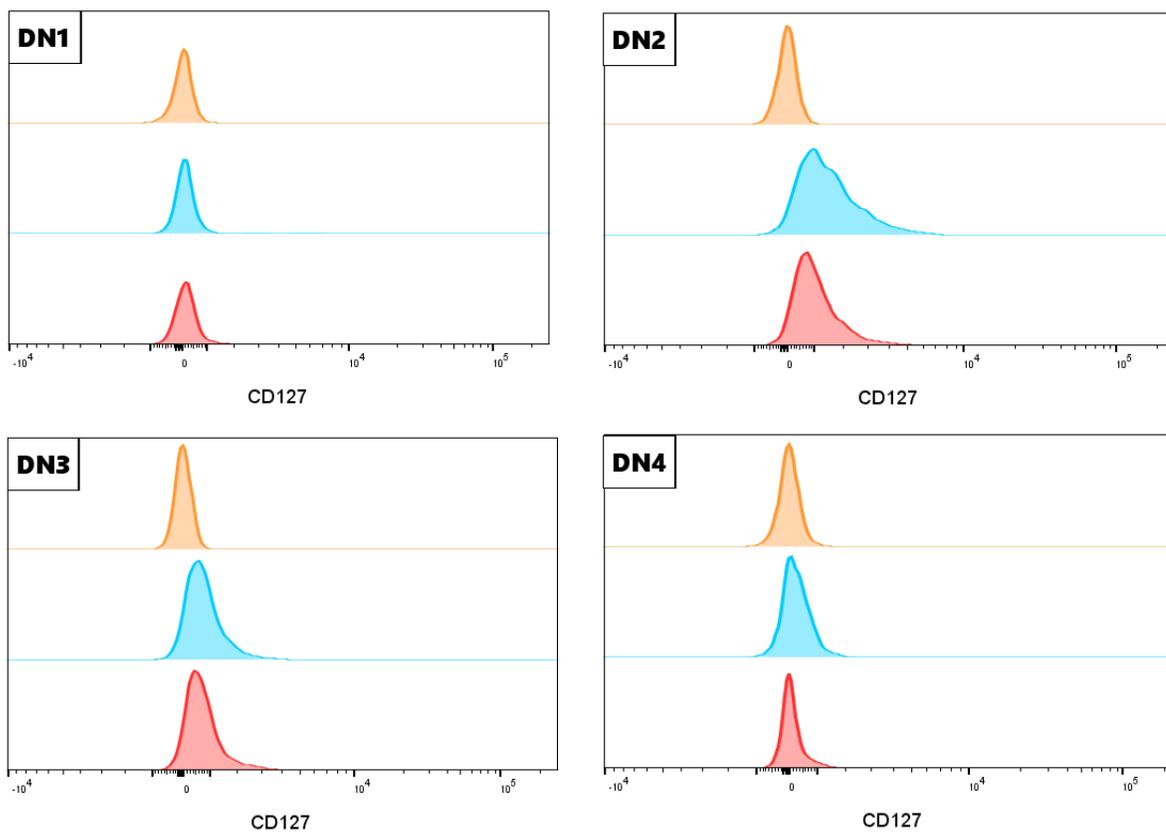
Posteriormente, se procedió a analizar si la expresión de CD127 varía en ausencia de CD73. Para esto, se analizó la expresión de CD127 en diferentes poblaciones de timocitos provenientes de animales CD73KO y se compararon con animales WT.

Se desprende de la Figura 6 que en las poblaciones DN1 y DN3 no hay diferencia en la expresión de CD127 entre un ratón WT y CD73 KO. Lo mismo sucede al comparar las poblaciones DN2 y DN4.

Por lo que, para determinar si realmente hay alguna diferencia en los casos respectivos se sugiera que se necesitan más datos experimentales.

A.

			CD127 mean			
	Sample	Population	DN1	DN2	DN3	DN4
	Control	DN	154	107	91,5	91,8
	WT	DN	285	1490	804	341
	KO	DN	338	1078	761	189



B.

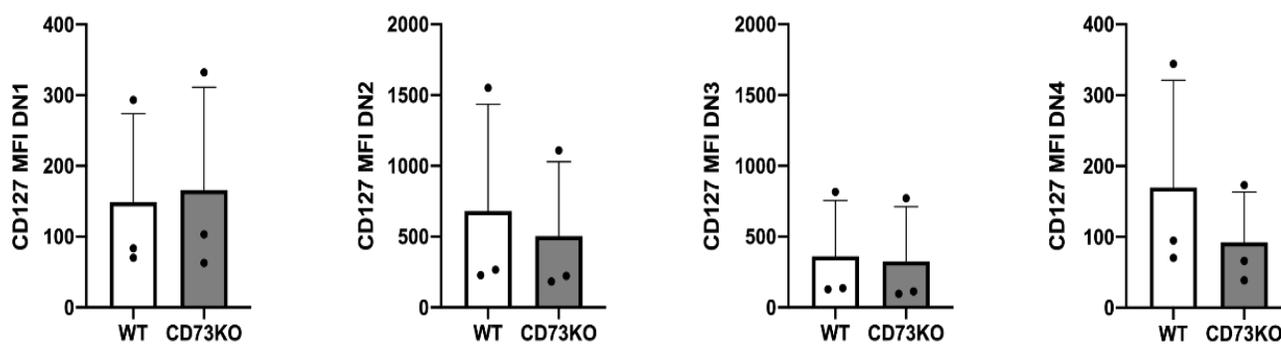


Figura 6. Expresión de CD127 en las poblaciones de timocitos DN provenientes de un ratón WT y CD73 KO. **A.** Expresión de CD127 determinado por citometría de flujo en las poblaciones DN. El color rojo representa al ratón CD73 KO, el azul al ratón WT y el naranja al ratón FMO (Fluorescence Minus One), el cual es el control. Resultado representativo de 3 experimentos independientes. **B.** Gráficos de barra que representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD127 en diferentes poblaciones DN provenientes de animales WT y CD73KO. Los datos representan el análisis de 3 animales WT y 3 animales CD73 KO. Los datos fueron analizados con un t test no pareado de dos colas (paramétrico) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Se consideró la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$.

Expresión de CD73 y CD127 en la población DP

Posteriormente se procedió a analizar la expresión de CD127 y CD73 en la población DP.

En la Figura 7 los niveles de expresión de CD127 se comparan con el control negativo y se observa que tanto en el ratón WT como CD73KO no hay una expresión de CD127. Lo cual coincide con los antecedentes expuestos en la literatura (Hong et al., 2012).

Expresión de CD73 y CD127 en poblaciones SP

Finalmente se procedió a realizar este mismo análisis con las poblaciones SP CD4 y SP CD8.

Para el caso de la población SP CD4, se desprende que hay expresión de CD127 en los ratones WT y CD73KO (Figura 8). Junto con, también observar expresión de CD73 de esta población en células WT.

También se observa que no existe una disminución significativa de la expresión de CD127 en las células SP CD4 en el ratón CD73 KO, en comparación con el ratón WT.

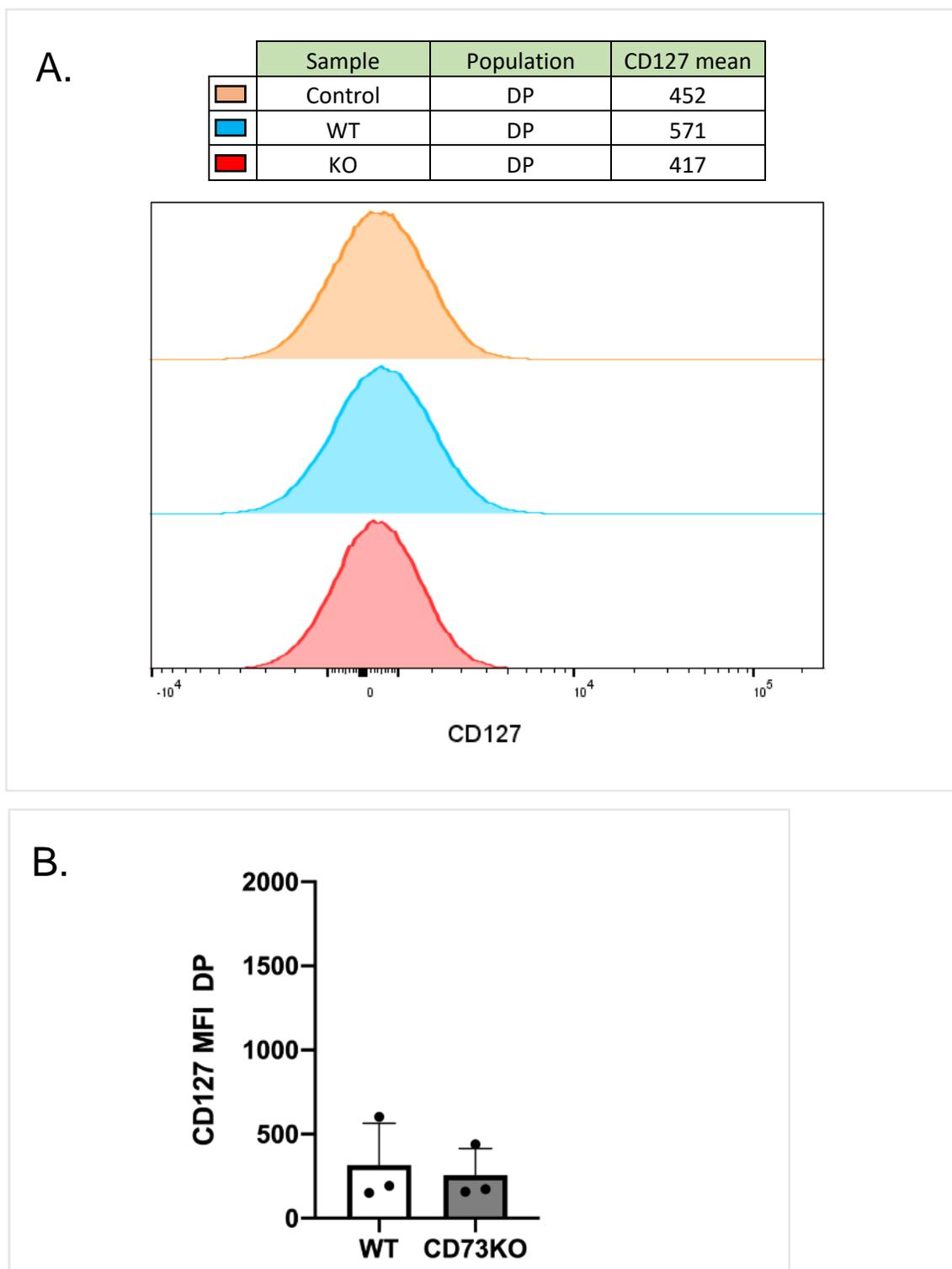
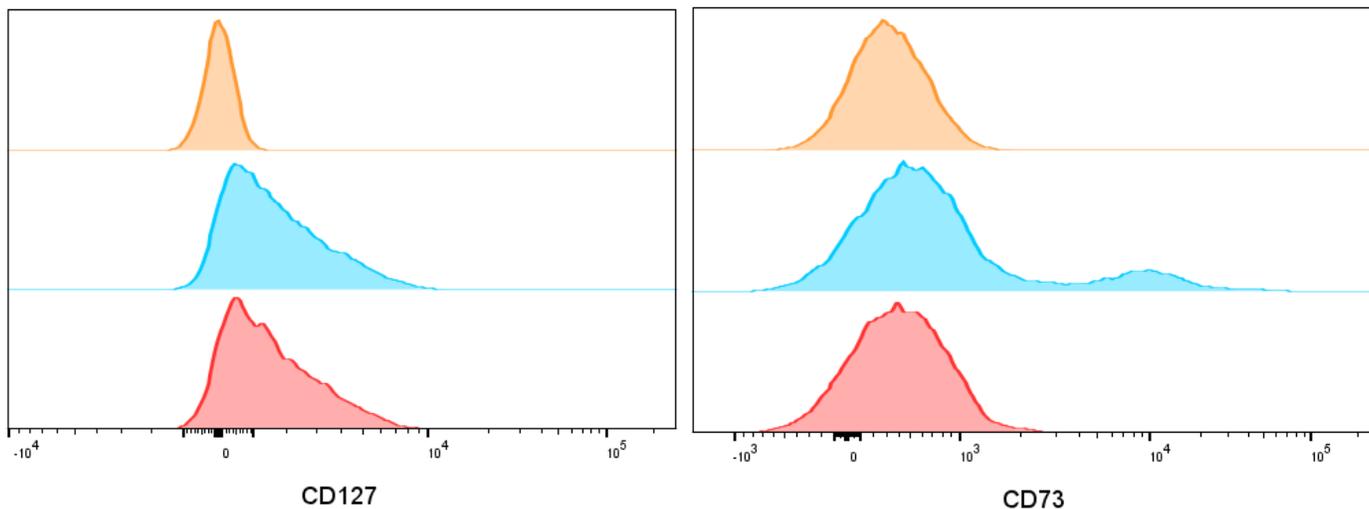


Figura 7. Expresión de CD127 en la población de timocitos DP provenientes de un ratón WT y CD73 KO. **A.**..Expresión de CD127 determinado por citometría de flujo. El color rojo representa al ratón CD73 KO, el azul al ratón WT (C57BL/6) y el naranja al ratón FMO (Fluorescence Minus One), el cual es el control. **B.** Gráfico de expresión de CD127 por parte da la población DP en ratones WT y CD73KO. Los datos representan el análisis de 3 animales WT y 3 animales CD73 KO. Los datos fueron analizados con un t test no pareado de dos colas (paramétrico) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Se consideró la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$.

A.

	Samples	Population	CD127 mean	CD73 mean
	Control	SP CD4	35,8	329
	WT	SP CD4	1636	786
	KO	SP CD4	1491	414



B.

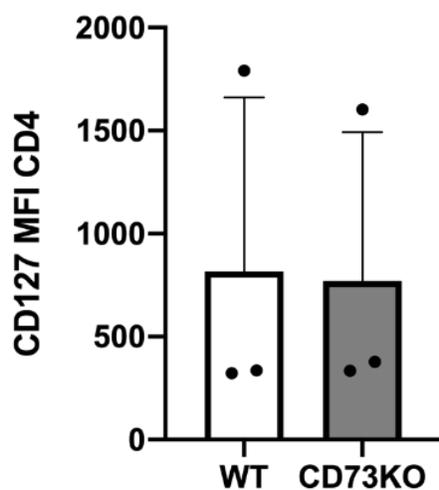


Figura 8. Expresión de CD127 y CD73 en la población de timocitos SP CD4 provenientes de un ratón WT y CD73 KO. **A.** Expresión de CD127 y CD73 determinado por citometría de flujo. El color rojo representa al ratón CD73 KO, el azul al ratón WT y el naranja al ratón FMO (*Fluorescence Minus One*), el cual es el control. Resultado representativo de 3 experimentos independientes. **B.** Gráfico de expresión de CD127 por parte de la población SP CD4 en ratones WT y CD73 KO. Los datos representan el análisis de 3 animales WT y 3 animales CD73 KO. Los datos fueron analizados con un t test no pareado de dos colas (paramétrico) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Se consideró la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$.

Por el lado contrario, en el caso de la población SP CD8 se observa que, al igual que para los CD4 SP, esta población expresa CD127 (Ver Figura 9).

En la Figura 9, también se observa que en el caso de la expresión de CD127 en la población SP CD8 entre los ratones CD73 WT y CD73 KO no existen diferencias significativas.

Porcentaje de las poblaciones tímicas en animales deficientes para CD73

Ya realizado lo anterior se procedió a determinar si CD73 regula la supervivencia o diferenciación de las poblaciones de timocitos, para lo cual se comparó el porcentaje de cada población tímica en animales CD73KO y WT.

Lo que se desprende de la Figura 10, es que la ausencia de CD73 posee distintos efectos en cada una de ellas. En DN1, DN2 y DN4 el porcentaje de la población aumentó en los ratones CD73KO, pero no resultaron en diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, se observó un aumento en el porcentaje de células SP CD8 en el animal CD73KO en comparación con el WT, lo cual alcanzó significancia estadística. Por otro lado, la población de linfocitos T $\gamma\delta$ disminuyó en los ratones CD73KO, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos ($p=0,129$). En el caso de la población DP no se observaron diferencias en las frecuencias de células entre los animales WT y CD73KO.

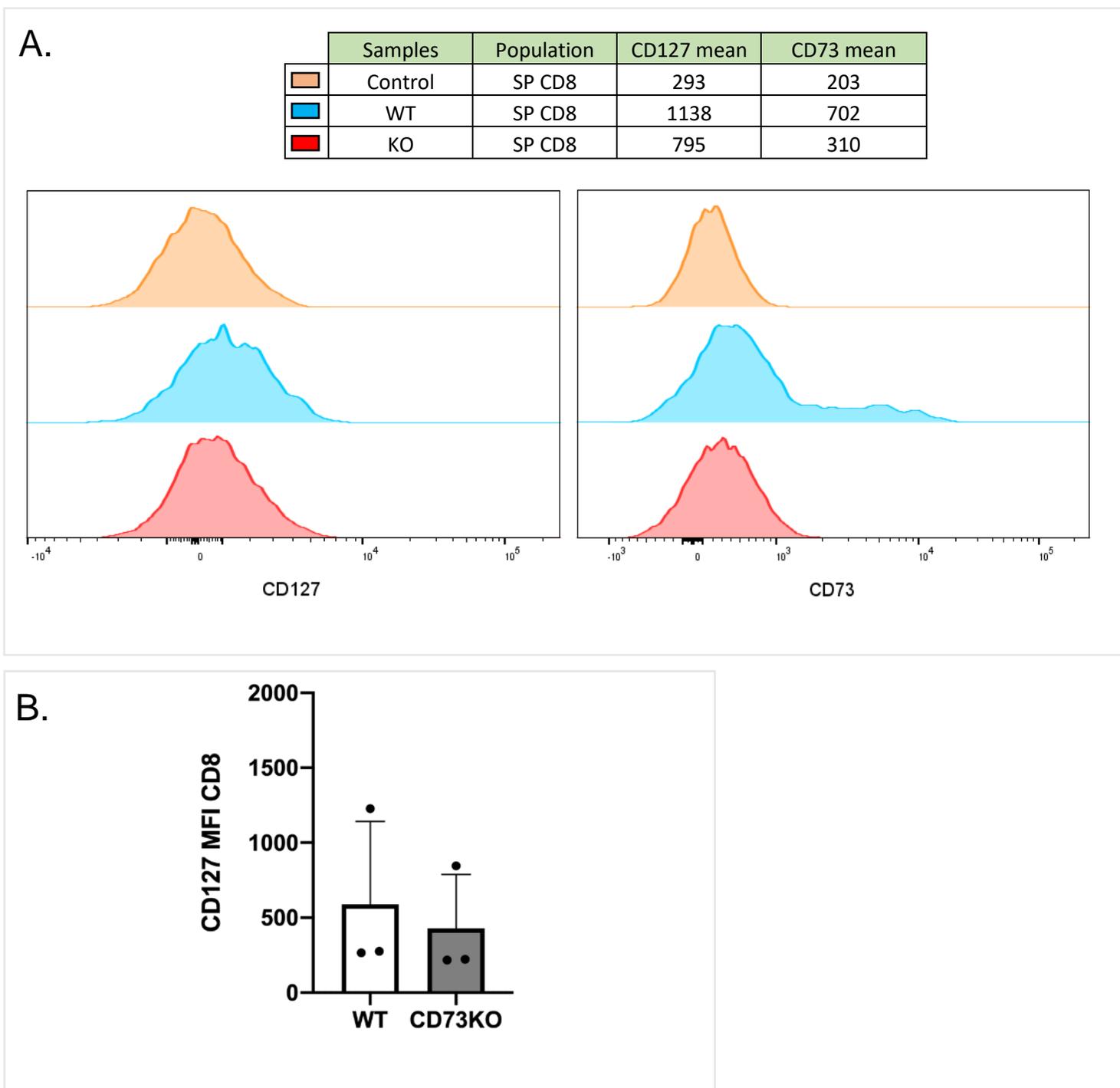


Figura 9. Expresión de CD127 y CD73 en la población SP CD8 de un ratón WT y CD73 KO. **A.** Expresión de CD127 y CD73 determinada por citometría de flujo. El color rojo representa al ratón CD73 KO, el azul al ratón WT y el naranja al ratón FMO (Fluorescence Minus One), el cual es el control. Resultado representativo de 3 experimentos independientes. **B.** Gráfico de expresión de CD127 por parte de la población SP CD8 en ratones WT y CD73 KO. Los datos representan el análisis de 3 animales WT y 3 animales CD73 KO. Los datos fueron analizados con un t test no pareado de dos colas (paramétrico) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Se consideró la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$.

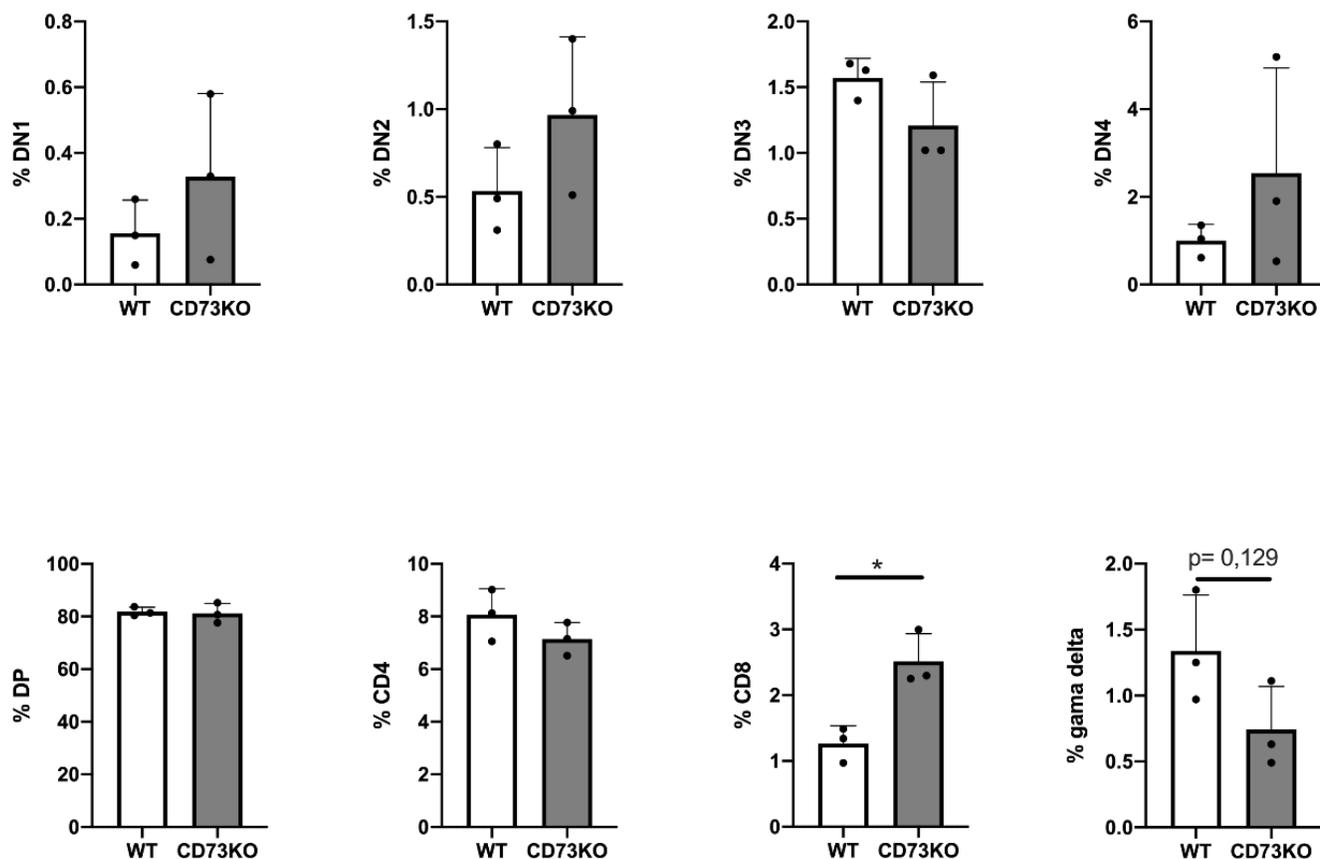


Figura 10. Frecuencia de cada población tímica en un ratón WT y CD73 KO. En la figura se exponen diferentes gráficos de barra, cada uno representando a una población tímica en particular. Los datos representan el análisis de 3 animales WT y 3 animales CD73 KO. Los datos fueron analizados con un t test no pareado de dos colas (paramétrico). Se consideró la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$.

4. DISCUSIÓN

Tanto en linfocitos T como en timocitos las señales de supervivencia son requeridas para que el linaje prospere y ejerzan su función inmunitaria en el organismo. Uno de estos factores relevantes para la supervivencia y proliferación homeostática de las células T es IL-7. Pero para que esta ejerza su función sobre las células es necesaria la expresión de su receptor compuesto por CD127 y CD132. Por otro lado, la adenosina extracelular es crucial para la homeostasis inmune y es generada constitutivamente en el organismo debido a procesos metabólicos como se ha nombrado anteriormente.

Diferentes antecedentes apuntan a que la activación del receptor de adenosina A2AR previene la regulación negativa de CD127 en linfocitos T vírgenes y linfocitos T de memoria CD8 (Cekic et al., 2013; Roseblatt et al., 2021). Pero no existen antecedentes si esta misma regulación sucede en timocitos.

Nuestros resultados indican que tanto DN2, DN3, SP CD4 y SP CD8 expresan CD127. Al evaluar la expresión de CD127 en todas estas poblaciones tímicas en los ratones CD73 KO, observamos que no existe una diferencia significativa en comparación con los ratones WT, lo cual refuta la hipótesis planteada y sugieren que existen otras vías de regulación de CD127 donde no participa CD73. Un ejemplo de una vía que probablemente este regulando la expresión de CD127, al menos en DN2 y DN3, es la relacionada con Gfi-1 (Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor), ya que es expresado en todas las poblaciones tímicas menos en SP, pero no se sabe el mecanismo en el que utilizaría para actuar en DN2 y DN3 (Yücel et al., 2003). Éste es un represor transcripcional que se induce rápidamente después de la activación del TCR. Gfi-1 se expresa en el sistema hematopoyético y su deficiencia da como resultado una serie de defectos en el desarrollo y función de las células madre y progenitoras

hematopoyéticas, granulocitos y linfocitos T (Yücel et al., 2003). En un estudio realizado por Park y colaboradores se demostró que la actividad de Gfi-1 está implicada en la regulación negativa de CD127 en células T CD8 periféricas después de la estimulación con IL-7 (Park et al., 2004). Asimismo, se demostró que la transcripción de CD127 se inhibe en las células T CD8 efectoras mediante el reclutamiento de la histona desacetilasa HDAC1 en el promotor CD127. Así, la expresión de CD127 es inhibida debido a que HDAC1 permite el reclutamiento del represor transcripcional Gfi-1 en el locus CD127.

Otra vía relacionada con la expresión de CD127 es la que incluye el factor de transcripción FOXO1. Para el caso de las poblaciones DN2 DN3, SP CD4 y SP CD8 es posible que CD127 esté siendo regulada por FOXO1, el cual es un regulador positivo de CD127 expresado en timocitos (E. H. Kim & Suresh, 2013; Shi et al., 2017). También existe la vía en donde la unión de IL-7 con su receptor regula negativamente la expresión de CD127 (Cekic et al., 2013). Este eje también podría estar influyendo en la expresión de CD127 en los timocitos que se exponen en los resultados. Ya nombrado lo anterior hay que realizar más estudios, ya que hay muchas vías que interfieren en la expresión de CD127 a parte de las nombradas y lo más probable, es que más de una de estas está interfiriendo en la expresión de CD127 en las poblaciones tímicas.

Por otro lado, los resultados de la expresión de CD73, indican que las poblaciones DN2 y DN3 expresan niveles muy bajo o no expresan CD73, lo cual no concuerda con lo esperado. En esta línea, se esperaba encontrar una correlación entre la expresión de CD73 y CD127 que apoyara la hipótesis de la regulación de CD127 por CD73. Sin embargo, hay que considerar que existen otras poblaciones en el timo que expresan CD73 y que podrían dar cuenta de una regulación de CD127 en estas

poblaciones. Además, hay que considerar que la concentración de adenosina está siendo regulada por otra enzima como la adenosina deaminasa y otras vías. Sería interesante estudiar también en este contexto la expresión de ADA en las poblaciones tímicas. Existe un antecedente de la investigación de Resta et al., 1997, en donde al aumentar la actividad de CD73 en timocitos la concentración de adenosina no se alteraba en el timo y la generación de linfocitos tampoco. Al utilizar un inhibidor de ADA en este modelo de inducción de CD73, se observó que la concentración de adenosina del timo aumentó más de 30 veces, demostrando que la expresión de ADA es regulada de manera muy dinámica de manera de mantener los niveles de adenosina relativamente constantes en el timo (Resta et al., 1997). Es por lo anterior, que el estudio de esta enzima es fundamental y debe ser incorporado en este contexto para estudios posteriores.

A pesar de lo reportado en la literatura, nuestros resultados indican que las poblaciones tímicas SP CD8 y SP CD4 expresan CD73. Sin embargo, es tan sólo un porcentaje de células las cuales expresan altos niveles de esta enzima, lo cual provoca que suba la intensidad media de fluorescencia para CD73. En el caso de la población SP CD8 en los ratones WT podrían tratarse de células T intraepiteliales debido a su alta expresión de CD73 (Bynoe et al., 2012). En el caso de las células SP CD4, podría tratarse de células T reguladoras, ya que se ha descrito la expresión de CD73 en esta población (Schuler et al., 2014).

Otra observación en base a los resultados obtenidos fue que en la población DN existían células que expresan una alta cantidad de CD73 y CD127, en específico en la población DN1, lo cual no concordaba con los antecedentes en la literatura. Al ahondar en esto, se llegó a la determinación que estas células corresponden a células T $\gamma\delta$ debido

a su alta expresión de CD73 en conjunto con otros marcadores como CD3 y ausencia de CD4 y CD8 (Coffey et al., 2014). Sin embargo, estos resultados deben ser confirmados utilizando otros marcadores de esta población celular, como serían el TCR gama delta y CD24. Existen antecedentes de que cerca del 90% de las células T $\gamma\delta$ maduras expresan CD73, y de que la expresión de esta enzima se relaciona con la decisión de linaje de las células T $\gamma\delta$ (Coffey et al., 2014). Junto con esto, las células T $\gamma\delta$ requieren de la IL-7 para su homeostasis, proliferación y diferenciación, al igual que otros linajes de linfocitos T (Parker & Ciofani, 2020). De manera concordante, observamos que la frecuencia de células T $\gamma\delta$ en los ratones CD73 KO se redujo en comparación con animales WT, pero este resultado no alcanzó significancia estadística.

Con respecto a los resultados de los porcentajes poblacionales observamos que cada población reacciona distinto a la deficiencia de CD73. En el caso de las poblaciones DN1, DN2 y DN4 la frecuencia de estas poblaciones aumentó en los ratones CD73 KO en comparación con los animales WT, aunque tampoco se lograron resultados estadísticamente significativos. Este resultado sugiere nuevamente que la hipótesis planteada no se cumple, ya que al menos en la población DN2 se esperaba que la deficiencia de CD73 disminuyera la supervivencia debido a la ausencia de la regulación positiva de CD127.

En el caso de la población SP CD8 se observa que no existen cambios en la expresión de CD127 en el CD73KO, sin embargo, hay una reducción en la frecuencia de células SP CD8. Esto sugiere que CD73 podría de alguna manera inhibir la diferenciación de los linfocitos T CD8, pero a través de un mecanismo que no depende de CD127. Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que CD73 y adenosina reducen la supervivencia de los linfocitos T CD8 periféricos después de la estimulación

antigénica al reducir la expresión de Bcl-2 y CD25 (Roseblatt et al., 2021). Otra posibilidad para explicar los resultados es que, en este estudio se utilizaron animales CD73 KO completo, por tanto que existen cambios compensatorios que permitirían de todas formas mantener los niveles de adenosina dentro de los rangos fisiológicos como se nombró anteriormente con lo relacionado a la expresión de ADA en el estudio de Resta et al., 1997. O bien, hay otros mecanismos por los cuales sigue produciéndose adenosina extracelular, como por ejemplo, a partir de ATP transportada desde varias células; ya sea por exocitosis, por canales iónicos o por muerte celular (Antonioli et al., 2014), lo cual puede estar sucediendo en el ratón CD73 KO.

Dicho ya todo lo anterior, una limitación de este estudio fue la baja cantidad de ratones estudiados, los cuales fueron 6, 3 de ellos correspondientes a animales WT (C57BL/6) y 3 a animales deficientes para CD73 o CD73KO. Por lo que quizás para sacar conclusiones más exactas se deben repetir estos experimentos incluyendo una mayor cantidad de individuos.

Finalmente, en la Figura 11 se expone un esquema representativo resumen de lo que se infiere de los resultados obtenidos junto con antecedentes de la literatura.

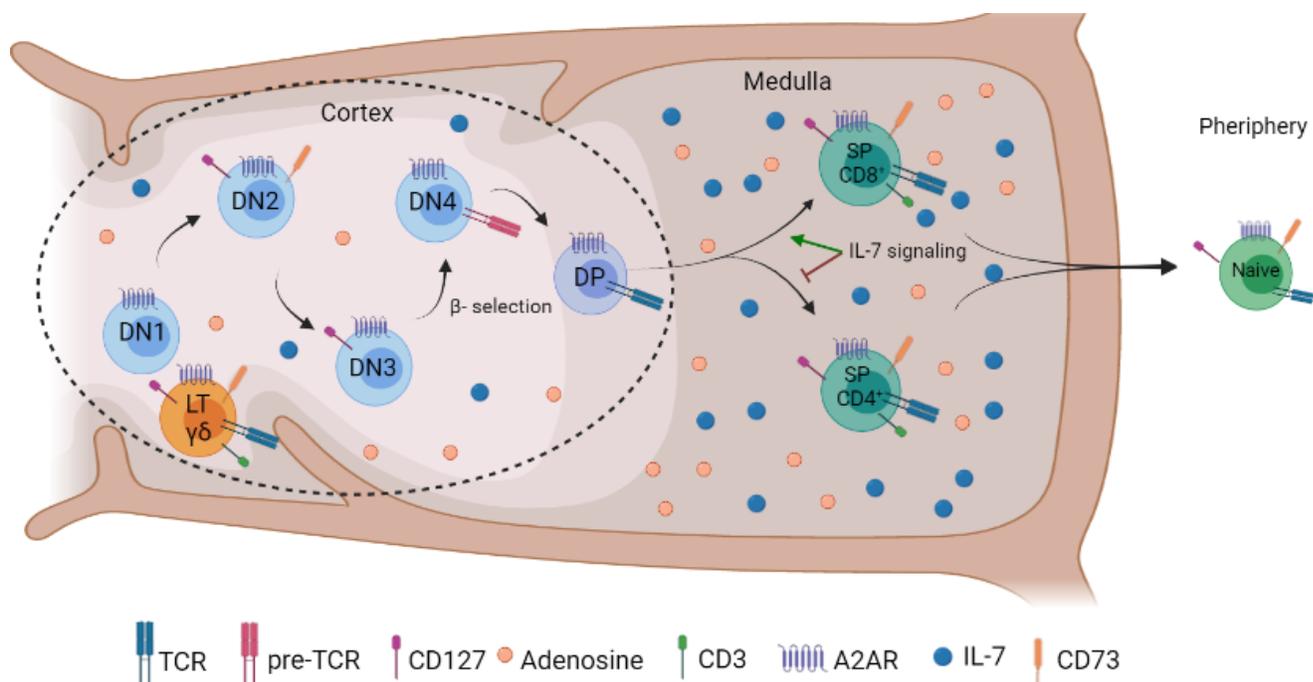


Figura 11. Esquema del timo que expone los distintos subsets de células T con su respectiva expresión de CD127, A2AR, CD3, CD73 y TCR. La corteza del timo es la zona en la que se encuentran los timocitos DN y DP y es el lugar físico donde ocurre la selección positiva. Los antecedentes exponen que CD127 es expresado en los timocitos DN2 y DN3 (Hong et al., 2012). Además, en base a los resultados obtenidos, sabemos que los linfocitos T $\gamma\delta$ están en la corteza del timo. En la zona medular del timo se encuentran los timocitos SP y es donde ocurre la selección negativa. Para que la población DP se diferencie en timocitos SP CD8 requiere de la señalización de IL-7, en cambio para diferenciarse a SP CD4 la señalización por IL-7 no es necesaria (Hong et al., 2012). Luego de estos procesos de selección en el timo los timocitos son liberados a la periferia y pasan a ser linfocitos T naive.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados expuestos en este trabajo, es posible concluir que no existe una correlación entre la expresión de CD73 y CD127 en las poblaciones tímicas, salvo en una población de células DN que podría corresponder a células T $\gamma\delta$. Por su parte, al analizar las poblaciones tímicas provenientes de animales que carecen de CD73, no se observaron cambios en la expresión de CD127, lo cual sugiere que CD73 no regula la expresión de CD127. Asimismo, al analizar el porcentaje de las diferentes poblacionales tímicas en carencia de CD73 se observa que la frecuencia de las células SP CD8 aumenta en el animal CD73KO en comparación al WT, sin embargo, debido a que la expresión de CD127 no cambia en ausencia de CD73, es probable que otros mecanismos independientes de CD127 den cuenta de este fenómeno. Finalmente, los datos sugieren que CD73 podría afectar la supervivencia o diferenciación de las células T $\gamma\delta$ debido a que observamos una reducción de la frecuencia de esta población en timocitos provenientes de animales CD73KO en comparación con animales WT.

De igual forma aún queda mucho por investigar, ya que todos los factores estudiados en este trabajo no constituyen lo que conforma en su totalidad al contexto tímico, excluyendo la influencia de otras células presentes en este órgano, como son los macrófagos y las células T $\gamma\delta$, entre otros. Si bien se ha descrito que la adenosina regula la expresión de CD127, hay muchos otros factores en este contexto que podrían estar influenciando ya sea la concentración de adenosina o la expresión de los principales actores CD73 y CD127 en esta problemática.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Antonioli, L., Csóka, B., Fornai, M., Colucci, R., Kókai, E., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2014). Adenosine and inflammation: What's new on the horizon? *Drug Discovery Today*, 19(8), 1051–1068. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.010>
- Apasov, S. G., Chen, J. F., Smith, P. T., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S., & Sitkovsky, M. V. (2000). Study of A(2A) adenosine receptor gene deficient mice reveals that adenosine analogue CGS 21680 possesses no A(2A) receptor-unrelated lymphotoxicity. *British Journal of Pharmacology*, 131(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703532>
- Barata, J. T., Silva, A., Brandao, J. G., Nadler, L. M., Cardoso, A. A., & Boussiotis, V. A. (2004). Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of Experimental Medicine*, 200(5), 659–669. <https://doi.org/10.1084/jem.20040789>
- Beavis, P. A., Stagg, J., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2012). CD73: A potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology*, 33(5), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009>
- Bono, M. R., Fernández, D., Flores-Santibáñez, F., Roseblatt, M., & Sauma, D. (2015). CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters*, 589(22), 3454–3460. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>
- Briceño, P., Rivas-Yañez, E., Roseblatt, M. V., Parra-Tello, B., Farías, P., Vargas, L., Simon, V., Cárdenas, C., Lladser, A., Salazar-Onfray, F., Elorza, A. A., Roseblatt, M., Bono, M. R., & Sauma, D. (2021). CD73 Ectonucleotidase Restrains CD8+ T Cell Metabolic Fitness and Anti-tumoral Activity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.638037>
- Bynoe, M. S., Waickman, A. T., Mahamed, D. A., Mueller, C., Mills, J. H., & Czopik, A. (2012). CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/260983>
- Carrette, F., & Surh, C. D. (2012). IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Seminars in Immunology*, 24(3), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.010>
- Cekic, C., Casella, C. R., Sag, D., Antignano, F., Kolb, J., Suttles, J., Hughes, M. R., Krystal, G., & Mitchell, T. C. (2011). MyD88-Dependent SHIP1 Regulates Proinflammatory Signaling Pathways in Dendritic Cells after Monophosphoryl Lipid A Stimulation of TLR4. *The Journal of Immunology*, 186(7), 3858–3865. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001034>
- Cekic, C., Sag, D., Day, Y. J., & Linden, J. (2013). Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance. *Journal of Experimental Medicine*, 210(12), 2693–2706. <https://doi.org/10.1084/jem.20130249>
- Coffey, F., Lee, S. Y., Buus, T. B., Holst Lauritsen, J. P., Wong, G. W., Joachims, M. L., Thompson, L. F., Zúñiga-Pflücker, J. C., Kappes, D. J., & Wiest, D. L. (2014). The TCR ligand-inducible expression of CD73 marks $\gamma\delta$ lineage commitment and a metastable intermediate in effector specification. *Journal of Experimental Medicine*, 211(2), 329–343. <https://doi.org/10.1084/jem.20131540>

- da Rocha Lapa, F., Macedo-Júnior, S. J., Luiz Cerutti, M., & Santos, A. R. S. (2014). Pharmacology of Adenosine Receptors and Their Signaling Role in Immunity and Inflammation. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.5772/57206>
- Francelin, C., & Verinaud, L. (2012). Apoptosis and the Developing T Cells. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, *01*(S3). <https://doi.org/10.4172/2155-9899.s3-001>
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Müller, C. E. (2011). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update. *Pharmacological Reviews*, *63*(1), 1–34. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>
- Goldrath, A. W., & Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, *402*(6759), 255–262. <https://doi.org/10.1038/46218>
- Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., & Butz, E. A. (2002). Cytokine requirements for acute and basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *195*(12), 1515–1522. <https://doi.org/10.1084/jem.20020033>
- Han, J. M., Patterson, S. J., & Levings, M. K. (2012). *The role of the PI3K signaling pathway in CD4 + T cell differentiation and function*. 3(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00245>
- Hand, T. W., Cui, W., Jung, Y. W., Sefik, E., Joshi, N. S., Chandele, A., Liu, Y., & Kaech, S. M. (2010). Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(38), 16601–16606. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003457107>
- Haskó, G., & Cronstein, B. N. (2004). Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, *25*(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.11.003>
- Hernandez, J. B., Newton, R. H., & Walsh, C. M. (2010). Life and death in the thymus-cell death signaling during T cell development. *Current Opinion in Cell Biology, Elsevier*, *22*(6), 865–871. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.003>
- Hong, C., Luckey, M. A., & Park, J. H. (2012). Intrathymic IL-7: The where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development. *Seminars in Immunology, Elsevier*, *24*(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.002>
- Jiang, Q., Wen, Q. L., Aiello, F. B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A. R., & Durum, S. K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine and Growth Factor Reviews, Elsevier*, *16*(4–5), 513–533. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.05.004>
- Kim, E. H., & Suresh, M. (2013). Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation. *Frontiers in Immunology*, *4*(FRB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00020>
- Kim, S., Jee, K., Kim, D., Koh, H., & Chung, J. (2001). Cyclic AMP Inhibits Akt Activity by Blocking the Membrane Localization of PDK1. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(16), 12864–12870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001492200>
- Kiss, I., Oskolás, H., Tóth, R., Bouillet, P., Tóth, K., Fülöp, A., Scholtz, B., Ledent, C., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2006). Adenosine A2A receptor-mediated cell death of mouse thymocytes involves adenylate cyclase and Bim and is negatively regulated by Nur77. *European Journal of Immunology*, *36*(6), 1559–1571. <https://doi.org/10.1002/eji.200535334>
- Köröskényi, K., Joós, G., & Szondy, Z. (2017). Adenosine in the thymus. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00932>
- Li, X., Monks, B., Ge, Q., & Birnbaum, M. J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic

- metabolism by directly inhibiting PGC-1 α transcription coactivator. *Nature*, 447(7147), 1012–1016. <https://doi.org/10.1038/nature05861>
- Lou, L., Urbani, J., Ribeiro-Neto, F., & Altschuler, D. L. (2002). cAMP inhibition of Akt is mediated by activated and phosphorylated Rap1b. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 32799–32806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201491200>
- Love, P. E., & Bhandoola, A. (2011). Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nature Reviews Immunology*, 11(7), 469–477. <https://doi.org/10.1038/nri2989>
- Mandal, M., Crusio, K. M., Meng, F., Liu, S., Kinsella, M., Clark, M. R., Takeuchi, O., & Aifantis, I. (2008). Regulation of lymphocyte progenitor survival by the proapoptotic activities of Bim and Bid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20840–20845. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807557106>
- Park, J. H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J. S., Montoya-Durango, D., Grimes, H. L., & Singer, A. (2004). Suppression of IL7R α transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: A novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity*, 21(2), 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.016>
- Parker, M. E., & Ciofani, M. (2020). Regulation of $\gamma\delta$ T Cell Effector Diversification in the Thymus. *Frontiers in Immunology*, 11(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00042>
- Peschon, B. J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsde, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D., & Davison, B. L. (1994). Early Lymphocyte Expansion Is Severely Impaired in Interleukin 7 Receptor-deficient Mice. *Journal of Experimental Medicine*, 180(November), 1955–1960.
- Resta, R., Hooker, S. W., Laurent, A. B., Rahman, S. M. J., Franklin, M., Knudsen, T. B., Nadon, N. L., & Thompson, L. F. (1997). Insights into thymic purine metabolism and adenosine deaminase deficiency revealed by transgenic mice overexpressing ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Journal of Clinical Investigation*, 99(4), 676–683. <https://doi.org/10.1172/JCI119211>
- Roseblatt, M. V., Parra-Tello, B., Briceño, P., Rivas-Yáñez, E., Tucer, S., Saavedra-Almarza, J., Hörmann, P., Martínez, B. A., Lladser, Á., Roseblatt, M., Cekic, C., Bono, M. R., & Sauma, D. (2021). Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Regulates the Survival of CD8+ T Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.647058>
- Schuler, P. J., Saze, Z., Hong, C. S., Muller, L., Gillespie, D. G., Cheng, D., Harasymczuk, M., Mandapathil, M., Lang, S., Jackson, E. K., & Whiteside, T. L. (2014). Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 177(2), 531–543. <https://doi.org/10.1111/cei.12354>
- Shi, L. Z., Saravia, J., Zeng, H., Kalupahana, N. S., Guy, C. S., Neale, G., & Chi, H. (2017). Gfi1-Foxo1 axis controls the fidelity of effector gene expression and developmental maturation of thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(1), E67–E74. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617669114>
- Staton, T. L., Lazarevic, V., Jones, D. C., Lanser, A. J., Takagi, T., Ishii, S., & Glimcher, L. H. (2011). Dampening of death pathways by schnurri-2 is essential for T-cell development. *Nature*, 472(7341), 105–110. <https://doi.org/10.1038/nature09848>
- Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden,

- R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M. P., Walker, J. R., & Hogenesch, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(16), 6062–6067. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400782101>
- Surh, C. D., & Sprent, J. (2008). Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*, *29*(6), 848–862. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.002>
- Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H. K., Hansen, K. R., Thompson, L. F., & Colgan, S. P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(7), 993–1002. <https://doi.org/10.1172/JCI0215337>
- Szondy, Z., Garabuczi, É., Tóth, K., Kiss, B., & Köröskényi, K. (2012). Thymocyte death by neglect: Contribution of engulfing macrophages. *European Journal of Immunology*, *42*(7), 1662–1667. <https://doi.org/10.1002/eji.201142338>
- Yücel, R., Karsunky, H., Klein-Hitpass, L., & Möröy, T. (2003). The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *Journal of Experimental Medicine*, *197*(7), 831–844. <https://doi.org/10.1084/jem.20021417>
- Zilberman, Y., Zafrir, E., Ovadia, H., Yefenof, E., Guy, R., & Sionov, R. V. (2004). The glucocorticoid receptor mediates the thymic epithelial cell-induced apoptosis of CD4⁺CD8⁺ thymic lymphoma cells. *Cellular Immunology*, *227*(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2004.01.005>

