



Posgrado en
Biología Experimental



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental

**“REDUCCIÓN DE LA INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR CÉLULAS T
REGULADORAS EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”**

TESIS

Para obtención de grado de
Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Biol. Exp. Paola Nallely Basurto Olvera

Matricula: 2212801120

COMITÉ DE TUTORES

Directora externa: Dra. María del Carmen Maldonado Bernal.

Director interno: Dr. Héctor Serrano

Asesora: Dra. Norma Angélica Sánchez Zauco

JURADO

Presidenta: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Secretaria: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Vocal: Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Vocal: Dra. Norma Angélica Sánchez Zauco

Ciudad de México, 14 de septiembre 2023

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONAHCYT, registrado 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Concejo, clave 2003IMPTNNN0020.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM- Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con un numero de becario/CVU 80168, en el periodo Julio 2021- Julio 2023

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal. Además del laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endócrina, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa., bajo la dirección del Dr. Héctor Fernando Serrano.

Declaración de originalidad

La que suscribe **Paola Nallely Basurto Olvera** alumna del posgrado en **Biología Experimental** de la División en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis titulada **“REDUCCIÓN DE LA INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR CÉLULAS T REGULADORAS EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”**

Declaro que:

1. La tesis que presento ante H. Jurado para la obtención de grado de Maestra en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formar alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis, respondiendo por la autoría y originalidad de esta, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si esta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad es firmada en la Ciudad de México el 15 de septiembre del 2023

Atentamente



Bio.Exp. Paola Nallely Basurto Olvera

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académico del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis Titulada “**Reducción de la inmunosupresión inducida por células T reguladoras en leucemia linfoblástica aguda**” que presenta Paola Nallely Basurto Olvera con fecha de examen 14 de septiembre 2023

Firmas

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Presidenta

UAMI Departamento de Ciencias de la Salud DCBS.
mcgr@xanum.uam.mx

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz (UAMI)
Secretaria

UAMI. Departamento de Ciencias de la Salud DCBS.
arom@xanum.uam.mx

Dra. Roxana Uri Miranda Labra.
Vocal

UAMI. Departamento de Ciencias de la Salud DCBS
roxml@xanum.uam.mx

Dra. Norma Angélica Sánchez Zauco
Vocal

UMAЕ Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.
angi_sanz@yahoo.com.mx.

Miembros del comité tutorial

DIRECTORA EXTERNA

Dra. María del Carmen Maldonado Bernal. Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México “Federico Gómez”
cmaldobe@yahoo.com.mx, Tel. 552252574

DIRECTOR INTERNO

Dr. Héctor Serrano. Lab. Biología Molecular y Regulación Endócrina, Dpto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
hser@xanum.uam.mx, Tel.5539300413.

ASESORA

Dra. Norma Angélica Sánchez Zauco, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. **angi_sanz@yahoo.com.mx**, Tel. 5531386954.

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia hematológica maligna, se presenta con la proliferación aberrante de las células precursoras hematopoyéticas de serie linfoide, es más común en edad pediátrica entre 0 -4 años. En México presenta una tasa de incidencia aproximadamente 75.3 casos por millón de personas por año y presenta una alta tasa de 26.2% recaída y mortalidad.

Dentro de las neoplasias hematológicas se ha observado que en leucemias agudas existe una relación directa con el porcentaje aumentado de células T reguladoras (Treg) y un mal pronóstico clínico, pero en la LLA aún no está esclarecido.

Las células Treg son una subpoblación de linfocitos T CD4+, y son descritas como una población inmunosupresora que juegan un papel importante en la progresión del cáncer; ya que son capaces de evadir la vigilancia antitumoral.

La señalización a través receptor de tipo-toll que se expresan en las células Treg es capaces de modular y afectar las funciones de las Treg. Así como también, influir en la modificación fenotípica de las células T reguladoras a un tipo celular que es capaz de inhibir la progresión de neoplasias, como las células efectoras Th17 y Th1, estimulada por concentraciones de citocinas en el microambiente

Lo que nos permite plantearnos como objetivo general reducir la capacidad de inmunosupresión de las células Treg, a través de la activación de sus receptores tipo-Toll 4 y 8, modificando su fenotipo de células Treg a células efectoras Th17 o Th1.

Nuestros resultados han demostrado que en pacientes recién diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda se encuentra un porcentaje de células Treg importante, en las cuales al ser activados con lipopolisacárido de *E. coli*, ligando del TLR4 (1 y 10 pg/mL) por 48 horas y R848, ligando del TLR8 (0.1 y 1 ng/mL) por 48 horas, se logra obtener un microambiente de citocinas favorable para llevar a cabo el proceso de plasticidad.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant hematological neoplasm, it presents with the aberrant proliferation of hematopoietic precursor cells of the lymphoid series, it is more common in pediatric ages between 0 -4 years. In Mexico it has an incidence rate of approximately 75.3 cases per million people per year and has a high rate of 26.2% relapse and mortality.

Within hematological neoplasms, it has been observed that in acute leukemias there is a direct relationship with the increased percentage of regulatory T cells (Treg) and a poor clinical prognosis, but in ALL it is not yet clarified.

Treg cells are a subpopulation of CD4+ T lymphocytes, and are described as an immunosuppressive population that play an important role in cancer progression; since they are capable of evading antitumor surveillance.

Signaling through toll-like receptors expressed on Treg cells is capable of modulating and affecting the functions of Tregs. As well as, influence the phenotypic modification of regulatory T cells to a cell type that is capable of inhibiting the progression of neoplasia, such as Th17 and Th1 effector cells, stimulated by concentrations of cytokines in the microenvironment.

This allows us to consider as a general objective to reduce the immunosuppression capacity of Treg cells, through the activation of their Toll-like receptors 4 and 8, modifying their phenotype from Treg cells to Th17 or Th1 effector cells.

Our results have shown that in patients newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia there is a significant percentage of Treg cells, which when activated with E. coli lipopolysaccharide, a TLR4 ligand (1 and 10 pg/mL) for 48 hours and R848, TLR8 ligand (0.1 and 1 ng/mL) for 48 hours, it is possible to obtain a favorable cytokine microenvironment to carry out the plasticity process.

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	7
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	13
Respuesta inmune.....	13
Células T reguladoras características y mecanismos supresores.....	18
Células T reguladoras y Receptores de Tipo-Toll	21
Plasticidad de células T reguladoras.....	22
Células T reguladoras y cáncer.....	24
Leucemia y células T reguladoras.....	27
ANTECEDENTES.....	32
JUSTIFICACIÓN	34
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	34
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
RESULTADOS.....	45
DISCUSIÓN	80
REFERENCIA.....	92

ABREVIATURAS

ABL1 Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (Homólogo 1 del oncogén viral de la leucemia murina de Abelson)

AP-1 Proteína activadora 1

BCR Receptor del linfocito B

CD grupo de diferenciación

CMN Células mononucleares

CTLA-4 Proteína asociada al linfocito T citotóxico-4

FoxP3 factor de transcripción Forkhead box P3

GM-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

IFN interferón

IL- interleucina

IRAK-1 Cinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1

IRAK-2 Cinasa 2 asociada al receptor de interleucina-1

IRAK4 Cinasa 4 asociada al receptor de interleucina-1

IRF7 Factor regulador de interferón 7

IκB Inhibitor of κB

JNK Jun N-terminal Cinasa

LMA leucemia mieloide aguda

LMC leucemia mieloide crónica

LPS lipopolisacárido

MAPK Proteína cinasa activada por mitógenos

MyD88 molécula adaptadora del factor de diferenciación mieloide 88

NF- κ B Factor nuclear kappa B

NK Natural Killer (asesinas naturales)

PAMP Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC Células mononucleares de sangre periférica

PRR Receptores de reconocimiento patrón

RIP1 Proteína 1 que interactúa con el receptor

ROR γ Receptor γ del ácido retinoico

ROR γ t Receptor relacionado con retinoide gamma-t

SNC sistema nervioso Central

TAB1 Proteína de unión a TAK1 1

TAK-1 Cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante beta

TCR γ/δ receptor de células T gamma/delta

TGF- β Factor beta de Crecimiento Transformante

Th linfocitos T cooperadores

TIR Toll/receptor de interleucina-1

TIRAP Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP)

TLR Receptores tipo-Toll

TNF Factor de necrosis tumoral

TRAF6 Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

Treg Células T reguladoras

TRIF Interferón- β inductor de adaptador que contiene el dominio TIR

INTRODUCCIÓN

Respuesta inmune

El sistema inmunológico es un sistema complejo y altamente especializado que desempeña un papel crucial en la protección del organismo contra patógenos invasores, y células transformadas como las células cancerosas (Abbott & Ustoyev, 2019; Idris et al., 2016)

El sistema inmunológico se divide en dos tipos de respuestas inmunitarias, la inmunidad innata e inmunidad adaptativa, aunque estas dos formas de inmunidad tienen características distintas en términos de mecanismos y componentes, también están estrechamente relacionadas y funcionan de manera integrada, para proporcionar una vigilancia inmunológica (Tomar & De, 2014).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y se activa de manera rápida y generalizada ante la presencia de agentes patógenos, integrada por barreras físicas como piel y tejido mucoso y por células especializadas como fagocitos, neutrófilos, macrófagos, NK, mastocitos, basófilos, dendríticas y eosinófilos (Kaur & Secord, 2019; Langmann & Rehli, 2010). A pesar de que las células del sistema inmune innato carecen de especificidad, expresan receptores de reconocimiento patrón (PRR) que reconocen estructuras conservadas presentes en los patógenos, como Patrones moleculares asociados al patógenos (PAMP), lo que permite una respuesta rápida y efectiva, que activan cascadas de señalización intracelular que conduce a la producción y liberación de citocinas, quimiocinas y moléculas efectoras,

así como a la activación de células fagocíticas y la presentación de antígenos (Kopp & Medzhitov, 1999; Medzhitov & Janeway, 2000; Netea et al., 2016)

Los TLR's son uno de los primeros PRR descubiertos en el sistema inmune innato; son glicoproteínas transmembranales y se componen de una región extracelular, una región transmembrana y una región intracelular (Kawai & Akira, 2010), que se pueden localizar en la superficie celular o en endosomas dentro de la célula, su localización determina el tipo de ligando y su mecanismo de reconocimiento. Hasta el momento se han descrito 10 tipos funcionales de TLR's en humanos (Chuenchor, Jin, Ravilious, & Xiao, 2014; Kopp & Medzhitov, 1999)

Los TLR desempeñan funciones importantes como reconocer PAMP estructuras moleculares específicas y altamente conservadas como lipopolisacáridos bacterianos, ácidos nucleicos virales y componentes de hongos, también son capaces de transmitir señales para activar la respuesta inflamatoria (Fitzgerald & Kagan, 2020; Saijo, Loo, & Yasuda, 2018).

La señalización de los TLR se inicia a través de al menos dos vías: una dependiente de MyD88 y la otra que es independiente de MyD88 (De Nardo, 2015; Kawai & Akira, 2010) (Figura 1)

La vía de señalización dependiente de MyD88, inicia al reconocer los dominios TIR de los TLR ya sea a través de una proteína adaptadora como TIRAP o directamente a través del dominio TIR C-terminal del MyD88. Esta interacción permite a MyD88

reclutar a IRAK4, formando un complejo que a su vez recluta IRAK-1 e IRAK-2, resultando en la autofosforilación de sus dominios de cinasas centrales.

Una vez fosforilados los IRAK abandonan MyD88 y se asocian con TRAF6, lo que induce la activación de TAK-1 y las proteínas de unión TAB1 y TAB2, estas proteínas a su vez activan la vía de señalización NF- κ B mediante la fosforilación de I κ B. Además, TAK-1 también puede activar a JNK y a la cinasa MAPK. (Takeda & Akira, 2015) (Figura 1).

La activación de I κ B induce la translocación NF- κ B y JNK y MAPK a AP-1 al núcleo para la regulación y transcripción de genes involucrados en la respuesta inmunitaria, incluyendo la secreción de citocinas inflamatorias como TNF α , IL-1, IL-6 e IL-12.(Kumar, Kawai, & Akira, 2011; Takeda & Akira, 2015; Xiang, Chao, & Feng, 2015) Además, también se ha descrito que MyD88 interactúan con IRAK4, IRAK1 para activar mediante la fosforilación al factor IRF7, el cual es esencial para la inducción de IFN de tipo 1 (Ning, Pagano, & Barber, 2011)

La vía de activación independiente de MyD88 requiere del adaptador TRIF que contiene el dominio TIR. TRIF interactúa con RIP1, lo que conduce a la poliubiquitinación de RIP1 y su combinación con los TAB, resultar en la translocación de NF- κ B y AP-1 al núcleo.(Ciesielska, Matyjek, & Kwiatkowska, 2021; Meylan et al., 2004)

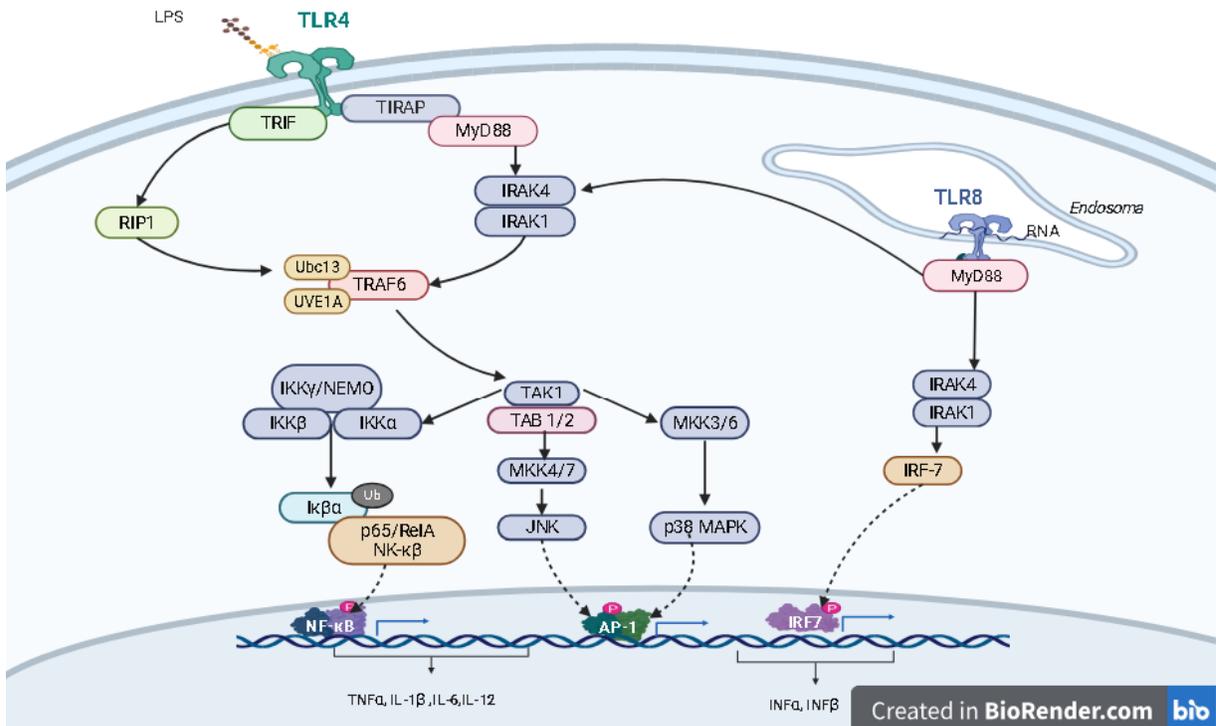


Figura 1. Representación gráfica del panorama integral de las vías de señalización, tanto dependiente como independiente de MyD88, tras la activación de los receptores TLRs 4 y 8. Esta imagen fue elaborada por Basurto Paola y se basa en los estudios de (Ning et al., 2011; Takeda & Akira, 2015).

Es importante tener en cuenta que las vías de señalización de los TLRs pueden variar según el tipo de TLR, el tipo celular y del estímulo, cada TLR puede activar una combinación específica de vías de señalización y crear una conexión entre la señal inmunitaria innata y el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa. (Fitzgerald & Kagan, 2020; Takeda & Akira, 2015).

La inmunidad adaptativa se caracteriza por su alta especificidad y capacidad de memoria, pero con dinámica de respuesta tardía, es capaz de reconocer y responder de manera eficiente a antígenos específicos (Bonilla & Oettgen, 2010)

La respuesta inmunitaria adaptativa es un proceso complejo que se va desarrollando a lo largo de la vida de un individuo. Esta respuesta es el resultado de una estrecha interacción entre antígenos anticuerpos y el sistema inmunitario innato, que actúa como el primer nivel de defensa contra las infecciones. Ambas formas de inmunidad son esenciales y se complementan entre sí para una respuesta inmunitaria efectiva (Bonilla & Oettgen, 2010; Tomar & De, 2014)

La respuesta inmune adaptativa se inicia cuando los antígenos son presentados a los linfocitos T y B, células clave en esta respuesta (Bonilla & Oettgen, 2010). Los linfocitos B producen anticuerpos que neutralizan antígenos específicos para su eliminación por otros componentes del sistema inmune, como los fagocitos y los linfocitos T citotóxicos, lo que genera la respuesta humoral (Lebien & Tedder, 2008), mientras que los linfocitos T cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+) desempeñan un papel crucial en la activación y regulación de otras células del sistema inmune, para trabajar en conjunto, garantizando una respuesta inmunitaria efectiva y coordinada (Taniuchi, 2018)

Cuando un antígeno es presentado a las células T CD4+ por células presentadoras de antígeno, las células T CD4+ se activan y se diferencian en distintas subpoblaciones, como las células Th1, Th2, Th17 y Treg (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012), con características específicas a partir de una compleja red de factores de transcripción y señalizaciones mediadas por citocinas y quimiocinas secretadas por las células del sistema inmune innato (Akkaya & Shevach, 2020; Suttmuller, Garritsen, & Adema, 2007). Cada subpoblación de células T CD4+ tiene funciones y respuestas específicas,

contribuyendo así a la eliminación efectiva de los invasores y al mantenimiento de la homeostasis inmunológica (Taniuchi, 2018).

Todos estos mecanismos inmunológicos han evolucionado para garantizar una mejor respuesta, pero al igual que muchos sistemas biológicos no siempre son infalibles. Por lo que el sistema inmunitario dispone de varios puntos de control y sistemas reguladores. Uno de los frenos más importantes de nuestro sistema de defensa inmune lo constituyen las Treg (Sutmuller et al., 2007; Taniuchi, 2018)

Células T reguladoras características y mecanismos supresores

En la década de 1995 Sakaguchi y sus colegas informaron sobre un subconjunto de células T CD4 que exhibía capacidades supresoras.

Las células Treg conforman parte de los subtipos de los linfocitos T CD4+, son células descritas como una subpoblación supresora (Josefowicz, Lu, & Rudensky, 2012). Son células especializadas en la regulación y supresión de respuestas inmunes, fundamentales en la inmunotolerancia e inmunorregulación periférica (Akkaya & Shevach, 2020), son capaces de prevenir la activación y respuesta de las células T autorreactivas, es decir, células T que reconocen y responden a antígenos propios. Así también participan en la supresión exacerbada y aberrante de células inmunitarias (Akkaya & Shevach, 2020; Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2017)

La participación de las células Treg en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica es esencial para prevenir respuestas autoinmunes y enfermedades alérgicas, así como en la promoción de la tolerancia a los trasplantes, modulando la respuesta inmunitaria

del receptor para evitar el ataque a los tejidos trasplantados y permitir la aceptación del injerto (Josefowicz et al., 2012)

Las células Treg se caracterizan por la expresión de FOXP3, fundamental para la diferenciación y el mantenimiento de las características supresoras de las células Treg (Lin et al., 2007; Marson et al., 2007). FoxP3 es inducido mediante la señalización de TGF- β en conjunto con otras señales como citocinas presentes en el microambiente en el timo y en los tejidos periféricos (Ouyang, Beckett, Ma, & Li, 2010). Las células Treg producen una cantidad significativa de TGF- β , el cual desempeña un papel crucial en la diferenciación y estabilidad de las células T reguladoras, así como en su capacidad para suprimir las respuestas inmunitarias (Tang et al., 2004; Y. Xu et al., 2021).

FoxP3 desempeña un papel importante en la función supresora y el fenotipo distintivo de las células Treg, es capaz de activar genes específicos en las células Treg, como el de interleucina (IL)-10, citocina con propiedades inmunosupresoras (Fujio, Yamamoto, & Okamura, 2017), que junto con TGF- β modulan la respuesta inmunitaria e inhiben la producción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6 y el interferón gamma (IFN- γ) (Chaudhry et al., 2011), inhiben la respuesta inmunitaria de otras células, como las células T efectoras, células dendríticas, los macrófagos, promoviendo la generación de células Treg (Rubtsov et al., 2010). Otra citocina secretada por las células Treg es la IL-35 pertenece a la familia de la IL-12, tiene potentes propiedades supresoras y desempeña un papel importante en la regulación inmunológica (Collison et al., 2007), inhibe la proliferación y

funcionalidad de células T y células dendríticas contribuyendo así a la supresión de la respuestas inmunitarias (Wei et al., 2017).

Otra característica distintiva de las células Treg es la alta expresión constitutiva de la cadena α del receptor de IL2, conocido como CD25, cuya transcripción es regulada por Foxp3 que a su vez también es capaz de reprimir la transcripción del gen IL-2 en las células Treg (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003; Marson et al., 2007; Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh, & Toda, 1995). La IL-2 es esencial para el desarrollo, mantenimiento y supervivencia de las Treg, ya que es capaz de regular la expresión de genes anti-apoptóticos (Burchill, Yang, Vang, & Farrar, 2007). Además, la IL-2 estimula la proliferación de las Tregs, lo que contribuye a su expansión (Fontenot, Rasmussen, Gavin, & Rudensky, 2005). La alta expresión de CD25 en las Treg les confiere una mayor afinidad hacia la IL-2 exógena, compitiendo con otras células, para su manteniendo supervivencia y funcionalidad (Malek et al., 2008), al mismo tiempo limitan la disponibilidad de IL-2 para otras células T efectoras, ejecutando un mecanismo de supresión por limitación de dicha citocina, también conocida como supresión por alteración metabólica (Pandiyan, Zheng, Ishihara, Reed, & Lenardo, 2007)

Las células Treg CD4+CD25+FoxP3+ también son capaces de expresar CTLA-4 el cual se centran en la supresión directa (Takahashi et al., 2000), ya que interactúa con sus ligandos CD80 y CD86 en células presentadoras de antígenos, esto provoca la detención del ciclo celular y por lo tanto, la inactividad o anergia de las células inmunitarias (Wing et al., 2008) y contribuye a su capacidad de suprimir las respuestas

inmunitarias y mantener la tolerancia inmunológica (Read, Malmström, & Powrie, 2000).

Células T reguladoras y Receptores de Tipo-Toll

Recientemente han surgido evidencias de que los TLR juegan un papel en la función inmunosupresora de las células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Caramalho et al., 2003; Voo et al., 2014). Se ha informado que las células Treg expresan TLR 2, 4 y 5 los que se encuentran principalmente en la membrana celular y son capaces de reconocer directamente PAMPs, presentes en la superficie de patógenos, como lipoproteínas bacterianas, lipopolisacáridos y flagelina (Abul K. Abbas ; Andrew H. Lichtman; Shiv Pillai., 2017; Oberg, Juricke, Kabelitz, & Wesch, 2011). También expresa TLR8, receptor de tipo intracelular que se localiza en compartimentos intracelulares y es capaz de reconocer PAMPs que han sido generados por la célula, como son los ácidos nucleicos (Blasius & Beutler, 2010). Estos TLR pueden tener diversos efectos en Treg como una mayor supresión o por el contrario, la anulación de la supresión (Chodaczek et al., 2021)

El TLR2 demostró efectos importantes en la función inmunomoduladora de las células Treg, la estimulación con lipoproteína bacterianas mostró un aumento en la capacidad supresora, inhibiendo la activación de otras células del sistema inmunológico, al promover la producción IL-10 y TGF- β , citocinas que desempeñan un papel clave en la supresión de respuestas excesivas y la promoción de la tolerancia inmunológica (H. Liu, Komai-Koma, Xu, & Liew, 2006). La activación del TLR4 a través de lipopolisacáridos , resultó en un aumento en la producción de IL-10, y con ello la

supresión de las células T efectoras (Caramalho et al., 2003). El TLR5 activado por flagelina, no solo mejora su capacidad supresora, sino también promovió la expresión de FOXP3 (Crellin et al., 2005). El TLR8 expresado en niveles altos y su activación previenen el fenotipo inhibitor de las células Treg, anulando la supresión y disminuyendo su proliferación (Peng et al., 2005)

La expresión de TLRs en las células Treg les otorga la capacidad de reconocer y responder rápidamente a estímulos inmunológicos específicos, lo que les permite participar en la regulación de la respuesta inmunitaria lo que puede tener implicaciones en enfermedades autoinmunes y en el cáncer (G. Liu & Zhao, 2007; R. F. Wang, 2006).

Plasticidad de células T reguladoras

La mayoría de las células Treg son estables en condiciones fisiológicas. En 2020 se estudió una característica importante en las células Treg que es la capacidad para cambiar su fenotipo y función en respuesta a diferentes señales del microambiente, fenómeno conocido como plasticidad (Ali, A. J. 2020, Rubtsov, Y. P., 2010) (Ali, Makings, & Ley, 2020; Rubtsov et al., 2010)

Como se ha descrito anteriormente, las células T vírgenes se pueden diferenciar en Treg localmente en un entorno de citocinas particulares como TGF- β . También demostraron que la IL-6 dificulta la diferenciación de células T vírgenes a Treg Foxp3, pero facilita la diferenciación de células T a células Th17 junto con la IL-23, en determinados contextos inmunológicos (Bettelli et al., 2006; L. Xu, Kitani, Fuss, & Strober, 2007)

Se ha observado que las células Tregs que expresan el factor de transcripción Foxp3 pueden adquirir características de células Th17 cuando se exponen a ciertas citocinas como IL-16 y factores de crecimiento (Stockinger & Veldhoen, 2007; Yang et al., 2008), junto con IL-1 β e IL-23, puede inducir una regulación negativa de Foxp3 y promover la expresión de genes asociados con las células Th17, como IL-17, IL-22, IL-23R y ROR γ (Yang et al., 2008).

También existe evidencia de que las células Treg CD4+CD25+FoxP3+ que previamente habían demostrado producir TGF- β , pueden inducir su diferenciación a células T CD4+CD25-Foxp3- o convertirse en células Th17 en ausencia de TGF- β exógeno y la presencia de IL-6 (L. Xu et al., 2007).

Se ha descrito que las Treg expresan factores de transcripción aparte de FoxP3, como T-bet, un factor de transcripción asociado con la diferenciación de células T hacia el fenotipo Th1, este factor de transcripción es necesario en las Treg para su homeostasis y función adecuada durante la inflamación de tipo 1, e influye en la producción de citocinas como IFN- γ (Koch et al., 2009). Algunas células Treg expresan tanto Foxp3 como ROR γ t y pueden perder la expresión de Foxp3 en ausencia de TGF- β y secretar IL-17 en un medio *in vitro* de citocinas Th17 (L. Xu et al., 2007)

De igual manera se ha estudiado como las células Th17 pueden exhibir plasticidad y adquirir características de otros subtipos de células T, como células T efectoras de tipo 1 (Th1) (Y. K. Lee et al., 2009). Estas células Th1 o bien exTh17 son funcionalmente distintas de las células Th1 clásicas, secretando más TNF α , IL-2, GM-CSF e IFN- γ . Las células exFoxP3 y ex-Th17 no están sujetas a la supresión de las Treg, pueden

mantener su estado efector y no son controladas por los mecanismos de supresión inmunológica que normalmente están presentes en el sistema inmunológico (Basdeo et al., 2017). Es importante mencionar que este efecto de plasticidad en células Th17, solo ocurre en dirección a la Th1 y no es bilateral como la plasticidad entre Th17 y Treg (Y. K. Lee et al., 2009).

Por lo tanto, esta creciente evidencia, nos revela que tanto las Treg como las Th17 desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis, en enfermedades autoinmunes y el cáncer.

La células Th17 desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria, la carcinogénesis y la inmunidad antitumoral (G. R. Lee, 2018; Tosolini et al., 2011), expresan el factor de transcripción maestro ROR γ t y son capaces de secretar citocinas proinflamatorias como IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22, reclutar neutrófilos y estimular la producción de quimiocinas y factores de crecimiento (Liang et al., 2006). El fenotipo Th17 se mantiene a largo plazo en presencia de IL-21 e IL-23 (Korn et al., 2007; Stritesky, Yeh, & Kaplan, 2008).

Células T reguladoras y cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja, caracterizada por el crecimiento descontrolado y la proliferación de células anormales en el cuerpo. Estas células anormales son generadas por la acumulación de mutaciones que afectan principalmente tres vías metabólicas; glucólisis aeróbica, glutaminólisis y metabolismo de un carbono, las cuales permiten que las células generen una alta producción de ATP, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otras biomoléculas, para el rápido crecimiento y división

celular (Boroughs & Deberardinis, 2015). Las células cancerosas son capaces de invadir tejido cercano y propagarse a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático, en un proceso conocido como metástasis (Vilchez Mercedes et al., 2021). Existen numerosos tipos de cáncer, cada uno con características específicas y diferentes formas de tratamiento (Hanahan & Weinberg, 2011).

Un factor importante en el cáncer es el microambiente tumoral, es decir, el entorno físico y biológico que rodea a un tumor, esto incluye células tumorales, células del sistema inmunológico y factores solubles presentes en el área cercana al tumor, que contribuye a la supervivencia y crecimiento de las células tumorales, así como a la invasión y metástasis del tumor (Montironi, Muñoz-Pinedo, & Eldering, 2021; Xiao & Yu, 2021).

Para garantizar la supervivencia y crecimiento del cáncer, las células tumorales son capaces de utilizar diferentes mecanismos inmunosupresores para evadir la vigilancia tumoral, como el reclutar a Treg a partir del microambiente tumoral (Rabinovich, Gabrilovich, & Sotomayor, 2007; Zou, 2005)

El papel de las células Treg en cáncer está respaldado por la fuerte evidencia del aumento de células Treg en cáncer de pulmón y cáncer gástrico (Sasada, Kimura, Yoshida, Kanai, & Takabayashi, 2003), mama (Bates et al., 2006), ovario (Curiel et al., 2004) y piel (Turk, Guevara-Patiño, Rizzuto, Engelhorn, & Houghton, 2004), ya sea en la circulación o en el propio tumor, esto revela que existe un reclutamiento específico de Tregs, en comparación con otras células inmunitarias.

Además del tráfico, la diferenciación y la expansión de las células Treg, también pueden estar presentes en un tumor como resultado de la conversión de células T CD4+ CD25- debido a las citocinas presentes en el microambiente tumoral favorables para impulsar la diferenciación de las Treg, como IL-10 y TGF β (Chen et al., 2003). Las células Treg CD4 + CD25 + FoxP3 + pueden modular negativamente las respuestas antitumorales mediante la liberación de factores solubles como IL-10 y TGF β y el contacto directo célula-célula (H. Y. Wang et al., 2004).

La inmunosupresión mediada por las células Treg se ha confirmado debido a la falta de respuesta inmune anti-tumoral y al desarrollo de respuestas efectoras, así como la respuesta deficiente a la inmunoterapia en pacientes con cáncer, que presentan un aumento de células Treg (G. Liu & Zhao, 2007; Szczepanski et al., 2009). Lo que evidencia que las Treg tienen una función clave en la obstrucción de la inmunovigilancia tumoral (G. Liu & Zhao, 2007; G. Zhou & Levitsky, 2007) a través de la secreción de diferentes citocinas, como IL-2, IL-10 y TGF- β (Oleinika, Nibbs, Graham, & Fraser, 2013).

También se ha reportado que el aumento de células Treg infiltrantes provoca una disminución de células CD8 infiltrantes en el tumor, lo que representa un mal pronóstico en cáncer de mama (Bates et al., 2006).

Asimismo es importante destacar que este efecto de las células Treg en los diferentes tipos de cáncer, no es igual. En el cáncer colorrectal el aumento de Treg se asocia con un pronóstico favorable en pacientes, los autores sugieren que las células Treg

FOXP3+ pueden suprimir la progresión del cáncer (Álvaro et al., 2005; Frey et al., 2010; Salama et al., 2009).

Esta poco descrito el efecto de la secreción de citocinas mediadas por la activación de los TLR en las células Treg y cómo puede favorecer al microambiente tumoral (Pahlavanneshan, Sayadmanesh, Ebrahimiyan, & Basiri, 2021).

Leucemia y células T reguladoras

Al igual que las neoplasias tumorales, en las neoplasias de tipo hematológicas como las leucemias, es importante evaluar el papel de las Treg.

El inicio del estudio de las leucemias fue en el año de 1845, por dos grandes médicos John Bennetty Rudolph Virchow, quienes observaron un aumento de glóbulos blancos que formaban una densa y lechosa sustancia, parecida a la pus, pero sin ninguna herida o infección aparente en diferentes autopsias de pacientes. Acuñaron el nombre de leucaemia del griego λευκός leukós 'blanco' y αἷμα haîma 'sangre' “sangre blanca” a esta afección, la cual era una descripción literal de lo que se observaba. A medida que la investigación y la comprensión de las leucemias avanzaron a lo largo de los años se reconoció a la leucemia como una neoplasia de sangre, por proliferación maligna de glóbulos blancos y se establecieron clasificaciones más detalladas (Mukherjee, 2012).

La leucemia es un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas malignas que se produce debido a la transformación maligna y proliferación aberrante de células hematopoyéticas pluripotentes y puede afectar a los tejidos productores de sangre. Se

propaga por todo el cuerpo a través de la sangre y los ganglios linfáticos. (Bothale, Bothale, Mahore, & Dongre, 2018; Chennamadhavuni A, Lyengar V, & Mukkamalla SKR, 2023). Las células leucémicas pueden infiltrar y diseminarse en otros órganos, como los ganglios linfáticos (Hartmann, Rudelius, Burger, & Rosenwald, 2016), el bazo (Ma et al., 2014), el hígado (Kakisaka, Suzuki, Kowata, Ito, & Takikawa, 2021), el sistema nervioso central (SNC) (Castellanos-Martínez et al., 2023), testículos (Colby-Graham & Chordas, 2003), piel (Prada Garcia, Sanchez Sambucety, & Rodriguez Prieto, 2013) y sistema gastrointestinal (Ebert & Hagspiel, 2012). Algunos de estos órganos infiltrados, funcionan como un sitio santuario para las células leucémicas, es decir, un sitio anatómico donde las células leucémicas pueden protegerse de agentes quimioterapéuticos y del sistema inmunológico (Herrera-Lomonaco, 2017), como el SNC el cual está protegido por una barrera hematoencefálica que dificulta que los medicamentos quimioterapéuticos alcancen las células leucémicas (Engelhardt, Patkar, & Ogunshola, 2014) y los testículos que presentan una barrera hematotesticular y junto con la testosterona puede ayudar a las células leucémicas a sobrevivir (de Jesus, Dekermacher, Resende, & Justiniano, 2022; Pereira & Garcia E Costa, 2007).

La clasificación de la leucemia se basa en el linaje celular predominante que es afectado y el nivel de diferenciación celular. Esto ayuda a determinar el tipo específico de leucemia y guía el enfoque de tratamiento. Los dos principales linajes celulares afectados en la leucemia son el mieloide y el linfoide, tanto las leucemias mieloides

como las linfoides pueden proliferar en formas agudas o crónicas (Arber et al., 2022; Colby-Graham & Chordas, 2003)

En las leucemias de tipo mieloides está implicada la proliferación anormal de las células mieloides inmaduras o anormales en la médula ósea. Se puede distinguir diferentes subtipos de leucemias mieloides, en función de la madurez y el nivel de diferenciación de las células afectadas (Chennamadhavuni A et al., 2023). La leucemia mieloides aguda (LMA) se caracteriza por una proliferación descontrolada de blastos mieloides que son células inmaduras, que no se diferencian correctamente, lo que afecta la producción normal de células sanguíneas (Döhner et al., 2017; Weinberg et al., 2023) y la leucemia mieloides crónica (LMC) es generada por la presencia de una translocación cromosómica recíproca entre el cromosoma 9 y el cromosoma 22, conocida como translocación Filadelfia. Esta translocación resulta en la fusión de dos genes BCR y ABL1, este gen es capaz de producir una proteína tirosina cinasa desregulada llamada BCR-ABL1 lo que conduce a la proliferación celular descontrolada y a la inhibición de la apoptosis en las células de la linaje mieloides (Burslem et al., 2019; T. Zhou, Medeiros, & Hu, 2018).

La leucemia linfoides implica una proliferación anormal de células linfoides inmaduras o anormales en la médula ósea. Al igual que con la leucemia mieloides, se pueden distinguir diferentes subtipos de leucemia linfoides, según el nivel de diferenciación de las células afectadas (Chennamadhavuni A et al., 2023). La leucemia linfoides crónica (LLC) se caracteriza por la proliferación de células linfocíticas maduras anormales principalmente linfocitos B. Es el tipo más común de leucemia en adultos y

generalmente afecta a personas mayores, con una mayor incidencia en las edades de 60 a 70 años (Bosch & Dalla-Favera, 2019; Zang & Kipps, 2014). En contraste, la leucemia linfocítica aguda (LLA) se caracteriza por la producción aberrante de células precursoras hematopoyéticas de la serie linfocítica en la médula ósea. La morfología e inmunofenotipo de las células de la LLA es semejante a las células precursoras de linaje B y linaje T (Onciu, 2009; Pérez-Figueroa et al., 2016; Silverman, 2007). La LLA se identifica en función de su morfología, inmunofenotipo, citogenética y anomalías moleculares (Craddock, 2009; O'Brien, Seif, & Hunger, 2018; Wu, Qing, Wu, Zhu, & Zhou, 2012). Es importante destacar que la LLA es más común en la población pediátrica, representando hasta el 80% de los casos en este grupo de edad y es más común en los primeros años de la niñez, entre los 2 y los 5 años a nivel internacional (Inaba & Pui, 2021; Madhusoodhan, Carroll, & Bhatla, 2016).

Los pacientes diagnosticados con LLA pueden tener una tasa de supervivencia de hasta el 90% si reciben un tratamiento correcto. Sin embargo, la recaída puede ocurrir con una tasa de supervivencia del 10-20% de estos pacientes, ya que presentan una mayor resistencia al tratamientos (O'Brien et al., 2018; Pogorzala, Kubicka, Rafinska, Wysocki, & Styczynski, 2015)

En México, más del 50% de los casos de cáncer pediátrico corresponden a leucemias agudas, con una incidencia de 75.3 casos por millón de personas por año y una mayor prevalencia en las edades de 2 a 4 años (Zapata-Tarrés, Balandrán, Rivera-Luna, & Pelayo, 2021). En México, como en América Latina, se ha registrado una tasa de 26.2% de recaída y una mortalidad por enfermedad de 4 a 7 veces mayor que en el

resto del mundo, en niños de 0 a 19 años (Núñez-Enríquez et al., 2016) (GLOBOCAN 2020)

Se ha observado que pacientes adultos con leucemia mieloide aguda están altamente inmunodeprimidos y una de las razones es la acumulación y activación de las células Treg en sangre periférica que fue de $4,2 \pm 0,3\%$ en comparación con donadores sanos adultos $1,4 \pm 0,1\%$, siendo ésta una característica importante del microambiente del cáncer (Szczepanski et al., 2009). Lo que sugiere que en las neoplasias hematológicas, al igual que en las neoplasias tumorales, el aumento de células Treg se relaciona con un mal pronóstico clínico. (Shenghui et al., 2011; Y. Xu et al., 2021).

En la leucemia mieloide aguda se ha demostrado un aumento de las células Treg en el microambiente tumoral y este aumento tiene un impacto negativo en la respuesta inmunitaria antitumoral, al suprimir la actividad de las células T efectoras y limitar la eliminación de las células leucémicas. Esto puede contribuir a la progresión de la enfermedad y a un peor pronóstico clínico (Shenghui et al., 2011; Y. Xu et al., 2021). Esto ocurre porque las células leucémicas son capaces de reclutar a las células Treg, para evadir la vigilancia inmune, favoreciendo la progresión del cáncer (Ustun, Miller, Munn, Weisdorf, & Blazar, 2011).

ANTECEDENTES

Se ha observado un aumento de células Treg, en sangre periférica de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y que el aumento de células Treg mostró en los pacientes una mayor capacidad de inmunosupresión, comparadas con los individuos con niveles normales de Treg (Bhattacharya, Chandra, & Mandal, 2014).

En contraste, un estudio recientes en niños con LLA-B, no se observó un aumento estadísticamente significativo de células Treg en sangre al momento del diagnóstico $2,3 \pm 0,1\%$ en comparación con los niños sanos $1,9 \pm 0,1\%$, pero si se encontró una disminución significativa al momento de la remisión total (Zahran et al., 2021)

Estos hallazgos aunados a otras investigaciones dentro de nuestro grupo de trabajo, donde se ha evaluado la expresión de TLR en PBMC de niños con LLA, mostrando que existe una expresión diferencial de TLRs en células inmunes normales y en células malignas. Con ello nos proporciona información sobre la importancia la expresión de TLR en las Treg pero no en las células T vírgenes como TLR8, TLR4 y TLR5 (Sánchez-Cuaxospa et al., 2016).

También se ha reportado en paciente pediátricos con LLA un microambiente desregulado, con incrementos de citocinas como IL-1 β , IL-8, IL-10, IFN- γ , IL-17 y TNF- α , que son consideradas moléculas puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa a través de la polarización de las células T y probablemente con algún efecto sobre las células Treg (Pérez-Figueroa et al., 2016).

Existe evidencia que los TLRs, antes mencionados pueden influir en la polarización de los linfocitos Treg hacia diferentes subpoblaciones como Th17 o Th1, así como modular la actividad supresora de las células Treg (Oberge et al., 2011; Pahlavanneshan et al., 2021).

El linaje de Th17 en el microambiente tumoral es de gran importancia debido a que se ha reportado que presenta varios mecanismos que son capaces de controlar el crecimiento tumoral; como reclutamiento de varias células inmunitarias, incluidas DC, células T CD4 + y células CD8 +, de esta manera son capaces de inhibir el desarrollo del cáncer (Bettelli et al., 2006; Guéry & Hugues, 2015). En cáncer de ovario las células Th17 infiltradas en el tumor pueden desempeñar un papel protector en el cáncer de ovario, secretando IL-17 que puede ayudar a eliminar las células tumorales. (Kryczek et al., 2009).

JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es la neoplasia maligna más frecuente en niños, principalmente como una enfermedad *de novo*, con una tasa de supervivencia de hasta 90%, si es diagnosticada y tratada de manera oportuna. Sin embargo, la recaída es de 15 -20 %, lo que presenta un mal pronóstico.

Las células Treg, tienen un papel importante en la supresión de la respuesta inmune anti-tumoral. Hallazgos recientes han demostrado un mayor porcentaje de células Treg en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, con respecto a individuos sanos, por lo que pueden ser un blanco terapéutico, utilizando su capacidad de plasticidad, influenciada por un microambiente de citocinas, que puede estar regulado por la activación de los TLRs.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efectos tiene la activación de los TLRs 4 y 8 sobre la reducción de la inmunosupresión de las células T reguladoras en la leucemia linfoblástica aguda?

HIPÓTESIS

La activación de los TLRs 4 y 8 en células T reguladoras de pacientes con LLA modificará su función inmunosupresora.

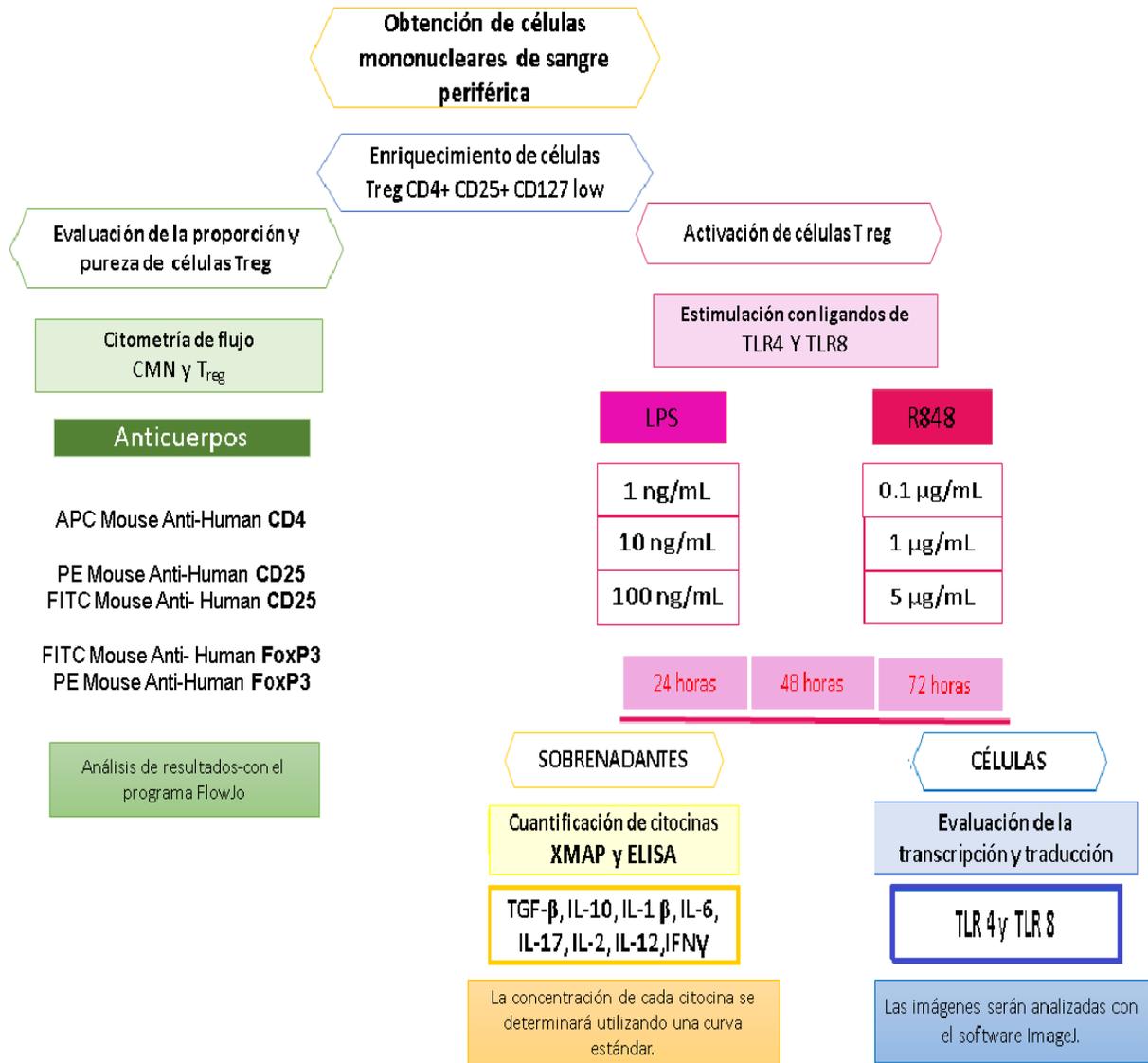
OBJETIVO GENERAL

Reducir la capacidad de inmunosupresora de las células Treg, a través de la activación de los receptores tipo-Toll 4 y 8, modificando su fenotipo de células Treg a células efectoras Th17 y/o Th1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer la frecuencia de las células T reguladoras de sangre periférica de niños con LLA.
- Establecer la concentración y tiempo de activación óptimos de los ligandos específicos de los TLRs 4 y 8 de las células Treg
- Determinar el cambio de inmunofenotipo de las células Treg activadas con los ligandos del TLR 4 Y 8 mediante sus marcadores específicos y la producción de las citocinas TGF- β , IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- γ , IL-2 e IL-12
- Correlacionar la transcripción de TLR4 y TLR8 con la síntesis de sus proteínas correspondientes, en el proceso de plasticidad de las Treg.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestra

La obtención de muestras se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo el consentimiento informado y firmado de los padres o tutores del menor, así como también el asentimiento de los niños mayores de 9 años.

Las muestras se obtuvieron de pacientes pediátricos de 1 a 18 años, género indistinto, recién diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, que no hayan recibido tratamiento antineoplásico o transfusión.

La obtención de muestra consistió en la toma de 2 a 4 mL de sangre periférica obtenida junto con las muestras necesarias para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

También se trabajó con muestra de concentrados leucocitarios de donadores sanos.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

El método utilizado fue por separación mediante gradiente de densidad, el cual consiste en diluir la sangre periférica obtenida en una proporción 1:2 con solución salina (NaCl) 0.9%. En tubos de 15ml se colocó Lymphoprep™ (Axis-Shield #114547) y sobre éste se colocó suavemente la sangre diluida, se centrifugó a 800 xg por 30 minutos, disminuyendo la aceleración y desaceleración a 0.

Se retiró la primera fase y se recolectó el anillo de células mononucleares de la muestra, las cuales fueron lavadas con solución salina (NaCl) 0.9%.

Para la obtención de células a partir de concentrado leucocitario, se realizó una dilución 1:4 con solución salina (NaCl) 0.9% y se siguió el mismo protocolo de separación por gradiente de densidad

Enriquecimiento de células CD4+CD25+, aislamiento y caracterización de las células Treg)

Las células mononucleares (CMN) obtenidas sirvieron para enriquecer las células reguladoras CD4+ CD25+ mediante el kit CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Cat. 130-091-301), el cual es un procedimiento de dos pasos. El primer paso consiste en el agotamiento mediante marcaje magnético de células No CD4+, con ayuda de un coctel de anticuerpos (CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , y CD235a) conjugados con biotina y anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados con microperlas, estas células marcadas magnéticamente se agotan mediante separación en una columna colocada en un campo magnético y se colectó el efluente que pasa a través de la columna, conteniendo células CD4+. En el segundo paso, las células CD4+ obtenidas del efluente, son marcadas directamente con microperlas CD25+ y se aíslan mediante selección positiva, a través de una segunda columna colocada en el campo magnético, por el cual se deja pasar la suspensión celular, en esta ocasión el efluente es descartado. Se retira la columna del campo magnético, ya que las células T reguladoras CD4+ CD25+ quedan retenidas magnéticamente, por lo que se requiere una serie de lavados para obtener las células marcadas.

Se utilizó un segundo kit para el enriquecimiento de Treg EasySep™ Human CD4+CD127lowCD25+ Regulatory T Cell Isolation (STEMCELL Technologies, Cat 180663). Esto se realizó para tener una mayor pureza.

Con este kit se pueden obtener células Treg CD4+ CD127low CD25+ humanas a partir de PBMC frescas o previamente congeladas o muestras de leucoaféresis. Las células CD25+ CD4+ se aíslan mediante una selección positiva inmunomagnética, utilizando EasySep™ Releasable RapidSpheres™, posteriormente esta fracción aislada, es marcada con anti-CD127 y se vuelven a seleccionar inmunomagnéticamente. La fracción aislada final contiene células CD4+ CD127low CD25+ altamente purificadas que expresan altos niveles de FOXP3 y las células no Treg no deseadas se eliminan.

Análisis de pureza de células Treg por citometría de flujo

El análisis y clasificación de células individuales en células mononucleares y células T reguladoras se realizó por citómetro de flujo con base a diferentes características, como el tamaño, la granularidad y la expresión de marcadores específicos que permiten identificar las células Treg.

Se realizaron tinciones celulares para la lectura en el citómetro de flujo CytoFLEX (LX 39eckman coulter). Para la tinción extracelular se utilizaron 2 µL APC Mouse Anti-Human CD4 (BD Pharmingen #555349), 5 µL FITC Mouse Anti-Human CD25 (BD Pharmingen, #555431), 2 µL PE Mouse Anti-Human CD25 clona 2A3 (Stemcell, Cat.60153PE) , los cuales se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, aconticunacion se realizó un lavado con solución de tinción (PBS 1X y BSA

al 1%) y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado de la misma manera, al finalizar los lavados se colocaron 200 µL de solución permeabilizadora de la célula Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Cat. 554722) la cual se dejó incubando 20 minutos a 4°C, se realizó un lavado con Perm/Wash (BD Biosciences Cat. 554723) y se centrifugaron la células a 2500 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se procedió a realizar la tinción intracelular con 5 µL PE Mouse Anti- Human FoxP3 (BD Pharmingen #560046) o 3 µL FITC Mouse Anti- Human FoxP3 (Biolegen Cat.320106) se incubó durante 30 minutos a 4°C y se lavaron las células con Perm/Wash, se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos y se decantaron los sobrenadantes, finalmente las células fueron fijadas con formaldehído al 4%.

Cultivos de células Treg y activación

Se cultivaron 50,000 células Treg por pozo en microplacas de 96 pozos, contenidas en un volumen de 300 µL de medio RPMI 1640 (Corning, 10-040-CV) suplementado con SFB (Gibco 16000044) al 2% inactivado por calor.

Las células Treg fueron estimuladas con diferentes concentraciones de ligandos específicos para TLR4 y TLR8.

Para estimular al TLR4, se utilizó LPS de E. coli serotipo 0111:B4 (Sigma #93572-42-0) en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL. Por otro lado, para estimular el TLR8, se utilizó R848 (Enzon Life sciences #ALX420038) en concentraciones de 0.1, 1 y 5

µg/mL. Cada concentración de ligando fue evaluada por duplicado. Bajo estas condiciones se incubaron a 24, 48 y 72 horas.

Al finalizar el tiempo de incubación se cosecharon las células mediante centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos y se obtuvieron los sobrenadantes con los que se realizaron los ensayos de ELISA para cuantificar IL-10 y TGF-β. Las células fueron fijadas con 200µL de solución de etanol y ácido acético en proporción 3:1 y se conservaron a -20°C, esta solución ayuda a preservar la integridad de las células y sus componentes. Posteriormente fueron utilizados para la determinación de síntesis de proteína de TLR4 Y TLR8.

Determinación de la concentración de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos de Treg.

Se desarrollaron ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas ELISA Set Human TGF-β (BD OptEIA Cat. 559119) para la detección y cuantificación de TGF-β en los sobrenadantes de cada tratamiento.

Las ELISAS se realizaron en microplacas de 96 pozos, los cuales se recubrieron con el anticuerpo de captura y se incubaron durante toda la noche a 4°C, posteriormente se usó una solución de bloqueo constituida por amortiguador de fosfatos salino y suero fetal bovino (SFB); para evitar uniones inespecíficas. Se realizaron los lavados indicados por el fabricante y se procedieron a colocar las muestras y las concentraciones indicadas para la curva estándar. La microplaca se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron los lavados necesarios para la

eliminación de moléculas no adheridas. Se agregó solución de detección, compuesto de un anticuerpo de detección y un reactivo enzimático conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano, se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y se realizaron los lavados indicados.

Para finalizar se colocó la solución de sustrato que contiene tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno, se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se colocó la solución de paro que consiste en ácido sulfúrico 2N.

La enzima produce una reacción colorimétrica en presencia del sustrato, lo que indica la presencia de la proteína de interés. Se procedió a leer en un espectrómetro de microplacas Epoch 3S Biotek a 450 nm y 570 nm

Las citocinas IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-2, IL-12 e IFN- γ se cuantificaron en los sueros de pacientes y controles utilizando la tecnología multiplex analyte profiling (xMAP) con el kit Millipore HSCYTOMAG-60K (LumineX, perlas magnéticas; Millipore, Billerica) y se leyeron en un equipo MAGPIX (Luminex Magpix MAGPX12234704) Todos los reactivos se proporcionaron en el kit y se prepararon de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se preparó la placa agregando 200 μ L de solución amortiguadora de lavado a cada pozo y se dejó incubar en movimiento durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó la solución amortiguadora de lavado, se colocaron 25 μ L de las concentraciones indicadas para la curva estándar, controles alto y bajo y las muestras

con solución reguladora de ensayo, matriz de suero y microperlas, se selló la microplaca con papel aluminio y se incubó en movimiento a 4°C toda la noche.

Se vertió el contenido de la placa y se realizaron los lavados correspondientes. A continuación, se agregaron 25µL del anticuerpo de detección, el cual se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Después se agregaron 25 µL de estreptavidina ficoeritrina a cada pocillo y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se realizaron los lavados indicados y se agregaron 150 µL de MaGPIX Drive Fluid (Luminex 40-50013)

Finalmente, la placa se leyó en el MAGPIX (Luminex Magpix MAGPX12234704). Cada muestra se analizó por duplicado y la concentración media de cada analito se calculó utilizando la curva estándar correspondiente a la citocina de prueba.

Determinación de la correlación de la transcripción de TLR4 y 8 y su traducción en células inducidas.

Se realizó el diseño de las sondas para TLR4 Y 8 con el programa National Center for Biotechnology Information NCBI Gene, siguiendo los siguientes criterios: Longitud de 25 nucleótidos, concentración de Citocinas y Guaninas mayor al 50%, con una especificidad mayor al 85% y una temperatura de fusión (TM) de 50°C. Se seleccionaron los fluorocromos Alexa Fluor 350 azul- brillante que es excitable a 350 nm, Alexa Flúor 647 rojo-lejano, excitable a 594 nm.

Las células fijadas de los cultivos tratados con ligandos de los TLR, así como las células sin estimulación fueron procesadas para este estudio, el cual se realizó en la

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. El protocolo que se utilizó fue basado en lo indicado en Angerer y colaboradores (1981).

El fijador se retiró y se hizo un lavado con solución salina de fosfatos por sus siglas en inglés (PBS)1x para retirar los restos de fijador. Las células se resuspendieron en solución permeabilizante de tritón 1% incubándose por 15 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de los TLR se hizo una estrategia de dos pasos en la cual uno de ellos estaba marcado con un fluoróforo mientras el otro requirió de una detección con un anticuerpo secundario marcado.

Las células se resuspendieron e incubaron con el anticuerpo anti TLR4- PE en concentración 1:100 (Invitrogen #12-9917-42) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. El exceso de anticuerpo se retiró con un lavado en PBS antes de que las células se incubaran con el anticuerpo anti TLR8 a 1:100 (Santa cruz SC-17585). La presencia de este anticuerpo fue detectada al incubar con un anticuerpo secundario conjugado con rabbit anti-goat IgG FITC a 1:150 (Invitrogen ZyMax cat. 81-1600) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, para hacer la detección de núcleos celulares, se realizaron dos lavados con PBS y se agregó DAPI al 1:10,000 (Invitrogen D1306) durante 4 minutos. El exceso de DAPI se retiró con 4 lavados con PBS 1X. Las células se colocaron sobre portaobjetos socavados y antes de ser cubiertos se adicionaron 8 μ L de medio de montaje Live Antifade Reagent (ProLong cat: P36975) y se procedió a su lectura en el microscopio Confocal (ZEISS LSM 900 with Airyscan 2, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania)

RESULTADOS

Pureza de células Treg CD4+CD25+Foxp3 a partir de CMN

Mostramos los resultados representativos de la caracterización de células Treg por citometría de flujo, contenidas en CMN totales obtenidas por enriquecimiento, procesados a partir de concentrado leucocitario de donadores sanos (Figura2). En los cuales, podemos observar a las células Treg CD4+CD25+FoxP3+ y otras poblaciones celulares, así como de restos celulares, tanto en la CMN como en las células Treg.

El porcentaje de Treg contenidas en CMN se realizó partiendo de la población celular CD4+ e identificando la población CD25+ y FoxP3+ (Figura 2A). Se obtuvo una mediana de 1.71% (0.5-5.2) a partir de 6 experimentos (Tabla 1). Después de realizar el enriquecimiento con el kit Miltenyi Biotec, las células obtenidas fueron contabilizadas en cada caso, los porcentajes de células fue mayor al esperado con una mediana de 5.98% (1.6-17.5%) (Tabla1). Su caracterización se realizó a partir de la población CD4+ y la identificación de CD25+ y FoxP3 (Figura 2B). Los resultados de los 6 experimentos nos proporcionaron una mediana de 19.50% (0.14-70%) (Tabla 1) de células Treg, aproximadamente el 80% de la células obtenidas por este método de enriquecimiento pertenecían a otra población celular no Treg, con un marcaje positivo para CD4+ pero no para CD25 y FoxP3 (Figura 2B).

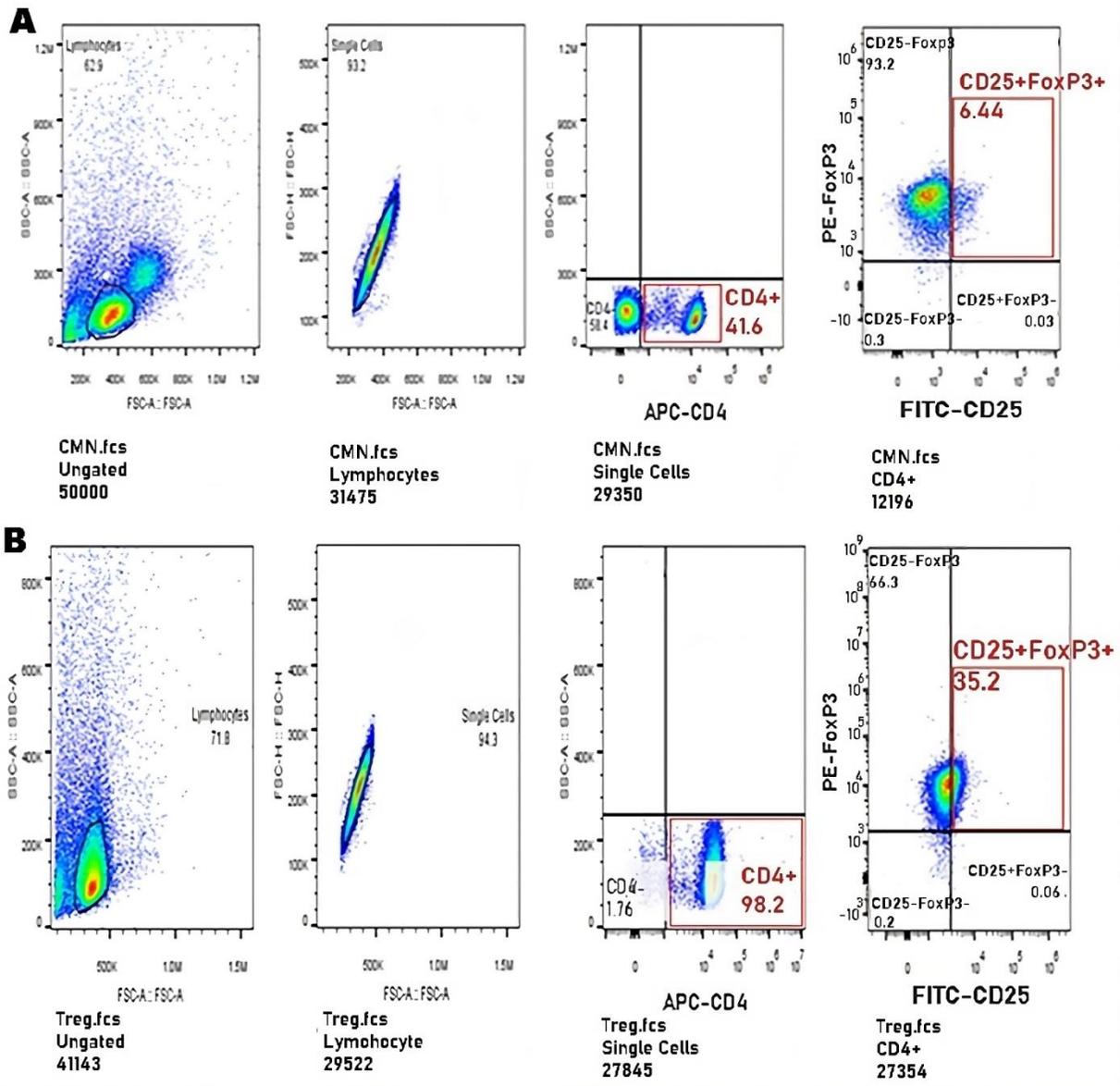


Figura 2. Identificación de células Treg obtenidas de donador sano A) Células Treg identificadas en mononucleares obtenidas por gradiente de densidad B) Células enriquecidas CD4+ CD25+ obtenidas con “CD4+CD25+Regulatory T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec). Imagen representativas de citometría de flujo, teñidos con APC Mouse Anti-Human CD4, FITC Mouse Anti-Human CD25 y PE Mouse Anti-Human FoxP3

El porcentaje de células Treg CD4+ CD25+ FoxP3+, así como la gran dispersión de datos entre los experimentos al momento del realizar el enriquecimiento, nos muestra poca pureza en su obtención.

Durante la realización del enriquecimiento con el kit “CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human” (Miltenyi Biotec) se determinó que el procedimiento depende de múltiples factores, como; la temperatura de los reactivos utilizados, el pH, también se debe realizar de manera rápida para lograr una mayor eficiencia y evitar la formación de burbujas de aire dentro de la columna, por lo que todos estos factores deben controlarse adecuadamente para la correcta obtención de células Treg y con una alta pureza. Durante los experimentos de enriquecimiento con este kit se realizaron modificaciones, en cuanto a la cantidad de células procesadas, para una mejor obtención de células enriquecidas. Tomando en cuenta los primeros resultados y buscando la forma de optimizar el proceso, lo cual no se logró. Debido a que la pureza de las células obtenidas jamás fue aceptable para este proyecto.

Se realizó el uso de un segundo kit de enriquecimiento de Treg EasySep™ Human CD4+CD127lowCD25+ Regulatory T Cell Isolation de STEMCELL. Mostramos una imagen representativa de la caracterización de las células Treg contenidas en CMN por citometría de flujo en donde se obtuvo una mediana 1.01% (0.8-2.4%) de 6 experimentos (Figura 3A).

Las CMN se sometieron al proceso de enriquecimiento con el kit EasySep™ Human CD4+CD127lowCD25+ Regulatory T Cell Isolation, finalizando el procedimiento las células se contabilizaron, obtuvimos un porcentaje de 1.09% (0.64 -2.49%) (Tabla 1)

Las células Treg obtenidas tras enriquecimientos fueron analizadas por citometría de flujo, para conocer la pureza, analizando las células a partir de la población CD4+ y las células doble positiva para CD25/ FoxP3 (Figura 3B), los resultados obtenidos de los 6 experimentos mostraron una mediana de 92% (80-90) (Tabla 1), lo cual representa un porcentaje de pureza aceptable y una dispersión entre experimentos también aceptable para el uso en las muestras de pacientes pediátricos con LLA de este proyecto.

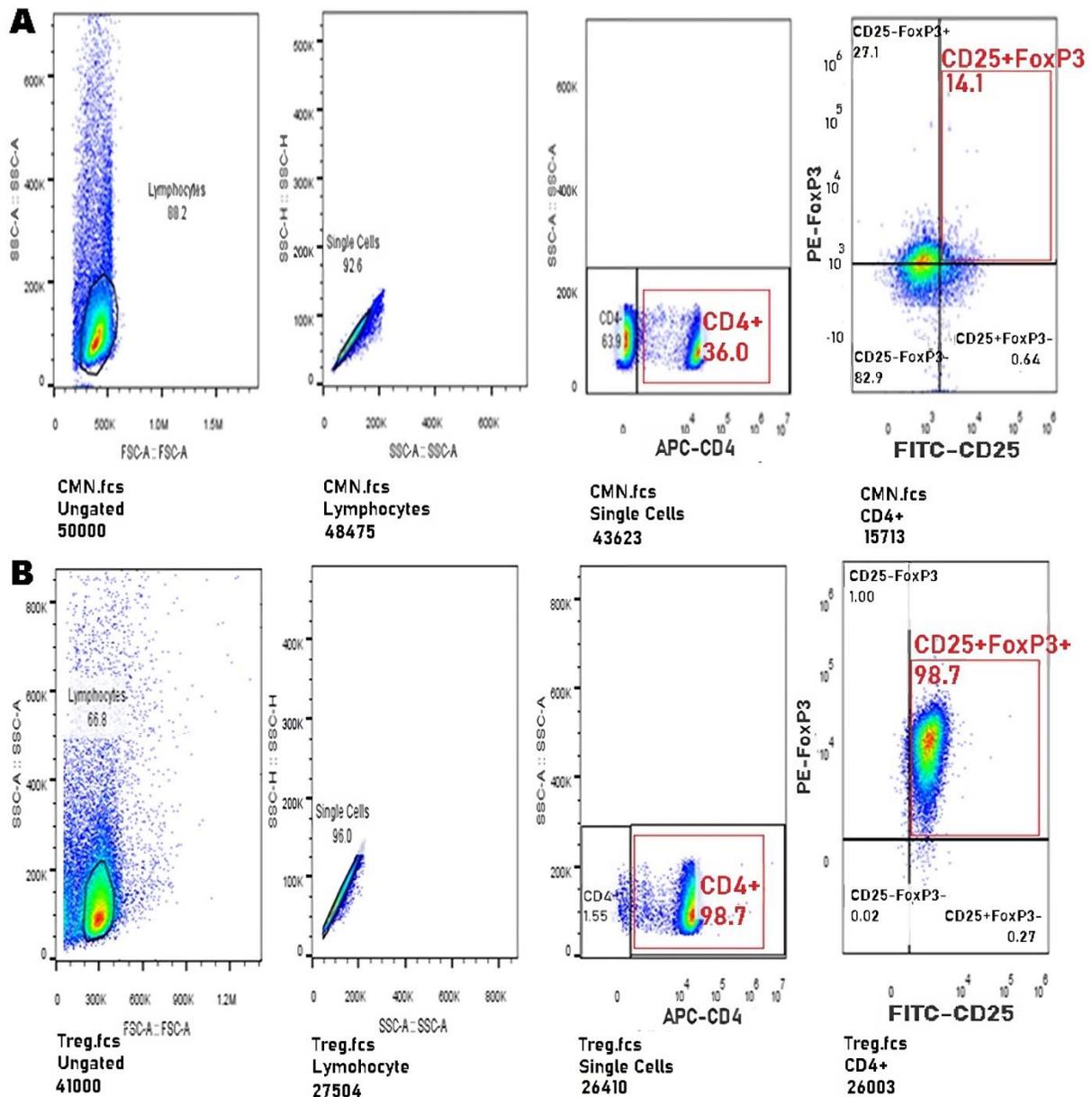


Figura 3. Identificación de células Treg obtenidas de donador sano A) Células Treg identificadas en mononucleares obtenidas por gradiente de densidad B) Células enriquecidas CD4+ CD25+ obtenidas con “CD4+CD25+Regulatory T Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec). Imagen representativas de citometría de flujo, teñidos con APC Mouse Anti-Human CD4, FITC Mouse Anti-Human CD25 y PE Mouse Anti-Human FoxP3

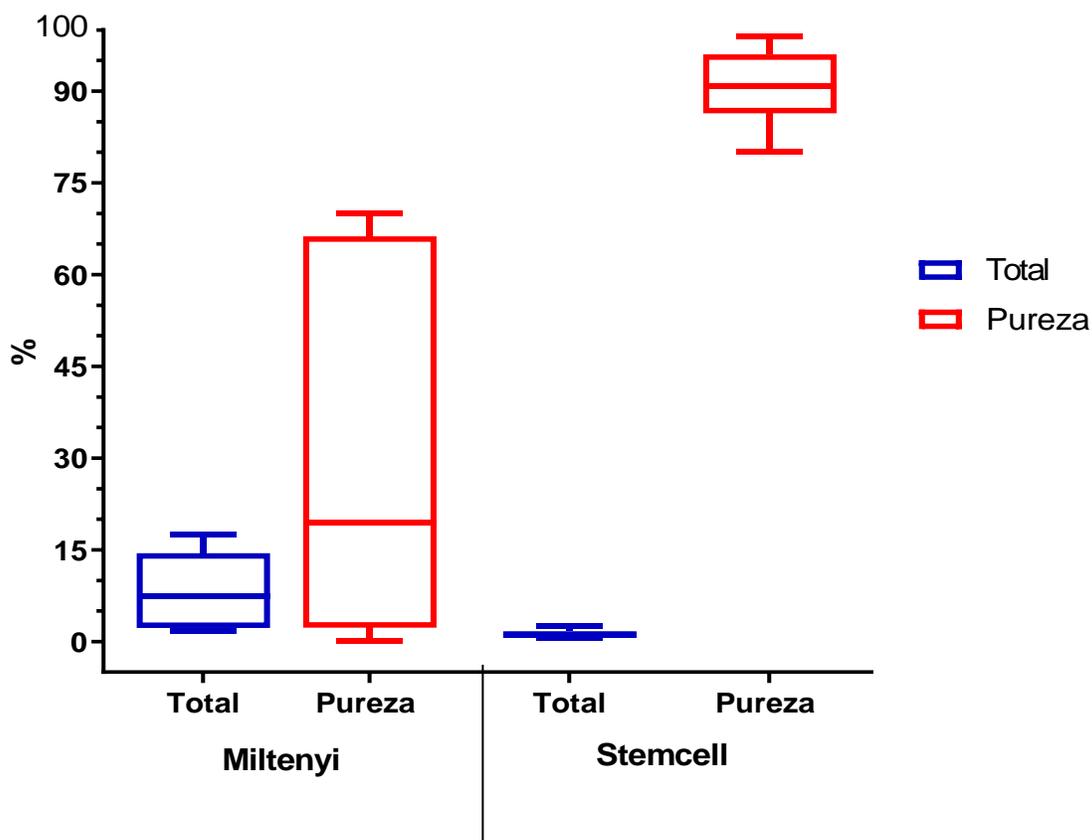
El kit EasySep™ Human CD4+CD127lowCD25+ Regulatory T Cell Isolation STEMCELL, permite hacer el enriquecimiento a temperatura ambiente lo que facilitó su manipulación, mejorando el proceso y la eficiencia. Todas las etapas del aislamiento se realizan en un tubo de poliestireno, lo que minimiza la formación de burbujas, reduce la posibilidad de afectar la eficiencia del proceso.

Kit's de enriquecimiento	Donadores (n)	Mediana de % de Treg Contenidas en CMN y rango	$\bar{x} \pm DE$ CMN	$\bar{x} \pm DE$ Treg	Mediana de % Treg Obtenidas	Pureza Mediana del %Treg CD4+CD25+FoxP3 y rangos
Miltenmyi Biotec	6	1.71% (0.5-5.2)	32,521,000 ± 9,228,000	1,948,000 ± 617,900	5.9% (1.6-17.5)	19.50% (0.14-70)
Stemcell Technologie	6	1.01% (0.80-2.49)	50,950,000 ± 10,180,000	559,300 ± 101,500	1.09% (0.64-2.49)	92% (80-99)

Tabla 1. Cantidad de células mononucleares y Treg. Obtenidas y pureza de Treg enriquecidas con dos kit

Los resultados se presentan de manera detallada en la Tabla 1, y también se encuentran representados en la Gráfica 1.

A continuación, se muestran gráficamente la pureza obtenida de células Treg obtenidas.



Gráfica 1. Representación de la cantidad de células Treg en medianas y rangos del porcentaje del total de células obtenidas, del porcentaje de pureza célula T CD4+, CD25+FoxP3+ por citometría de flujo.

En resumen, se logró la obtención de células mononucleares a través de gradiente de densidad, así como un enriquecimiento adecuado de células Treg, determinando que el kit EasySep™ Human CD4+CD127lowCD25+ Regulatory T Cell Isolation STEMCELL fue apropiado para nuestro estudio.

Activación de células T reguladoras mediante el ligando de TLR8 y establecimiento de concentraciones y tiempos óptimos.

Para analizar la activación del TLR8 en las células Treg y establecer la concentración óptima del ligando para activación, se utilizaron tres donadores sanos. Mostramos una imagen de citometría de flujo representativa de las células Treg obtenidas (Figura 4) mediana media de la pureza 90% (91-92%).

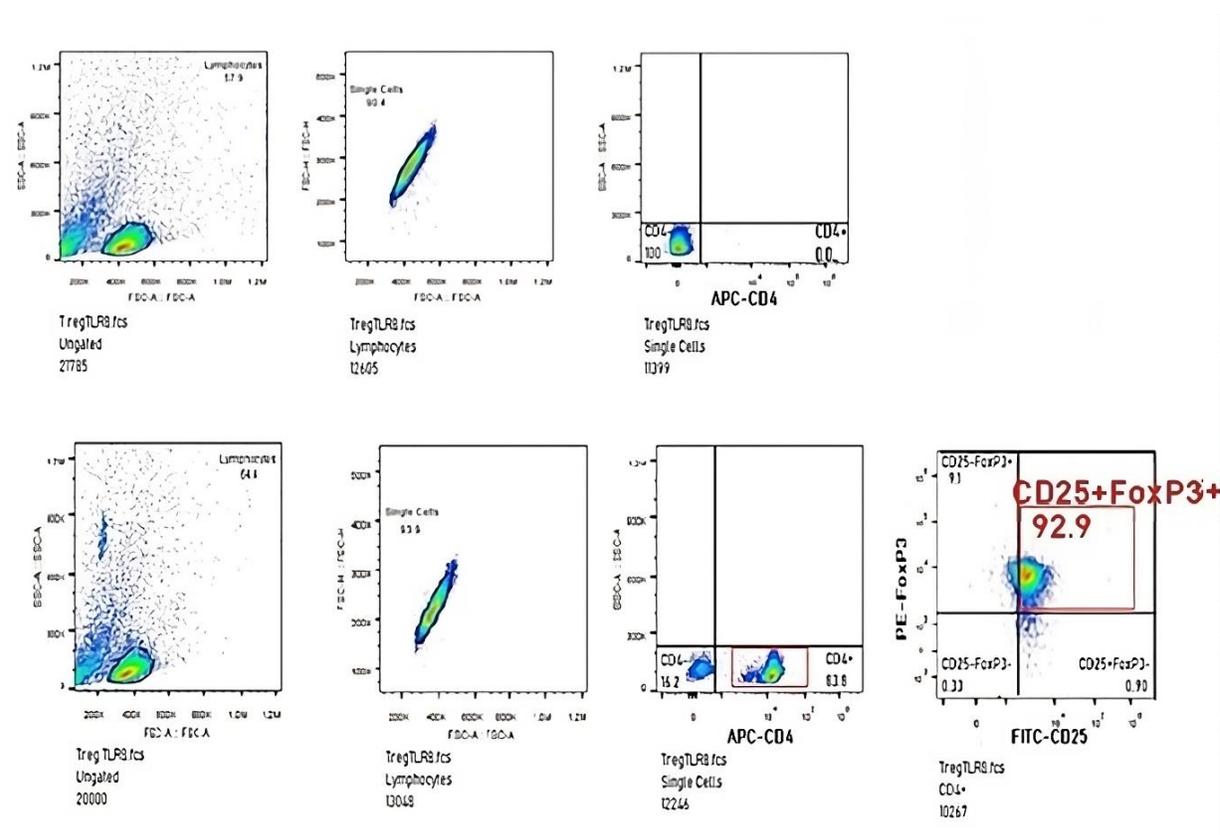
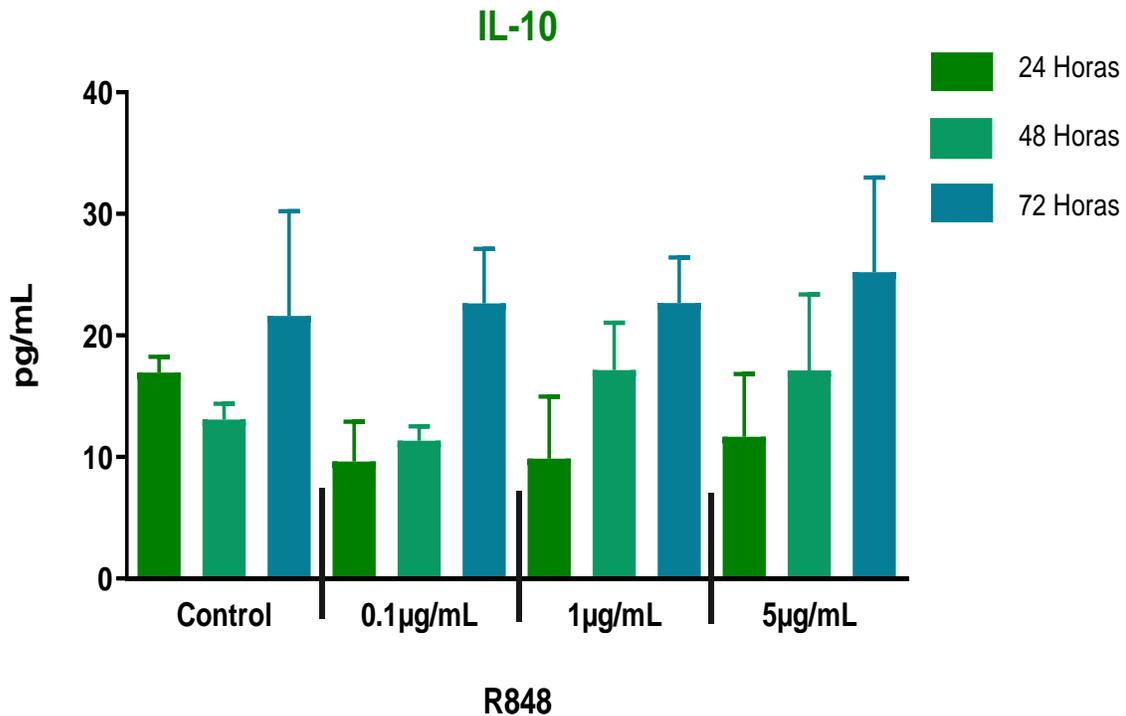


Figura 4 Identificación de células Treg obtenidas por enriquecimiento. Imagen Representativa de donador sano para activación de TLR8 con R848, teñidos con APC Mouse Anti-Human CD4, FITC Mouse Anti-Human CD25 y PE Mouse Anti- Human FoxP3.

Después de la incubación con el ligando de TLR8 a las concentraciones y tiempos establecidos, se analizaron los sobrenadantes y se cuantificó la IL-10 (Grafica 2)



Gráfica 2. Concentración media de IL-10 en sobrenadantes de células T reguladoras de donadores sanos estimuladas con R848 a diferentes concentraciones (0.1 µg/ml, 1 µg/ml y 5 µg/ml) y cultivadas durante periodos de 24, 48 y 72 horas. Los valores de la gráfica son la media de tres experimentos, con sus respectivos errores estándar. Análisis estadístico Friedman test.

Se observaron que a las 24 h hay una concentración basal de IL-10 de 16.9 ± 0.75 pg/ml, la cual presentó una disminución en las tres concentración empleadas de R848 0.1 µg/ml 9.64 ± 1.87 pg/ml 9.8 ± 2.9 pg/ml, 5 µg/ml (11.10 ± 2.9). La alta dispersión de los datos no permitió encontrar diferencia significativa.

Las concentraciones de IL-10 con los tratamientos a 48 horas, también se vieron afectadas con las diferentes concentraciones de R848, pero de distintas manera. La concentración basal fue de 13.09 ± 0.7 pg/mL se observó una leve disminución con 0.1 µg/ml de R848 11.3 ± 0.66 pg/ml con un comportamiento similar en los tres

experimentos, para las concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$ se observó un aumento de IL-10 en comparación al control, 17.17 ± 2.1 pg/ml y 17.13 ± 3.6 pg/ml respectivamente y en el caso de la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ hubo una mayor dispersión.

Con los tratamientos de las tres concentraciones de R848 a las 72 horas, se observaron cambios mínimos en las concentraciones de IL-10. Se observó una concentración basal de IL-10 de 21.61 ± 4.9 y con los tratamientos 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de R848 22.65 ± 2.57 pg/ml , con 1 $\mu\text{g/ml}$ de R848 22.67 ± 2.1 pg/ml , con 5 $\mu\text{g/ml}$ de R848 25.2 ± 4.48 pg/ml . En las 4 condiciones se observó una alta dispersión de los datos.

Las concentraciones de IL-10 obtenidas en los tres intervalos de tiempo mostraron variaciones, destacando cambios importantes en el tratamiento con R848 a las 24 y 48 horas, presentando un comportamiento particular.

Con estos resultados podemos establecer que las concentraciones de R848 de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 y 48 horas son útiles para la activación de las Treg.

Activación de células T reguladoras mediante el ligando de TLR4 y establecimiento de concentraciones y tiempos óptimos.

Para el análisis de la activación del TLR4 se utilizaron muestras de tres donadores sanos para el enriquecimiento de las Treg, las cuales fueron analizadas y caracterizadas por citometría de flujo para conocer su pureza (Figura 5), con el fin de garantizar que el efecto observado fuera ejercido por células Treg.

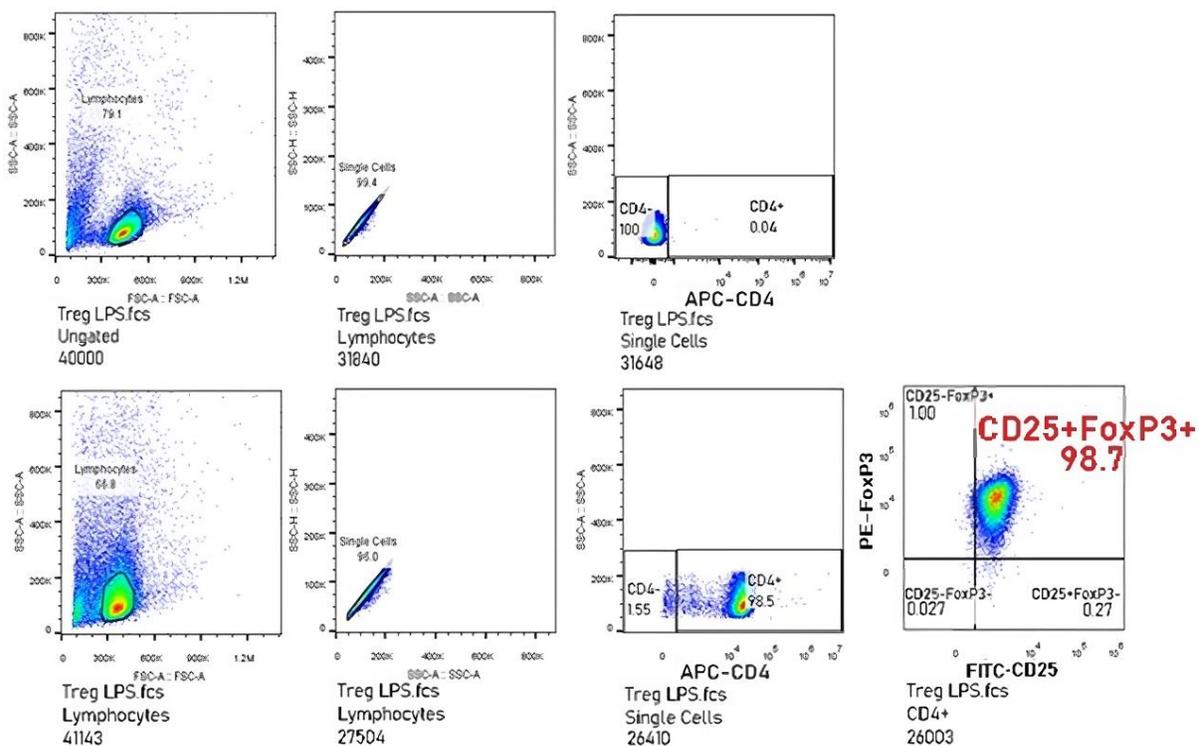
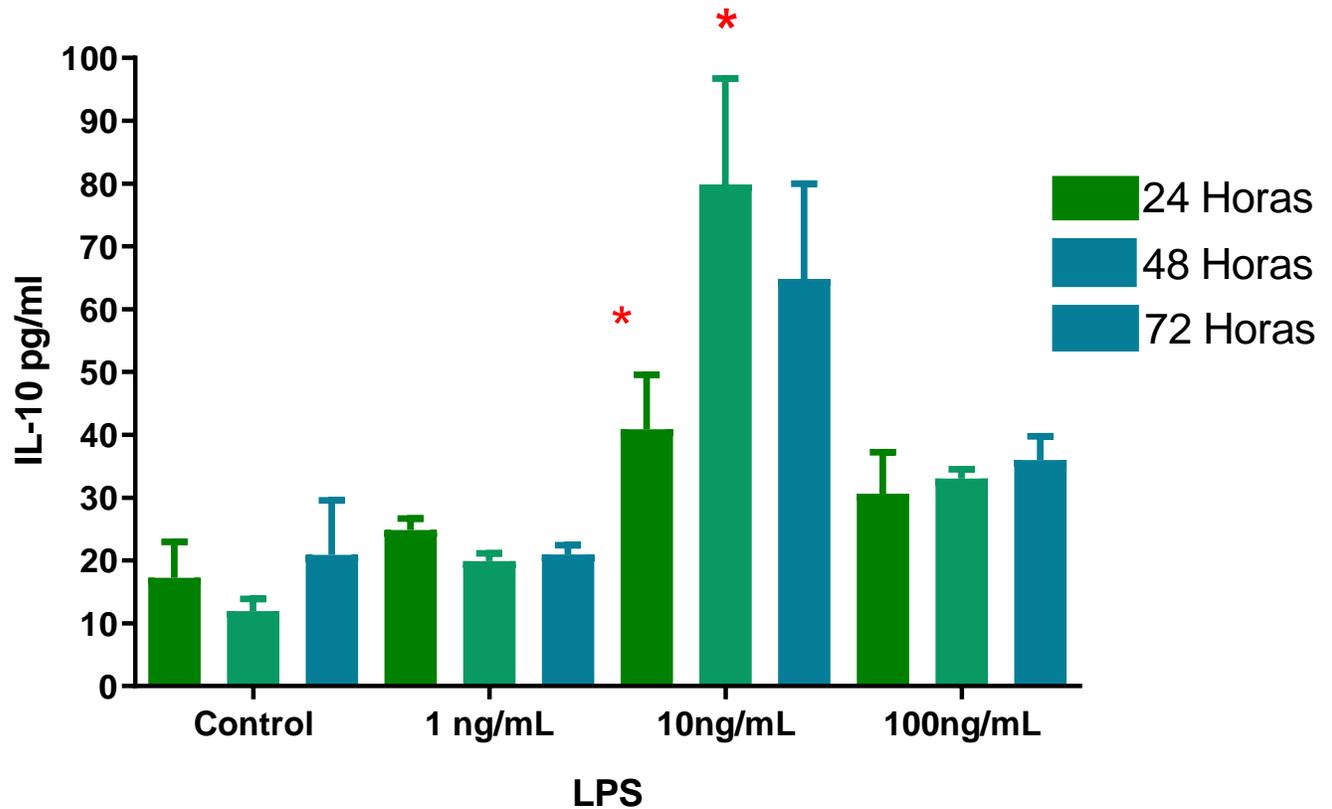


Figura 5. Identificación de células Treg obtenidas por enriquecimiento. Imágenes representativas de tres donadores sanos para activación de TLR4 con LPS, teñidas con APC Mouse Anti-Human CD4, FITC Mouse Anti-Human CD25 y PE Mouse Anti-Human FoxP3



Gráfica 3. Concentración media de IL-10 en sobrenadantes de células Treg de donadores sanos, estimuladas con diferentes concentraciones de LPS (1 ng/mL, 10 ng/mL y 100 ng/mL) y cultivadas durante 24, 48 y 72 horas. Los datos de la gráfica representan el promedio de tres experimentos, y su error estándar correspondiente prueba estadística Friedman 24H 10ng/ml $p=0,0342$ 48H 10 ng/ml $p=0.0133$.

Los resultados obtenidos a las 24 h de activación nos mostraron concentraciones basales de IL-10 de 17.25 ± 5.7 pg/ml, las cuales se vieron aumentados a las tres concentraciones de LPS. La concentración de 1 ng/mL 24.82 ± 1.8 pg/ml, con 10 ng/mL 40 ± 8.6 pg/ml con $p= 0.0342$ y con 100 ng/mL 30.63 ± 6.6 pg/ml, aunque en las tres concentraciones presentó un aumento, se observó únicamente una diferencia

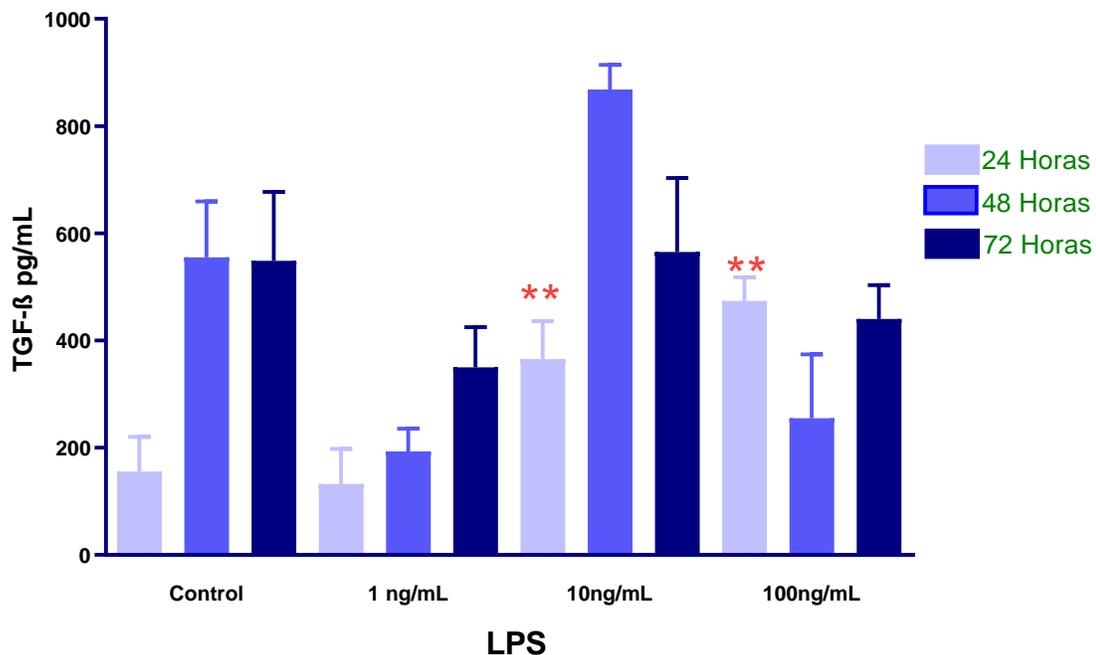
estadística significativa en las concentraciones de IL-10 a 10 ng/mL de LPS con una $p=0.0342$.

Con el tratamiento a 48 horas, la concentración basal de IL-10 fue de 11.96 ± 1.9 pg/ml, y presentó un comportamiento similar al tratamiento de 24h, con 1 ng/mL incrementó el valor a 19.8 ± 1.3 pg/ml, con 10 ng/mL 86.52 ± 10.7 pg/ml con una $p= 0.0133$ y con 100 ng/mL 33.04 ± 1.4 pg/ml.

A las 72 horas con el tratamiento de 1 ng/mL de LPS no hubo cambio en la concentración de IL-10 pero con una menor dispersión en los datos 20.9 ± 1.4 pg/ml con respecto al control 20.89 ± 8.65 pg/ml. Para el tratamiento con 10 ng/ml se observó un aumento notable 64.85 ± 15.7 pg/ml pero con una alta dispersión de datos y en el caso del tratamiento con 100 ng/mL se observó incremento con respecto al control teniendo el valor de 36.01 ± 3.7 pg/ml.

A pesar de que los datos presentaron cierta variabilidad, se observó una tendencia congruente en los tres experimentos, a los intervalos de tiempo y concentraciones de LPS y las concentraciones de IL-10.

Con respecto a la concentración de TGF- β (Gráfica 4), observamos que las concentraciones mostraron un comportamiento distinto a la IL-10. Se observaron diferencias importantes en las concentraciones basales en los tres tiempos, a las 24h 155.5 ± 64.90 pg/ml, mientras que se observaron concentraciones más altas a las 48 horas 555.2 ± 104.5 pg/ml y 72 horas 548.5 ± 128.59 pg/ml, mostrando un efecto diferente con los tratamientos de LPS.



Gráfica 4. Concentración de TGF- β en sobrenadantes de células Treg de donadores sanos estimuladas con LPS a diferentes concentraciones 1, 10 y 100 ng/mL, y cultivadas durante 24, 48 y 72 horas. Los datos de la gráfica representan el promedio de 3 experimentos, junto con su error estándar correspondiente.

En el tratamiento a 24 horas con una concentración de 1 ng/mL, mostro una reducción mínima en los niveles de TGF- β 132.2 ± 65.90 pg/ml, mientras que se observó un incremento en los tratamientos con 10 ng/ml 365.2 ± 70.7 pg/ml $p=0.0017$ y 100 ng/ml 473.5 ± 44.6 pg/ml $p=0.0017$ con respecto al control que fue de 155.5 ± 64.90 pg/ml.

En los experimentos realizados en un periodo de 48 horas, se observó una disminución con dos concentraciones de LPS con respecto al control, a 1 ng/ml 142.6 ± 42.8 pg/ml y a 100ng/ml $255.2 \pm 118,9$ pg/ml y un incremento con el tratamiento a 10 ng/ml 868.5 ± 45.4 pg/ml. Por el contrario, los tratamientos a 72 horas mostraron una

reducción en los niveles de TGF- β en todas las concentraciones de LPS 1 ng/ml 350 ± 74.8 pg/ml, 10 ng/ml 542.2 ± 142 pg/ml y con 100 ng/ml 440.2 ± 62.93 pg/ml en comparación al control 555.2 ± 104.5 pg/ml.

Establecimos para el uso de los tratamientos de los pacientes con LLA a 1 ng/ml y 10 ng/ml a 48 horas, en donde se observó una disminución y un incremento en los niveles TGF- β , respectivamente. Así como también un aumento en la concentración de IL-10, lo cual sugiere una posible tendencia hacia el incremento.

Proporción de Células Treg en Pacientes Pediátricos con LLA de Inmunofenotipo pre-B

Se analizaron las muestras de sangre periférica de 14 pacientes pediátricos diagnosticados con LLA con un inmunofenotipo pre-B, con una edad media de 10 ± 5.7 años, determinando la proporción de células Treg con respecto a las CMN y con respecto a la población de linfocitos T CD4+ (Grafica 4) (Figura 6)

Los resultados mostraron que el porcentaje de células Treg caracterizadas por CD25+FoxP3+ (Figura 6A) contenidas en las CMN fue bajo, con una mediana de 1.23% (0.05 - 32.93%), con respecto a la población de linfocitos T CD4+ presente en las CMN, las medianas de las Treg CD25+ FoxP3+ (Figura 6B) fue de 21.92% (2.17 - 83.91%)

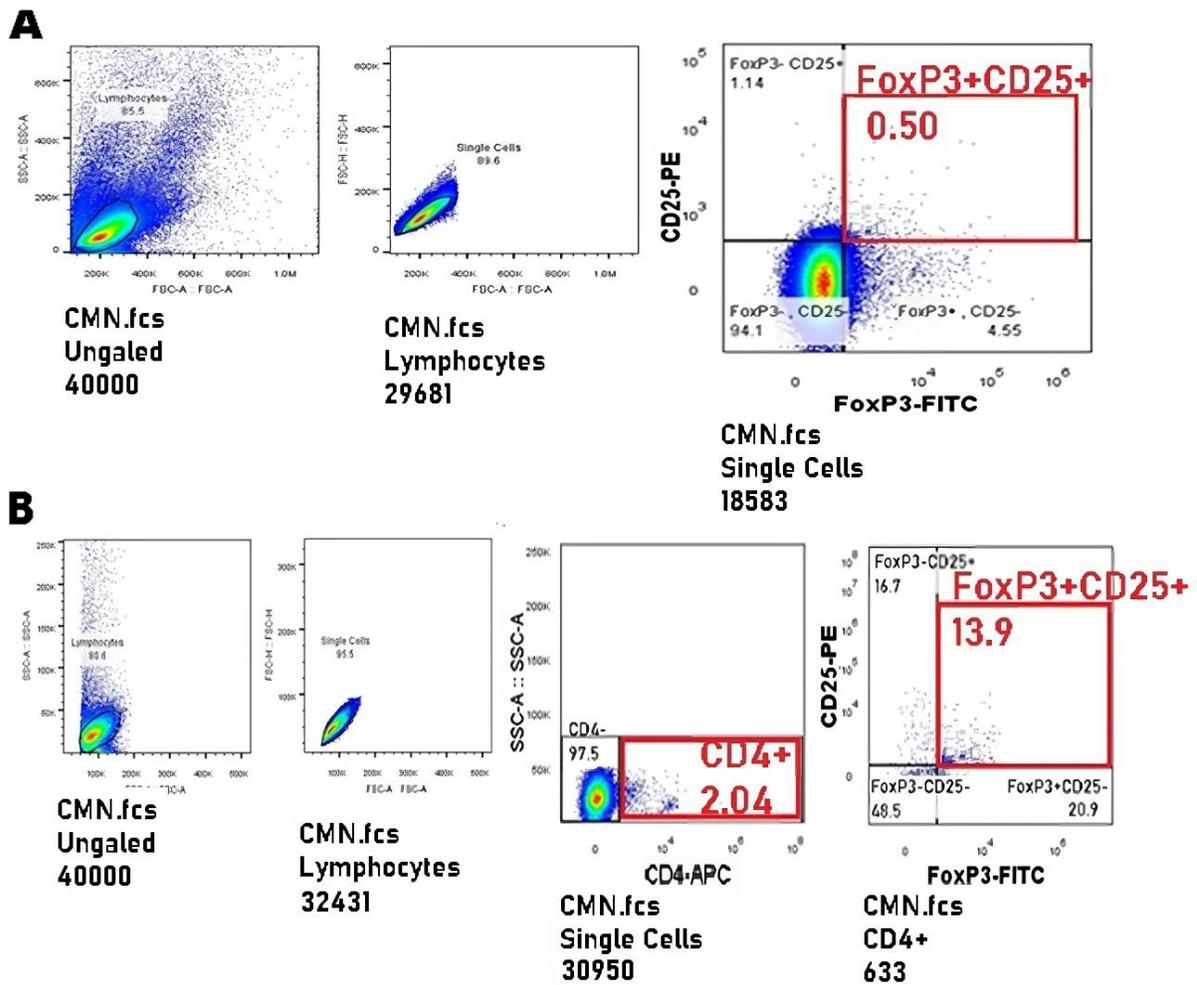
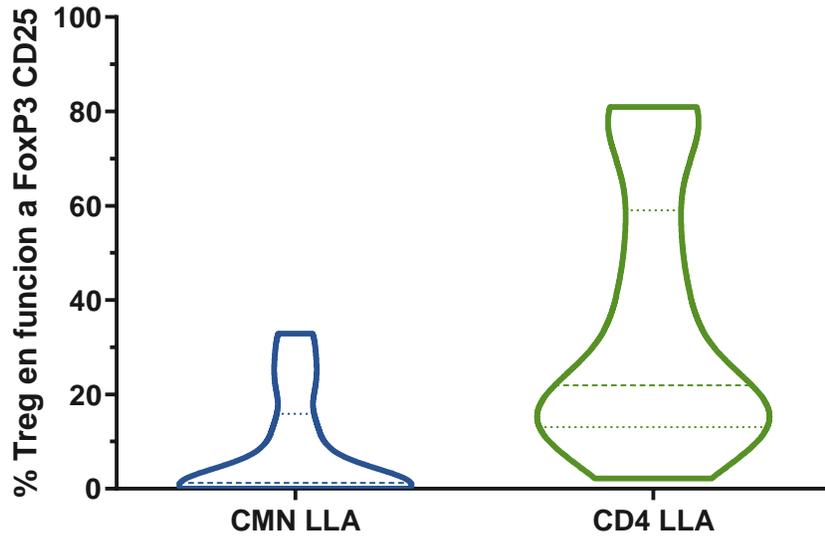


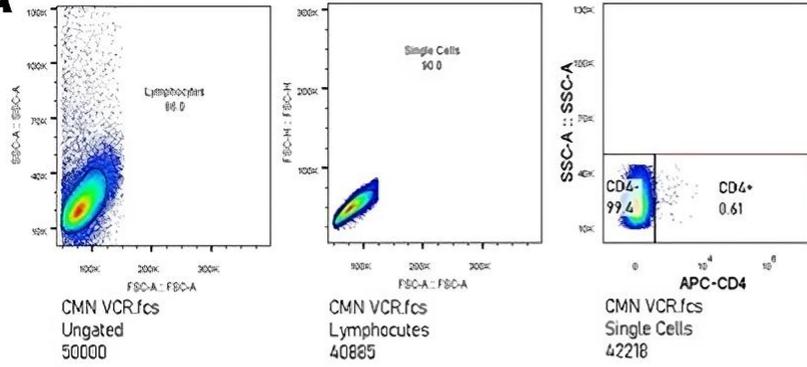
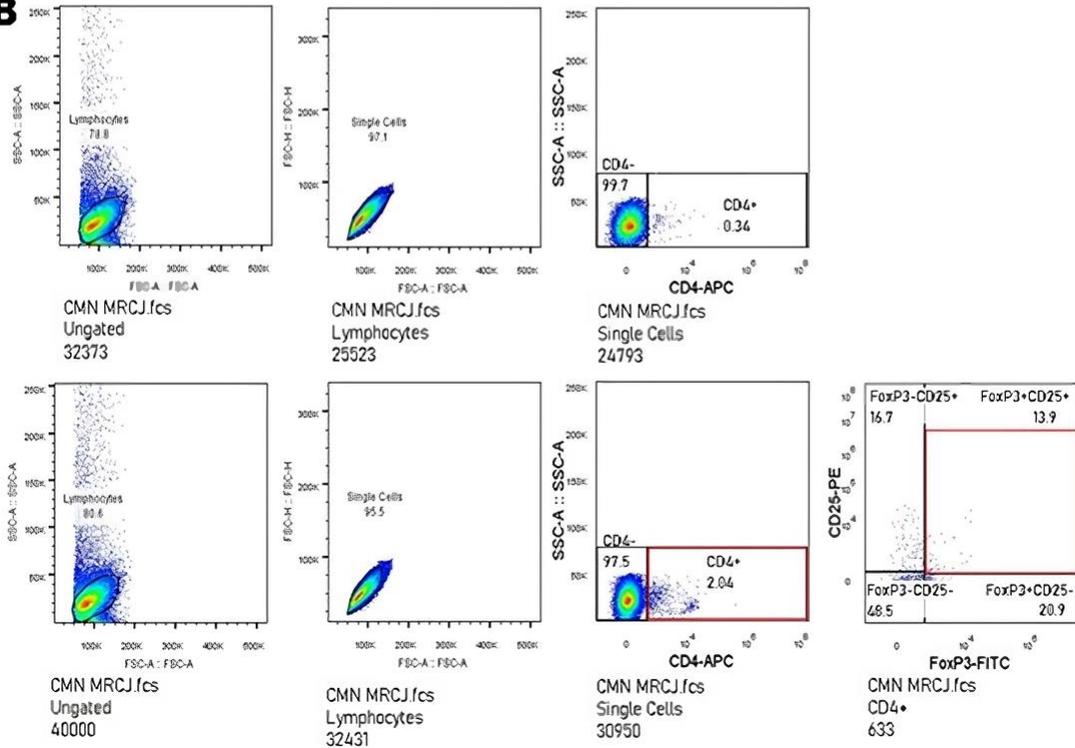
Figura 6. Caracterización de células Treg de pacientes pediátricos con LLA preB A) Caracterización de Treg CD25+FoxP3+ presentes en las CMN totales B) Caracterización de células Treg CD25+FoxP3+ en las población de linfocitos T CD4+. Análisis por citometría de flujo, imagen representativa de los 14 pacientes.

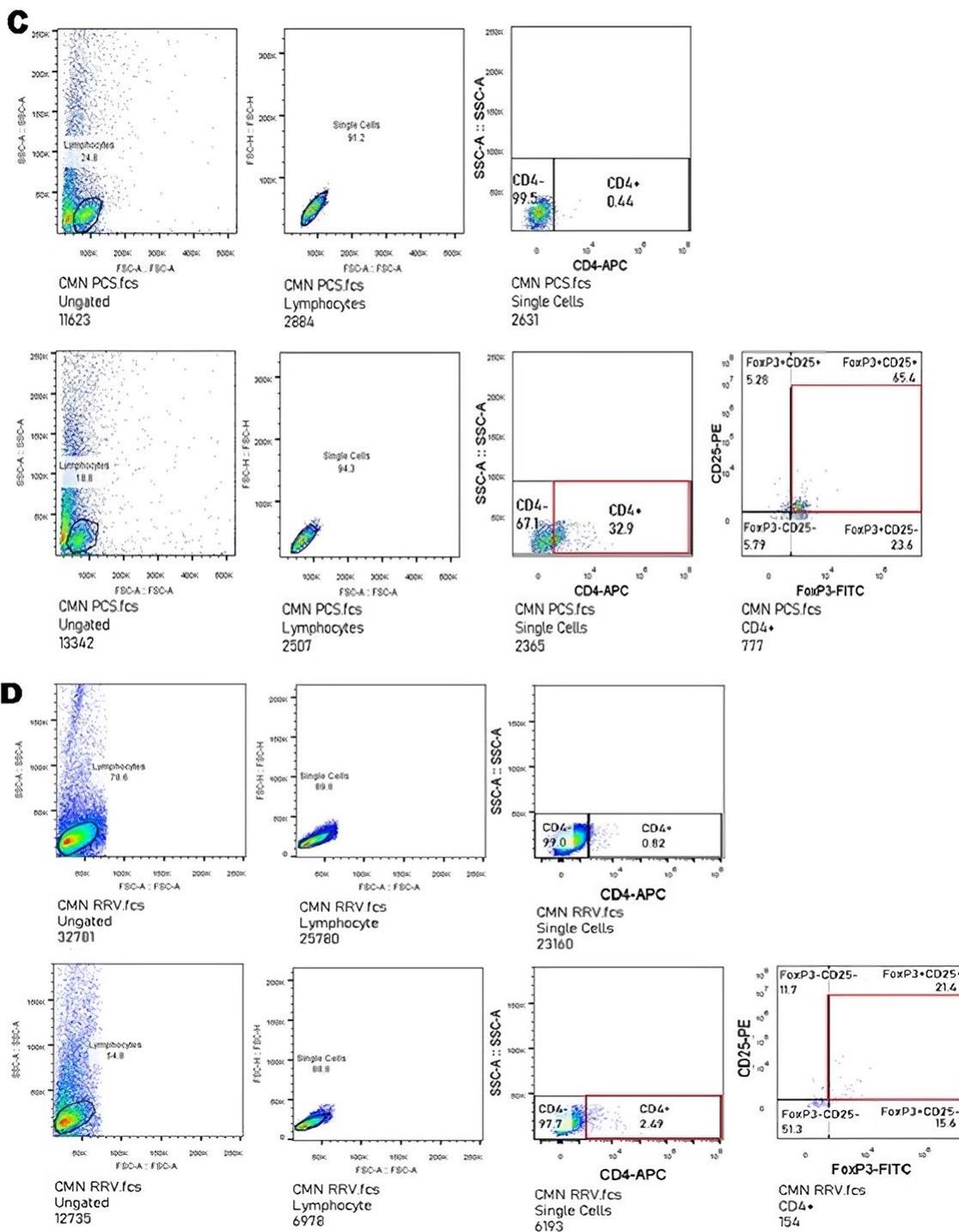


Grafica 4. Porcentaje de células Treg en paciente con LLA-B en CMN totales y en la población de CD4+, proporcionados en medianas y rangos

Pureza de las células Treg aisladas de pacientes pediátricos con LLA

De los 14 pacientes pediátricos con LLA pre-B, se emplearon las muestras de 6 pacientes, para obtener las células Treg y llevar a cabo los ensayos de estimulación a través de los TLR4 y 8, utilizando los ligandos específicos en los intervalos de tiempo y concentración previamente establecidos. Las células Treg fueron caracterizadas por CD4+CD25+FoxP3+. Las cifras presentes en las Figuras 7 A-F representan los resultados de cada paciente, antes de enriquecerse o separarse con una mediana de 0.52% (0.15-20.27%).

A**B**



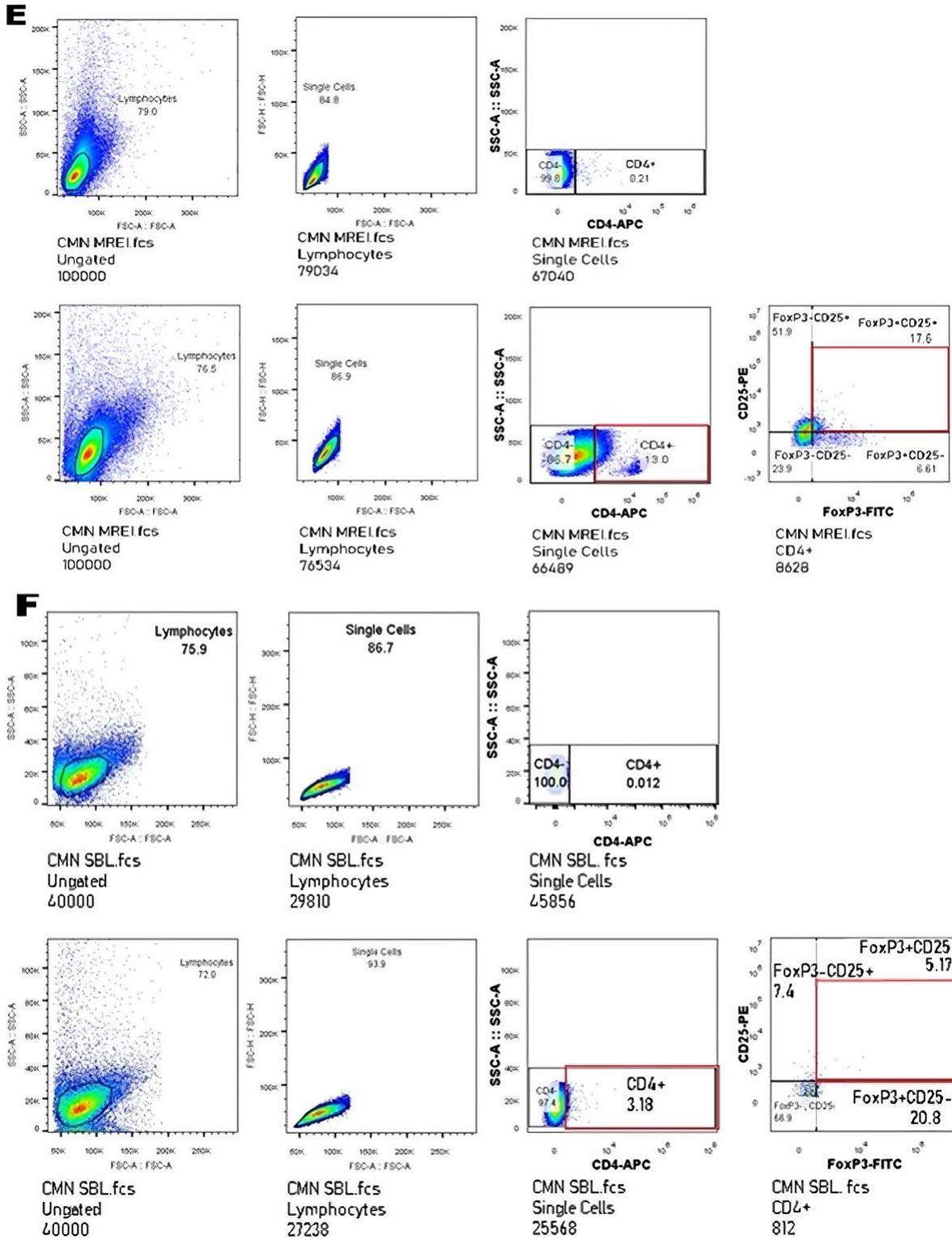


Figura 7. Identificación de células Treg obtenidas de CMN totales de 6 paciente pediátrico con LLA pre-B, teñidos con APC Mouse Anti-Human Anti-CD4, PE Mouse Anti-Human CD25 clona 2A3 y FITC Mouse Anti-Human FoxP3, análisis por citometría de flujo.

Después de llevar a cabo el proceso de enriquecimiento de las células Treg, procedimos a analizar su pureza. A continuación, presentamos imágenes representativas de citometría de flujo que respaldan la confirmación de la pureza de las células Treg obtenidas (Figura 8). Los resultados arrojaron una mediana de pureza del 93.3% (88.8-99.4%).

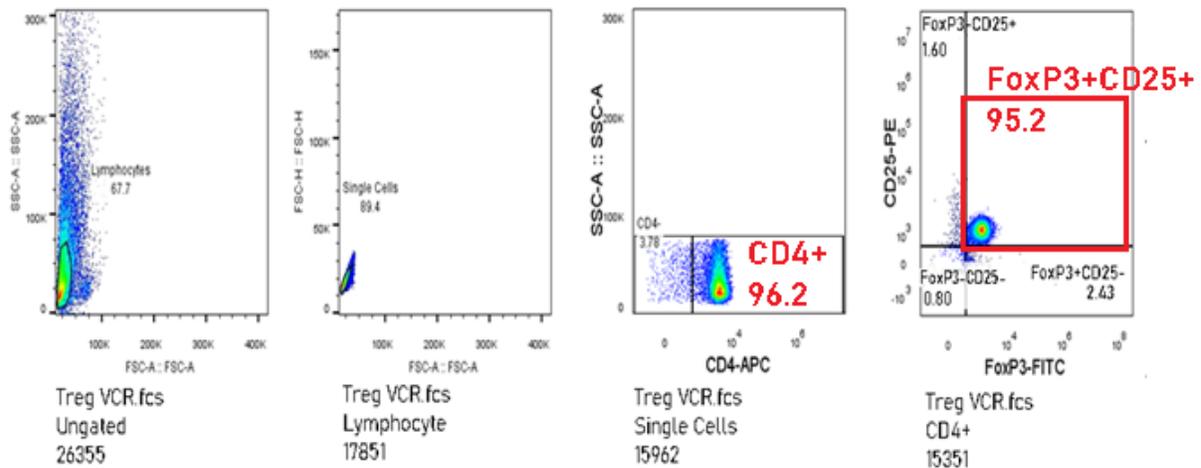
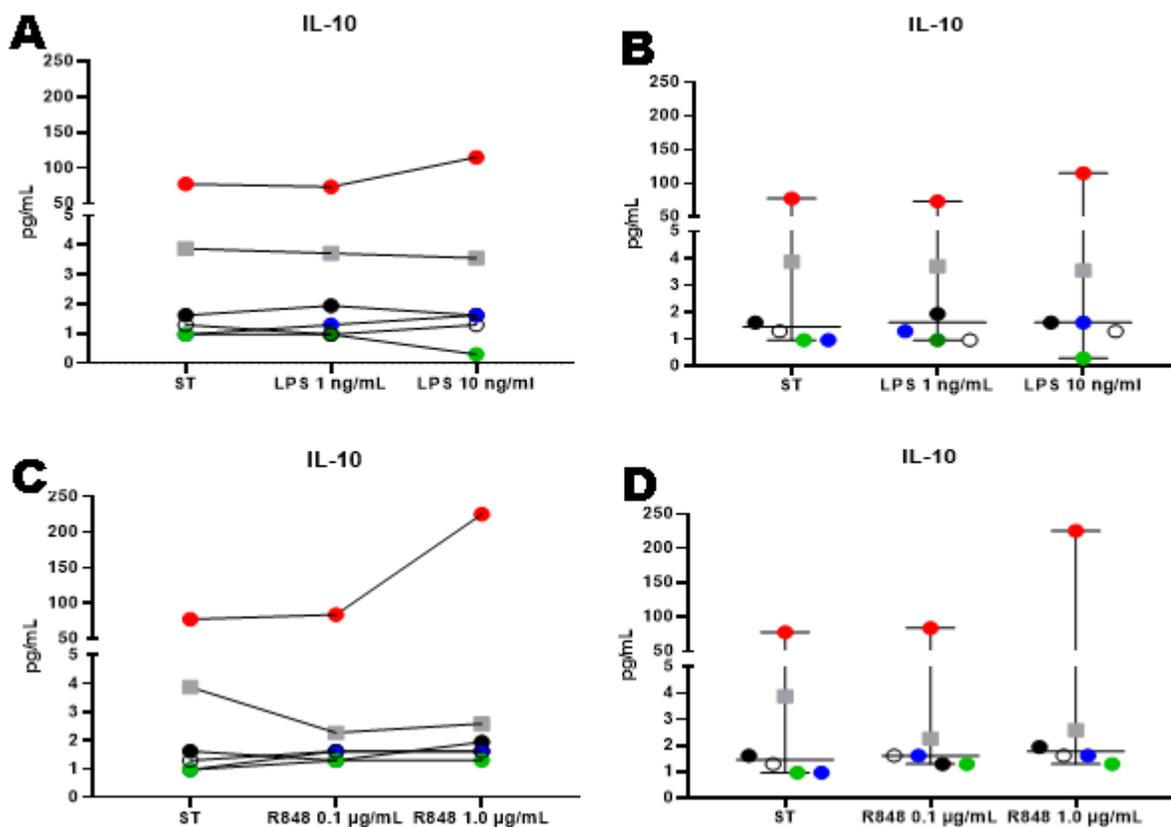


Figura 8. Pureza de Treg obtenida por enriquecimiento a partir de CMN. Caracterizadas con APC Mouse Anti-Human Anti-CD4, PE Mouse Anti-Human CD25 clona 2A3 y FITC Mouse Anti-Human FoxP3. Imagen representativa de pacientes con LLA pre-B.

La obtención de la pureza después del enriquecimiento de las células Treg fue aceptable, lo que nos permitió llevar a cabo los tratamientos con los ligandos y en los intervalos de tiempo predeterminados para la activación de los TLRs 4 y 8.

Activación de los TLRs favoreció la secreción de citocinas necesaria para el cambio de inmunofenotipo de las células Treg a TH17.

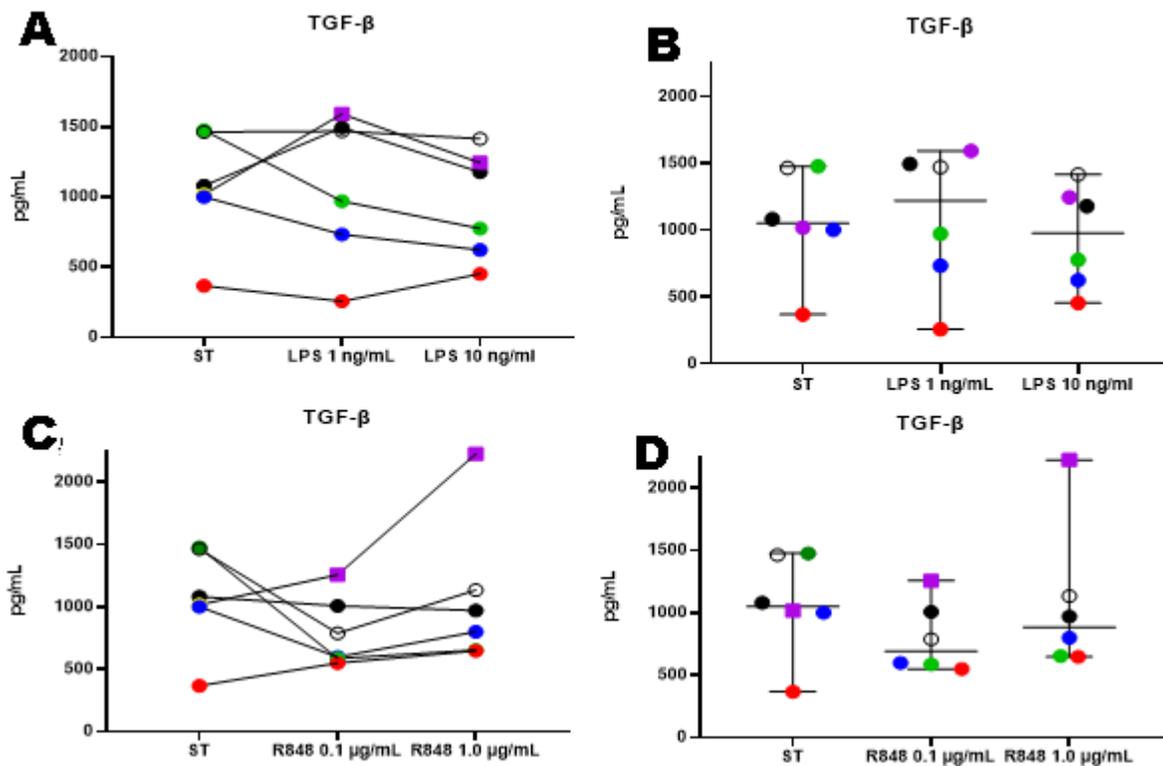
Los resultados de las citocinas fueron analizados y representados con medianas de 6 pacientes pediátricos con LLA pre-B y rangos para cada citocina.



Grafica 4. Concentración de IL-10 (pg /ml), citocina característica de las células Treg, sin tratar y posterior al tratamiento por 48 horas con LPS en concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml con 848 en concentraciones de 0.1 µg/ml y 1 µg/ml. Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) y mostrando medianas y rangos (B y D) Prueba estadística Friedman test LPS p=0.993 y R848 p=0.098 sin diferencia estadística significativa.

Los niveles basales de IL-10 producida por células Treg fue de 1.45 pg/ml (0.97-77.6 pg/ml) y con los tratamientos con LPS, se obtuvo un valor de 1.60 pg/ml (0.97- 73.40 pg/ml) con 1 ng/ml de LPS, y de 1.62 pg/ml (0.29-114.8 pg/ml) con 10 ng/ml de LPS (Grafica 5 A y B). Estos resultados indican que no se observaron cambios importantes en los niveles de IL-10 con el tratamiento de LPS.

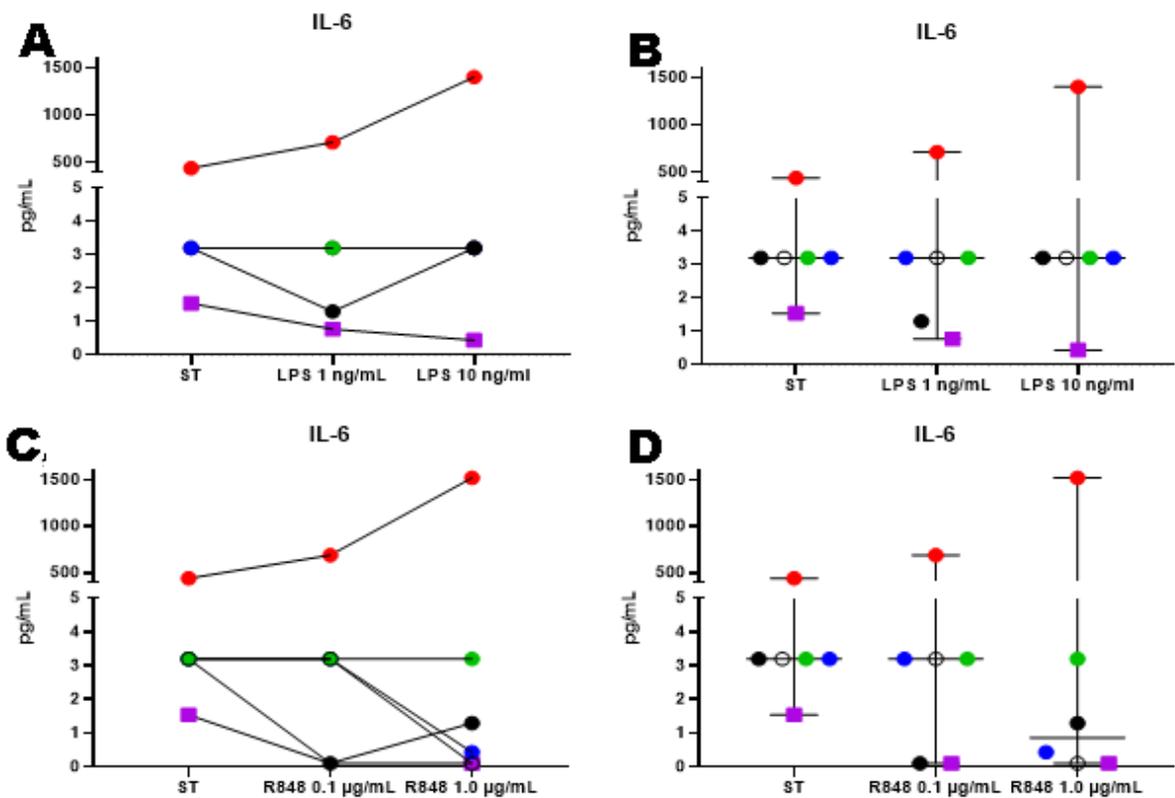
Con respecto al tratamiento con R848. Los niveles de IL-10 fueron de 1.62 pg/ml (1.29-83.81pg/ml) con 0.1 µg/ml y de 1.78 pg/ml (1.29-225.3 pg/ml) para 10 µg/ml (Grafica 5 C y D). Observamos un caso, en el cual hubo un aumento importante en los niveles de IL-10. Las células de este paciente incrementaron de 77.6 pg/ml a 115.1 pg/ml en presencia de 10 ng/ml de LPS, a diferencia de los demás participantes (Grafica 5A) y el incremento con 1 µg/ml de R848 donde fue de 77.6 pg/ml a 225.2 pg/ml.



Grafica 5. Concentración TGF- β (pg /ml), citocina característica de las célula Treg, sin tratar y después del tratamiento por 48 horas con LPS en concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml (A y B) y con R848 en concentraciones a 0.1 μ g/ml y 1 μ g/ml (C y D). Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) mostrando medianas y rangos (B y D) de 6 pacientes. Prueba estadística Friedman test LPS ($p=0.57$) y R848 ($p=0.42$) sin diferencia estadística significativa.

Los resultados revelaron niveles basales de TGF β notablemente más altos, alcanzando una mediana de 1,050 pg/ml (368.2-1476 pg/ml), en comparación con las otras citocinas. Después de los tratamientos con LPS, se observó un ligero incremento de la mediana 1,220 pg/ml (258.6-1333 pg/ml), con el tratamiento 1 ng/ml, con respecto al grupo no tratado 1,050 pg/ml (368.2-1,476 pg/ml), y una ligera disminución de TGF β con el tratamiento de 10 ng/ml dando un valor de 976.9 pg/ml (453.4-961.8 pg/ml) (Grafica 6B).

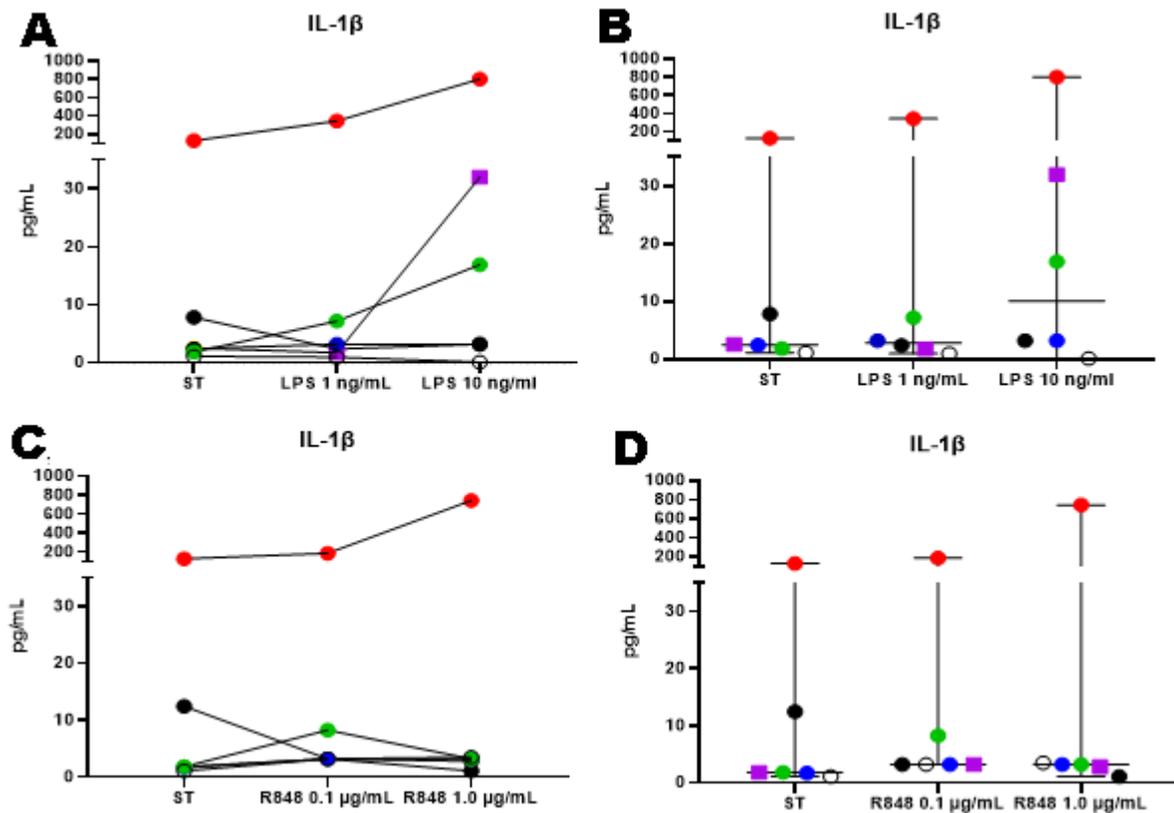
Con el tratamiento con R848, se mostró una reducción en los niveles de TGF- β a 693.8 pg/ml (550.8-706.2 pg/ml) con una concentración de 0.1 μ g/mL, en comparación con el grupo control 1,050 pg/ml (368.2-1476 pg/ml). Asimismo, con el tratamiento de 1 μ g/mL, se observó una leve disminución a 885.6 (648.2-1577) en comparación con el grupo no tratado (Grafica 6D).



Grafica 6. Concentración de IL-6 (pg /ml), citocina importante para el efecto de plasticidad entre Treg /Th17. Sin tratar y después del tratamiento por 48 horas LPS en concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml (A y B) R848 en concentraciones a 0.1 μ g/ml y 1 μ g/ml (C y D). Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) mostrando medianas y rangos (B y D). Prueba Friedman test LPS ($p=0.88$) y R848 ($p=0.50$), sin diferencia estadística significativa.

La IL-6 presentó niveles basales de 3.2 pg/ml (1.54- 439.7 pg/ml) y con el tratamiento con LPS, permaneció en 3.2 pg/ml (0.77-711.4 pg/ml) con 1 ng/ml y 3.2 pg/ml (0.44- 1,402) con 10 ng/ml. Así mismo no se observó cambio en el comportamiento de la secreción de IL-6 en las Treg de los pacientes (Gráfica 7B).

Para los tratamientos con R848 no mostró efecto 3.2 pg/ml (0.11-688.1 pg/ml) para el tratamiento a 0.1 µg/ml, pero con el tratamiento a 1 µg/ml se puede observar una disminución de la mediana a 0.87 pg/ml (0.11-1,520 pg/ml) (Gráfica 7D)



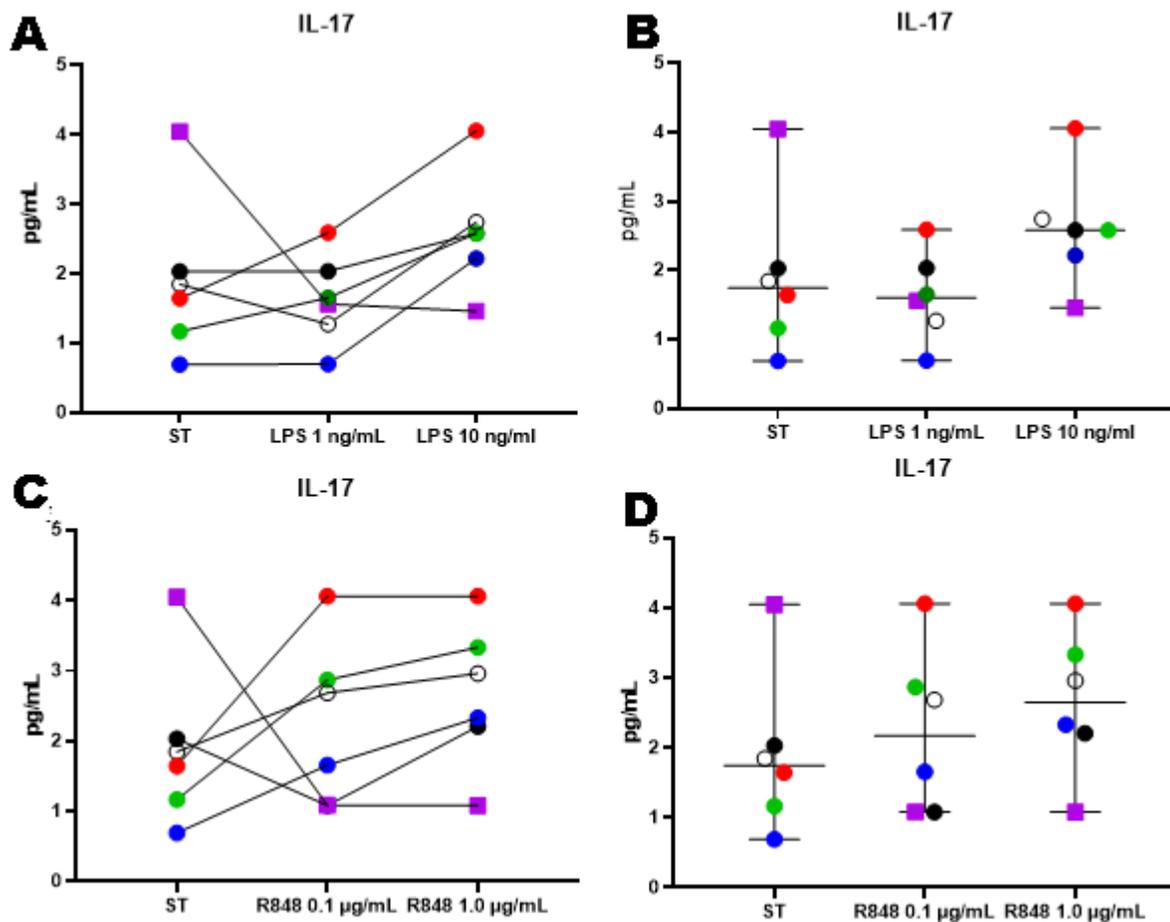
Gráfica 7 Concentración de IL-1β (pg /ml), citocina importante para el efecto de plasticidad entre Treg /Th17. Sin tratar y después del tratamiento por 48 horas LPS en

concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml (A y B) R848 en concentraciones a 0.1 µg/ml y 1 µg/ml (C y D). Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) mostrando medianas y rangos (B y D). Prueba Friedman test LPS (p=0.52) y R848 (p=0.13), sin diferencia estadística significativa.

La concentración basar del IL-1 β se encontró en 1.84 pg/ml (1.10-1291 pg/ml). Ante la aplicación de los tratamientos con LPS, se observó un leve incremento en ambas concentraciones, de 2.7 pg/ml (0.29-344.4 pg/ml) para 1 ng/ml y de 3.2 pg/ml (0.10-801.5 pg/ml) para 10 ng/ml (Grafica 8B)

El comportamiento de los niveles de IL-1 β fue similar en los cinco pacientes, aunque se presentaron diferentes niveles en la concentración de la citocina. Solo un paciente mostró una disminución en ambas concentraciones del ligando de LPS a 1 ng/ml 2.3 pg/ml y 10 ng/ml 3.2 pg/ml en comparación con el grupo no tratado 12pg/ml (Grafica 8A).

Para el tratamiento con R848, se observó un aumento en ambas concentraciones en comparación con el grupo no tratar. La concentración se elevó de 1.84 pg/ml (1.03-128.0 pg/ml) a 3.2 pg/ml (3.2- 183.9 pg/ml) con 0.1 µg/mL y 3.2 pg/ml (1.10-742 pg/ml) con 10 µg/ml, sin mostrar diferencia entre los tratamientos. En cuanto al comportamiento de los datos, no se observaron similitudes (Grafica 8D)



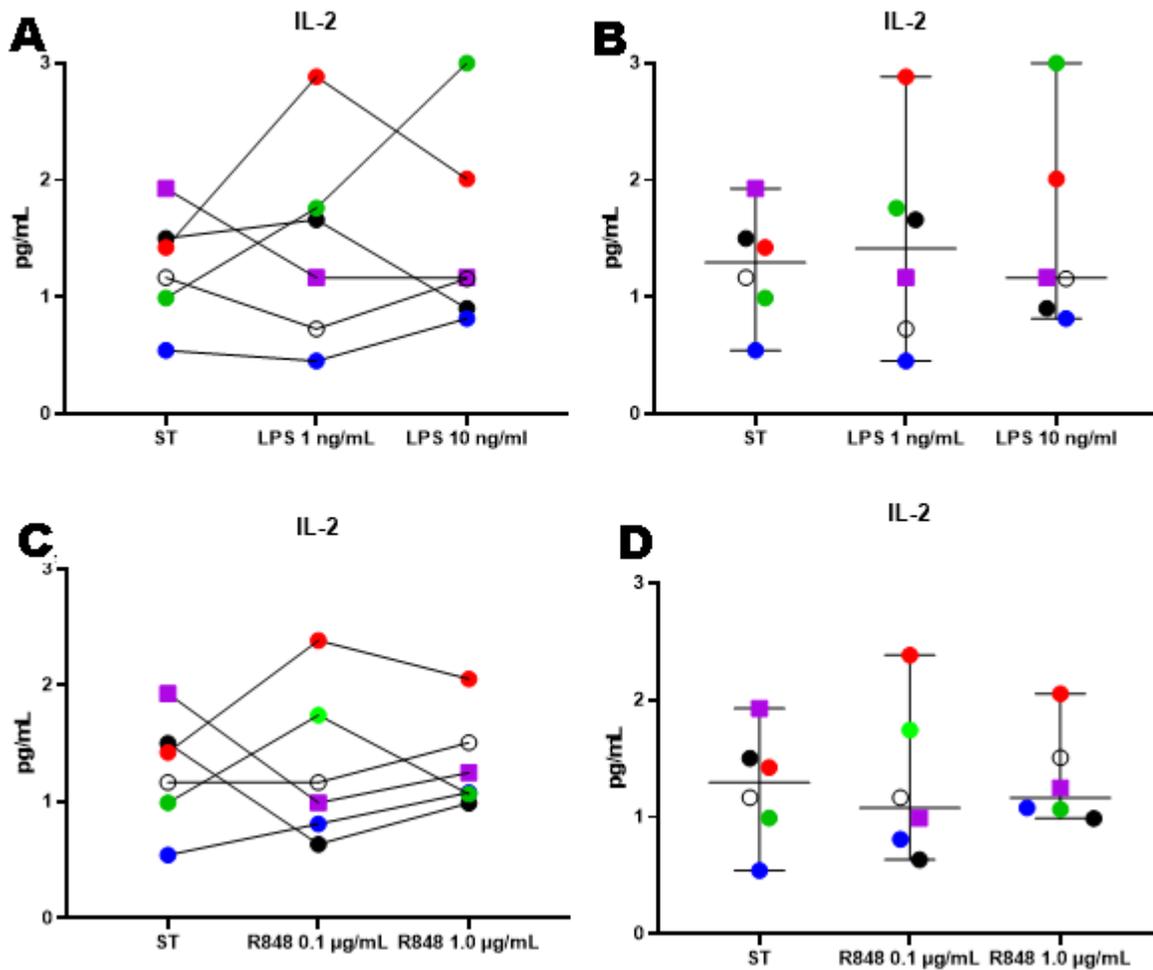
Grafica 8. Concentración de IL-17 (pg/ml), citocina distintiva de las células Th17. La representación incluye datos. Sin tratar y después del tratamiento por 48 horas LPS en concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml (A y B) R848 en concentraciones a 0.1 µg/ml y 1 µg/ml (C y D). Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) mostrando medianas y rangos (B y D). Prueba Friedman test LPS ($p=0.14$) y R848 ($p=0.17$), sin diferencia estadística significativa.

Los niveles basales de IL-17 fueron de 1.74 pg/ml (0.69 - 4.05 pg/ml). Con el tratamiento de LPS a 1 ng/ml no se observó una diferencia importante, registrándose una mediana de 1.61 pg/ml (0.70-2.59 pg/ml). Sin embargo, con 10 ng/ml, se produjo un incremento a 2.58 pg/ml (1.45-2.6 pg/ml) (Grafica 9B).

Es de destacar que los niveles de IL-17 incrementaron en 5 pacientes con el tratamiento de 10 ng/ml de LPS. Solo en una muestra se encontró una reducción en los niveles de IL-17, esta muestra presentó un nivel basales de 4.04 pg/ml, el cual disminuyó a 1.56 pg/ml con 1ng/ml y a 1.45 pg/ml para 10 ng/ml de LPS (Grafica 9B).

Con el tratamiento con R848, se observó un aumento en los niveles de IL-17. La concentración registrada fue de 2.17 pg/ml (1.08-2.97 pg/ml) con 0.1 µg/mL y de 2.64 pg/ml (1.08-2.97 pg/ml) con 10 µg/mL, con respecto al grupo sin tratar 1.74 pg/ml (0.69 - 4.05 pg/ml) (Grafica 9D).

Se observó un incremento en los niveles de IL-17 en cuatro pacientes con los tratamientos con R848 desde la concentración más baja. En dos pacientes se observó un efecto de disminución de los niveles de IL-17. (Grafica 9C).



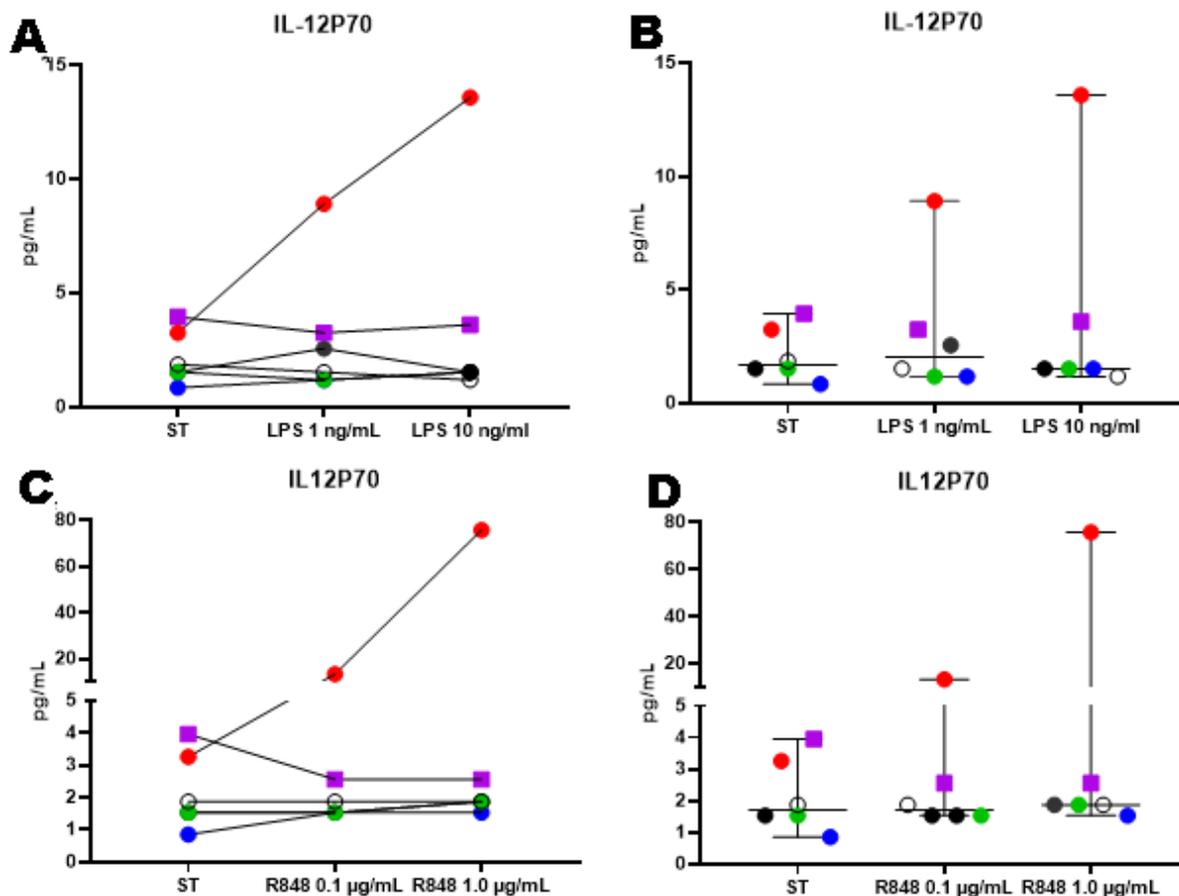
Grafica 9. Concentración de IL-2 (pg /ml), citocina distintiva de las células Th1. La representación incluye datos. Sin tratar y después del tratamiento por 48 horas LPS en concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml (A y B) R848 en concentraciones a 0.1 µg/ml y 1 µg/ml (C y D). Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) mostrando medianas y rangos (B y D). Prueba Friedman test LPS ($p=0.99$) y R848 ($p=0.64$), sin diferencia estadística significativa.

Los niveles de IL-2 en el grupo sin tratar fueron de 1.29 pg/ml (0.54-1.92 pg/ml). Con el tratamiento de LPS a 1 ng/ml, se observó un ligero aumento 1.41 pg/ml (0.45-2.43 pg/ml), mientras que con 10 ng/ml se presentó una leve disminución con valores de 1.16 pg/ml (0.81-2.18 pg/ml) (Grafica 10B). Es relevante destacar que las células de

un paciente mostraron un incremento con los tratamiento de LPS a 1 ng/ml (1.76 pg/ml) y 10 ng/ml (3.00 pg/ml) con respecto al grupo sin tratar (0.99 pg/ml), lo que implica que las células tenían un microambiente favorable para el fenotipo de células Th1 (Grafica 10A)

El tratamiento con R848 a 0.1 µg/mL presentó una disminución de IL-2 de 1.079 pg/ml (0.63 -1.74 pg/ml) y con 1 µg/mL de R848 un ligero incremento de la mediana a 1.16 pg/ml (0.98- 1.06 pg/ml) con respecto al grupo sin tratar 1.29 pg/ml (0.54-1.92 pg/ml). (Grafica 10D)

El patrón de comportamiento para estas muestras fue más variado para el ligando de R848, para 0.1 µg/ml las muestras de dos pacientes aumentaron su niveles de IL-2 de 0.99 pg/ml a 1.74 pg/ml y de 1.42 pg/ml a 2.38 pg/ml (Grafica 10C).

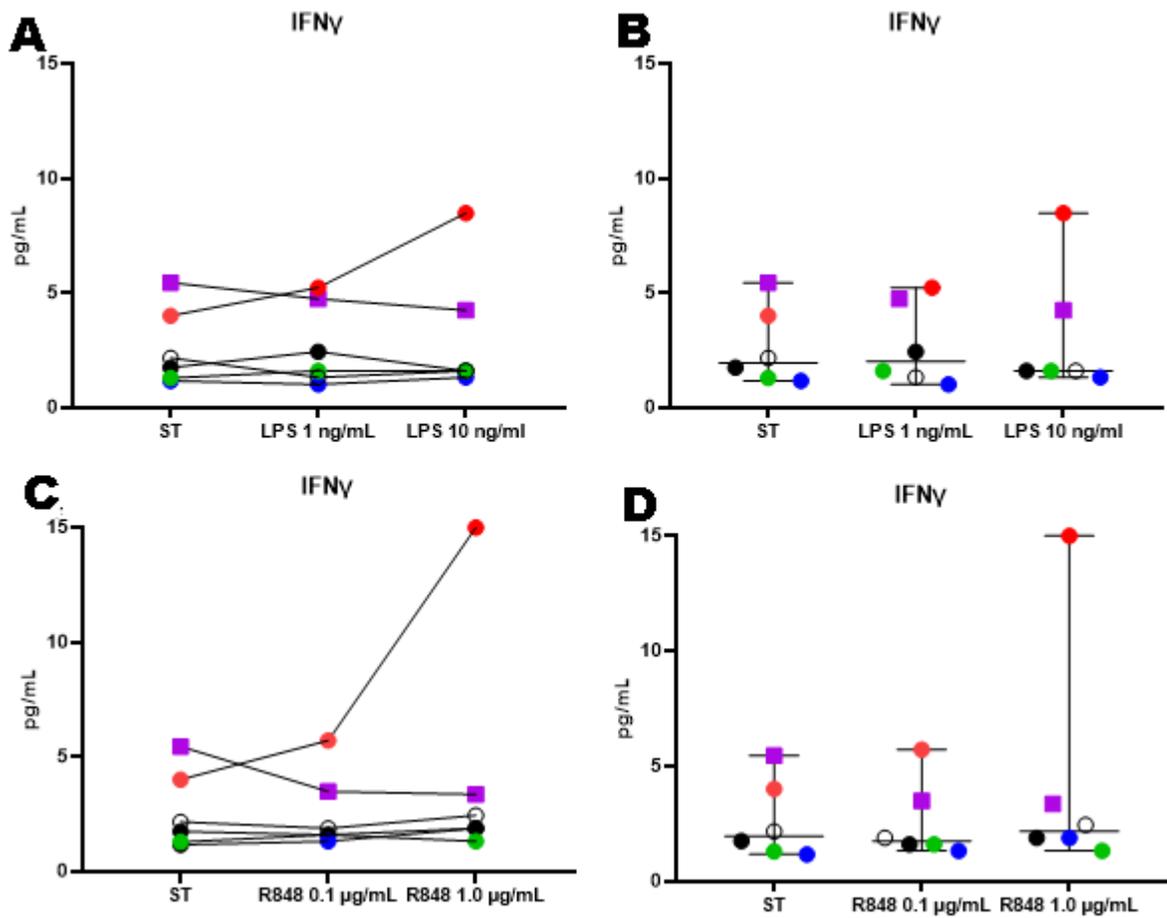


Grafica 10. Concentración de IL-12P70 (pg /ml), citocina distintiva de las células Th1. La representación incluye datos. Sin tratar y después del tratamiento por 48 horas LPS en concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml (A y B) R848 en concentraciones a 0.1 µg/ml y 1 µg/ml (C y D). Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) mostrando medianas y rangos (B y D). Prueba Friedman test LPS ($p=0.87$) y R848 ($p=0.24$), sin diferencia estadística significativa

Los niveles basales de IL-12p70 presentaron una mediana de 1.69 pg/ml (0.8 - 3.95 pg/ml). En el caso de los tratamientos con LPS a 1 ng/ml, presentaron un ligero aumento de 2.04 pg/ml (1.18-7.72 pg/ml), mientras que con 10 ng/ml se observó una ligera disminución 1.52 pg/ml (1.18-12.40 pg/ml) (Grafica 11B), en ambos caso, el comportamiento de las muestras mostró una respuesta baja a cada uno de los

tratamientos. Únicamente una muestra exhibió un incremento en los niveles de IL12p70 en respuesta al incremento del ligando a 1 ng/ml aumento a 8.91 pg/ml y con 10 ng/ml 13.59 pg/ml con respecto al sin tratar 3.25 pg/ml (Grafica 11A)

En lo que respecta a los tratamientos con R848 a una concentración de 0.1 µg/ml, no se observaron diferencia en los niveles de IL12p70, que se mantuvo en 1.69 pg/ml (1.5-11.8 pg/ml) y con 1 µg/ml se observó un ligero incremento de 1.86 pg/ml (1.52-75.8) (Grafica 11D). En uno de los pacientes, se presentó un aumento dependiente de la concentración de R848 en comparación con el grupo sin tratar 3.25 pg/ml aumento a 0.1 µg/ml 13.04 pg/ml y a 1 µg/ml de R848 incremento a 75.7 pg/ml, Lo que indica un fenotipo de células Th1 (Grafica 11C).



Grafica 11. Concentración de $INF-\gamma$ (pg/ml), citocina distintiva de las células Th1. La representación incluye datos. Sin tratar y después del tratamiento por 48 horas LPS en concentraciones de 1 ng/ml y 10 ng/ml (A y B) R848 en concentraciones a 0.1 µg/ml y 1 µg/ml (C y D). Los resultados se presentan en forma de gráficos por paciente (A y C) mostrando medianas y rangos (B y D). Prueba Friedman test LPS ($p=0.99$) y R848 ($p=0.42$), sin diferencia estadística significativa.

Los niveles de $INF-\gamma$ en el grupo no tratado fueron de 1.96 pg/ml (1.17 - 5.45 pg/ml). Estos niveles experimentaron un ligero aumento a 2.02 pg/ml (1.01 - 5.24 pg/ml) con LPS a 0.1 ng/ml y disminuyó ligeramente a 1.61 pg/ml (1.32- 8.48 pg/ml) con 10 ng/ml de LPS (Grafica 12B). La tendencia en los datos por paciente fue similar, pero con variaciones en las concentraciones de $INF-\gamma$, con excepción de una muestra que

mostró un aumento en el tratamiento con LPS a 1 ng/ml teniendo un valor de 5.24 pg/ml y con 10 ng/ml aumentó a 8.48 pg/ml (Grafica 12A).

Para el caso de tratamiento de R848 en comparación con el grupo sin tratar con niveles de 1.96 pg/ml (1.17-5.45 pg/ml), se observó una disminución de 1.75 pg/ml (1.32- 5.72 pg/ml) con una concentración de 0.1 µg/ml y un aumento a 2.17 pg/ml (1.32-15 pg/ml) con 1.0 µg/ml (Grafica 12D).

Al igual que con LPS, un paciente presentó un incremento de IFN-γ con el aumento de R848, de 4.01 pg/ml aumento a 5.72 pg/ml con 0.1 µg/ml y a 15 pg/ml con 1 µg/ml (Grafica 12B).

Correlación entre ARNm y proteína de los TLR 4 Y 8

El tratamiento de las células para la evaluación conjunta de transcripción y traducción no fue adecuado. Al visualizar las preparaciones de inmunocitoquímica, se observaron fragmentos celulares que no permitieron la identificación de compartimentos. Uno de los indicadores metodológicos que nos permitió identificar la fuente de error es la falta de núcleos. Esta falta nos indica que el uso de la mezcla alcohólica de ácido acético no preserva la integridad de los linfocitos Treg separados. Al no tener una conservación de la compartimentalización celular, no era posible evaluar la presencia de mRNA.

DISCUSIÓN

El aprendizaje, la práctica y optimización de las metodologías es importante para tener resultados confiables y reproducibles, para poder cumplir con los objetivos del proyecto de investigación. El uso de dos kits de enriquecimiento de células Treg fue fundamentales para tomar una decisión respecto al método de enriquecimiento más adecuado para nuestro estudio, ya que la pureza de las células Treg resulta crucial, ya que debemos activar receptores de tipo-Toll que también se expresan en otras células del sistema inmune. Esto se evidencia claramente en los resultados de los análisis realizados de sangre periférica de pacientes con LLA, donde se evidenció la expresión de TLR en linfocitos T CD4+ y células NK (Sánchez-Cuaxospa et al., 2016; Sánchez-Herrera et al., 2021). Con base a nuestros resultados decidimos utilizar el Kit de Stemcell CD4+CD127^{low}CD25⁺ en nuestro estudio ya que nos permitió obtener una pureza de células T reg del 92%.

Los experimentos de activación de células Treg con tres diferentes concentraciones de R848 y tres tiempos de exposición, nos permitió evaluar la cinética de activación de las células Treg a través del tiempo y de la concentración utilizada como indicador de la citocina IL-10. Observamos variaciones en las concentraciones de IL-10 en los tres experimentos realizados de forma independiente, pero notamos una misma tendencia con el tratamiento con R848 a 0.1 µg/ml a las 48 horas, donde se detectó una leve disminución en la concentración de IL-10. Además, se observó un aumento de IL-10 a las 48 horas con 1 µg/ml de R848. Estos resultados nos sugirieron un comportamiento de las células Treg frente a la activación de TLR8 con R848. Específicamente, la

reducción en la liberación de IL-10 sugiere un efecto posible de plasticidad en las células Treg.

El tratamiento con LPS, en general a los diferentes tiempos y concentraciones produjo un incremento en la producción de IL-10 por lo que se decidió utilizar concentraciones de 1ng/ml y 10 ng/ml. Por otro lado, las concentraciones de TGF- β presentaron un comportamiento diferente al de IL-10. Se observó una concentración alta desde los controles a las 48 y 72 horas, seguida de una disminución con 1 ng/ml de LPS y un aumento con 10 ng/ml. Este efecto fue más notable a las 48 horas, lo que nos llevó a considerar este tiempo como el más adecuado para el estudio, debido a los cambios observados en las concentraciones de TGF- β y a la tendencia al aumento en la concentración de IL-10.

Con base a los resultados obtenidos, se procedió al procesamiento de las muestras obtenidas de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de tipo preB. Esta variante de LLA se caracteriza por la acumulación de células leucémicas en una fase inicial de desarrollo, específicamente identificadas como células pre-B (Crist, Carroll, & Pui, 1990; Pérez-Saldivar et al., 2011)

Los hallazgos revelaron que las células Treg, identificadas por su expresión de CD25+FoxP3+ en el conjunto de CMN totales, presentaban un porcentaje de 1.23% (0.05 - 32.93%). Además, se llevó a cabo un análisis adicional enfocado en la proporción de células Treg CD25+ FoxP3+ dentro de la población de linfocitos T CD4+, este análisis reveló un porcentaje de 3% (2.4 -32%), células T CD4+ en los pacientes con LLA -preB. Se ha descrito en estudios previos que el porcentaje de células T CD4+

en LLA de células precursoras de B suele ser normal y en algunos casos pueden estar disminuidas o agotadas con respecto a personas sanas adultas (Gerdemann & Alvarez-Calderon, 2022; Lepe-Zúñiga, Jerónimo-López, & Hernández-Orantes, 2017).

Con el propósito de proporcionar un contexto más amplio, contrastamos nuestros resultados con las proporciones de células Treg documentadas en niños sanos, de acuerdo a (Zahran et al., 2021) es de $(1.9 \pm 0.1\%)$. Sin embargo, debemos mencionar que los datos en el artículo de referencia se presentaron utilizando la media y la desviación estándar. Dado que nuestros datos son porcentajes utilizamos la mediana y el rango 1.23 % (0.05-32.93%) de células Treg CD4+CD25+FoxP3+.

En este estudio investigamos el efecto de la activación de los TLR en las células Treg de pacientes pediátricos con LLA, centrándonos de manera específica en la modificación de su inmunofenotipo por la secreción de citocinas. Se observó que la activación de los TLR 4 y 8 promovió la secreción de citocinas que favorecen el cambio de inmunofenotipo de las Treg hacia el subtipo TH17.

En relación con las citocinas, se evaluaron los niveles de varias de ellas que se conocía su importancia tanto para las células Treg, como para el efecto de plasticidad hacia células Th17 y Th1, en respuesta a los tratamientos con lipopolisacárido (LPS) y resiquimod (R848) por activación de TLR 4 y TLR8 respectivamente.

Con relación a la secreción de citocinas regulatorias o inhibitorias de la respuesta inmune, entre las cuales se incluyen la IL-10 y el TGF- β , que han sido descritas como parte integral de los mecanismos reguladores de las células Treg (Akkaya & Shevach,

2020), también se ha observado que estas están alteradas en pacientes adultos con LLA (Wu et al., 2012).

Observamos que los niveles iniciales de IL-10 fueron bajos, es probable que esto pueda estar relacionado con la cantidad de células cultivadas o con la fracción específica de células Treg (Miyara et al., 2009). Los tratamientos con LPS y R848 no produjeron cambios en los niveles de IL-10 en general. Sin embargo, se resaltó un caso particular en el que se observó un aumento considerable en los niveles de IL-10 en respuesta al tratamiento con R848 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cabe destacar que la IL-10 desempeña un papel crucial en la interregulación entre las células Th1, Th2, TH17 (Sabat et al., 2010).

TGF- β , otra citocina distintiva de las células Treg, tuvo niveles basales más elevados en comparación con otras citocinas. Esta citocina juega un papel crucial al inducir la expresión de genes que regulan la función supresora de las Treg, como Foxp3 (Hue et al., 2012; Maruyama, 2015).

Después de los tratamientos, se identificó un ligero aumento en los niveles de TGF- β con LPS a 1 ng/ml y una ligera disminución con LPS a 10 ng/ml. Por otro lado, el tratamiento con R848 a 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ llevó a una reducción en los niveles de TGF- β . Este efecto de disminución puede ser clave para el cambio de isotipo de las Treg. Se ha informado que TGF- β al interactuar con otras citocinas, como IL-6, puede influir en la diferenciación a células Th17 en células Tnaive (Sharma, Kaveri, & Bayry, 2013; J. Wang, Zhao, & Wan, 2023). No obstante, también se ha demostrado

que las células Th17 pueden generarse en ausencia de TGF- β , si se combinan citocinas como IL-6 con IL-23 o IL-1 β (Kyburz & Corr, 2011).

En este sentido, se llevó a cabo un análisis de citocinas consideradas que participan en la modulación del inmunofenotipo, enfocándonos en la IL-6, una citocina proinflamatoria con un papel trascendental en la regulación de la respuesta inmunológica. La IL-6 puede influir en el inmunofenotipo a través de la vía de señalización IL-6-STAT3, promoviendo la diferenciación de células Th17 y obstaculizando la diferenciación de las células Treg (Burchill et al., 2007). Nuestros hallazgos indican que las células Treg de pacientes pediátricos con LLA preB produjeron niveles basales bajos de IL-6 y los tratamientos con LPS no tuvieron un impacto en los niveles de IL-6, lo que sugiere que, en este contexto particular, las células Treg pueden ser menos susceptibles a la inducción de IL-6 y a la posible transición hacia el fenotipo Th17. Aunque se observó una variabilidad en las respuestas individuales, no se identificó un patrón claro en la secreción de IL-6. Sin embargo, el tratamiento con R848 no produjo cambio en la concentración de IL-6 a 0.1 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo se observó una disminución importante en la mediana en la concentración con el tratamiento de 1 $\mu\text{g/ml}$, a pesar del notable incremento de un paciente.

En cuanto al perfil de IL-1 β , esta citocina ha emergido como un actor fundamental en la diferenciación de los principales subconjuntos de células T cooperadoras, Th1, Th2 y Th17, ya que fomenta la expresión de genes que promueven la diferenciación de

células Th17, tales como ROR γ t y STAT3 (Garlanda & Mantovani, 2013; Lasigliè et al., 2011).

Nuestros resultados revelan que las células Treg obtenidas de pacientes pediátricos con LLA preB tenían una concentración basal de IL-1 β pequeña. Tras la exposición con los tratamientos de LPS, se observó un ligero aumento con 1 ng/ml y con 10 ng/ml. Si bien los niveles de IL-1 β presentaron comportamientos similares en los cuatro pacientes, hubo incremento mayor en 2 pacientes con ambas concentraciones. Asimismo, el tratamiento con R848 resultó en un aumento con ambas concentraciones en comparación con el grupo no tratado. Hubo un paciente que tuvo un incremento notable con la concentración 1 μ g/mL, sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos resaltan la complejidad de las respuestas de las células Treg ante estímulos inflamatorios, lo que puede influir en la modulación de la plasticidad entre Treg y Th17 (Knochelmann et al., 2018). Algunos autores han mostrado que la IL-1 β puede actuar de forma sinérgica con otras citocinas, como la IL-6, para promover la diferenciación a células Th17 (Garlanda & Mantovani, 2013).

La plasticidad de las células Treg origina conduce a la generación de células semejantes a Th17, caracterizadas por su producción de citocinas como IL-17A, IL-21, IL-22, IL-10 e IL-23 (El-maadawy, Bakry, Moussa, El-Naby, & Talaat, 2022; Hatzioannou et al., 2021), conocidas también como células ex-Treg, las cuales poseen una mayor resistencia a la supresión impuesta por las células T reguladoras (Saxena, Lakhani, Iyathurai, & Bromberg, 2021). En este contexto, procedimos al análisis de la citocina IL-17, donde los niveles basales fueron bajos y después del tratamiento con

LPS a una concentración de 1 ng/ml no observamos cambios pero la concentración de 10 ng/ml, se observó un incremento considerable en comparación con las células sin tratar.

En cuanto al tratamiento con R848, se observó un aumento en los niveles de IL-17. Las concentraciones registradas con 0.1 µg/mL y con 10 µg/mL fueron mayores, en comparación con el grupo sin tratar, lo que nos sugiere que se logró el cambio de inmunofenotipo con los dos tratamientos de R848y con la mayor concentración de LPS. Sin embargo, por la dispersión de los datos la diferencia no fue significativa, y las células de un paciente tuvieron una disminución importante con las diferentes concentraciones del tratamiento, mismo que tuvo mayor concentración de TGF-β.

En la misma línea, se ha explorado el efecto de la plasticidad hacia Th1, generando lo que se conoce como ex Th17, que producen citocinas tipo Th1. Estas células ex Th17 muestran una mayor resistencia a la supresión ejercida por las células T reguladoras, lo que significa que estas células pueden persistir en el sistema inmunológico incluso en presencia de células T reguladoras. Las células Th1 secretan citocinas como INFγ, IL-2 e IL-12 (Basdeo et al., 2017). Por lo que determinamos los cambios en los niveles de dichas citocinas, después del tratamiento con LPS y R848 en células Treg de pacientes pediátricos LLA preB.

La IL-2, citocina pleiotrópica que estimula el crecimiento de las células, aumenta la actividad citolítica de las NK y favorece la diferenciación a Th1 al promover la expresión de genes que codifican para las citocinas Th1, como el IFN-γ (Liao, Lin, & Leonard, 2011), nuestros resultados reflejan que los tratamientos con LPS y R848 no generaron

un cambio en los niveles de IL-2. Aunque hubo algunas variaciones en las respuestas individuales, no se observaron diferencias significativas. Esta observación podría indicar que los tratamientos no favorecieron la diferenciación hacia Th1. Vale la pena mencionar que la IL-2 podría tener efectos tanto favorables como desfavorables debido a su naturaleza pleiotrópica y a la presencia del entorno de células Treg, las cuales, debido a su expresión de CD25, presentan una mayor captación de IL-2, lo cual podría potenciar su crecimiento y proliferación (Fontenot et al., 2017, 2005). Lo cual no ocurrió y es de acuerdo con lo esperado.

En lo que respecta a la citocina heterodimérica IL-12p70, la forma biológicamente activa de la IL-12 que se forma cuando las dos subunidades se unen, se observó que hubo cambios leves en los niveles de la citocina en respuesta a los tratamientos. Con respecto al tratamiento con LPS, se observó un aumento ligero a la concentración de 1 ng/ml y una disminución leve con 10 ng/ml. Sin embargo, estos cambios no fueron consistentes en todas las muestras. En el caso del tratamiento con R848, no se observaron diferencias relevantes en los niveles de IL-12p70 en comparación con el grupo sin tratar lo que sugiere nuevamente que no hubo cambio a células Th1. Estos resultados sugieren que los tratamientos con LPS y R848 no influyeron en la producción de IL-12p70 en las células Treg evaluadas. Si bien la IL-12 ha sido poco explorada en la Th1 no convencional, un estudio ha observado que favorece a las células Th1 y que posee una relevante respuesta inmunológica antitumoral, lo cual se comprobó mediante la utilización de ARNm de IL-12 (Hewitt et al., 2020).

Las células Th1 también produjeron IFN- γ , el cual puede contribuir a la activación de las células T y NK, importantes en la lucha inmunológica contra el cáncer (Kamali et al., 2019), por lo que su importancia en el microambiente del cáncer es innegable. En nuestros resultados, se detectaron aumentos mínimos en los niveles de esta citocina en respuesta al tratamiento con 0.1 ng/ml de LPS y disminuciones en respuesta a 10 ng/ml. Nuevamente, se apreció variabilidad en las respuestas individuales. Con respecto al tratamiento con R848, se observó una leve disminución en los niveles de IFN- γ con una concentración de 0.1 μ g/ml, seguida de un ligero aumento en los niveles con 1 μ g/ml. Estos cambios no fueron consistentes en todas las muestras. En conjunto, estos resultados muestran que los tratamientos con LPS y R848 tuvieron efectos variables en la producción de IFN- γ por parte de las células Treg, sugiriendo que, al igual que con IL-2 e IL-12, no se evidenció una diferenciación hacia el fenotipo Th1 o ex-Th17 (Basdeo et al., 2017).

También es importante destacar que entre las células Treg de los pacientes, se identificó una muestra que de manera constante manifestó un comportamiento distinto en los niveles de cada citocina, sin ajustarse a las tendencias observadas en las poblaciones con patrones más similares. Se llevó a cabo un análisis exhaustivo de las variables que pudieran haber desencadenado este fenómeno, como posibles infecciones subyacentes o enfermedades inmunológicas no notificadas en el momento de la obtención de las muestras. Sin embargo, no se halló ninguna variable que pudiera explicar este comportamiento particular. Por lo tanto, es plausible plantear la hipótesis

de que estos efectos podrían derivarse simplemente de factores genéticos ante los estímulos presentes en el paciente.

Para poder realizar la evaluación conjunta de transcripción y traducción de los TLR es importante mantener la compartimentalización celular. En nuestro caso, el uso de un fijador equilibrado como la solución de Carnoy no permitió la conservación de la estructura celular, aun cuando se ha reportado que es un método simple y útil para estudios de citoarquitectura (Dias et al., 2016). Una opción es utilizar soluciones con albúmina como aditivo (Francis, 2010) o usar un fijador más genérico como glutaraldehído en dos etapas, (Abay et al., 2019). En cualquier caso, la inmovilización de las células en portaobjetos cubiertos con colágena o albúmina de manera directa podría facilitar el procesamiento. En la mayoría de los casos, los anticuerpos tienen incorporado dentro de su formulación comercial la presencia de estabilizadores como la albúmina (Francis, 2010) por lo cual no interferiría con el ensayo.

De manera complementaria, si bien se utilizan detergentes no iónicos como el tritón X100 para permeabilizar a las células y que con ello permitir el acceso de los anticuerpos que reconocen proteínas de compartimientos intracelulares, en nuestro caso lo recomendable sería disminuir la concentración y el tiempo de exposición. Un punto de partida sería utilizar soluciones de tritón 0.01% por lapsos de 5 minutos como ocurre con células cultivadas y detectadas in situ (J. F. Lee, Liao, Kuo, Yang, & Chiou, 2000) o de 0.1% en células adheridas a sustratos (Angerer & Angerer, 1981).

CONCLUSIÓN

Los cambios observados en los niveles de las citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β , no fueron estadísticamente significativos por lo que la activación de TLR4 y TLR8 a través de sus ligandos LPS y R848 respectivamente, no incrementaron la inmunosupresión.

La IL-6 y IL-1 β que son citocinas que de acuerdo con la literatura se requieren para el cambio de inmunofenotipo, no tuvieron cambios importantes con los tratamientos de LPS y R848.

La IL-17 fue la única citocina que mostró un mayor incremento por activación de TLRs 4 y 8 lo que sugiere la transición del inmunofenotipo de las Treg hacia el subtipo TH17. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas por lo que debe explorarse más este fenómeno.

La plasticidad de las células Treg hacia un fenotipo similar a Th17 es un tema de interés en la investigación de actualidad como una inmunoterapia en neoplasias sólidas y hematológicas. En este estudio, se observó que las respuestas a los estímulos utilizados podrían estar influyendo en esta plasticidad, especialmente en la producción de citocinas

En conjunto, estos hallazgos resaltan la complejidad de las respuestas de las células Treg y la variación que puede haber entre los pacientes a la activación de los TLR y la plasticidad asociada en el contexto de la LLA preB. Estos resultados sugieren la necesidad de investigaciones adicionales para comprender más a fondo los

mecanismos de estas respuestas, así como las vías de activación presentes en el cambio de plasticidad y cómo podrían influir en la respuesta inmunológica en pacientes pediátricos con esta enfermedad.

El estudio de la plasticidad celular podría ofrecer nuevas perspectivas en el diseño de enfoques terapéuticos que modulen de manera selectiva la función de las células Treg y su interacción con otras células del sistema inmunológico en el contexto de la LLA preB.

REFERENCIA.

- Abay, A., Simionato, G., Chachanidze, R., Bogdanova, A., Hertz, L., Bianchi, P., ... Kaestner, L. (2019). Glutaraldehyde - A subtle tool in the investigation of healthy and pathologic red blood cells. *Frontiers in Physiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00514>
- Abbott, M., & Ustoyev, Y. (2019). Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Seminars in Oncology Nursing*. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.002>
- Abul K. Abbas ; Andrew H. Litchman; Shiv Pillai. (2017). *INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR octava edicion. Elsevier.*
- Akkaya, B., & Shevach, E. M. (2020). Regulatory T cells: Master thieves of the immune system. *Cellular Immunology*, 355. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104160>
- Ali, A. J., Makings, J., & Ley, K. (2020). Regulatory T Cell Stability and Plasticity in Atherosclerosis. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9122665>
- Álvaro, T., Lejeune, M., Salvadó, M. T., Bosch, R., García, J. F., Jaén, J., ... Piris, M. A. (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clinical Cancer Research*, 11(4). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1869>
- Angerer, L. M., & Angerer, R. C. (1981). Detection of poly A+ RNA in sea urchin eggs and embryos by quantitative in situ hybridization. *Nucleic Acids Research*, 9(12). <https://doi.org/10.1093/nar/9.12.2819>

- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Borowitz, M. J., Calvo, K. R., Kvasnicka, H. M., ... Tefferi, A. (2022). International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, *140*(11). <https://doi.org/10.1182/blood.2022015850>
- Basdeo, S. A., Cluxton, D., Sulaimani, J., Moran, B., Canavan, M., Orr, C., ... Fletcher, J. M. (2017). Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *198*(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600737>
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., & Banham, A. H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(34). <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9584>
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., ... Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*(7090). <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Bhattacharya, K., Chandra, S., & Mandal, C. (2014). Critical stoichiometric ratio of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells and CD4⁺ CD25⁻ responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology*, *142*(1). <https://doi.org/10.1111/imm.12237>
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>

Boroughs, L. K., & Deberardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>

Bosch, F., & Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0239-8>

Bothale, A., Bothale, K., Mahore, S., & Dongre, T. (2018). Cytodiagnosis of coexistence of leukemic infiltration and extramedullary hematopoiesis in a cervical lymph node, in T cell leukemia patient. *Journal of Cytology*, 35(3). <https://doi.org/10.4103/0970-9371.232256>

Burchill, M. A., Yang, J., Vang, K. B., & Farrar, M. A. (2007). Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.08.005>

Burslem, G. M., Schultz, A. R., Bondeson, D. P., Eide, C. A., Stevens, S. L. S., Druker, B. J., & Crews, C. M. (2019). Targeting BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia by PROTAC-mediated targeted protein degradation. *Cancer Research*, 79(18). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1236>

Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M., & Demengeot, J. (2003). Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated

by lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, 197(4).
<https://doi.org/10.1084/jem.20021633>

Castellanos-Martínez, R., León-Vega, I. I., Guerrero-Fonseca, I. M., Vargas-Robles, H., Jiménez-Camacho, K. E., Hernández-Galicia, G., ... Schnoor, M. (2023). T cell functions and organ infiltration by leukemic T cells require cortactin. *Journal of Leukocyte Biology*, 113(3). <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad001>

Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J. M., ... Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, 34(4).
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>

Chen, W. J., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., ... Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12). <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>

Chennamadhavuni A, Lyengar V, & Mukkamalla SKR. (2023). Leukemia - StatPearls - NCBI Bookshelf. *NCBI*.

Chodaczek, G., Pagni, P. P., Christoffersson, G., Ratliff, S. S., Toporkiewicz, M., Wegrzyn, A. S., & von Herrath, M. (2021). The effect of Toll-like receptor stimulation on the motility of regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity*, 116.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102563>

Chuenchor, W., Jin, T., Ravilious, G., & Xiao, T. S. (2014). Structures of pattern

recognition receptors reveal molecular mechanisms of autoinhibition, ligand recognition and oligomerization. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.10.009>

Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>

Colby-Graham, M. F., & Chordas, C. (2003). The childhood leukemias. *Journal of Pediatric Nursing*, 18(2). <https://doi.org/10.1053/jpdn.2003.9>

Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., ... Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169). <https://doi.org/10.1038/nature06306>

Craddock, C. (2009). Acute leukaemias. *Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.01.007>

Crellin, N. K., Garcia, R. V., Hadisfar, O., Allan, S. E., Steiner, T. S., & Levings, M. K. (2005). Human CD4⁺T Cells Express TLR5 and Its Ligand Flagellin Enhances the Suppressive Capacity and Expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, 175(12). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8051>

Crist, W. M., Carroll, A. J., & Pui, C. H. (1990). Pre-b-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Leukemia and Lymphoma*, 3(1). <https://doi.org/10.3109/10428199009050969>

- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9). <https://doi.org/10.1038/nm1093>
- de Jesus, L. E., Dekermacher, S., Resende, G. C., & Justiniano, R. R. (2022). Testicular involvement in pediatric acute lymphocytic leukemia: what to do about it? *International Braz J Urol*, 48(6). <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2022.0318>
- De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>
- Dias, A. R., Pereira, M. A., Mello, E. S., Zilberstein, B., Cecconello, I., & Ribeiro Junior, U. (2016). Carnoy's solution increases the number of examined lymph nodes following gastrectomy for adenocarcinoma: a randomized trial. *Gastric Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1007/s10120-014-0443-2>
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Ebert, E. C., & Hagspiel, K. D. (2012). Gastrointestinal manifestations of leukemia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06908.x>

- El-maadawy, E. A., Bakry, R. M., Moussa, M. M., El-Naby, S. H., & Talaat, R. M. (2022). Genetic variation in FOXP3 and ROR- γ genes in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) patients: correlation with associated cytokines. *Discover Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00549-3>
- Engelhardt, S., Patkar, S., & Ogunshola, O. O. (2014). Cell-specific blood-brain barrier regulation in health and disease: A focus on hypoxia. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.12489>
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2017). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 198(3). <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology*, 6(11). <https://doi.org/10.1038/ni1263>
- Francis, G. L. (2010). Albumin and mammalian cell culture: Implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9263-3>
- Frey, D. M., Droeser, R. A., Viehl, C. T., Zlobec, I., Lugli, A., Zingg, U., ... Tornillo, L. (2010). High frequency of tumor-infiltrating FOXP3⁺ regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients.

International Journal of Cancer, 126(11). <https://doi.org/10.1002/ijc.24989>

Fujio, K., Yamamoto, K., & Okamura, T. (2017). Overview of LAG-3-Expressing, IL-10-Producing regulatory T cells. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 410). https://doi.org/10.1007/82_2017_59

Garlanda, C., & Mantovani, A. (2013). Ligands and receptors of the interleukin-1 family in immunity and disease. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00396>

Gerdemann, U., & Alvarez-Calderon, F. (2022). Uncovering CD4+ T-cell exhaustion in B-ALL. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016597>

Guéry, L., & Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/314620>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hartmann, E. M., Rudelius, M., Burger, J. A., & Rosenwald, A. (2016). CCL3 chemokine expression by chronic lymphocytic leukemia cells orchestrates the composition of the microenvironment in lymph node infiltrates. *Leukemia and Lymphoma*, 57(3). <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1068308>

Hatzioannou, A., Boumpas, A., Papadopoulou, M., Papafragkos, I., Varveri, A., Alissafi, T., & Verginis, P. (2021). Regulatory T Cells in Autoimmunity and Cancer: A Duplicitous Lifestyle. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.731947>

- Hewitt, S. L., Bailey, D., Zielinski, J., Apte, A., Musenge, F., Karp, R., ... Luheshi, N. (2020). Intratumoral IL12 mRNA therapy promotes TH1 transformation of the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 26(23). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0472>
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.[see comment]. *Science*, 299(5609).
- Hue, S., Kared, H., Mehwish, Y., Mouhamad, S., Balbo, M., & Levy, Y. (2012). Notch activation on effector T cells increases their sensitivity to Treg cell-mediated suppression through upregulation of TGF- β RII expression. *European Journal of Immunology*, 42(7). <https://doi.org/10.1002/eji.201142330>
- Idris, S. Z., Hassan, N., Lee, L. J., Md Noor, S., Osman, R., Abdul-Jalil, M., ... Abdullah, M. (2016). Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukaemia patients. *Hematology*, 21(4). <https://doi.org/10.1080/10245332.2015.1101965>
- Inaba, H., & Pui, C. H. (2021). Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Medicine*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/jcm10091926>
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Kakisaka, K., Suzuki, Y., Kowata, S., Ito, S., & Takikawa, Y. (2021). Acute liver injury due to T-cell infiltration into the liver as an initial clinical finding of adult T-cell

leukemia/lymphoma. *Internal Medicine*, 60(15).

<https://doi.org/10.2169/internalmedicine.6793-20>

Kamali, A. N., Noorbakhsh, S. M., Hamedifar, H., Jadidi-Niaragh, F., Yazdani, R., Bautista, J. M., & Azizi, G. (2019). A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. *Molecular Immunology*, 105.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.11.015>

Kaur, B. P., & Secord, E. (2019). Innate Immunity. *Pediatric Clinics of North America*.

<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2019.06.011>

Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*.

<https://doi.org/10.1038/ni.1863>

Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Bailey, S. R., Amaya, S. M., Elston, D. M., Mazza-McCrann, J. M., & Paulos, C. M. (2018). When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cellular and Molecular Immunology*.

<https://doi.org/10.1038/s41423-018-0004-4>

Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature Immunology*, 10(6).

<https://doi.org/10.1038/ni.1731>

Kopp, E. B., & Medzhitov, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 11(1). <https://doi.org/10.1016/S0952->

7915(99)80003-X

Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., ... Kuchroo, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H17 cells. *Nature*, *448*(7152). <https://doi.org/10.1038/nature05970>

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., ... Zou, W. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*, *114*(6). <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208249>

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, *30*(1). <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>

Kyburz, D., & Corr, M. (2011). Th17 cells generated in the absence of TGF- β induce experimental allergic encephalitis upon adoptive transfer. *Expert Review of Clinical Immunology*, *7*(3). <https://doi.org/10.1586/eci.11.7>

Langmann, T., & Rehli, M. (2010). Editorial. *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.07.001>

Lasigliè, D., Traggiai, E., Federici, S., Alessio, M., Buoncompagni, A., Accogli, A., ... Gattorno, M. (2011). Role of IL-1 beta in the development of human TH17 cells: Lesson from NLPR3 mutated patients. *PLoS ONE*, *6*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020014>

Lebien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: How they develop and function.

Blood, 112(5). <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>

Lee, G. R. (2018). The balance of th17 versus treg cells in autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>

Lee, J. F., Liao, P. M., Kuo, C. C., Yang, H. T., & Chiou, C. T. (2000). Influence of a nonionic surfactant (Triton X-100) on contaminant distribution between water and several soil solids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 229(2). <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7039>

Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O., & Weaver, C. T. (2009). Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. *Immunity*, 30(1). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.005>

Lepe-Zúñiga, J. L., Jerónimo-López, F. J., & Hernández-Orantes, J. G. (2017). Características citopatológicas de la leucemia aguda en el Hospital de Especialidades Pediátricas de Chiapas, México. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 74(2). <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.12.002>

Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10). <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>

Liao, W., Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2011). IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.003>

- Lin, W., Haribhai, D., Relland, L. M., Truong, N., Carlson, M. R., Williams, C. B., & Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nature Immunology*, 8(4). <https://doi.org/10.1038/ni1445>
- Liu, G., & Zhao, Y. (2007). Toll-like receptors and immune regulation: Their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02651.x>
- Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D., & Liew, F. Y. (2006). Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18). <https://doi.org/10.1073/pnas.0601554103>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: Differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Ma, S., Shi, Y., Pang, Y., Dong, F., Cheng, H., Hao, S., ... Zheng, G. (2014). Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen. *Journal of Hematology and Oncology*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0071-7>
- Madhusoodhan, P. P., Carroll, W. L., & Bhatla, T. (2016). Progress and Prospects in Pediatric Leukemia. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 46(7). <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.04.003>
- Malek, T. R., Yu, A., Zhu, L., Matsutani, T., Adeegbe, D., & Bayer, A. L. (2008). IL-2

family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *Journal of Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9235-y>

Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G. M., Jacobsen, E. S., Polansky, J. K., Maclsaac, K. D., ... Young, R. A. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*, 445(7130). <https://doi.org/10.1038/nature05478>

Maruyama, T. (2015). TGF- β -induced I κ B- ζ controls Foxp3 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.013>

Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x>

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., & Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF κ B activation. *Nature Immunology*, 5(5). <https://doi.org/10.1038/ni1061>

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., ... Sakaguchi, S. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*, 30(6). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019>

Montironi, C., Muñoz-Pinedo, C., & Eldering, E. (2021). Hematopoietic versus solid cancers and T cell dysfunction: Looking for similarities and distinctions. *Cancers*,

13(2). <https://doi.org/10.3390/cancers13020284>

Mukherjee, S. (2012). The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer. *Journal of Postgraduate Medicine, Education and Research*, 46(2).
<https://doi.org/10.5005/jp-journals-10028-1025>

Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Latz, E., Mills, K. H. G., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., ... Xavier, R. J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>

Ning, S., Pagano, J. S., & Barber, G. N. (2011). IRF7: Activation, regulation, modification and function. *Genes and Immunity*.
<https://doi.org/10.1038/gene.2011.21>

Núñez-Enríquez, J. C., Bárcenas-López, D. A., Hidalgo-Miranda, A., Jiménez-Hernández, E., Bekker-Méndez, V. C., Flores-Lujano, J., ... Mejía-Aranguré, J. M. (2016). Gene Expression Profiling of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children with Very Early Relapse. *Archives of Medical Research*, 47(8).
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.12.005>

O'Brien, M. M., Seif, A. E., & Hunger, S. P. (2018). Acute lymphoblastic leukemia in children. *Wintrobe's Clinical Hematology: Fourteenth Edition*, 4939–5015.
<https://doi.org/10.1056/nejmra1400972>

Oberg, H. H., Juricke, M., Kabelitz, D., & Wesch, D. (2011). Regulation of T cell activation by TLR ligands. *European Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.012>

- Oleinika, K., Nibbs, R. J., Graham, G. J., & Fraser, A. R. (2013). Suppression, subversion and escape: The role of regulatory T cells in cancer progression. *Clinical and Experimental Immunology*, 171(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04657.x>
- Onciu, M. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(4), 655–674. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009>
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., & Li, M. O. (2010). Transforming growth factor- β signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity*, 32(5). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.012>
- Pahlavanneshan, S., Sayadmanesh, A., Ebrahimiyan, H., & Basiri, M. (2021). Toll-Like Receptor-Based Strategies for Cancer Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*. <https://doi.org/10.1155/2021/9912188>
- Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., & Lenardo, M. J. (2007). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nature Immunology*, 8(12). <https://doi.org/10.1038/ni1536>
- Peng, W., Fu, T., Wang, D. Y., Li, Y., Wang, H. Y., & Wang, R. (2005). Toll-Like Receptor 8 – Mediated Reversal of CD4⁺ Regulatory T Cell Function. *Science*, 309(August).
- Pereira, M. L., & Garcia E Costa, F. (2007). The blood-testis barrier as a target of some chemotherapeutic agents. *Chemotherapy*, 53(6).

<https://doi.org/10.1159/000110017>

Pérez-Figueroa, E., Sánchez-Cuaxospa, M., Martínez-Soto, K. A., Sánchez-Zauco, N., Medina-Sansón, A., Jiménez-Hernández, E., ... Maldonado-Bernal, C. (2016). Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection. *Oncology Reports*, 35(5). <https://doi.org/10.3892/or.2016.4657>

Pérez-Saldivar, M. L., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Martínez-Avalos, A., Medina-Sanson, A., Espinosa-Hernández, L., ... Mejia-Arangure, J. M. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-355>

Pogorzala, M., Kubicka, M., Rafinska, B., Wysocki, M., & Styczynski, J. (2015). Drug-resistance profile in multiple-relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Research*, 35(10).

Prada Garcia, C., Sanchez Sambucety, P., & Rodriguez Prieto, M. A. (2013). Cutaneous infiltratiton by chronic myelononocytic leukemia: Presentation of three cases. *Dermatology Online Journal*, 19(11). <https://doi.org/10.5070/d31911020408>

Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609>

Read, S., Malmström, V., & Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated

antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2).
<https://doi.org/10.1084/jem.192.2.295>

Rubtsov, Y. P., Niec, R. E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., ... Rudensky, A. Y. (2010). Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science*, 329(5999).
<https://doi.org/10.1126/science.1191996>

Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., & Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(5).
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>

Saijo, Y., Loo, E. P. iian, & Yasuda, S. (2018). Pattern recognition receptors and signaling in plant–microbe interactions. *Plant Journal*, 93(4).
<https://doi.org/10.1111/tpj.13808>

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. *The Journal of Immunology*, 155(3).
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.155.3.1151>

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., ... Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2).
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.7229>

Sánchez-Cuaxospa, M., Contreras-Ramos, A., Pérez-Figueroa, E., Medina-Sansón, A., Jiménez-Hernández, E., Torres-Nava, J. R., ... Maldonado-Bernal, C. (2016). Low expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Oncology*, 49(2). <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3569>

Sánchez-Herrera, D., Contreras-Ramos, A., Jiménez-Hernández, E., Medina-Sansón, A., Giono-Cerezo, S., & Maldonado-Bernal, C. (2021). NK Cell Subpopulation Is Altered and the Expression of TLR1 and TLR9 Is Decreased in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Oncology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5528378>

Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., & Takabayashi, A. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: Possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*, 98(5). <https://doi.org/10.1002/cncr.11618>

Saxena, V., Lakhan, R., Iyyathurai, J., & Bromberg, J. S. (2021). Mechanisms of exTreg induction. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.202049123>

Sharma, M., Kaveri, S. V., & Bayry, J. (2013). Th17 cells, pathogenic or not? TGF- β 3 imposes the embargo. *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.72>

Shenghui, Z., Yixiang, H., Jianbo, W., Kang, Y., Laixi, B., Yan, Z., & Xi, X. (2011).

- Elevated frequencies of CD4+CD25+CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *International Journal of Cancer*, 129(6). <https://doi.org/10.1002/ijc.25791>
- Silverman, L. B. (2007). Acute lymphoblastic leukemia in infancy. *Pediatric Blood and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/pbc.21352>
- Stockinger, B., & Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.005>
- Stritesky, G. L., Yeh, N., & Kaplan, M. H. (2008). IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *The Journal of Immunology*, 181(9). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.5948>
- Sutmuller, R. P. M., Garritsen, A., & Adema, G. J. (2007). Regulatory T cells and toll-like receptors: Regulating the regulators. In *Annals of the Rheumatic Diseases* (Vol. 66). <https://doi.org/10.1136/ard.2007.078535>
- Szczepanski, M. J., Szajnik, M., Czystowska, M., Mandapathil, M., Strauss, L., Welsh, A., ... Boyiadzis, M. (2009). Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research*, 15(10). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3010>
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., ... Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2).

<https://doi.org/10.1084/jem.192.2.303>

Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-Like receptors. *Current Protocols in Immunology*, 2015, 14.12.1-14.12.10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109>

Tang, Q., Boden, E. K., Henriksen, K. J., Bour-Jordan, H., Bi, M., & Bluestone, J. A. (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF- β in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European Journal of Immunology*, 34(11). <https://doi.org/10.1002/eji.200425143>

Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual Review of Immunology*, 36. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>

Tomar, N., & De, R. K. (2014). A brief outline of the immune system. *Methods in Molecular Biology*, 1184. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_1

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., ... Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Research*, 71(4). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>

Turk, M. J., Guevara-Patiño, J. A., Rizzuto, G. A., Engelhorn, M. E., & Houghton, A. N. (2004). Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 200(6). <https://doi.org/10.1084/jem.20041130>

Ustun, C., Miller, J. S., Munn, D. H., Weisdorf, D. J., & Blazar, B. R. (2011). Regulatory

T cells in acute myelogenous leukemia: Is it time for immunomodulation? *Blood*.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365817>

Vilchez Mercedes, S. A., Bocci, F., Levine, H., Onuchic, J. N., Jolly, M. K., & Wong, P. K. (2021). Decoding leader cells in collective cancer invasion. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00376-8>

Voo, K. S., Bover, L., Harline, M. L., Weng, J., Sugimoto, N., & Liu, Y.-J. (2014). Targeting of TLRs Inhibits CD4+ Regulatory T Cell Function and Activates Lymphocytes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The Journal of Immunology*, 193(2). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203334>

Wang, H. Y., Lee, D. A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., ... Wang, R. F. (2004). Tumor-Specific Human CD4+ Regulatory T Cells and Their Ligands: Implications for Immunotherapy. *Immunity*, 20(1). [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00359-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00359-5)

Wang, J., Zhao, X., & Wan, Y. Y. (2023). Intricacies of TGF- β signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01036-7>

Wang, R. F. (2006). Functional control of regulatory T cells and cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.11.004>

Wei, X., Zhang, J., Gu, Q., Huang, M., Zhang, W., Guo, J., & Zhou, X. (2017). Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance. *Cell Reports*,

21(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.090>

Weinberg, O. K., Porwit, A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Foucar, K., Duncavage, E. J., & Arber, D. A. (2023). The International Consensus Classification of acute myeloid leukemia. *Virchows Archiv*. <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03430-4>

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., ... Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322(5899). <https://doi.org/10.1126/science.1160062>

Wu, C. P., Qing, X., Wu, C. Y., Zhu, H., & Zhou, H. Y. (2012). Immunophenotype and increased presence of CD4 +CD25 + regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters*, 3(2). <https://doi.org/10.3892/ol.2011.499>

Xiang, W., Chao, Z. Y., & Feng, D. Y. (2015). Role of Toll-like receptor/MYD88 signaling in neurodegenerative diseases. *Reviews in the Neurosciences*, 26(4). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0067>

Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107753>

Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., & Strober, W. (2007). Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4+CD25–Foxp3– T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF- β . *The Journal of Immunology*, 178(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6725>

- Xu, Y., Mou, J., Wang, Y., Zhou, W., Rao, Q., Xing, H., ... Wang, J. (2021). Regulatory T cells promote the stemness of leukemia stem cells through IL10 cytokine-related signaling pathway. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01375-2>
- Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., ... Dong, C. (2008). Molecular Antagonism and Plasticity of Regulatory and Inflammatory T Cell Programs. *Immunity*, 29(1). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.007>
- Zahran, A. M., Shibl, A., Rayan, A., Mohamed, M. A. E. H., Osman, A. M. M., Saad, K., ... El-Badawy, O. (2021). Increase in polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and regulatory T-cells in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94469-x>
- Zapata-Tarrés, M., Balandrán, J. C., Rivera-Luna, R., & Pelayo, R. (2021). Childhood Acute Leukemias in Developing Nations: Successes and Challenges. *Current Oncology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01043-9>
- Zhang, S., & Kipps, T. J. (2014). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163955>
- Zhou, G., & Levitsky, H. I. (2007). Natural Regulatory T Cells and De Novo-Induced Regulatory T Cells Contribute Independently to Tumor-Specific Tolerance. *The Journal of Immunology*, 178(4). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2155>
- Zhou, T., Medeiros, L. J., & Hu, S. (2018). Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-

ABL1. *Current Hematologic Malignancy Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1586>



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Nº. 00253
Matricula: 2212801120

Reducción de la inmunosupresión inducida por células T reguladoras en leucemia linfoblástica aguda.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de septiembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DRA. NORMA ANGELICA SANCHEZ ZAUCO
DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: PAOLA NALLELY BASURTO OLVERA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



REVISÓ
[Signature]
MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS
[Signature]
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA
[Signature]
DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL
[Signature]
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL
[Signature]
DRA. NORMA ANGELICA SANCHEZ ZAUCO

SECRETARIA
[Signature]
DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ