



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina**  
**(CICSaB)**



**Análisis prospectivo del número y la función de células T reguladoras**  
**Foxp3<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup> en individuos sanos**

**TESIS QUE PRESENTA**

Q.F.B Erick Colunga Bolaños

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO**  
**EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Roberto Fidencio González Amaro

Febrero 2024

## **CREDITOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis se llevó a cabo en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la tutoría del Dr. Roberto González Amaro, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con número 1009289. Para la realización de este trabajo se utilizaron los recursos propios del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.S.L.P.

Tesis que presenta:

**Q.F.B ERICK COLUNGA BOLAÑOS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Roberto Fidencio González Amaro**

**ASESORES**

**Dra. Diana Patricia Portales Pérez**

**Dra. Esther Layseca Espinosa**

**JURADO**

**Presidenta de Sinodales: Dra. Sofia Bernal Silva**

**Secretaria: Dra. Diana Patricia Portales Pérez**

**Sinodal: Dra. Esther Layseca Espinosa**

**Febrero 2024**



Análisis prospectivo del número y la función de células T reguladoras Foxp3+ y CD69+ en individuos sanos © 2024 Por Erick Colunga Bolaños se distribuye bajo [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

**Análisis prospectivo del número y la función de células T reguladoras  
Foxp3<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup> en individuos sanos**

Colunga-Bolaños E<sup>1</sup>, Dóniz-Padilla L<sup>1,2</sup>, Layseca-Espinosa E<sup>1,2</sup>, Portales-Pérez DP<sup>1,3</sup>, González-Amaro R<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, UASLP, San Luis Potosí, SLP; <sup>2</sup>Facultad de Medicina, UASLP, San Luis Potosí, SLP; <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, San Luis Potosí, SLP.

Autor para correspondencia: Roberto González-Amaro  
Facultad de Medicina, UASLP  
Ave. V. Carranza 2405  
78210 San Luis Potosí, SLP  
México  
e-mail: [rgonzale@uaslp.mx](mailto:rgonzale@uaslp.mx)

## Resumen

**Antecedentes.** Los linfocitos T reguladores llevan a cabo una función importante en la fisiología del sistema inmune y alteraciones en su número y/o función están claramente relacionados con la fisiopatogenia de diferentes condiciones patológicas que afectan a los humanos.

**Objetivo.** Determinar las posibles variaciones que ocurran en los niveles y la función de los linfocitos Treg Foxp3+ y Treg CD69+ en individuos sanos, durante un período de 60 días.

**Materiales y métodos.** En un estudio piloto se reclutaron 30 individuos aparentemente sanos y peso normal y se obtuvieron de ellos tres muestras de sangre a los días 0, 30 y 60 del estudio. Mediante citometría de flujo multiparamétrica se analizaron los niveles de las células Treg CD69+ (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) y Treg Foxp3+ (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>). La función de estas células se analizó mediante un ensayo de inhibición de la activación celular (expresión de CD40L) de linfocitos autólogos.

**Resultados.** Aunque el análisis de varianza de medidas repetidas no reveló diferencias significativas en ninguno de los cuatro parámetros estudiados a lo largo del estudio, se encontró que una fracción importante de individuos mostró variaciones que se consideraron como relevantes en el número y/o en la función de las dos subpoblaciones de linfocitos Treg estudiadas. Estas variaciones no mostraron una asociación aparente con eventos que afectan al sistema inmune (infecciones, toma de medicamentos, etc.)

**Conclusión.** Nuestros resultados sugieren que en una fracción significativa de individuos normales ocurren variaciones importantes en los niveles sanguíneos y en la función de los linfocitos Treg CD69+ y Treg Foxp3+. Lo anterior puede ser de relevancia para la realización de estudios sobre estas células en pacientes con diferentes condiciones patológicas, así como para tener una mejor comprensión de la fisiología de los mecanismos reguladores de la respuesta inmune en individuos normales.

## Introducción

Se han descrito diferentes mecanismos que pueden regular negativamente la respuesta inmune, incluidas las células T reguladoras (Treg). Estas células son capaces de suprimir la activación y proliferación de linfocitos efectores, ejerciendo así un papel clave en la patogénesis de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas [1,2].

A inicios de 1970 Tomio Tada Chiba, describió que las células T, además de las funciones de ayuda, también podrían cumplir funciones reguladoras. En ese mismo año, Gershon y Kondo describieron que una subpoblación de células T podía suprimir la respuesta inmune y mediar una regulación negativa de la respuesta inmune [1]. Esta subpoblación celular fue denominada como linfocitos T supresores, de la cual se describieron varias subpoblaciones, con diferentes características y funciones en la regulación inmune [2,3]. Sin embargo, en la siguiente década surgieron múltiples dudas sobre la naturaleza de estas células supresoras y finalmente se llegó a la conclusión que se trataba de un artefacto de laboratorio y que la mayor parte de la información que se había generado sobre este tema (miles de artículos publicados en muy diversas revistas científicas) no correspondían con la realidad. Bajo este sombrío panorama, en el año de 1995 el Dr. Simon Sakaguchi describió a una subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con una función similar a la que se había descrito para células supresoras y que se caracterizaba por la expresión constitutiva de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25) [2,4], las cuales fueron denominadas como células T reguladoras o linfocitos Treg [2,4]. Posteriormente, se encontró que esta subpoblación de linfocitos mostraba una alta expresión del factor de transcripción Foxp3 (así como una expresión baja o ausente de la molécula CD127) y que la función de estas células es de gran importancia en la regulación de la respuesta inmune hacia prácticamente cualquier antígeno [5,6]. De acuerdo con lo anterior, múltiples evidencias indican el papel relevante que tienen los linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> en diversas condiciones patológicas,

incluyendo las enfermedades autoinmunes, las neoplasias malignas, las alergias o la tolerancia a los trasplantes [11,15,17,29].

Las células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> ejercen su efecto supresor sobre las células T efectoras a través de diferentes mecanismos, incluida la síntesis de citocinas inmunomoduladoras (TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35) [5,6,16]. Estas células reguladoras pueden originarse directamente en el timo (células tTreg) o en la periferia (células pTreg) o a través de la diferenciación *in vitro* de células CD4<sup>+</sup> vírgenes convencionales (iTreg) [12]. Como se ha mencionado anteriormente, estas células tienen un papel relevante en enfermedades autoinmunes, y su deficiencia congénita (debido a mutaciones en el gen FOXP3) da lugar al síndrome IPEX, caracterizado por desregulación inmune, poli-endocrinopatía autoinmune y enteropatía inflamatoria [6,16].

Además de las células descritas por S. Sakaguchi, se han descrito otras subpoblaciones de linfocitos Treg. A este respecto, se ha descrito que una subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresa en forma constitutiva la molécula de activación CD69 ejerce un efecto regulador negativo sobre la respuesta inmune, por lo que se les ha denominado como linfocitos Treg CD69<sup>+</sup> [21,22,28]. Sin embargo, la molécula CD69 se describió originalmente como un marcador de activación inducible de linfocitos T y otras células inmunes [13]. Los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup> no expresan el factor de transcripción Foxp3, pero sintetizan TGF- $\beta$  e IL-10, con una expresión variable de CD25 (en la mayoría negativa y en ningún caso *high*), por lo que el fenotipo de estas células corresponde a: CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-/+</sup>LAP<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, en donde LAP corresponde a TGF- $\beta$  [21,25]. Estas células se detectan en sangre periférica y diferentes tejidos linfoides de sujetos sanos y ejercen un relevante efecto supresor *in vitro* sobre la activación de células T efectoras autólogas [14,15]. Como sería esperado, se han descrito diferentes alteraciones tanto en el número como en la función de estas células en diferentes condiciones

patológicas, principalmente enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunes y neoplásicas [17,21,27].

Como se ha mencionado anteriormente, se han publicado múltiples estudios sobre los niveles y función de los linfocitos Treg (principalmente de las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>) en muestras de sangre de pacientes con muy diversas condiciones. Sin embargo, hasta donde llega nuestro conocimiento, no existen estudios sobre las posibles variaciones, en el número y la función, de las células reguladoras en individuos sanos a través del tiempo. A este respecto, consideramos que es de importancia conocer estas posibles variaciones (su dirección, su magnitud, su consistencia), con el fin de interpretar más apropiadamente los datos que se publican sobre estas células, que con gran frecuencia corresponden a estudios transversales (estudio de una sola muestra por individuo). De acuerdo a lo anterior, decidimos llevar a cabo un estudio piloto en individuos sin patologías aparentes en tres muestras de sangre consecutivas, a lo largo de 60 días y analizando la función y el número de células Treg Foxp3<sup>+</sup> y T reg CD69<sup>+</sup>.



## **Materiales y métodos**

**Tipo de estudio.** Se realizó un estudio piloto, prospectivo y descriptivo y el tipo de investigación fue cuantitativa y observacional. El presente proyecto se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, SLP, México.

**Individuos.** La muestra de individuos objeto del estudio fue no probabilística y por conveniencia. Se incluyeron a 30 individuos de 25 a 35 años de edad, aparentemente sanos, sin evidencia de sobrepeso o bajo peso, que no recibieron ningún tipo de tratamiento farmacológico o de inmunización durante la realización del estudio y que no mostraron signos o síntomas de algún proceso infeccioso durante la duración del estudio. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado y este estudio se realizó de acuerdo a los lineamientos de la Declaración de Helsinki. De cada participante se obtuvieron tres muestras de sangre venosa periférica, al inicio de estudio y a los 30 y 60 días. Las principales características de los individuos estudiados se muestran en la Tabla 1.

**Cuantificación de células.** Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMN) de cada participante mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich). De manera breve, primero se diluyó la sangre con Buffer Salino de Fosfatos (PBS) en una relación 1:1, y se transfirió lentamente a un tubo con Ficoll-Hypaque (3 mL por cada 10 mL de muestra), para posteriormente centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos a 25°C. Posteriormente, se recuperó el anillo de las CMN y se realizó un lavado con PBS, para finalmente cuantificar las células en la cámara de Neubauer y evaluar la viabilidad celular por el método de Azul de Tripano, la cual fue siempre superior al 95%. Finalmente, se ajustó la concentración de las células obtenidas a  $1 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI (suplementado con

suero bovino fetal al 10%, glutamina 2mM, y antibióticos) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, en presencia de brefeldina (10 µg/ml).

Posteriormente las CMN fueron teñidas durante 20 min en oscuridad a 4°C, con los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb): CD4/FITC (eBioscience), CD25/APC-Cy7 (BD), anti-LAP/PerCp-Cy5.5 (BioLegend) y CD69/APC (eBioscience). Luego, las células se lavaron, fijaron y permeabilizaron con el kit *Foxp3 Fix/Perm buffer set* (eBioscience) durante 30 minutos. Posteriormente, las células mononucleares se tiñeron con mAb contra IL-10 (PE) (BioLegend) y Foxp3 (PE/Cy7) (eBioscience).

Las células se analizaron en un citómetro FACSCanto II y la discriminación de dobletes se realizó utilizando los parámetros FSC-A y FSC-W, en las células que de acuerdo a su FSC (dispersión de luz a 180 grados) y SSC (dispersión de luz a 90 grados) correspondieron a linfocitos. En todos los casos, se adquirieron al menos 1×10<sup>6</sup> eventos, los cuales se analizaron utilizando el software FlowJo v10 (Tree Star).

**Análisis de la función de las células Treg.** La función supresora de las células Treg CD69<sup>+</sup> se evaluó mediante un ensayo de inhibición de la activación celular, que compara la expresión del marcador de activación CD40L (CD154) de CMN con o sin la presencia de células CD69<sup>+</sup> [17]. Brevemente, las CMN se depletaron o no de células CD69<sup>+</sup> mediante selección negativa, con la utilización de un mAb anti-CD69 humano, microperlas paramagnéticas acopladas a un anticuerpo de rata anti-IgG de ratón y columnas MACS LD (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Luego, se incubaron las CMN (una alícuota *depletada* de células CD69<sup>+</sup> y otra sin *depletar*) en placas de 48 pocillos recubiertas previamente con un mAb anti-CD3 (10 µg /ml) y un anti-CD28 (10 µg/ml) durante 7 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, en presencia de un mAb anti-CD40L/PE (BD). Finalmente, las células se

lavaron y analizaron para determinar la expresión de CD40L en citómetro de flujo FACSCanto II, utilizando el software Flow Jo v10 para el análisis. El nivel de la actividad supresora de la activación celular se calculó mediante la comparación del porcentaje de células CD40L<sup>+</sup> en las dos alícuotas analizadas de cada muestra, con la utilización de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(\% \text{ células CD40L}^+ \text{ en alícuota no } \textit{depletada} / \% \text{ células CD40L}^+ \text{ en alícuota } \textit{depletada})100].$$

La función reguladora de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> fue analizada en una forma similar, pero en este caso las CMN se depletaron o no de las células CD25<sup>+</sup> y el resto del ensayo fue del todo similar a lo descrito en el párrafo anterior.

**Análisis estadístico.** La distribución de los datos (normal o no) se determinó mediante la prueba de Shapiro Wilk y en los casos con distribución gaussiana los datos se representaron mediante la media aritmética y la desviación estándar. Para la comparación de los datos correspondientes al número y a la función de las células Treg, se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas y análisis *post-hoc* (cuando esto último fuese necesario). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPadSoftware, San Diego, CA) y los valores de  $p < 0.05$  se consideraron como significativos.

## Resultados

**Características de los individuos estudiados.** Para el presente estudio se reclutaron un total de 30 voluntarios clínicamente sanos once hombres y diecinueve mujeres. El promedio de edad de los participantes fue de 29.0 (22.0-36.0) años, con un peso corporal promedio de 64.5 (49.0-79.0) kg y 1.65 (1.45-1.81) m de estatura, con un promedio de Índice de Masa Corporal (IMC) normal, de 23.85 (19.38-24.9) kg/m<sup>2</sup> (**Tabla 1**).

**Variabilidad de los ensayos de medición.** Previo a la realización del estudio se determinó la variabilidad de los cuatro ensayos medición empleados, a través del cálculo del coeficiente de variación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CV = (\text{desviación estándar} / \text{media aritmética}) \times 100$$

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2**. Como se puede observar, la variabilidad, intraensayo de la cuantificación de los linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> fue buena (CVs de 10.8 y 9.8%, respectivamente), al igual que la variabilidad interensayo (CVs de 15.4 y 17.2%). En cuanto a los ensayos funcionales, se encontró una variabilidad aceptable (menor del 25% en todos los casos), tanto intra como interensayo.

**Niveles de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>.** El análisis de los niveles de células Treg CD69<sup>+</sup> en muestras de sangre venosa periférica se llevó a cabo mediante citometría de flujo multiparamétrica, mediante la estrategia que se muestra en la Fig. 1. A este respecto, de la gráfica de puntos de FSC vs SSC, se seleccionaron a las células con características de linfocitos y en estas se detectaron a las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> y en las mismas se determinaron las células CD69<sup>+</sup>LAP(TGF-β)<sup>+</sup> y de estas a las negativas para Foxp3 pero positivas para IL-

10. De esta forma, se definieron a las células de interés como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> [16].

Como se muestra en la **Fig. 2A**, los niveles de las células Treg CD69<sup>+</sup> mostraron (como en estudios previos), una variación amplia (por ej., rango de la 1<sup>a</sup> determinación = 18.3 - 82.0 x 10<sup>-2</sup>%), en las tres determinaciones que se efectuaron. El análisis de varianza de estos datos indicó que no existió una diferencia significativa (ANOVA de medidas repetidas, p>0.05), por lo cual no se realizó el análisis *post-hoc* (**Fig. 2A**). En un análisis arbitrario de las variaciones individuales, se definieron como casos de interés a aquellos en los se observó una diferencia mayor a una desviación estándar (de la primera determinación) del porciento de células positivas entre cualesquiera de las 3 muestras de cada voluntario. Mediante este abordaje, se detectaron a 8 voluntarios (26%) con variaciones que se consideraron como de interés. Como se puede observar en la **Fig. 2C**, en algunos de estos casos se pudo observar una diferencia de gran magnitud, ya sea positiva (por ej., 40.2 y 76.4% de células positivas en la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> medición) como negativa (64.7 y 30.0% en la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> medición). Sin embargo, el análisis estadístico de estos casos indicó una diferencia no significativa, sin que fuera necesario realizar el análisis *post-hoc* (**Fig. 2C**).

**Niveles de células Treg Foxp3<sup>+</sup>.** El análisis de los niveles de células Treg Foxp3<sup>+</sup> se llevó a cabo también mediante citometría de flujo multiparamétrica, en las mismas muestras en las que se analizaron los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup>. A este respecto, de la gráfica de puntos de *FSC* vs *SSC* de la Fig. 1, se seleccionaron a las células con características de linfocitos y en estas se detectaron a las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y en las mismas se determinaron las células positivas para Foxp3. De esta forma, se definieron a las células de interés como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

Como se muestra en la **Fig. 2B**, los niveles de las células Treg Foxp3<sup>+</sup> mostraron también una variación amplia (por ej., rango de la 1<sup>a</sup> determinación = 1.3 - 3.6%), en las tres determinaciones que se efectuaron. El análisis de varianza de estos datos indicó que no existió una diferencia significativa (ANOVA de medidas repetidas,  $p > 0.05$ ), por lo cual no se realizó el análisis *post-hoc* (**Fig. 2B**). En un análisis arbitrario de las variaciones individuales (similar al de las células Treg CD69<sup>+</sup>), también se definieron como casos de interés a aquellos en los se observó una diferencia mayor a una desviación estándar (de la primera determinación) del porcentaje de células positivas entre cualesquiera de las 3 muestras de cada voluntario. Mediante este abordaje, se detectaron a 11 voluntarios (36%) con variaciones que se consideraron como de interés. Como se puede observar en la **Fig. 2D**, en algunos de estos casos se pudo observar una diferencia de gran magnitud, ya sea positiva (por ej., 2.5 y 3.9% de células positivas en la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> medición) como negativa (3.0 y 1.4% en la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> medición). Sin embargo, el análisis estadístico de estos casos tampoco arrojó una diferencia significativa, sin que fuera necesario realizar el análisis *post-hoc* (**Fig. 2D**).

**Análisis de la función de los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup>.** Como se muestra en la **Fig. 3**, la función supresora de los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup> se analizó mediante un ensayo en el que en una alícuota de CMN se eliminan las células CD69<sup>+</sup> y se compara el nivel de activación de linfocitos T (expresión de CD40L inducida a través de CD3 y CD28) en la misma, comparada con la observada en otra alícuota del mismo individuo, en la que no se eliminaron a las células CD69<sup>+</sup>. De acuerdo a este análisis, se encontró, como ha sido reportado previamente, una gran variación en la actividad supresora de los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup> (rango del % de supresión de la primera muestra = 29.1 - 70.6%). Como se muestra en la **Fig. 4A**, los porcentajes de supresión fueron muy similares en los tres conjuntos de muestras analizadas y la prueba de significancia estadística (análisis de varianza para medidas repetidas) no detectó una diferencia significativa, por lo que no se realizó el análisis *post-hoc*. En este caso también se realizó un análisis arbitrario de las variaciones individuales

y se definieron como casos de interés a aquellos en los se observó una diferencia mayor a una desviación estándar (de la primera determinación) del porcentaje de supresión entre cualesquiera de las 3 muestras de cada voluntario. Mediante este abordaje, se detectaron a 9 voluntarios (de un total de 15, el 60%) con variaciones que se consideraron como de interés. Como se puede observar en la **Fig. 4C**, en algunos de estos casos se pudo observar una diferencia de magnitud importante, ya sea positiva (por ej., 29.1 y 48.7% de supresión en la 1ª y 2ª medición) como negativa (48.7 y 25.3% en la 2ª y 3ª medición). Sin embargo, el análisis estadístico de estos casos arrojó también una  $p > 0.05$ , sin que fuera necesario realizar el análisis *post-hoc* (**Fig. 4C**).

**Análisis de la función de los linfocitos Treg CD25<sup>high</sup>.** La actividad supresora de las células CD25<sup>high</sup> se analizó en una forma similar al de los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup> (Fig. 3), pero en este caso se eliminaron o no a las células CD25<sup>+</sup>. De acuerdo a este análisis, también se encontró una variación importante en la actividad supresora de los linfocitos Treg CD25<sup>+</sup> (rango del % de supresión de la primera muestra = 25.8 - 62.9%). Como se muestra en la **Fig. 4B**, los porcentajes de supresión fueron muy similares en los tres conjuntos de muestras analizadas y el análisis de varianza para medidas repetidas no detectó una diferencia significativa, por lo que no se realizó el análisis *post-hoc*. El análisis arbitrario de las variaciones individuales (similar al realizado para las células Treg CD69<sup>+</sup>) detectó a también a 9 voluntarios (60%) con variaciones que se consideraron como de interés. Como se puede observar en la **Fig. 4D**, en algunos de estos casos se pudo observar una diferencia de magnitud importante, ya sea positiva (por ej., 36.5 y 60.7% de supresión en la 1ª y 2ª medición) como negativa (53.1 y 41.1% en la 2ª y 3ª medición). Sin embargo, el análisis estadístico de estos casos tampoco arrojó una diferencia significativa, sin que fuera necesario realizar el análisis *post-hoc* (**Fig. 4D**).

## Discusión

Desde la descripción original de los linfocitos Treg CD25+ por S. Sakaguchi, et al., [2,4] se han publicado aproximadamente 20,000 artículos sobre los mismos en revistas científicas de circulación internacional (PubMed). Asimismo, el grupo de investigación en la UASLP en el cual se realizó el presente trabajo, ha publicado más de 50 artículos relacionados con estas y otras células reguladoras (PubMed). Una proporción muy importante de estos artículos corresponde a trabajos de investigación en los que se realizó una evaluación del número y/o la función de alguna o varias subpoblaciones de linfocitos reguladores en muy diferentes condiciones que afectan al humano o a animales de experimentación. Lo anterior incluye, principalmente, a enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, tumores malignos y enfermedades infecciosas, así como trasplantes de órganos sólidos y de células progenitoras hematopoyéticas [24,25,29]. Sin embargo, en la gran mayoría de estos artículos solo se realiza una medición puntual del número o la función de los linfocitos reguladores (incluyendo los publicados por nuestro grupo de investigación). Lo anterior, nos llevó a la pregunta de que cuál es la variación que ocurre, a través del tiempo, en los niveles de linfocitos Treg en la sangre venosa periférica de individuos normales, así como en la actividad supresora de los mismos.

Para llevar a cabo este proyecto, se reclutaron a 45 voluntarios sanos, con peso e IMC normal y que aceptaron donar tres muestras de sangre venosa periférica, a los días 0, 30 y 60. De estos individuos, fueron eliminados durante el estudio 15, por diversas causas (abandono del estudio, recibir una inmunización, presentar una enfermedad), por lo que al final del mismo se contó con los datos de 30 voluntarios, en lo relacionado con los ensayos de cuantificación de células. En cuanto a los ensayos de la función de las células Treg, al final del estudio solo se pudo contar con los datos de 15 individuos, por diversas causas (principalmente por insuficiente número de células y falla en la realización del ensayo).



Previo al reclutamiento de voluntarios y la toma de la primera muestra, se llevó a cabo la determinación del coeficiente de variación de las cuatro técnicas empleadas, tanto en un mismo experimento (variación intraensayo), como en experimentos consecutivos (variación interensayo). A este respecto, aunque no existe un criterio uniforme sobre las técnicas experimentales de laboratorio, se puede considerar que los coeficientes de variación intra e interensayo encontrados para la cuantificación de células son buenos (9.8 y 10.8% para intraensayo) o aceptables (15.4 y 17.2% para interensayo). Algo similar ocurrió para los ensayos de función celular (13.3 y 15.7% para intraensayo y 22.4 y 24.5% para interensayo). Con estos datos, se procedió a realizar el estudio objeto de esta comunicación.

Aunque no encontramos diferencias significativas entre las tres muestras analizadas, tanto en la cuantificación de células como en la función de las mismas (ANOVA de medidas repetidas,  $p > 0.05$  en los cuatro casos), los resultados obtenidos indican que hay una fracción importante de individuos (principalmente para los ensayos de función) en los que se observó una variación que consideramos como de interés y la cual correspondió, en algunos casos, a un incremento y en otros a un decremento. De la misma forma, se observaron algunos casos en los cuales una de las muestras fue notablemente mayor (o menor, en otros casos) a las otras dos muestras. Lo anterior sugiere que en al menos algunos individuos existen variaciones importantes en el número y/o la función de al menos dos de las subpoblaciones de linfocitos reguladores y que estas no tienen una explicación aparente. Sin embargo, se puede especular que las variaciones encontradas pudiesen estar relacionadas con infecciones subclínicas (por ej., catarro común o COVID-19), cambios en los niveles hormonales (etapa del ciclo menstrual, embarazo no informado), variaciones en la ingesta de ciertos nutrientes, inmunizaciones no informadas, etc. [26,30]. Otra posibilidad es que estas variaciones correspondan simplemente al comportamiento fisiológico de las variables estudiadas y que los mecanismos reguladores del

sistema inmune, o al menos los analizados en el presente trabajo, se comporten en la forma observada en individuos normales.

Independiente de las posibles causas de las variaciones encontradas, consideramos que nuestros resultados sugieren que, en los estudios sobre el número o la función de los linfocitos reguladores, sería conveniente realizar al menos dos mediciones, sobre todo en aquellos en los que se estudie un número limitado de pacientes y de controles. A este respecto, no es raro encontrar artículos en los que el número de controles estudiados es notablemente menor al de pacientes incluidos en el proyecto, algo que podría sesgar los resultados finales. Por otra parte, consideramos que sería de gran interés realizar estudios similares al presente en individuos con diferentes condiciones patológicas (autoinmunidad, tumores malignos, etc.) en las que se han informado alteraciones en el número o función de los linfocitos Treg. Aunque lo más probable es que se confirmen los resultados previamente informados, cabe la posibilidad de que esto no sea así.

## **Conclusión**

Los resultados de este estudio piloto sugieren que en una fracción significativa de individuos normales ocurren variaciones importantes en los niveles sanguíneos y en la función de los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup> y Treg Foxp3<sup>+</sup>. Lo anterior puede ser de relevancia para la realización de estudios sobre estas células en pacientes con diferentes condiciones patológicas y para tener una mejor comprensión de la fisiología de los mecanismos reguladores de la respuesta inmune en individuos normales.

**Tabla 1. Características de los individuos clínicamente sanos (n=30) de quienes se obtuvieron las muestras sanguíneas.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Edad (años)	29.0 (22.0 - 36.0)
Sexo (M/F)	11/19
Peso (Kg)	64.5 (42.0 - 79.0)
Estatura (cm)	165 (145 - 181)
IMC	23.8 (19.3 - 24.9)

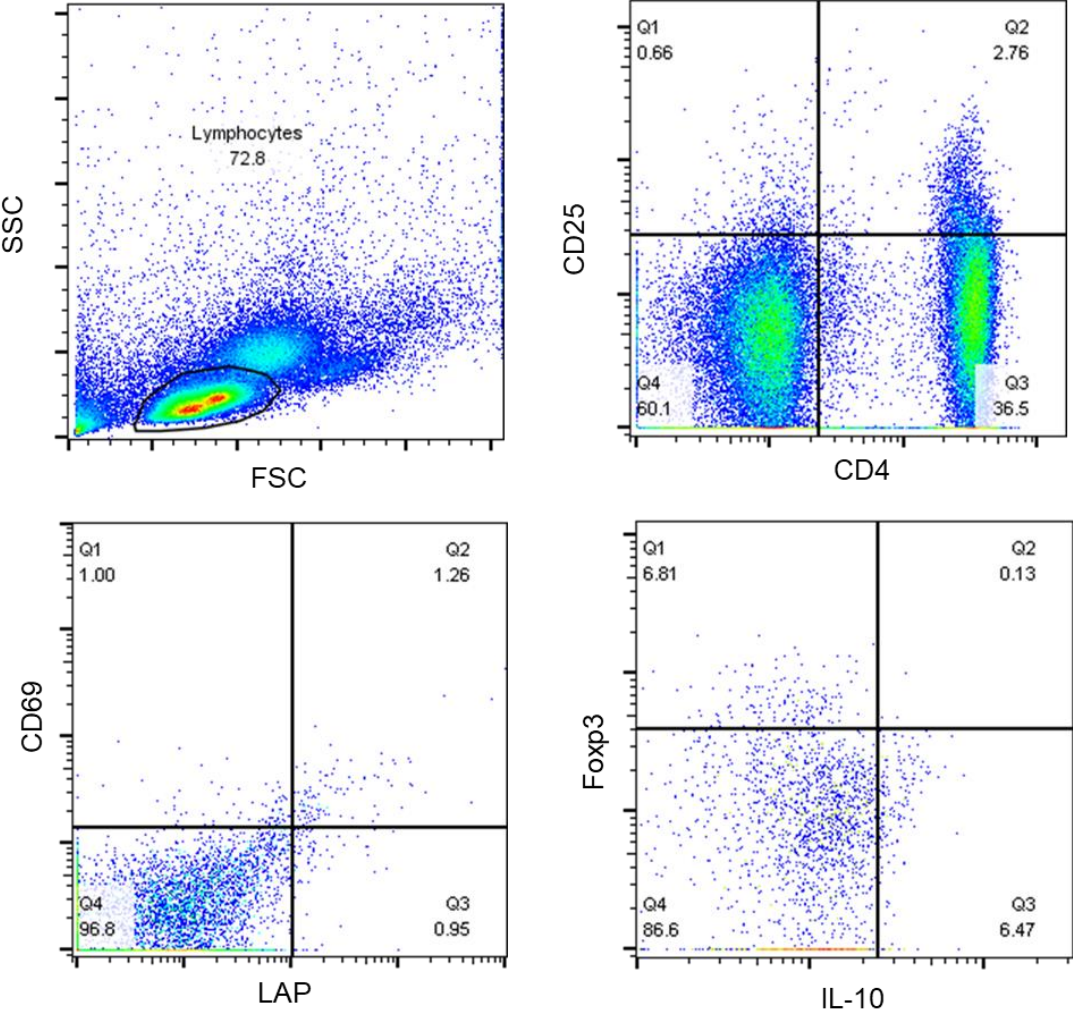
Los datos corresponden a la media aritmética y rango. IMC= índice de masa corporal.

**Tabla 2. Variabilidad de los ensayos utilizados en el estudio.**

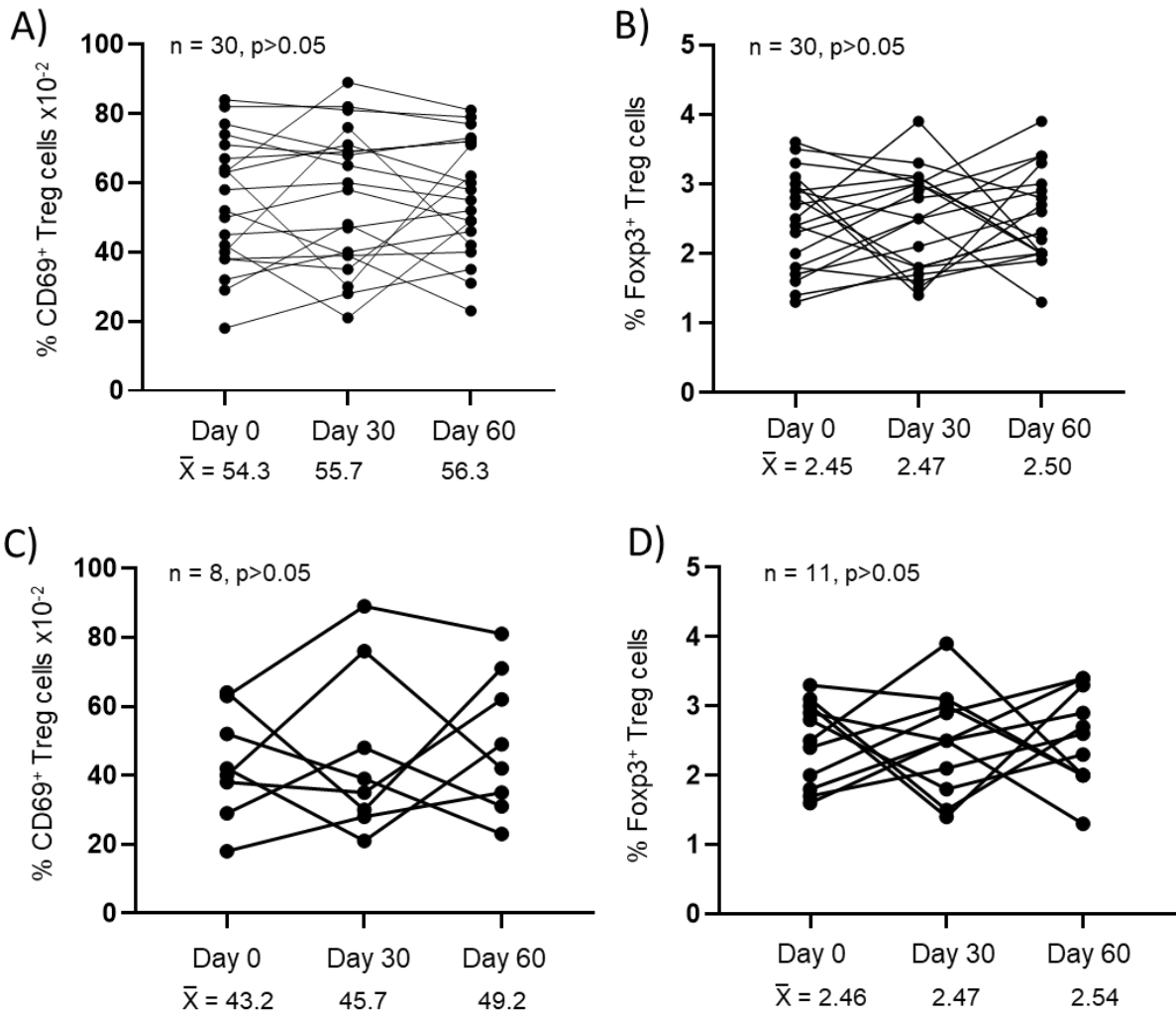
<b>Ensayo</b>	<b>Variabilidad intraensayo</b>	<b>Variabilidad interensayo</b>
Cuantificación de linfocitos Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	10.8%	15.4%
Actividad de linfocitos Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	13.3%	22.4%
Cuantificación de linfocitos Treg CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	9.8%	17.2%
Actividad de linfocitos Treg CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	15.7%	24.5%

Los datos corresponden al coeficiente de variación o CV

Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

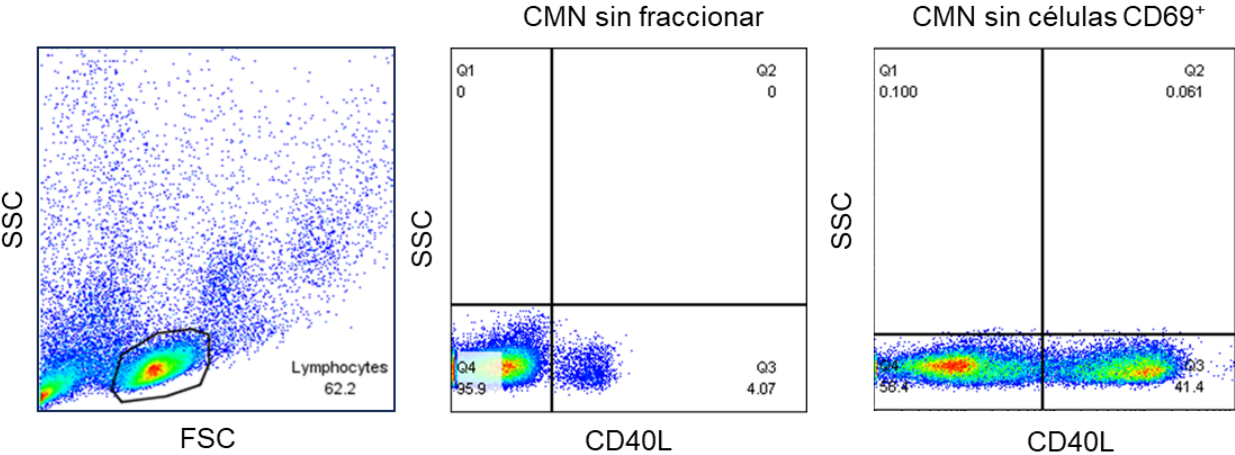
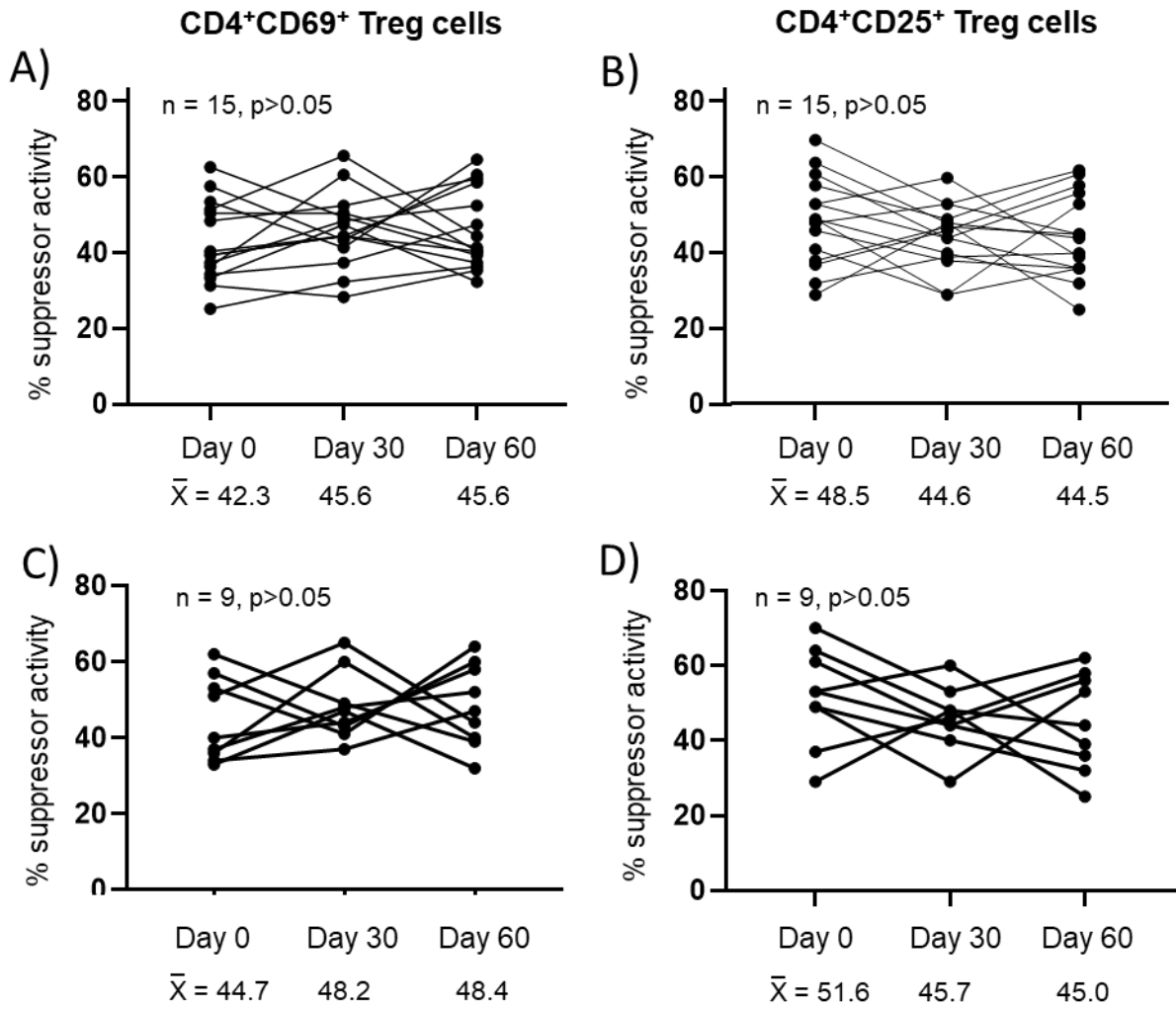


Fig. 4



## PIES DE FIGURA

**Figura 1. Estrategia de análisis de las células Treg CD69<sup>+</sup> en muestras de sangre periférica por citometría de flujo.** La identificación de las subpoblaciones de ILC a partir de CMN de sangre periférica se llevó a cabo mediante un análisis multiparamétrico por citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron con base en los parámetros de tamaño y complejidad, y posteriormente, se seleccionaron las células CD4<sup>+</sup> con una expresión positiva de CD25 para determinar la expresión de LAP (TGF- $\beta$ ) y CD69. Finalmente, se seleccionaron las células IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> para la cuantificación de células con el fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>. En estas mismas muestras se cuantificaron las células Treg Foxp3<sup>+</sup> (con el fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>)

**Figura 2. Cuantificación de células Treg CD69<sup>+</sup> y Foxp3<sup>+</sup>.** En tres muestras de sangre de 30 individuos sanos (obtenidas a los días 0, 30 y 60) se cuantificaron las células Treg CD69<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) y Treg Foxp3<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo multiparamétrica, como se especifica en Materiales y Métodos y en la Fig. 1. **A)** Porcentajes de células Treg CD69<sup>+</sup>. **B)** Porcentajes de células Foxp3<sup>+</sup>. **C)** Porcentajes de células Treg CD69<sup>+</sup> en los individuos que se consideró que mostraron diferencias importantes (negativas o positivas) entre sus tres determinaciones. **D)** Porcentajes de células Treg Foxp3<sup>+</sup> en los individuos que se consideró que mostraron diferencias importantes (negativas o positivas) entre sus tres determinaciones.

**Figura 3. Ensayo de la función supresora de linfocitos Treg CD69<sup>+</sup>.** Las PBMC recién aisladas de 30 voluntarios sanos se *depletaron* o no de las células CD69<sup>+</sup> y luego se estimularon a través de CD3/CD28 durante 7 horas. Finalmente, se evaluó la expresión de CD40L mediante citometría de flujo. Se muestran diagramas de puntos representativos del análisis de la expresión de CD40L en cultivos celulares de células no *depletadas* (panel central) o *depletadas* (panel derecho) de células CD69<sup>+</sup>.



**Figura 4. Análisis secuencial de la función supresora de los linfocitos Treg CD69<sup>+</sup> y Foxp3<sup>+</sup> en individuos sanos.** Las PBMC recién aisladas de 15 voluntarios sanos se *depletaron* o no de las células CD69<sup>+</sup> y luego se estimularon a través de CD3/CD28 durante 7 horas. Finalmente, se evaluó la expresión de CD40L mediante citometría de flujo. Las muestras de sangre de cada individuo fueron obtenidas a los días 0, 30 y 60. **A)** Actividad supresora de células Treg CD69<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>). **B)** Actividad supresora de células Treg CD25<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>). **C)** Actividad supresora de células Treg CD69<sup>+</sup> en los individuos de la Fig. 4A que se consideró que mostraron diferencias importantes (negativas o positivas) entre sus tres determinaciones. **D)** Actividad supresora de células Treg CD25<sup>+</sup> en los individuos de la Fig. 4B que se consideró que mostraron diferencias importantes (negativas o positivas) entre sus tres determinaciones.

## REFERENCIAS

1. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18:723.
2. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells a brief history and perspective. *European Journal of Immunology*. 2007; 37:116.
3. Hisashi A, Seino k. The Study of regulatory T cells and NKT cells in Japan: A historical perspective. *International Immunology*. 2009; 21:1101.
4. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$  chain (CD25), breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune disease. *The Journal Immunology* 1995; 155:1151.
5. Nie J, Li YY, Zheng SG, Tsun A, Li B. FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2015; 28:493.
6. Göschl L, Scheinecker C, Bonelli M. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Seminars immunopathology*. 2019; 41:301
7. Sakaguchi S. Natural arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. *Annual Review of Immunology*. 2004; 22:531.
8. Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis. *Journal of Autoimmunity*. 2020; 110:102376.
9. Dikiy S, Rudensky AY. Principles of regulatory T cell function. *Immunity*. 2023; 56:240.
10. Wegrzyn AS, Kedzierska AE, Obojski A. Identification and classification of distinct surface markers of T regulatory cells. *Frontiers in Immunology*. 2023; 13:1055805.
11. Bittner S, Hehlhans T, Feuerer M. Engineered Treg cells as putative therapeutics against inflammatory diseases and beyond. *Trends Immunology*. 2023; 44:468.

12. Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. Treg-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*. 2014; 10:543.
13. Collison LW, Chaturvedi, Henderson AL. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology*. 2010; 11:1093.
14. Dhuban KB, Piccirillo CA, The immunological and genetic basis of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2015; 15:525.
15. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annual Review Immunology*. 2020; 38:541.
16. Vitales-Noyola M, Doníz-Padilla L, Alvarez-Quiroga C, Monsiváis-Urenda A, Portillo-Salazar H, Gonzalez-Amaro R. Quantitative and functional analysis of CD69+ NKG2D+ T regulatory cells in healthy subjects. *Human Immunology*, 2015: 76:511.
17. Zhu J, Feng A, Sun J, Jiang Z, Zhang G, Wang K, et al. Increased CD4+CD69+CD25- T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011; 26:1519
18. Eggenhuizen PJ, Ng BH, Ooi JD. Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21:7015.
19. Lee W, Lee GR. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Experimental Molecular Medicine*. 2018; 9:50.
20. Yi J, Kawabe T, Sprent J. New insights on T-cell self-tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2020; 63:14
21. Radulovic K, Niess JH. CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment?. *Journal of immunology research*, 2015.

22. Peixoto TV, Carrasco S, Botte DA, Catanozi S, Parra ER, Lima TM, et al. CD4+CD69+ T cells and CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells imbalance in peripheral blood, spleen and peritoneal lavage from pristane-induced systemic lupus erythematosus (SLE) mice. *Advances in Rheumatology*. 2019; 24:59.
23. Gorabi AM, Hajighasemi S, Kiaie N, Hayat, S, Jamialahmadi, Johnston T, Sahebkar TP. The pivotal role of CD69 in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2020; 11:102453.
24. Liappas G, González-Mateo GT, Sánchez-Díaz J, Lazcano S, Lasarte S, Matesanz-Marín A, et al, Immune-regulatory molecule CD69 controls peritoneal fibrosis, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2016; 12:3561.
25. Radstake TR, Van Bon L, Wenink M, Santegoets T. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF $\beta$  expression, *PloS One*. 2009; 4:5981.
26. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka S, Yamagiwa DA. Generation ex vivo of TGF- $\beta$ -producing regulatory T cells from CD4+ CD25- precursors. *Journal of Immunology*. 2002; 169:4183
27. Yu L, Yang F, Zhang F, Guo D, Li L, Wang X, et al. CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production, *Cell Death and Disease*. 2018; 9:905.
28. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology*. 2005; 26:136.
29. Lu J, Li P, Du X, Liu Y, Zhang B. Regulatory T cells induce transplant immune tolerance. *Transplant Immunology*. 2021; 67:101411.
30. Robinson GA, Peng J, Peckham H, Butler G, Pineda-Torra I, Ciurtin C, et al. Investigating sex differences in T regulatory cells from cisgender and transgender healthy individuals and patients with autoimmune inflammatory disease: a cross-sectional study. *Lancet Rheumatology*. 2022; 31:4