



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PARTICIPACIÓN DE NLRP3 EN LA REGULACIÓN
DEL LOCUS TH2 EN LINFOCITOS T CD4+
TRANSFORMADOS PRESENTES EN PACIENTES
CON LINFOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS T (LCCT)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

EDGAR JAVIER AHUMADA RAMOS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ENRIQUE ORTEGA SOTO

VOCAL: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ

SECRETARIO: LUIS ENRIQUE HUANOSTA MURILLO

1er. SUPLENTE: GIBRAN PEREZ MONTESINOS

2° SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ)

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. LUIS ENRIQUE HUANOSTA MURILLO

SUSTENTANTE:

EDGAR JAVIER AHUMADA RAMOS

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	1
II. ABREVIATURAS	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1. La piel y el sistema inmune	3
1.1. Linfoma cutáneo de células T	4
1.2. Citocinas en LCCT	9
1.3. Antecedentes de la Unidad de investigación médica en Inmunoquímica	12
1.4. Mecanismo clásico de diferenciación en linfocitos Th2	15
1.5. El receptor NLRP3 como regulador transcripcional de la diferenciación Th2	16
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos particulares	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Determinación de la expresión y localización de NLRP3	21
6. RESULTADOS	24
6.1. Expresión y localización de NLRP3 en LCCT	24
6.2. Inhibición del ensamblaje del inflamosoma NLRP3	26
7. Discusión	31
8. Conclusiones	36
9. Referencias	37

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Expresión y localización de NLRP3 en pacientes con LCCT en etapa temprana	24
Figura 2.	Aumento de la expresión de NLRP3 y TOX en LCCT	25
Figura 3.	Expresión nuclear de NLRP3	26
Figura 4.	Expresión nuclear de NLRP3 en células HTB-176	27
Figura 5.	Expresión de IL-4 en el ensayo de inhibición farmacológica del inflamasoma NLRP3	29
Figura 6.	Localización de NLRP3 y expresión de IL-4	30

II. ABREVIATURAS

Asc	Proteína asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasas
Casp1	Caspasa 1
GATA3	Proteína 3 de unión a GATA
IFNγ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IgG4	Inmunoglobulina G subclase 4
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-7	Interleucina 7
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IRF4	Factor regulador de interferón 4
LCCT	Linfoma cutáneo de células T
MF	Micosis fungoide
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NLRP3	Familia NLR, que contiene un dominio de pirina 3
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
STAT4	Transductor de señal y activador de la transcripción 4
STAT5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5
STAT6	Transductor de señal y activador de la transcripción 6
TCR	Receptor de células T

1. ANTECEDENTES

1.1. La piel y el sistema inmune

La piel es la barrera primaria que separa nuestro organismo del ambiente, que cumple con la función de ser la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos, agentes químicos y físicos. Debido al gran tamaño que posee este órgano y a la cantidad de estímulos a los que se expone constantemente, las células encargadas de la respuesta inmune en piel cumplen un papel muy importante al diferenciar los estímulos dañinos de aquellos que no lo son. Por tal motivo es que las células encargadas de dicha respuesta inmune en piel, deben tener una organización y regulación muy bien establecida¹.

Estructuralmente, la piel se compone de dos compartimentos principales: la epidermis y la dermis. La epidermis es el compartimento más externo y se divide en cuatro estratos: el estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato corneo. Las células que se encuentran en este compartimento incluyen a los melanocitos encargados de la producción de melanina y a las células de Langerhans que son las principales células residentes de la piel. Además, también se encuentran linfocitos T, principalmente CD8⁺.

La dermis es anatómicamente más compleja al poseer una diversidad celular mayor. Contiene varias células especializadas entre las que se incluyen las células dendríticas, los linfocitos T CD4⁺ cooperadores, las células T $\gamma\delta$ y las células NKT. Además también se encuentran presentes macrófagos, mastocitos y fibroblastos¹.

La regulación del sistema inmune en la piel es un proceso complejo y vital, que debe regularse mediante una estrecha comunicación entre células epiteliales y células especializadas del sistema inmune, como los linfocitos T que participan activamente en el proceso de regulación de la inflamación mediante la secreción de diversas citocinas. Esto permite que se lleve a cabo una correcta respuesta inmune en contra de los estímulos externos, ya sea contra microorganismos patógenos o agentes físicos y químicos. Sin embargo, si la respuesta inmune es inadecuada, puede presentarse un cuadro infeccioso o neoplásico, mientras que, si la respuesta es excesiva, pueden desarrollarse enfermedades inflamatorias crónicas que a su vez pueden desencadenar algún tipo de neoplasia como el linfoma cutáneo de células T¹.

1.1. Linfoma cutáneo de células T

El linfoma cutáneo de células T (LCCT) es una neoplasia de progresión lenta de linfocitos T CD4⁺ que se localizan preferentemente en la epidermis, sin embargo, también pueden localizarse en la dermis. Provoca lesiones en forma de placa o parche que pueden progresar hacia eritrodermia y finalmente a tumores. Las lesiones en forma de parches o placa tienen predilección por zonas no expuestas al sol, aunque cualquier área de la piel puede verse afectada. Las lesiones pueden tener espesor variable, pueden unirse y formar placas más grandes o pueden sufrir una involución dejando placas anulares residuales. Clínicamente, la etapa de parche se caracteriza por lesiones finas, ligeramente escamosas, eritematosas, típicamente de más de 4 cm de diámetro y distribuidas en áreas protegidas contra el sol o regiones intertriginosas como la axila del brazo. Las placas son más gruesas

que los parches. Estas lesiones pueden mostrar hipopigmentación o hiperpigmentación, atrofia y petequia, así como una variedad de tropismos en los que las células malignas se acumulan en áreas especializadas de la epidermis como los folículos y las glándulas sudoríparas. Los principales hallazgos histológicos en la etapa de parche o placa representan varias características importantes de la enfermedad. Un infiltrado linfocítico en la dermis superficial, con linfocitos individuales migrando entre los queratinocitos, define lo que se llama epidermotropismo que caracteriza a este linfoma ².

La piel de los pacientes con LCCT puede mostrar áreas de eritema pobremente definidas, surgiendo aparentemente de forma espontánea o después de la progresión de la enfermedad de la etapa de parche o placa. Cuando el eritema alcanza un punto de dominio (cubriendo más del 80% del área de la superficie corporal), los pacientes son más propensos a tener afectaciones leucémicas que aquellos pacientes con afectación limitada en la superficie del cuerpo ².

Agentes infecciosos, exposiciones ocupacionales y mutaciones genéticas han sido evaluados como factores etiológicos de la enfermedad, pero la evidencia de la causalidad no ha sido establecida. Algunos virus han sido propuestos como los agentes etiológicos en al menos dos linfomas cutáneos y se ha observado que un gran porcentaje de pacientes con micosis fungoide (MF), un tipo de LCCT, son seropositivos para citomegalovirus. Por otra parte, se han observado cambios en los genes supresores de tumores y relacionados a la apoptosis en pacientes con LCCT, aunque aún no se sabe cómo estas alteraciones afectan directamente a los linfocitos T. Una anomalía frecuente en los pacientes con LCCT, interfiere con la

expresión de NAV3 que actúa como supresor de tumor en los linfocitos T. Mutaciones en los genes *p53*, *p15*, *p16*, *JunB* y *PTEN* ocurren en las fases avanzadas de la enfermedad lo que sugiere que estos son eventos genéticos secundarios y no parte de la enfermedad^{2,3}.

En la etapa de parche, el diagnóstico de la enfermedad puede ser difícil ya que el diagnóstico diferencial es muy amplio e incluye eccema crónico, parapsoriasis, psoriasis y pitiriasis liquenoide crónica. Además, el examen histopatológico puede ser inespecífico ya que los parches no muestran los hallazgos característicos de epidermotropismo, linfocitos cerebriformes y los microabscesos de Pautrier. En lugar de eso, los parches solo revelan un infiltrado bien definido de linfocitos pequeños y puede ser difícil distinguirlo de un proceso reactivo inmunológico. Sin embargo se ha propuesto utilizar a TOX como un potencial marcador positivo para LCCT, ya que su expresión se encuentra incrementada en esta enfermedad, y no así en otras enfermedades cutáneas inflamatorias⁴.

Recientemente se ha reportado que un factor de unión a DNA denominado TOX, podría servir como un marcador molecular para diagnósticos histológicos de MF de fase temprana. TOX es un factor de transcripción que, normalmente, participa en el desarrollo del linaje de linfocitos T CD4⁺ en el timo, mientras que en los linfocitos T CD4⁺ maduros en circulación, la expresión de TOX es nula. Aliahmad y colaboradores propusieron mediante diversos experimentos que TOX es requerido para la reexpresión de *cd4* en los linfocitos con fenotipo CD4^{low}CD8^{low} que conduce a la transición hacia linfocitos CD4⁺CD8^{low}. También tiene la función de crear un estado permisivo para la inducción de ThPOK, molécula que participa como

represor de la expresión de CD8. Adicionalmente, TOX desempeñaría un papel importante en promover la expresión de la proteína Id2 y en la completa inhibición de la actividad de la proteína E en la etapa de linfocitos T CD4⁺CD8^{low}, siendo estos requisitos necesarios para la inducción de múltiples aspectos del programa genético del linaje de linfocitos T CD4⁺⁵.

Sin embargo, diversos grupos de trabajo han evaluado la expresión de TOX en LCCT y cuál es el efecto de su expresión en la enfermedad. Un experimento realizado con PBMCs obtenidas de pacientes con LCCT demostró que, cuando se silenciaba el gen de la proteína TOX con un siRNA específico, la viabilidad de las células malignas disminuía, por lo que se sugiere que TOX podría tener un importante papel al mantener el fenotipo maligno de las células. Por lo tanto, se ha relacionado una alta expresión de este factor de transcripción con un pronóstico no favorable. Adicional a este experimento, también se demostró que TOX actúa como un inhibidor de la expresión del factor de transcripción RUNX3, que es un supresor de tumores frecuentemente deletado en otras neoplasias que ha sido relacionado con el desarrollo de una respuesta Th1⁶.

Otro grupo de trabajo encontró que, además del efecto que TOX tiene en la supervivencia de las células malignas, también tiene la capacidad de acelerar la migración e invasión celular de la línea MyLA (linfocitos malignos obtenidos de LCCT) a través de la fosforilación de la proteína cinasa B (AKT). En conjunto estos resultados sugieren que TOX posee un papel oncogénico en esta enfermedad, al promover la supervivencia, la migración y la invasión de las células malignas⁷.

Así mismo es importante destacar que los linfocitos T CD4⁺ transformados presentes en el LCCT, presentan alteraciones en las vías de señalización, que incluyen a las proteínas STAT. Se ha demostrado, en biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con LCCT en etapa temprana, que la proteína STAT5 se encuentra constitutivamente activa y está relacionada con la transcripción de proteínas antiapoptóticas, genes del ciclo celular y con la expresión de IL-4, las cuales trabajan en conjunto para promover la carcinogénesis. Se ha demostrado que una de las funciones críticas de STAT5 en LCCT es promover la expresión de miR-155, el cual se ha denominado como “el puente entre inflamación y cáncer”, ya que el aumento en la expresión de este miRNA lleva a la activación de varios tipos de células del sistema inmune. Por otro lado, se ha sugerido que STAT4 es uno de los objetivos de miR-155, teniendo como resultado la subsecuente pérdida de la expresión de STAT4 y al mismo tiempo, provocando que las células malignas adquieran un fenotipo Th2. Este cambio de fenotipo se debe a que STAT4 y STAT6 son inversamente reguladas y se ha sugerido que la pérdida de expresión de STAT4 lleva a un aumento en la expresión de STAT6, lo cual promueve el fenotipo Th2 en LCCT^{8,9}.

Aunque gran parte de la patogénesis de esta neoplasia se desconoce, existen resultados que sugieren que el sistema inmunológico tiene un papel importante en el desarrollo y la progresión del LCCT, por lo que el estudio de las células y las moléculas del sistema inmune que participan durante la enfermedad es de vital importancia.

1.2. Citocinas en LCCT

En un individuo sano, los linfocitos T son células que participan activamente durante una respuesta inmune tanto en sangre periférica como en piel. Son capaces de expresar moléculas de superficie y secretar diversas citocinas que son específicas para cada fenotipo de linfocito T¹⁰.

La población de linfocitos T puede ser dividida en diferentes subpoblaciones tomando como base la expresión de diversos marcadores de superficie o la producción de determinadas citocinas. Así, los linfocitos T que expresan el marcador CD4 se conocen como linfocitos T cooperadores (Th), los cuales son capaces de diferenciarse en subpoblaciones efectoras, como los son los linfocitos Th1 y los linfocitos Th2. Los linfocitos Th1 secretan IFN γ , IL-2 y TNF- β las cuales tienen actividad antiviral, promueven la actividad citotóxica, aumentan la expresión de moléculas del MHC-I y MHC-II, inhiben el crecimiento celular y tienen efectos proapoptóticos. Las funciones de estas citocinas establecen la importancia de esta subpoblación para el control de respuestas tumorales. Sin embargo, el papel principal recae sobre el IFN γ . Se ha demostrado en diversos estudios la importancia del IFN γ para iniciar una respuesta inmune contra tumores, siendo uno de los más importantes el que se realizó en ratones *knockout* para la subunidad IFNGR1 (receptor de IFN γ), provocando que estos ratones fueran insensibles al efecto del IFN γ . Después de un tratamiento con metilcolantreno A, el cual es un agente carcinógeno, se observó que los ratones que no reconocían al IFN γ desarrollaban tumores con mayor rapidez y con mayor frecuencia que los ratones de fenotipo silvestre¹¹⁻¹³.

Por otro lado, los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales tienen la función de inducir un cambio de clase de anticuerpos a IgE e IgG₄, participan en la inmunidad contra parásitos activando eosinófilos y mastocitos, e inhiben la diferenciación en linfocitos Th1 al inhibir la expresión de la cadena β 2 del receptor de IL-12 y del gen *Stat4*, que son moléculas fundamentales para la diferenciación de linfocitos Th1^{12,13}.

Diversos autores han sugerido que las citocinas del perfil Th2 tienen efectos benéficos sobre células tumorales en ciertas neoplasias como el cáncer de mama, el cáncer de próstata y el cáncer de vejiga. La respuesta Th2 es asociada con un mal pronóstico debido a que favorece la producción de proteínas antiapoptóticas en las células malignas y al mismo tiempo, suprime la respuesta Th1 que ha demostrado tener un importante papel en la eliminación de células tumorales. Un estudio llevado a cabo en muestras de pacientes con cáncer esofágico demostró que la polarización hacia un perfil Th2 promueve la infiltración de macrófagos activados alternativamente (perfil M2) el cual tiene un papel inmunosupresor y protumoral. Esto como consecuencia a que los macrófagos M2 secretan principalmente IL-10, la cual tiene funciones antiinflamatorias que evitan el control y promueven la proliferación de las células neoplásicas¹⁴⁻¹⁸.

Este antagonismo en las respuestas Th1-Th2 puede explicar la asociación del perfil Th2 a un mal pronóstico en cáncer. Al predominar este tipo de respuesta, se inhibe la producción de citocinas Th1 lo que lleva a una pérdida de la inmunovigilancia y de la respuesta antineoplásica.

Al igual que para otros tipos de neoplasias, en LCCT se ha encontrado la expresión de diversas citocinas en el microambiente tumoral que se han relacionado con las características de la enfermedad. Por ejemplo, en muestras de piel y sangre obtenidas de pacientes con MF, se encontró que hay un aumento en la presencia de IL-7 e IL-18. En estudios *ex vivo* en cultivos de piel proveniente de lesiones de pacientes con MF, se ha observado un aumento en la cantidad de IL-7 de hasta 5 veces más que en un control sano. A su vez, la IL-7 fue suficiente para promover la proliferación de linfocitos T no neoplásicos de tejido y fue necesaria para mantener viables los linfocitos T malignos de las lesiones de MF *in vitro*³.

Sumado a estos hallazgos, también se ha demostrado que los pacientes con MF avanzada se encuentran en un estado de inmunosupresión, el cual se observa debido a una notable disminución de linfocitos T normales y sustituidos por la expansión de linfocitos T malignos. La inmunosupresión es causada probablemente por varios factores, sin embargo, un factor importante podría ser la disminución de citocinas Th1 que contrasta con un aumento en la producción de citocinas Th2. Este cambio en la producción de citocinas provoca la disminución de una respuesta inmune celular efectiva contra las células malignas^{3,19}.

Por otro lado, se han realizado diversos estudios enfocados en la respuesta Th1 y Th2 en LCCT, por ejemplo; en un estudio de ELISA realizado del sobrenadante del cultivo de células de dermis y epidermis, para cuantificar la producción de citocinas, se demostró que en etapas tempranas de la enfermedad no hay un patrón detectable de linfocitos T CD4⁺, ya que las células son capaces de producir IL-4 e IFN γ . Otro estudio realizado por PCR de material genético extraído de leucocitos de

sangre periférica y de células de biopsias de pacientes con MF demostró que las lesiones cutáneas en la fase de placa están caracterizadas por un perfil epidérmico de citocinas tipo Th1, ya que se detectó mRNA de IFN γ e IL-2. También se han reportado diferencias entre las citocinas encontradas en las diferentes etapas de MF. Vowels *et al* demostraron la presencia del mRNA de IFN γ en los pacientes en etapa de placa con detección variable de IL-4 e IL-5, mientras que en etapa de tumor, las últimas dos citocinas son siempre detectables²⁰⁻²².

En análisis del mRNA de lesiones de pacientes con MF se ha encontrado que hay niveles incrementados de los mRNA para IL-4 y bajos niveles de IFN γ . La disminución de la expresión de IFN γ y la dominancia de las citocinas Th2 podría contribuir a la pérdida de la inmunovigilancia en las lesiones de MF, permitiendo así la progresión de la enfermedad hacia una etapa tumoral²³

Sin embargo, no existe un consenso sobre el tipo de respuesta que predomina en la etapa temprana de la enfermedad, por lo cual, en nuestro grupo de trabajo se realizaron experimentos para analizar el tipo de respuesta presente en lesiones de pacientes con MF en etapa temprana.

1.3. Antecedentes de la Unidad de investigación médica en Inmunoquímica

En nuestra unidad de investigación se han realizado estudios sobre la producción de citocinas en linfocitos T CD4⁺ que provienen de muestras de pacientes con MF en etapa temprana. Mediante la técnica de Cytometric Bead Arrays (CBAs) se analizó el sobrenadante de biopsias de lesiones cutáneas de pacientes en etapa

temprana. Se encontró un incremento en la expresión de IL-2 e IFN γ en piel de pacientes al compararse con piel sin patología cutánea y de manera interesante la producción de ambas citocinas correlacionó de manera positiva con el tiempo en el que los pacientes han mantenido la enfermedad en etapa de placa. Además, también se encontró que había expresión de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, lo que nos sugiere que en etapa temprana de la enfermedad hay una respuesta mixta Th1/Th2.

Posteriormente, para identificar cuáles células eran las productoras de dichas citocinas, mediante citometría de flujo se analizaron linfocitos obtenidos de biopsias con lesiones cutáneas de pacientes con MF en etapa temprana que previamente fueron activados en cultivo con ionomicina y PMA donde se observó la producción de IFN γ por linfocitos T reactivos y de morfología linfoide normal. Además, en etapa de placa, también se observó la presencia de una población de linfocitos T grandes atípicos que, de manera basal, eran productores de IL-4. La morfología, la localización en epidermis y la producción de IL-4 sugerían que podrían tratarse de linfocitos T transformados.

Por otro lado, al evaluar la producción de las citocinas, IFN γ e IL-4 en cortes histológicos de biopsias de lesiones cutáneas en las diferentes etapas de la enfermedad, se encontró que en etapa temprana existen células con morfología linfoide normal productoras de IFN γ que disminuyen con la progresión de la enfermedad. Al analizar la producción de IL-4 se encontró que desde etapa temprana existe producción de dicha citocina, pero esta producción se da en las células grandes de morfología atípica, y se incrementa en la etapa tumoral. Estos

resultados indican fuertemente que las células con potencial fenotipo neoplásico producen constitutivamente IL-4 desde las etapas tempranas.

Para corroborar que las células transformadas eran las productoras de IL-4, se procedió a realizar una inmunofluorescencia de un paciente en etapa de placa utilizando como marcador a TOX, que ya había sido sugerido por diversos autores como un marcador de malignidad en el LCCT. Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar que las células transformadas (TOX⁺) eran las productoras de IL-4.

Para ampliar el estudio de esta enfermedad, también se llevó a cabo la caracterización de la línea celular HTB-176, la cual es una línea de linfocitos T CD4⁺ derivada de un paciente con LCCT en etapa temprana. Mediante citometría de flujo se demostró que las células de mayor tamaño eran las productoras de IL-4 de manera basal y que no incrementaba significativamente su producción cuando se les estimulaba policlonalmente. Además, mediante inmunofluorescencias se demostró que había coexpresión del marcador tumoral TOX y de IL-4 en las células de dicha línea, teniendo un comportamiento similar a los obtenidos en los experimentos con muestras de pacientes.

En conjunto, estos resultados sugieren que la IL-4 tiene un papel importante en la progresión de la enfermedad, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se está regulando la producción de dicha citocina en células transformadas. De esta manera sería esencial conocer los mecanismos de regulación de la activación del

locus Th2 tanto en los linfocitos T CD4⁺ transformados como en los linfocitos T no transformados en pacientes con LCCT.

1.4. Mecanismo clásico de diferenciación en linfocitos Th2

La inmunidad a diferentes clases de microorganismos es dirigida por linajes separados de linfocitos T cooperadores, que se diferencian de un linfocito T CD4⁺ *naïve* como respuesta a las señales proporcionadas por las células presentadoras de antígeno y el microambiente. Dentro de estos linajes de linfocitos T, el linaje Th2 se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 como respuesta a estímulos provenientes de parásitos⁹.

El mecanismo clásico de activación del locus Th2 en linfocitos T CD4⁺ *naïve* inicia con la estimulación antigénica a través del TCR y mediante señales coestimuladoras (como CD28). Esto induce la expresión del gen maestro *gata3* y por lo tanto de una baja expresión del gen *Il-4*. Por otro lado, la señalización del receptor de IL-4 mediada por STAT6 promueve fuertemente la expresión de estos dos genes. Una importante función de GATA-3 consiste en reorganizar la estructura de la cromatina en el locus Th2, que abarca los genes de la IL-4, IL-5 e IL-13 para promover su transcripción. La continua producción de IL-4 promueve aún más la diferenciación en linfocitos Th2 en un ciclo de retroalimentación positiva⁹.

El perfil de diferenciación Th2 es inducido en respuesta a la infección con parásitos extracelulares como los helmintos. Además, también medía las enfermedades alérgicas inflamatorias como el asma, la rinitis alérgica y la dermatitis atópica²⁴.

El mecanismo clásico de diferenciación de Th2 ha sido ampliamente descrito y estudiado, sin embargo, recientemente se han caracterizado nuevos participantes que median la diferenciación Th2 en linfocitos T *naïve*.

1.5. El receptor NLRP3 como regulador transcripcional de la diferenciación Th2

Un estudio reciente sugiere que el receptor NLRP3 tiene la capacidad de regular la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ *naïve* en linfocitos Th2. La estimulación de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* a través del TCR induce la secreción de IL-2, que, a su vez mediante la señalización a través de STAT5 promueve la expresión de NLRP3, debido a que tiene sitios de unión en el promotor de *nlrp3*. Una vez expresado, con ayuda de la importina karioferina $\alpha 2$, NLRP3 se trasloca al núcleo donde interactuará con el factor de transcripción IRF4, para activar al locus Th2. Se encontró que ambas proteínas poseían el mismo sitio de unión al promotor del gen *il-4* y que en conjunto actúan como un factor de transcripción. Es importante destacar que la función NLRP3 como factor de transcripción es independiente del ensamblaje y activación del inflamosoma, ya que al evaluar la producción de IL-4 en linfocitos T CD4⁺ *naïve* de ratones *knockout* para las proteínas ASC y caspasa 1, componentes del inflamosoma NLRP3, se demostró que no había disminución en su producción y la diferenciación a linfocitos Th2 no se encontró afectada²⁵.

En un modelo en ratón *knockout* de *Nlrp3* al cual se le administraba de forma intravenosa células trasplantables de melanoma, se observó que la producción de IL-4 disminuía significativamente en comparación con el control *wild type* y con

ratones *knockout* para *Asc* y para *Casp1*, lo que descartaba al inflamosoma como el agente causal de la producción de IL-4. Como se había sugerido un enlace entre la producción de IL-4 y el crecimiento tumoral, también se evaluó el tamaño de los tumores en estos ratones, obteniendo como resultado una notable disminución en el tamaño del tumor en los ratones *knockout* de *Nlrp3* en comparación con los controles ya mencionados. En conjunto, estos datos muestran que NLRP3 controla la polarización Th2 *in vivo* y que su expresión es dependiente de STAT5²⁵.

Este novedoso mecanismo dependiente de NLRP3 se ha descrito en la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ *naïve* hacia un perfil Th2 y en modelos murinos, sin embargo, se desconoce el papel que podría tener en linfocitos transformados presentes en las lesiones de pacientes con LCCT.

2. JUSTIFICACIÓN

El linfoma cutáneo de células T es una neoplasia de progresión lenta de linfocitos T CD4⁺ que se encuentran en la epidermis y afecta tanto a la dermis como a la epidermis. Puede progresar desde una etapa temprana en forma de placas hasta una etapa tumoral. Diferentes grupos de trabajo han sugerido que la progresión de la enfermedad está determinada por el sistema inmune, aunque aún se sigue investigando esta posibilidad.

En diversos estudios se ha correlacionado la desregulación en el balance de linfocitos Th1/Th2 con la progresión de algunas neoplasias como el cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el cáncer de páncreas. Esto indica que la presencia de linfocitos Th1 promueve el control de la enfermedad mediante la producción de IFN γ , el cual induce una respuesta inmune contra células malignas. En cambio, la presencia de linfocitos Th2 evita la eliminación de clones transformadas debido a la producción de IL-4, la cual actúa como antagonista de la respuesta Th1, inhibiendo así la producción de IFN γ y el control de la enfermedad.

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado la presencia de linfocitos transformados (TOX⁺) que expresan IL-4 de manera constitutiva en etapa temprana de LCCT. Estos linfocitos transformados se encontraron desde etapas tempranas de la enfermedad y además se observó un incremento en la expresión de IL-4 conforme progresa la enfermedad. Este resultado sugiere que la presencia de estos linfocitos T CD4⁺ transformados productores de IL-4 podría estar relacionada con la progresión de la enfermedad, por lo que es importante investigar cual podría ser el

mecanismo por el cual se está regulando la expresión de IL-4 en los linfocitos transformados. Recientemente, se reportó que el receptor NLRP3 participa como un factor de transcripción en la regulación del perfil de diferenciación Th2 en linfocitos T CD4⁺ *naïve*, sin embargo, se desconoce si NLRP3 tiene un papel en linfocitos T CD4⁺ transformados presentes en LCCT, por lo que encontrar el mecanismo responsable de la regulación de la expresión de IL-4 podría permitir el desarrollo de nuevas terapias, no solo para esta enfermedad, sino además para otras enfermedades en donde la respuesta Th2 participe en la fisiopatología de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

NLRP3 regulará de manera positiva la expresión de IL-4 en linfocitos T CD4⁺ transformados de la línea celular HTB-176 y en pacientes con LCCT.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la participación de NLRP3 en la regulación de la expresión de IL-4 en linfocitos T CD4⁺ transformados presentes en etapa temprana de LCCT.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar la expresión y localización de NLRP3 en linfocitos T CD4⁺ transformados (TOX⁺) de biopsias obtenidas de pacientes con LCCT en etapa temprana.
- Caracterizar la expresión y localización de NLRP3 en la línea celular HTB-176.
- Inhibir farmacológicamente el ensamblaje del inflamosoma NLRP3 y evaluar su efecto en la expresión de IL-4 en la línea celular de LCCT.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cortes histológicos de biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con LCCT en etapa temprana de la enfermedad. Los pacientes son provenientes del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua. Se utilizó piel remanente de cirugía de individuos sin patología cutánea del servicio de gastrocirugía del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que serán utilizados como sujetos control. Los individuos que participaron en el estudio fueron informados acerca de las cuestiones referentes al uso de las biopsias, aceptando su participación en el estudio al firmar la carta de consentimiento informado correspondiente.

Además, se utilizó una línea celular de linfocitos T CD4+ derivada de un paciente con linfoma cutáneo de células T en etapa temprana (HTB-176, derivada de la línea Hut78).

5.1. Determinación de la expresión y localización de NLRP3

Para determinar la expresión y localización del receptor NLRP3 se realizaron inmunofluorescencias de cortes de lesiones cutáneas de pacientes con LCCT en etapa temprana de la enfermedad, y en cortes de piel de individuos sin patología cutánea. Se llevó a cabo una tinción para TOX (0.02 mg/mL Rabbit polyclonal; Thermo Scientific) y NLRP3 (0.01 mg/mL Rat; R&D Systems) analizándose por microscopía confocal (Microscopio confocal Nikon A1+).

Para la caracterización de la línea celular HTB-176 se evaluó la expresión de NLRP3 y se analizó mediante citometría de flujo, así mismo se caracterizó su localización celular por inmunofluorescencia y se analizó por microscopía confocal.

Inhibición del ensamblaje del inflamosoma

La inhibición del ensamblaje del inflamosoma se realizó en la línea celular HTB-176. Para evaluar la expresión y localización de NLRP3, las células se sometieron a las siguientes condiciones: células sin estímulo, células sin estímulo con el inhibidor farmacológico de NLRP3 (MCC950 5 μ M) durante 10 horas, células estimuladas con PMA/Ionomicina (2 μ L/mL, Cell Stimulation Cocktail, eBioscience), estimuladas con PMA/Ionomicina más el inhibidor farmacológico, células estimuladas con anti-CD3/CD28 durante 72 horas y células estimuladas con anti-CD3/CD28 más el inhibidor farmacológico. Para evaluar la expresión de IL-4, se agregó brefeldina/monensina (2 μ L/mL, Protein Transport Inhibitor Cocktail, eBioscience) 6 horas antes de que se cumpliera el periodo de incubación de cada estímulo para inhibir el transporte de proteínas al medio extracelular y se analizó por citometría de flujo y microscopía confocal.

Análisis de datos y Análisis Estadístico

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron analizadas empleando el software ImageJ 1.50i, NIH, USA. Por otro lado, los datos obtenidos por citometría de flujo fueron analizados mediante el software FlowJo 7.6.2, USA. Los datos fueron analizados empleando el software GraphPad Prism Software V7, USA. Están representados por la media \pm SD. Las diferencias significativas entre el grupo control

y los grupos experimentales fueron determinados utilizando la prueba U de Mann-Whitney a dos colas para datos no paramétricos. Valores de p menores a 0.05 se consideraron significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Expresión y localización de NLRP3 en LCCT

Inicialmente se evaluó la expresión y la localización de NLRP3 en biopsias de lesiones cutáneas de pacientes con LCCT en etapa temprana. En la figura 1 se muestra la expresión de NLRP3 y de TOX mediante inmunofluorescencia, en donde se observa que existe una gran expresión de ambas moléculas y esta expresión se da en el citoplasma. Es importante destacar que hay expresión nuclear de NLRP3 en células transformadas (TOX⁺). Se puede observar que en algunas células hay coexpresión de ambas moléculas. Este resultado indica que NLRP3 se está expresando tanto en el núcleo como en el citoplasma de células transformadas (TOX⁺) de biopsias de pacientes con LCCT.

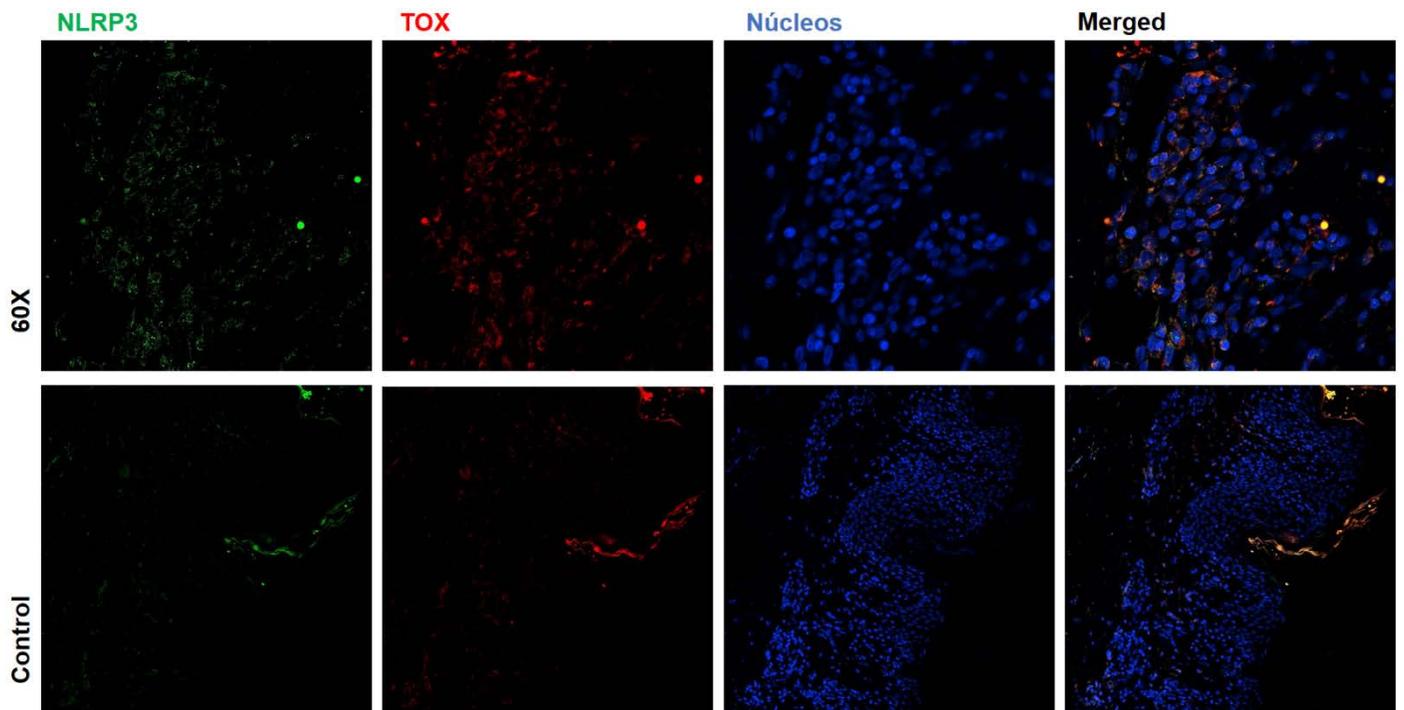


Figura 1. Expresión y localización de NLRP3 en pacientes con LCCT en etapa temprana. Se muestran microfotografías representativas de la tinción para NLRP3 y TOX. La imagen se presenta a un aumento de 20X y a un aumento de 60X.

Después de comprobar que NLRP3 se expresa en piel lesionada de pacientes con LCCT, se realizaron inmunofluorescencias de muestras provenientes de 23 pacientes con enfermedad en etapa temprana y de 6 controles sanos, para buscar si la expresión de NLRP3 se veía incrementada en LCCT. En la figura 2 se muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de NLRP3 y de TOX para los grupos de pacientes y de controles sanos. Se observa un incremento en la expresión de NLRP3 en cortes de piel lesionada de pacientes con LCCT. El aumento en la expresión de TOX en comparación con los controles sanos permite evidenciar un aumento en la presencia de células malignas en los cortes de piel lesionada. Por otro lado, el aumento en la expresión de NLRP3 sugiere que algún mecanismo propio de la enfermedad estaría aumentando la expresión del receptor NLRP3.

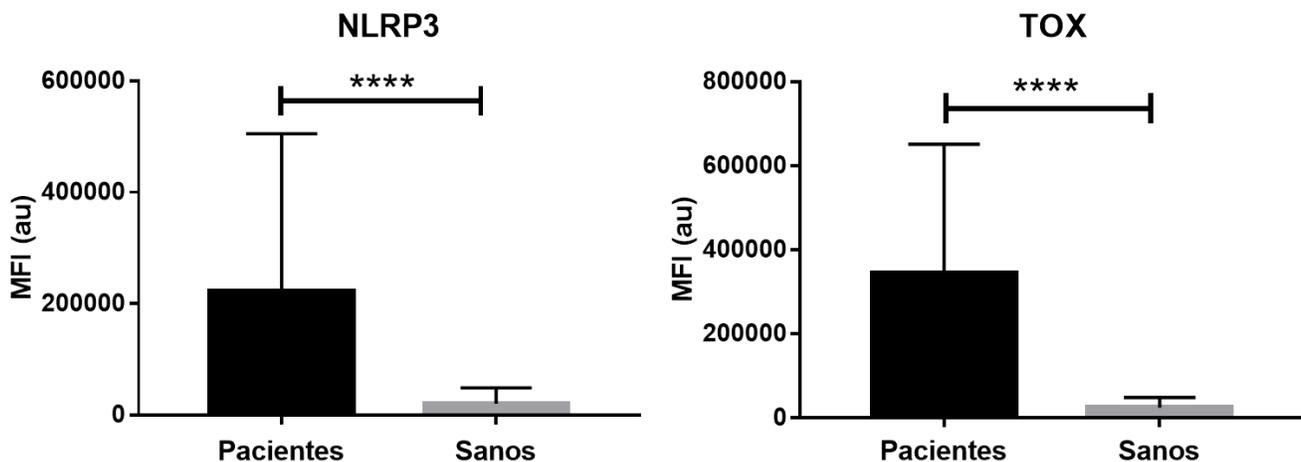


Figura 2. Aumento de la expresión de NLRP3 y TOX en LCCT. Cuantificación de la MFI de NLRP3 y TOX en los cortes de piel lesionada (Pacientes) y de los controles sanos (Sanos). El resultado se expresa en unidades arbitrarias (au). Datos provenientes de 23 pacientes con LCCT y 6 controles sanos.

Además de cuantificar el aumento en la expresión de NLRP3 en los cortes de piel lesionada, también se analizó la localización celular de NLRP3 en los pacientes y en los controles sanos. La figura 3 muestra el porcentaje de expresión nuclear de

NLRP3 en células transformadas (TOX⁺) para los cortes de piel lesionada y los controles sanos, donde se puede observar que hay un incremento en la localización nuclear de NLRP3. Esta expresión nuclear de NLRP3 sugiere que este receptor podría estar participando en la regulación de la producción de IL-4 en las células transformadas en LCCT.

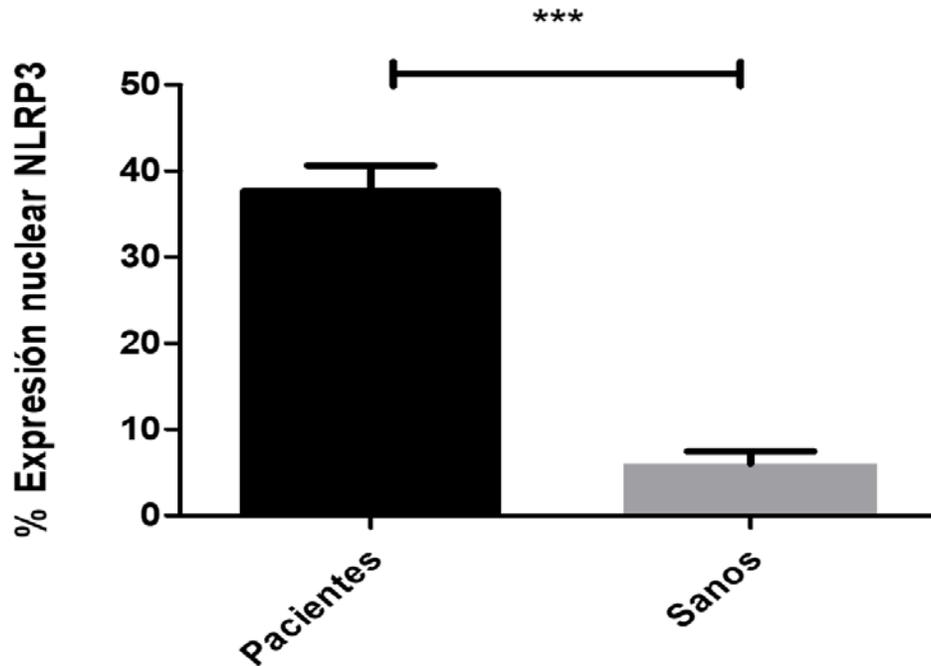


Figura 3. Expresión nuclear de NLRP3. Se muestra el porcentaje de células que expresan NLRP3 en el núcleo para ambos grupos de estudio. Datos obtenidos de 23 pacientes con LCCT y 6 controles sanos.

6.2. Inhibición del ensamblaje del inflamosoma NLRP3

Una vez que se comprobó que hay un aumento en la expresión de NLRP3 en los pacientes con LCCT, y que se encuentra localizado en el núcleo de las células transformadas (TOX⁺), se procedió a estudiar si NLRP3 participa en la regulación de la producción de IL-4 en estas células. Para realizar esto, se caracterizó la línea celular HTB-176 y se buscó la expresión de NLRP3. En primer lugar, se procedió a

analizar si NLRP3 estaba expresado en la línea celular y posteriormente identificar su localización por microscopía confocal. En la figura 4a, se muestran histogramas representativos de la expresión de NLRP3 en la línea celular y en la figura 4b se puede observar que NLRP3 se expresa en citoplasma y núcleo. Además, en citoplasma se observa un patrón de tinción punteado, lo cual es característico del inflamosoma NLRP3 ensamblado.

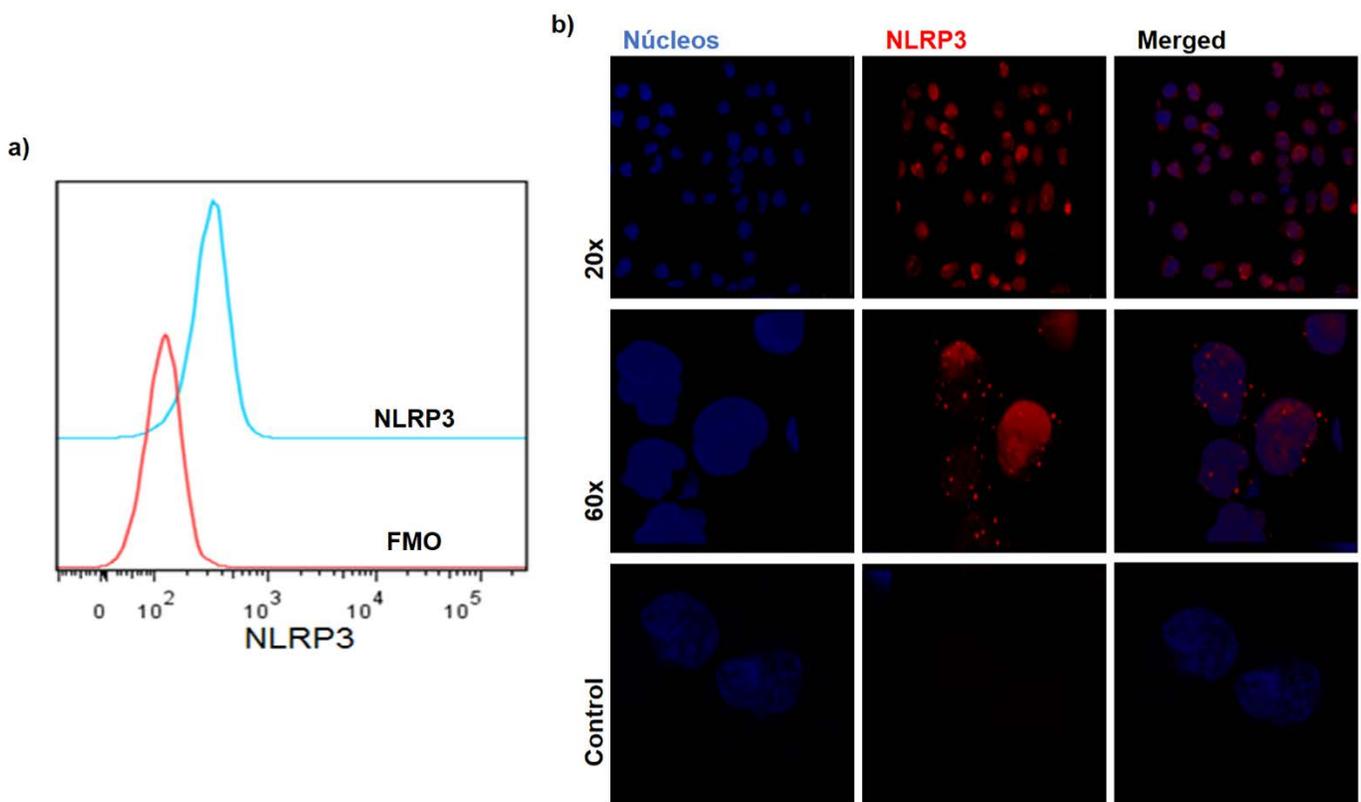


Figura 4. Expresión nuclear de NLRP3 en células HTB-176. a) Se muestran histogramas de MFI de la expresión de NLRP3 (azul) y FMO (rojo). b) Microfotografías representativas de la expresión de NLRP3 en células HTB-176. NLRP3 (TRITC) y núcleos ((Hoescht 33285).

Después de haber caracterizado la línea celular HTB-176 y de analizar la expresión y localización de NLRP3, se realizó un ensayo de inhibición del ensamblaje del inflamosoma para determinar el efecto en la producción de IL-4.

En la figura 5, se observa que las células de la línea celular HTB-176 producen IL-4 de manera basal, sin la necesidad de un estímulo y que, cuando se hace la estimulación con PMA/Ionomicina no incrementa la producción de dicha citocina. (5a) De igual forma, se realizó una estimulación con anti-CD3/CD28, en donde tampoco se observó un incremento en la producción de IL-4 (5b). También se muestra que al adicionar el inhibidor del ensamblaje del inflamasoma, hubo un incremento en la expresión de IL-4 en estas células (5c), tanto en presencia o ausencia del estímulo con PMA/Ionomicina. Debido a que se observó un incremento en la expresión de IL-4, se pensó que al inhibir el ensamblaje del inflamasoma, el receptor NLRP3 queda libre para traslocarse al núcleo y ejercer su papel transcripcional en el promotor de IL-4. Para probar esta hipótesis, se analizaron las células por microscopía confocal en las condiciones previamente descritas.

En la figura 6, se muestra que cuando las células de la línea HTB-176 no son tratadas con el inhibidor de NLRP3, se observa la tinción característica del inflamosoma ensamblado y cierta localización nuclear. Así mismo, se observa cierta expresión de IL-4. Sin embargo, cuando las células son tratadas con el inhibidor, la tinción característica del inflamosoma ensamblado disminuye, se observa una mayor expresión nuclear de NLRP3 y un incremento en la expresión de IL-4, con respecto a las células que no fueron tratadas con el inhibidor. Este mismo patrón de expresión se repite en las células que fueron estimulas con PMA/Ionomicina y que concuerda con los datos obtenidos por citometría de flujo (Figura 5).

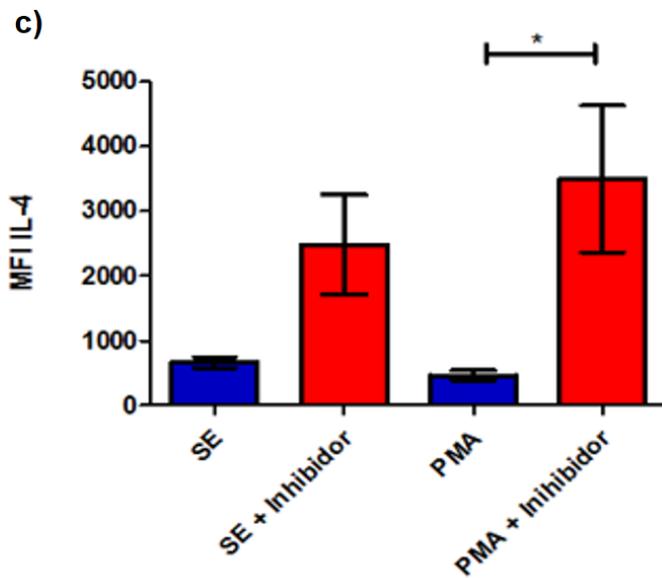
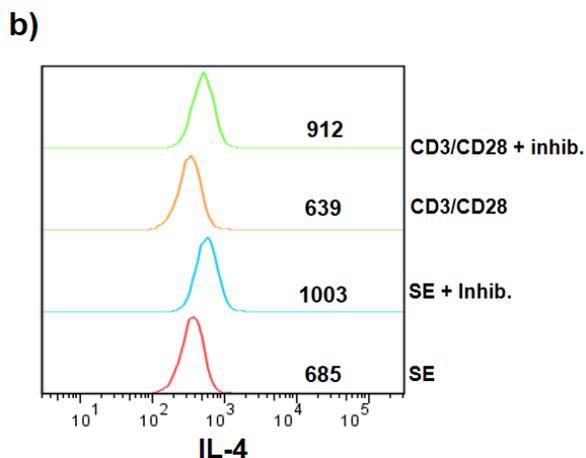
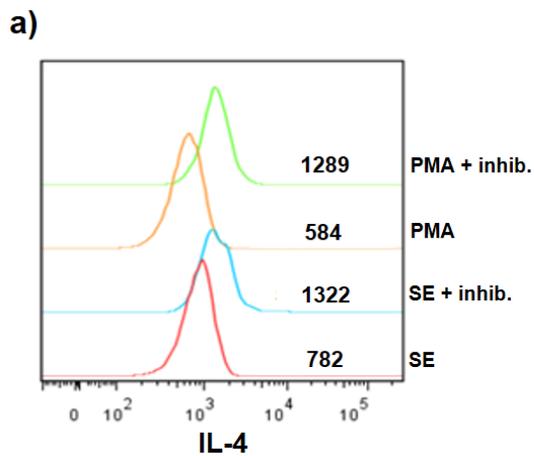


Figura 5. Expresión de IL-4 en el ensayo de inhibición farmacológica del inflamasoma NLRP3. Se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia de IL-4 en células de la línea HTB-176 sin estimulación, sin estimulación más inhibidor de NLRP3, estimuladas con PMA/Ionomicina y estimuladas con PMA/Ionomicina más inhibidor. a) Histograma representativo de la MFI de IL-4. b) Estimulación alternativa de la línea celular HTB-176 con anti-CD3 y anti-CD28. c) Gráfica de la cuantificación de IL-4 de dos experimentos independientes.

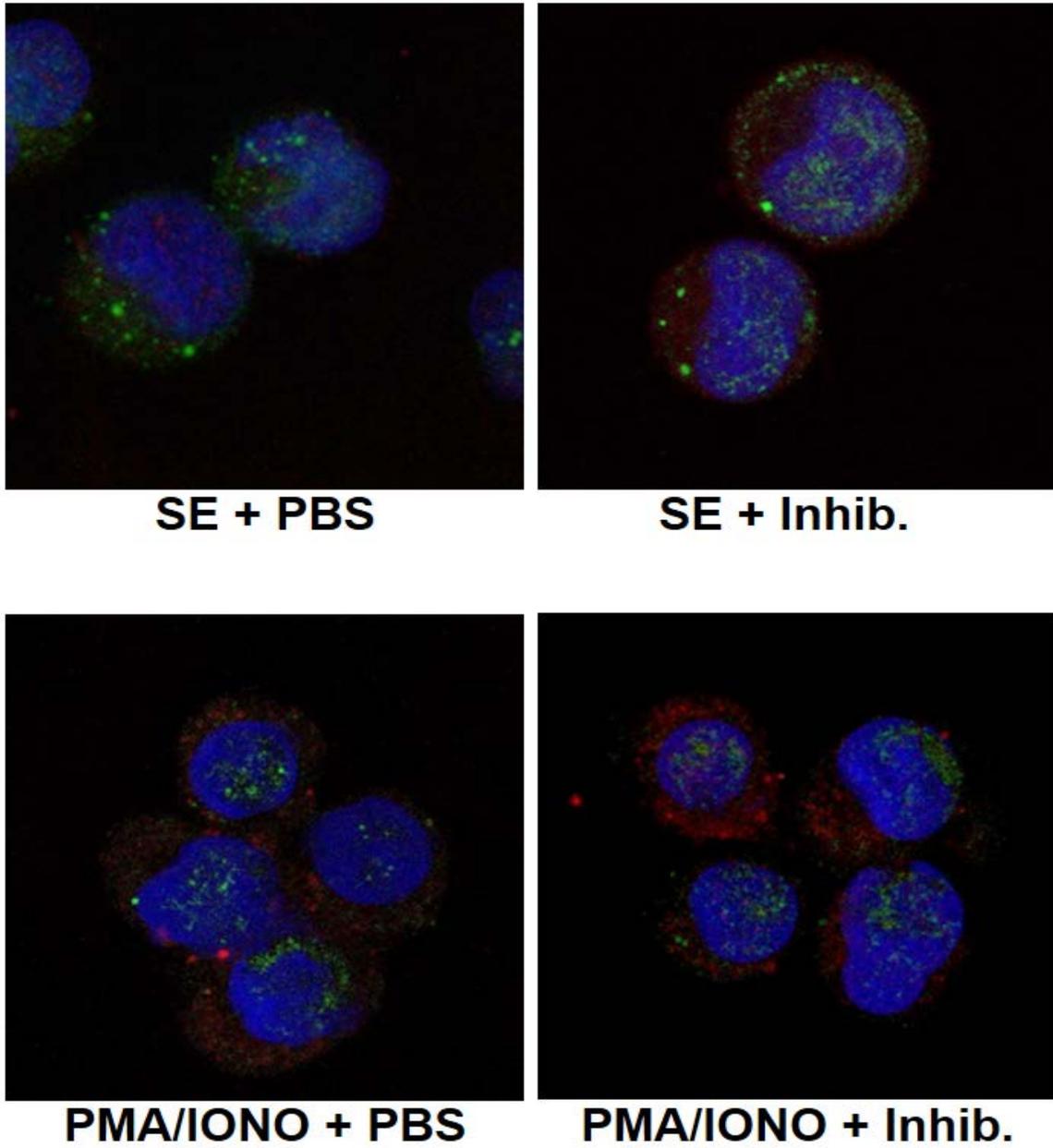


Figura 6. Localización de NLRP3 y expresión de IL-4. Se muestran microfotografías representativas de la expresión de NLRP3 (AF488), IL-4 (TRITC) y núcleos (Hoescht 33285) en diferentes condiciones. Las imágenes se observan a un aumento de 60x y son representativas de dos experimentos independientes.

7. Discusión

El linfoma cutáneo de células T es una neoplasia de progresión lenta, ya que los pacientes pueden permanecer con lesiones en forma de placa durante meses e incluso años antes de progresar a formas más avanzadas como los tumores cutáneos. Esto indica fuertemente que existen mecanismos del sistema inmune que se encuentran controlando la progresión de la enfermedad y mientras que otros favorecen la progresión de la misma².

Para el presente estudio se utilizaron biopsias de lesiones cutáneas de pacientes en etapa de placa de LCCT. Así como linfocitos T CD4⁺ de la línea celular HTB-176, la cual proviene de un paciente con linfoma cutáneo de células T en etapa temprana. Con este trabajo, se demostró que en piel lesionada de pacientes con LCCT en etapa temprana, hay coexpresión del receptor NLRP3 y de TOX, siendo este último sugerido como un marcador de células transformadas desde etapa temprana de la enfermedad. Además, se demostró un incremento en la expresión y localización nuclear de NLRP3 en piel de pacientes en etapa temprana. También se demostró que la línea celular HTB-176 expresa NLRP3 tanto en núcleo como en citoplasma, y que la inhibición del ensamblaje del inflamosoma de NLRP3, tiene como consecuencia aumento en la expresión nuclear de NLRP3 y a su vez un incremento en la producción de IL-4.

Se demostró que en los cortes de piel lesionada de pacientes con LCCT, NLRP3 es expresado por las células transformadas (TOX⁺) tanto en el citoplasma como en el núcleo. Lo que concuerda con los hallazgos de Huang y colaboradores que

demuestran que la sobreexpresión de TOX en linfocitos T CD4⁺ es específica para el linfoma cutáneo de células T, debido a que no se expresa en enfermedades inflamatorias benignas de la piel, como en psoriasis o dermatitis alérgica por contacto. Además, se ha descrito que TOX tiene funciones oncológicas en MF, tales como la aceleración en la proliferación y el incremento en el potencial de migración de las células transformadas, proponiéndose como un potencial biomarcador para diagnóstico histológico de MF. La expresión de NLRP3 que se observó en las biopsias de piel lesionada de pacientes con LCCT tiene similitud con lo reportado por diversos autores en cáncer. Wang y colaboradores observaron mediante inmunofluorescencias el efecto de la activación del inflamosoma NLRP3 con LPS y ATP en la línea celular A549 derivada de células de adenocarcinoma de pulmón, mientras que Wei y colaboradores estudiaron la expresión de las moléculas del inflamosoma NLRP3 en pacientes con carcinoma hepatocelular mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se observó expresión nuclear de NLRP3^{6,7,26-28}.

Además, al realizar un análisis mayor de la expresión de NLRP3 y TOX en cortes de piel lesionada de pacientes con LCCT, se demostró un incremento en la expresión, tanto de NLRP3 como de TOX, respecto a los controles sanos. El aumento en la expresión de TOX en los pacientes con LCCT que se observó concuerda con lo descrito por otros grupos de trabajo, como el de McGirt y colaboradores, en el cual hallaron que las muestras de piel obtenidas de pacientes con MF tenían incrementada la expresión de TOX en comparación con muestras de piel de pacientes con enfermedades inflamatorias benignas de la piel, en los cuales

había una mínima o nula expresión de TOX. Por otro lado, aunque no se han realizado estudios acerca del aumento de la expresión de NLRP3 en LCCT, algunos grupos de trabajo como el de Okamoto y colaboradores, encontraron una expresión similar de NLRP3 en tres diferentes líneas celulares de melanoma que provenían de diferentes etapas de esta neoplasia. Sin embargo, también encontraron que, pese a que no aumentaba la expresión de NLRP3 en ninguna etapa de la enfermedad, en la etapa avanzada de melanoma, el inflamasoma NLRP3 se encontraba constitutivamente activo y que, además, la inhibición de este inflamasoma podría ser utilizada como terapia para esta enfermedad. Lo cual contrasta con nuestros resultados, debido a que observamos que al inhibir el ensamblaje del inflamosoma incrementa la expresión de IL-4, lo cual favorecería la progresión de la enfermedad^{4,29}.

También se encontró que las células transformadas (TOX⁺) expresan NLRP3 en el núcleo, lo que concuerda con lo reportado por Bruchard y colaboradores, en donde se reportó que NLRP3 se expresa principalmente en el núcleo de linfocitos Th2 y, además, que este actúa como factor de transcripción para la diferenciación de linfocitos *naïve* en Th2, en un modelo murino. Aunque no se ha descrito lo que sucede en las células transformadas, los resultados que se obtuvieron y los estudios reportados en la literatura sugieren que NLRP3 podría estar participando en la regulación de la expresión de IL-4 en los linfocitos transformados de LCCT²⁵.

Además de los resultados obtenidos con los cortes de piel lesionada de pacientes en etapa temprana con LCCT, también se caracterizó la línea celular HTB-176 demostrando que expresa NLRP3 y que este se localiza en el núcleo y en el

citoplasma, con una tinción punteada característica. Este patrón punteado ya había sido observado por Atianand y colaboradores, quienes evidenciaron la expresión del inflamosoma ensamblado con la estimulación por la bacteria *Francisella tularensis* cuando realizaron una inmunofluorescencia del receptor NLRP3³⁰.

También se demostró que al inhibir el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 farmacológicamente, aumentaba la producción de IL-4 en la línea celular HTB-176, como consecuencia de que el fármaco MCC950 inhibe el ensamblaje del inflamasoma al bloquear la oligomerización de la proteína ASC, dejando una mayor cantidad del receptor NLRP3 libre, y con capacidad de traslocarse al núcleo e incrementando la expresión de IL-4, mecanismo que aunque no había sido reportado por el uso de este fármaco en LCCT y que no se había relacionado con la expresión de IL-4, concuerda con lo que había sido evidenciado anteriormente por Bruchard y colaboradores, que observaron que NLRP3 en linfocitos Th2 debe traslocarse al núcleo para activar la expresión de IL-4 y otras citocinas Th2^{25,31}.

Finalmente, se comprobó mediante microscopía confocal que, al utilizar el fármaco inhibidor, había disminución en el patrón de tinción característica del inflamasoma ensamblado, lo que concuerda con el estudio realizado por Coll y colaboradores, que al utilizar el fármaco en macrófagos derivados de médula ósea demostraron una disminución en el ensamblaje del inflamasoma, al observar una disminución en el patrón de tinción punteada. Por otra parte, un estudio realizado por Arbore y colaboradores en linfocitos T CD4⁺ obtenidos de sangre periférica de humano, se encontró que estos linfocitos necesitan que el inflamasoma NLRP3 se ensamble y que haya una producción local de IL-1 β para que haya expresión de IFN γ , mientras

que, basado en nuestros resultados, en los linfocitos productores de IL-4, NLRP3 debe localizarse en el núcleo de la célula para observar el incremento de dicha citocina^{31,32}.

Con los resultados anteriores se confirma que las células transformadas (TOX⁺) de LCCT expresan NLRP3 principalmente en el núcleo y además se sugiere que NLRP3 participa como un regulador de la expresión de IL-4, lo cual es importante, ya que se ha planteado que las citocinas del perfil Th2 podrían ser responsables de la pérdida de la inmunovigilancia desde etapas tempranas del LCCT, y encontrar los mecanismos responsables de la regulación de la producción de estas citocinas podría ayudar a generar terapias para el control de esta enfermedad y posiblemente otras enfermedades en las que participe la respuesta Th2.

8. Conclusiones

Considerando que un predominio de respuesta Th2 podría favorecer la progresión de la enfermedad, nuestros resultados sugieren que NLRP3 podría estar participando en la regulación de la expresión de IL-4 en las células transformadas de pacientes con LCCT en etapa temprana y por lo tanto favoreciendo la progresión de la misma. Esto es especialmente importante, debido a que diversos estudios han sugerido que las citocinas del perfil Th2 están involucradas en la progresión de la enfermedad a etapas más avanzadas, por lo que dilucidar el mecanismo de regulación de estas citocinas nos proporciona información que podría ser útil para el desarrollo de terapias contra esta neoplasia u otras enfermedades que involucren al perfil Th2.

9. Referencias

1. Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z. & Nickoloff, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 679–91 (2009).
2. Girardi, M., Heald, P. W. & Wilson, L. D. The Pathogenesis of Mycosis Fungoides. *N Engl J Med* **350**19350, 1978–88 (2004).
3. Hwang, S. T., Janik, J. E., Jaffe, E. S. & Wilson, W. H. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet* **371**, 945–957 (2008).
4. McGirt, L. Y. *et al.* TOX expression and role in CTCL. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **30**, 1497–1502 (2016).
5. Aliahmad, P., Kadavallore, A., de la Torre, B., Kappes, D. & Kaye, J. TOX Is Required for Development of the CD4 T Cell Lineage Gene Program. *J. Immunol.* **187**, 5931–5940 (2011).
6. Dulmage, B. O., Akilov, O., Vu, J. R., Falo, L. D. & Geskin, L. J. Dysregulation of the TOX-RUNX3 pathway in cutaneous T-cell lymphoma. *Oncotarget* (2014). doi:10.18632/oncotarget.5742
7. Yu, X., Luo, Y., Liu, J., Liu, Y. & Sun, Q. TOX Acts an Oncological Role in Mycosis Fungoides. *PLoS One* **10**, e0117479 (2015).
8. Netchiporouk, E. *et al.* Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle* **13**, 3331–3335 (2014).

9. Amsen, D., Spilianakis, C. G. & Flavell, R. A. How are TH1 and TH2 effector cells made? *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 153–160 (2009).
10. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. Immunobiología de Janeway. in 835 (McGraw Hill, 2009).
11. Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 95–109 (2002).
12. Akdis, M. *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 701–721 (2011).
13. Appay, V., van Lier, R. A. W., Sallusto, F. & Roederer, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom. Part A* **73A**, 975–983 (2008).
14. Conticello, C. *et al.* IL-4 Protects Tumor Cells from Anti-CD95 and Chemotherapeutic Agents via Up-Regulation of Antiapoptotic Proteins. *J. Immunol.* **172**, 5467–5477 (2004).
15. Dancescu, M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J. Exp. Med.* **176**, 1319–1326 (1992).
16. Shurin, M. R., Lu, L., Kalinski, P. & Stewart-Akers, A. M. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin. Immunopathol.* **21**,

339–359 (1999).

17. Gao, J. *et al.* Infiltration of Alternatively Activated Macrophages in Cancer Tissue Is Associated with MDSC and Th2 Polarization in Patients with Esophageal Cancer. *PLoS One* **9**, e104453 (2014).
18. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 1–13 (2014).
19. Willerslev-Olsen, A. *et al.* Bacterial Toxins Fuel Disease Progression in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Toxins (Basel)*. **5**, 1402–1421 (2013).
20. Harwix, S., Zachmann, K. & Neumann, C. T-cell clones from early-stage cutaneous T-cell lymphoma show no polarized Th-1 or Th-2 cytokine profile. *Arch. Dermatol. Res.* **292**, 1–8 (2000).
21. Saed, G., Fivenson, D. P., Naidu, Y. & Nickoloff, B. J. Mycosis Fungoides Exhibits a Th1-Type Cell-Mediated Cytokine Profile Whereas Sezary Syndrome Express a Th2-Type Profile. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 29–33 (1994).
22. Vowels, B. R. *et al.* Th2 Cytokine mRNA Expression in Skin in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 669–673 (1994).
23. Bagot, M. *et al.* Crosstalk between Tumor T Lymphocytes and Reactive T Lymphocytes in Cutaneous T Cell Lymphomas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **941**, 31–38 (2006).

24. Licona-Limón, P., Kim, L. K., Palm, N. W. & Flavell, R. A. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **14**, 536–542 (2013).
25. Bruchard, M. *et al.* The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat. Immunol.* **16**, 859–870 (2015).
26. Huang, Y., Su, M.-W., Jiang, X. & Zhou, Y. Evidence of an oncogenic role of aberrant TOX activation in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* **125**, 1435–1443 (2015).
27. Wei, Q. *et al.* Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. *Lab. Investig.* **94**, 52–62 (2014).
28. Wang, Y. *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **35**, 2053–64 (2016).
29. Okamoto, M. *et al.* Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1 β . *J. Biol. Chem.* **285**, 6477–6488 (2010).
30. Atianand, M. K. *et al.* Francisella tularensis reveals a disparity between human and mouse NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 39033–39042 (2011).
31. Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* **21**, 248–255 (2015).

32. Arbore, G. *et al.* T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4+ T cells. *Science* (80-.). **352**, aad1210-aad1210 (2016).