



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**"Efecto de la desmetilación dirigida del gen *FOXP3*  
mediante CRISPR-TET1 para generar un fenotipo tipo  
regulador en linfocitos humanos"**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

Presenta:

**EMANUEL ALEJANDRO LÓPEZ MARTÍNEZ**

Director de tesis:

**Dr. Rubén Darío Arroyo Olarte**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por darme la oportunidad de estar aquí, con vida, haciendo lo que más me gusta. Gracias por permitirme contar con la presencia de mi mamá y de todas las amistades que siempre han estado ahí, compartiendo momentos y apoyándome en todo momento.*

*A mi madre por haberme cuidado, por no dejar de preocuparse por mí y por asegurarse siempre de que nada me faltara. También por motivarme a seguir estudiando, por brindarme herramientas que han sido importantes para mi crecimiento personal y académico, y por hacerme entrar en razón en múltiples ocasiones. Además, agradezco mi abuela Martha, quien, aunque ya no está conmigo, me inculcó valores que hoy me ayudan a ser una mejor persona.*

*A mis mejores amigos que conocí desde Prepa 9, Uriel y Jacqueline porque siempre han estado ahí, en los buenos y malos momentos, sin mencionar las veces que no hemos parado de reír. Jacqueline, gracias por escucharme y darme los mejores consejos cuando más los he necesitado. Uriel, gracias por compartir tu amistad conmigo, gracias a ti, he aprendido a relacionarme mejor con las personas y a apreciar el valor del trabajo.*

*También agradezco a los amigos que hice desde el primer semestre de la carrera, en especial a Mau y a Dany, porque siempre me la pasaba riendo con ellos dentro y fuera de clases. Su compañía fue muy valiosa en esos primeros semestres y durante la pandemia. Aprecio mucho a Dany a pesar de que ya casi nos veamos y valoro la amistad de Mau, que se ha mantenido hasta ahora.*

*A mis compañeros de laboratorio, incluyendo al doctor Aarón Ramírez, a Alejandro Rebolledo y por haber contribuido a crear un ambiente más cálido y agradable en el laboratorio. También quiero agradecerle a los Melonis (Chris y Ángel) por fomentar el deporte dentro del mismo al organizar partidos de basquetbol. Extrañaré los partidos y las salidas a Clandes.*

*A Fer y a Carlos por haberme capacitado cuando entré al laboratorio.*

*A mis compañeros de CINVESTAV, que me motivaron a continuar escribiendo la tesis, aún con la carga de trabajo que teníamos encima a lo largo de todo el semestre.*

*A Cody Rhodes, gracias a su perseverancia encontré una gran motivación para no darme por vencido a pesar de las adversidades. Además, su incansable lucha por el título me recordó la importancia de “terminar mi historia”.*

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

*A la Universidad Nacional Autónoma de México*

*A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por brindarme una educación de calidad en múltiples áreas de la biología, permitiéndome desarrollar un gran conocimiento, así como habilidades prácticas. También me gustaría expresar un agradecimiento a los profesores que se esforzaron por impartir las clases durante pandemia, utilizando los recursos que tenían disponibles para garantizar el aprendizaje de los alumnos.*

*A la UBIMED por facilitarme el acceso a sus instalaciones y equipos de alta calidad, necesarios para realizar todos mis experimentos. Además, valoró la oportunidad de haber compartido ideas y experiencias con una variedad de colegas, con quienes sigo manteniendo una excelente relación tanto a nivel personal y profesional.*

*A la Dra. Sonia Andrea León Cabrera, por la confianza que me otorgó al permitirme integrarme a su equipo de trabajo, y por brindarme un proyecto de tesis que disfruté realizar, ya que abordaba un tema de mi interés. Así como por las retroalimentaciones durante los seminarios, lo cual ha sido de gran ayuda hasta el día de hoy para mi formación académica.*

*A mi asesor de tesis, el Dr. Rubén Darío Arroyo Olarte, por haberme guiado durante el tiempo que realicé mi estancia en el laboratorio. Gracias a su orientación, aprendí una variedad de técnicas en biología molecular y herramientas bioinformáticas que me permitirán desarrollar múltiples proyectos de investigación. Asimismo, le agradezco la paciencia y el apoyo que me brindó durante la realización de los experimentos.*

*También quiero agradecer al laboratorio de citometría del Hospital Siglo XXI por su gran apoyo al permitir el uso del citómetro de flujo, una herramienta clave para la realización de esta investigación.*

*Este trabajo fue apoyado por el programa de apoyo a la investigación **UNAM-PAPIIT** (número de proyectos **IN215421** e **IN201724**).*

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es el resultado de varios meses de esfuerzo, resiliencia y mucho aprendizaje, y va dedicado a mi madre y a todas las personas que estuvieron conmigo durante su realización. También lo quiero dedicar a todas aquellas personas que padecen de alguna enfermedad inflamatoria o autoinmune. Espero que los resultados obtenidos sean de gran utilidad para el desarrollo de nuevas terapias, que contribuyan a mejorar su calidad de vida.

**El presente proyecto se desarrolló en el Laboratorio 16 de Inmunidad Tumoral de la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM**

## INDICE DE FIGURAS

1. Diferenciación de células Th a partir de células T CD4+ naïve.....	11
2. Mecanismos de supresión de las células Treg.....	18
3. Regulación transcripcional del locus Foxp3.....	22
4. Importancia funcional de los cambios epigenéticos en los distintos tipos de Treg.....	23
5. Desmetilación sitio-específica basada en dCas9-TET1-CD (CRISPR-TET1).....	26
6. Diseño del RNA guía dirigido hacia la desmetilación del TSDR humano.....	33
7. Plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP (TET1).....	39
8. Plásmido pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-EGFP (pdTET).....	41
9. Cuadrante representativo para el conteo en la cámara de Neubauer mejorado.....	44
10. PCR cuantitativa con transcripción reversa en dos pasos.....	47
11. Curvas de amplificación de qPCR para FOXP3 y 18S.....	49
12. Selección de guías de ARN para la región TSDR utilizando Blenching.....	51
13. Estrategia utilizada para la desmetilación activa de FOXP3-TSDR en células T Jurkat.....	52
14. PCR de colonia con fragmentos U6 y sgRNA.....	52
15. Segunda PCR de colonia con fragmentos U6 y sgRNA.....	53
16. PCR de colonia con fragmentos TET1 y EGFP.....	54
17. PCR de colonia con fragmentos dTET y EGFP.....	54
18. Estrategia de gating y plots representativos de cada condición.....	56
19. Efectos de la electroporación con diferentes cantidades de ADN (0, 5, 7.5 y 10 µg).....	57
20. Efectos de la electroporación a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h) utilizando 10 µg de ADN plasmídico.....	59
21. Plots representativos del ensayo de cell-sorting.....	60
22. Niveles de expresión de ARNm asociados a Treg.....	61
23. Niveles de expresión de ARNm asociados a Th.....	63

## **GLOSARIO**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**CD4:** Clúster de diferenciación 4

**CD25:** Clúster de diferenciación 25

**CRISPR:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

**CTLA-4:** Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

**EGFP:** Proteína verde fluorescente mejorada

**Foxp3:** Forkhead box P3

**IFN-  $\gamma$ :** Interferón gamma

**iTreg:** Linfocitos T reguladores inducidos

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa

**PD-1:** Proteína de muerte celular programada 1

**pTreg:** Linfocitos T reguladores periféricos

**ROR $\gamma$ t:** Receptor gamma huérfano relacionado con RAR

**sgRNA:** ARN guía único

**STAT6:** Transductor de señal y activador de la transcripción 6

**TET1:** Tet metilcitosina dioxigenasa

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**Th:** Linfocitos T cooperadores

**tTreg:** Linfocitos T reguladores tímicos

**FACS:** Fluorescence-Activated Cell Sorting

## 1. RESUMEN

Los linfocitos T reguladores (Treg) son una subpoblación de linfocitos T CD4+ que regulan el sistema inmune de vertebrados. Su desarrollo y función requieren de proteínas de superficie, como CTLA-4 y PD-1, interleucinas como TGF- $\beta$  y el factor de transcripción Foxp3. La expresión estable de Foxp3 en Treg depende de la desmetilación en la región intrónica TSDR/CNS2 del gen Foxp3. Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de edición epigenética con CRISPR-TET1 para la generar linfocitos humanos con un fenotipo T regulador. Se construyó el plásmido (pSp-dCas9- TET1-sgTSDRhuman-EGFP) que incluye la enzima TET1, que participa en la desmetilación al catalizar la conversión de 5-mC en 5-hmC, una forma inactiva de Cas9 (dCas9), que, trabaja en conjunto con un ARN guía para dirigir el sistema hacia la región TSDR del gen *FOXP3* humano, y un marcador de fluorescencia (EGFP) para la identificación y aislamiento de las células, mediante citometría de flujo y FACS. El vector fue utilizado para transfectar células de la línea celular Jurkat mediante electroporación. La viabilidad y eficiencia de la transfección se evaluaron mediante citometría de flujo. Las células transfectadas positivas para EGFP fueron aisladas mediante FACS. Finalmente se analizó la expresión de genes asociados al fenotipo Treg y a linfocitos T efectores (Th) mediante PCR transcriptasa reversa cuantitativa (qRT-PCR). Los resultados obtenidos demuestran que la desmetilación dirigida de la región TSDR Desmetilación sitio-específica basada en dCas9-TET1-CD CRISPR-TET1 aumenta la expresión de Foxp3 y marcadores supresores como CTLA-4, PD-1 y TGF- $\beta$ , mientras que afecta la expresión de marcadores asociados a linfocitos Th, como STAT6, IFN $\gamma$  y ROR $\gamma$ t. En conclusión, el uso de CRISPR-TET1 para desmetilar la región TSDR promueve una mayor estabilidad y capacidad supresora en células Jurkat, lo que sugiere posibles aplicaciones contra enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

<b>2. <u>ÍNDICE</u></b>	
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. <i>ÍNDICE</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>3. <i>INTRODUCCIÓN</i>.....</b>	<b>8</b>
3.1. SISTEMA INMUNE.....	8
3.1.1 SISTEMA INMUNE INNATO Y ADAPTATIVO.....	8
3.2. INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL .....	8
3.3. DIFERENCIACIÓN DEL LINAJE DE CÉLULAS T CD4+.....	9
3.4. CÉLULAS T REGULADORAS (Treg).....	11
3.4.1 TIPOS DE CÉLULAS T REGULADORAS.....	12
3.4.1.1 CÉLULAS T REGULADORAS TÍMICAS (tTreg).....	13
3.4.1.2 CÉLULAS T REGULADORAS PERIFÉRICAS (pTreg).....	14
3.4.2 MECANISMOS DE SUPRESIÓN.....	
3.4.2.1 SUPRESIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DEL ANTÍGENO.....	15
3.4.2.2 SUPRESIÓN MEDIANTE LA DESTRUCCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA.....	16
3.4.2.3 SUPRESIÓN MEDIANTE ALTERACIÓN METABÓLICA.....	16
3.4.2.4 SUPRESIÓN POR CITOCINAS INHIBIDORAS.....	17
3.4.3 ESTABILIDAD DE CÉLULAS T REGULADORAS.....	18
3.5. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN EL ADN .....	19
3.5.1 METILACIÓN DEL ADN.....	20
3.5.2 DESMETILACIÓN DEL ADN Y ENZIMAS TET.....	21
3.6. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE CÉLULAS T REGULADORAS.....	21
3.7. SISTEMAS DE EDICIÓN GENÉTICA EN EUCARIOTAS.....	23
3.7.1 SISTEMA CRISPR/Cas.....	24

3.7.1.1 SISTEMA CRISPR dCas9 Y EDICIÓN EPIGENÉTICA.....	25
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>28</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
7.1. LINEAS CELULARES Y CEPAS BACTERIANAS.....	29
7.1.1 LINEAS CELULARES.....	29
7.1.2 CEPAS BACTERIANAS.....	29
7.2. BUFFER Y MEDIOS DE CULTIVO.....	29
7.3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....	30
7.4. ENZIMAS Y FLUOROCROMOS.....	30
7.5. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	31
7.6. KITS COMERCIALES.....	31
7.7. EQUIPOS.....	32
7.8. SOFTWARE, BASES DE DATOS Y HERRAMIENTAS ONLINE.....	32
7.9. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	32
7.9.1 DISEÑO DE ARN GUÍA DIRIGIDA A LA DESMETILACIÓN DEL TSDR DEL GEN FOXP3 HUMANO.....	32
7.9.2 SÍNTESIS Y ALINEAMIENTO DE ARN GUÍA.....	33
7.9.3 CLONACIÓN DE LA GUÍA DE ARN EN EL PLÁSMIDO pSpCas9(BB)-2A- GFP.....	33
7.9.4 CLONACIÓN DEL CASSETTE pU6-sgRNA EN EL VECTOR pSpdCas9-huTET1CD- T2A-mCherry.....	35
7.9.5 CLONACIÓN DE EGFP EN EL VECTOR pSpdCas9-huTET1CD-T2A- mCherry.....	37

7.9.6 CLONACIÓN DEL $\Delta$ TET EN EL VECTOR pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP.....	39
7.9.7 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	41
7.9.8 PREPARACIÓN DE STOCKS DE GLICEROL.....	41
7.9.9 PCR DE COLONIA.....	42
7.9.10 DETERMINACIÓN FOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN/ADN.....	42
7.10. CULTIVO CELULAR.....	43
7.10.1 VIABILIDAD CELULAR.....	43
7.11. TRANSFECCIÓN.....	44
7.11.1 ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS T JURKAT.....	44
7.12. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	45
7.12.1 TINCIÓN DE CITOMETRÍA.....	46
7.13. CELL SORTING.....	46
7.14. EXTRACCIÓN DE ARN/ADN.....	46
7.15. CONVERSIÓN A ADNc.....	47
7.16. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT qPCR).....	48
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
8.1. VALIDACIÓN DEL DISEÑO DE LA GUÍA DE ARN.....	50
8.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	51
8.3. CLONACIÓN DE VECTORES.....	52
8.3.1 CLONACIÓN DE LA sgRNA EN pSpCas9(BB)-2A-GFP.....	52
8.3.2 CLONACIÓN DE pU6-sgRNA EN pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry.....	52
8.3.3 CLONACIÓN DE EGFP EN pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry.....	53
8.3.4 CLONACIÓN DEL $\Delta$ TET EN PSPDCAS9-HUTET1CD-T2A-EGFP.....	53

8.4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN ADN.....	54
8.5. DURACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE EGFP EN CÉLULAS TRANSFECTADAS.....	57
8.6. CELL SORTING.....	59
8.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS T JURKAT TRANSFECTADAS.....	60
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>10. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>68</b>

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 SISTEMA INMUNE**

##### **3.1.1 SISTEMA INMUNE INNATO Y ADAPTATIVO**

Nuestro organismo posee un sistema inmunitario constituido por un conjunto de células y moléculas que tienen como objetivo la defensa contra microorganismos infecciosos: virus, bacterias y arqueas, hongos y organismos unicelulares y multicelulares denominados parásitos, así como sustancias extrañas no infecciosas. Esto lo hace a través de dos tipos de inmunidad: inmunidad innata y adaptativa (Abbas, 2014).

El Sistema Inmune Innato (SII), es la primera línea de defensa contra elementos extraños, aunque posee una especificidad limitada. Sus componentes incluyen barreras físicas y químicas, macrófagos, células naturales killer (NK), citocinas, sistema del complemento y receptores tipo Toll (Toche, 2012). Por otra parte, el Sistema Inmune Adaptativo (SIA) se caracteriza por ser específico para distintas moléculas, generando una respuesta dirigida contra esos elementos, principalmente a través de linfocitos B y T que se activan frente a los antígenos (Toche, 2012). Además, participan un grupo de proteínas denominadas citocinas, las cuales regulan y coordinan muchas actividades de las células, en las inmunidades innata y adaptativa (Abbas, 2014).

#### **3.2 INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL**

Los linfocitos B y T, van a actuar dependiendo de la respuesta inmunitaria que se ha generado; existen dos respuestas inmunitarias adaptativas, *inmunidad humoral* e *inmunidad celular*. La inmunidad humoral, se encarga de eliminar microbios extracelulares, a través de macromoléculas como anticuerpos o inmunoglobulinas, que son secretados por los linfocitos B. Los anticuerpos poseen una región constante (Fc) que determina su clase (G, A, M, D y E) y funciones biológicas

y una región variable (Fab) de unión al antígeno (Toche, 2012). Los anticuerpos tienen la capacidad de unirse al antígeno mediante una región específica, y promover la fagocitosis, mucho antes que se produzca la infección (Abbas, 2014).

La inmunidad celular, mediada por linfocitos T es crucial para defensa contra microorganismos intracelulares, promoviendo la destrucción de estos en fagocitos o eliminando células infectadas (Toche, 2012). Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones: linfocitos T CD4+, que colaboran en la respuesta inmunológica, mediante la secreción de citocinas proinflamatorias, como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-6, IL-17 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), así como anti inflamatorias, como: IL-9, IL-4 e IL-10 (Parra-Ortega, *et al.* 2019). Por otra parte, los linfocitos T CD8+ producen citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y eliminan células infectadas o tumorales a través de moléculas como granzima B y perforina.

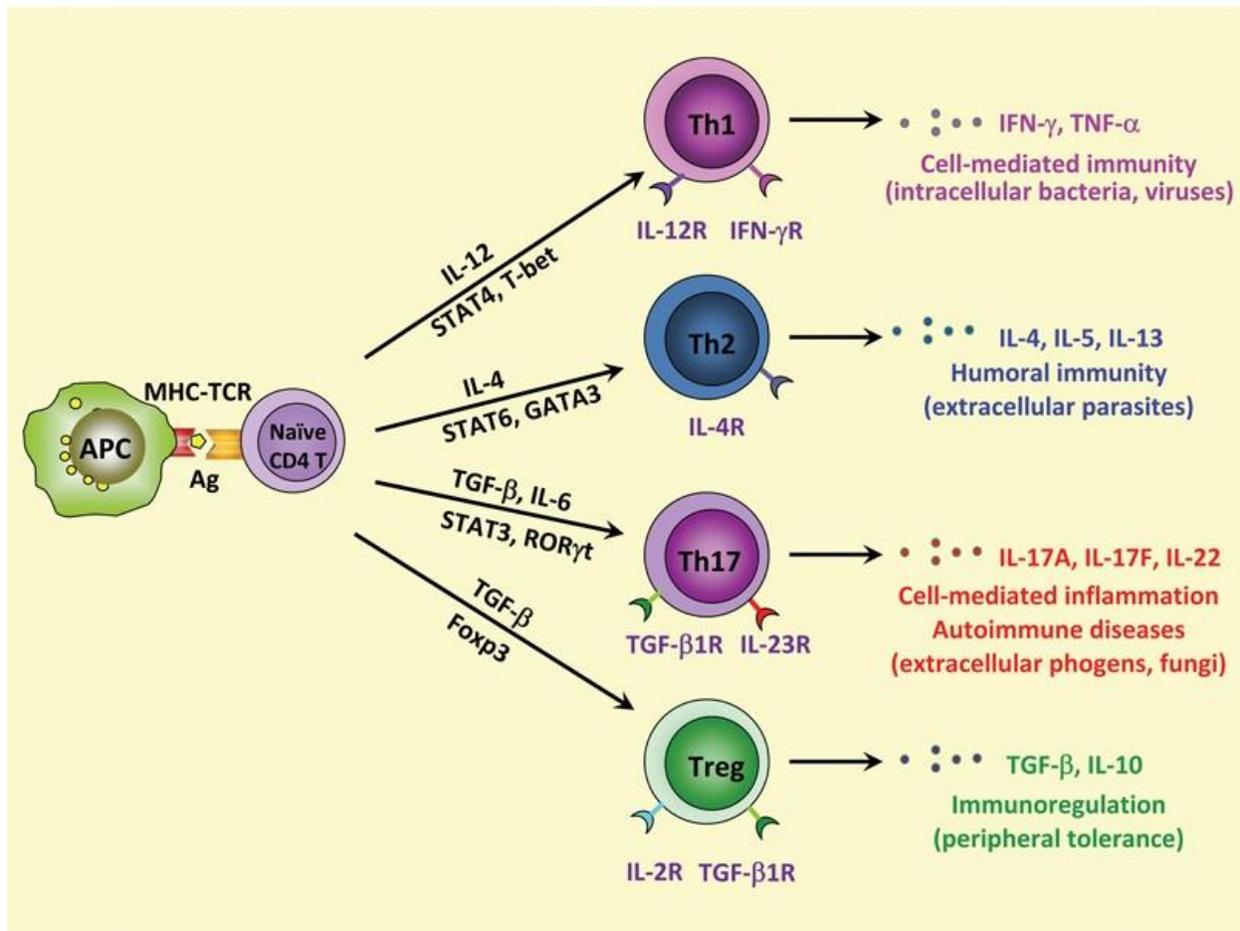
### **3.3 DIFERENCIACIÓN DEL LINAJE DE CÉLULAS T CD4+**

Los linfocitos T CD4+ también conocidos como células T CD4+ helper, contribuyen a la protección del huésped frente a distintas amenazas al provocar diferentes tipos de respuesta inmunológica. Estas células se dividen principalmente en los subtipos Th1, Th2, Th17 y en células T reguladoras (Treg) (Figura 1). La polarización de las células Th depende de la activación del receptor para antígeno del linfocito T (TCR) en células T CD4+ naïve, así como de la presencia de citocinas y otras señales coestimuladoras (Corripio-Miyar, *et al.*, 2022). Esto impulsa la activación de factores de transcripción clave, que a su vez regulan la expresión de marcadores de superficie específicos y citocinas efectoras asociadas con cada subconjunto Th (Lee, *et al.*, 2021).

Las células Th1 son importantes para la defensa contra patógenos intracelulares como bacterias, virus y protozoos (Zhu y Zhu, 2020). La diferenciación de estas células ocurre tras la activación

del factor de transcripción T-bet, así como de las proteínas STAT1 y STAT4, luego la estimulación con IFN- $\gamma$  e IL-12 (Saravia, *et al.*, 2019). Por otra parte, las células Th2 se encargan de combatir infecciones por parásitos como helmintos (Zhu y Zhu, 2020) gracias a la producción de IL-4, IL-5 e IL-13. La diferenciación de las células Th2 ocurre cuando IL-4 promueve la activación de STAT6 y GATA3 (Leung, *et al.*, 2010).

La eliminación de bacterias y hongos extracelulares produce una respuesta inmunitaria por parte de células Th17 mediante la producción de IL-17 e IL-22 (Zhu y Zhu, 2020). La diferenciación de estas células ocurre cuando IL-6 activa a STAT3 y, en combinación con TGF- $\beta$ , aumenta la expresión de los receptores del ácido retinoico ROR $\alpha$  y ROR $\gamma$ t. Además, la IL-23 resulta fundamental en el mantenimiento del linaje Th17 (Stritesky GL *et al.* 2008). Por otro lado, el TGF- $\beta$  promueve la expresión del factor de transcripción Foxp3 (Forkhead box P3), que en ausencia de IL-6, bloquea las actividades de ROR $\alpha$  y ROR $\gamma$ t y permite la diferenciación hacia células T reguladoras (Treg) (Leung, *et al.*, 2010).



**Figura 1. Diferenciación de células Th a partir de células T CD4+ naïve.** En presencia de IL-12, Th1 se diferencia mediante la activación de T-bet, STAT1 y STAT4, produciendo IFN- $\gamma$  para combatir patógenos intracelulares. Th2 se diferencia cuando IL-4 activa STAT6 y GATA3, importantes en la inmunidad humoral contra parásitos al producir IL-4, IL-5 e IL-13. Th17 se diferencia por la interacción de TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23, activando STAT3 y ROR $\gamma$ t, y protegiendo contra patógenos extracelulares al producir IL-17 e IL-22. TGF- $\beta$  también promueve la diferenciación en células Treg Foxp3+, que producen TGF- $\beta$  e IL-10, modulando respuestas inmunitarias. Imagen tomada de Leung et al. (2010).

### 3.4 CÉLULAS T REGULADORAS (Treg)

Las Treg son un subconjunto de linfocitos T CD4+ que se encarga de mantener la tolerancia inmunitaria y prevenir la autoinmunidad (Abbas, 2014). Estas células son capaces de suprimir una gran variedad de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos T CD4+ y CD8+, células presentadoras de antígenos (APCs), macrófagos y células NK (Siachoque, et al. 2011) a través de diferentes mecanismos. Desde la descripción de las células Treg, se le han atribuido características

que actúan sobre procesos inmunológicos en enfermedades autoinmunes, inflamatorias y oncológicas (Olgúin, *et al.*, 2020).

Existe una subpoblación de linfocitos T CD4+ reguladores que expresan en su superficie de manera constitutiva la molécula CD25, que es la cadena alfa del receptor de alta afinidad para IL-2, una citocina crítica para la activación y proliferación de los linfocitos T (Chávez-Sánchez, *et al.*, 2017). También se caracterizan por la expresión de Foxp3, dando como resultado el fenotipo Treg Foxp3+CD4+CD25+.

Foxp3 juega un papel importante en la diferenciación, el mantenimiento y la función de las Treg (Kanamori, *et al.*, 2016). Los ratones “scurfy” son una cepa mutante que se caracteriza por una deficiencia funcional completa de las células T reguladoras (Treg) debido a una mutación ligada al cromosoma X en el gen *FOXP3*. La deficiencia de Foxp3 en estos ratones produce signos de inflamación autoinmune con respuestas Th1, Th2 y Th17 exageradas, posteriormente mueren entre las 3ª y 4ª semanas de edad. Las mutaciones del gen *FOXP3* en humanos dan lugar a una amplia variedad de enfermedades clínicas con una regulación inmunitaria gravemente alterada. Se conoce como síndrome IPEX (Inmunodesregulación, Poliendocrinopatía, Enteropatía ligada al cromosoma X), debido a que Foxp3 se encuentra codificado en el cromosoma X (González-Parias, *et al.*, 2010).

### **3.4.1 TIPOS DE CÉLULAS T REGULADORAS**

Las células Treg se pueden clasificar de acuerdo con su origen de desarrollo. Existen células Treg que se generan en el timo (tTregs). También existen células Treg generadas extratímicamente en la periferia (pTregs). La periferia incluye órganos linfoides secundarios como: ganglios linfáticos,

bazo, placas de Peyer, así como tejidos asociados a mucosas. Finalmente existen Treg que pueden ser inducidas *in vitro* (iTregs) (Li y Rudensky, 2016).

#### **3.4.1.1 CÉLULAS T REGULADORAS TÍMICAS (tTreg)**

El desarrollo de los linfocitos T implica dos procesos clave: selección *positiva* y *negativa*. En la selección positiva, los timocitos interactúan con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II, lo que permite seleccionar aquellos linfocitos T que reconocen las moléculas del MHC propias, basado en la avidéz de su receptor TCR. En la selección negativa los timocitos migran hacia el centro del timo, una vez en la zona, los linfocitos T doble positivos son expuestos a la presentación de sus propios antígenos. Los linfocitos con alta afinidad por estos autoantígenos son eliminados por apoptosis. Una pequeña porción de estas células, no son eliminadas y sufren un proceso de diferenciación, dando lugar a las células T reguladoras (Chávez-Sánchez, 2017).

El desarrollo de las tTregs también requiere de algunas señales coestimuladoras y receptores de citocinas. Una señal coestimuladora crucial es la interacción de CD28 con CD80/CD86; ratones deficientes del CD28 o CD80/CD86 presentan una disminución en el número de células tTregs, así como en la expresión de Foxp3 (Klein, y Hsieh, 2019). La expresión de Foxp3 también puede ser favorecida, gracias a citocinas como IL-2 e IL-15. TGF- $\beta$  también contribuye en el desarrollo tímico de Tregs al promover la supervivencia de timocitos precursores de células tTregs y activando señales a través de su receptor para inducir la expresión de Foxp3 (Bettini y Vignali, 2010).

Las tTregs expresan Foxp3 de forma constitutiva y tienen un receptor de células T (TCR) de alta afinidad por los autoantígenos. Estas células predominan en el torrente sanguíneo y en los ganglios

linfáticos; y se encargan de promover la tolerancia a los autoantígenos (Shevyrev y Tereshchenko, 2020).

### **3.4.1.2 CÉLULAS T REGULADORAS PERIFÉRICAS (pTregs)**

La segunda ruta para la generación de Tregs es la diferenciación a partir de células T CD4+ naïve en la periferia tras una estimulación antigénica y una combinación de citocinas, como IL-2 y TGF- $\beta$ . Las células Treg Foxp3+ producidas de esta forma se denominan células Treg periféricas (pTreg) (Göschl, *et al.*, 2019). Mientras que, las células Treg generadas *in vitro* en presencia de TGF- $\beta$  se conocen como Treg inducidas (iTreg) (Shevach, *et al.*, 2014). Estas células se encuentran presentes en órganos particulares, incluyendo el intestino y la placenta materna (Kanamori, *et al.*, 2016).

La señalización de TGF- $\beta$  a través de su receptor, incluye la fosforilación y la posterior translocalización nuclear de los factores de transcripción Smad2 y Smad3 hacia el gen *FOXP3*, y en conjunto con otros factores, inducen su expresión. (Kanamori, *et al.*, 2016). Además de promover la expresión de Foxp3, TGF- $\beta$  también está relacionado con el número de células pTreg. Se ha demostrado que los ratones con deficiencia específica de Smad2 y Smad3 presentan células Treg normales en el timo, sin embargo, el número total de células Treg disminuye en la periferia (Takimoto, *et al.*, 2010).

Las células tTreg parecen mantener una alta estabilidad en la expresión de Foxp3. En cambio, la expresión de Foxp3 en las pTregs es de naturaleza transitoria y, bajo ciertas condiciones *in vivo*, como la inflamación crónica, pueden diferenciarse en células T efectoras (Shevyrev y Tereshchenko, 2020).

### **3.4.2 MECANISMOS DE SUPRESIÓN**

Las Treg cuentan con una serie de mecanismos que se encargan de mantener la homeostasis inmune (Figura 2). La función supresora de las Treg ocurre a través de mecanismos dependientes de contacto (modificando la función de células T efectoras, así como la maduración y función de las CD (células dendríticas), las cuales son necesarias para la activación de las primeras) y/o a través de mecanismos independientes del contacto (Schmidt y Krammer, 2012). Los mecanismos de acción utilizados por las Treg pueden actuar de cuatro formas diferentes: supresión mediante la modulación de la maduración o función de las células presentadoras del antígeno, supresión mediante la destrucción de las células diana, supresión mediante alteración metabólica y supresión por citocinas inhibitorias (Liberal, *et al.*, 2015).

#### **3.4.2.1 SUPRESIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DEL ANTÍGENO**

La expresión constitutiva de CTLA-4 en la superficie de Tregs da como resultado una regulación negativa y el secuestro de moléculas CD80 y CD86 en las APC (Figura 2) (Liberal *et al.*, 2015). Ambas son proteínas coestimuladoras de células T que se unen al CD28 expresado en células T para promover la activación de las células T (Hernández., 2013). La unión de CTLA-4 a CD80/CD86 también contribuye a la regulación positiva de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La IDO induce la producción quinureninas inmunosupresoras (KYN) (Sakaguchi, *et al.*, 2009). La quinurenina es el metabolito central de la vía metabólica encargada de la degradación del aminoácido esencial triptófano (TRP) (Morales-Puerto y Esther O'Shea, N, 2023).

El gen 3 de activación de linfocitos de la superficie celular (LAG-3, también conocido como CD223) también desempeña un papel importante en la interacción Treg-APC (Figura 2) (Sakaguchi, *et al.*, 2009). LAG-3 es una proteína transmembrana, que se expresa de manera transitoria en células T activadas y se expresa de manera más alta y persistente después de la

activación de Treg. Esta proteína se une de manera competitiva al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) con muy alta afinidad. Esto impide la maduración y la capacidad de las células dendríticas para activar las células T efectoras (Liang, *et al.*, 2008).

### **3.4.2.2 SUPRESIÓN MEDIANTE LA DESTRUCCIÓN DE LAS CÉLULAS DIANA**

Las granzimas son una familia de serina proteasas con actividad citotóxica (Aubert *et al.*, 2024), mientras que la perforina es una glicoproteína que forma poros en la membrana celular de células objetivo (Osińska, *et al.*, 2014). Durante mucho tiempo, se consideró que la citólisis mediada a través de la secreción de granzimas era un mecanismo exclusivo de las células NK y de los linfocitos T CD8+ (Vignalli, *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que, este mecanismo de supresión también es característico de algunas subpoblaciones de células Treg activadas, y son capaces de ir en contra de una variedad de objetivos, incluyendo las células T efectoras CD4+ y CD8+ (Figura 2) (Shevyrev y Tereshchenko, 2020). Las células Treg exhiben citotoxicidad a través de granzimas A y B, y de manera dependiente e independiente de perforina (Liberal, *et al.*, 2015).

La vía TRAIL/DR5 es otro mecanismo que induce la apoptosis en los linfocitos efectores, activando la caspasa-8 (Figura 2). Esto se logra a través de la interacción de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF), producido por Treg activadas, con la molécula DR5 (receptor de muerte 5), perteneciente a células efectoras CD4+ (Shevyrev y Tereshchenko, 2020).

Las Treg también pueden perjudicar la proliferación y función de las células B autorreactivas. Esto ocurre por medio de la unión del receptor de muerte programada-1 (PD-1) en células B autorreactivas y la expresión de los dos ligandos de PD-1 (PDL-1 y 2) en Treg (Xu, *et al.*, 2022).

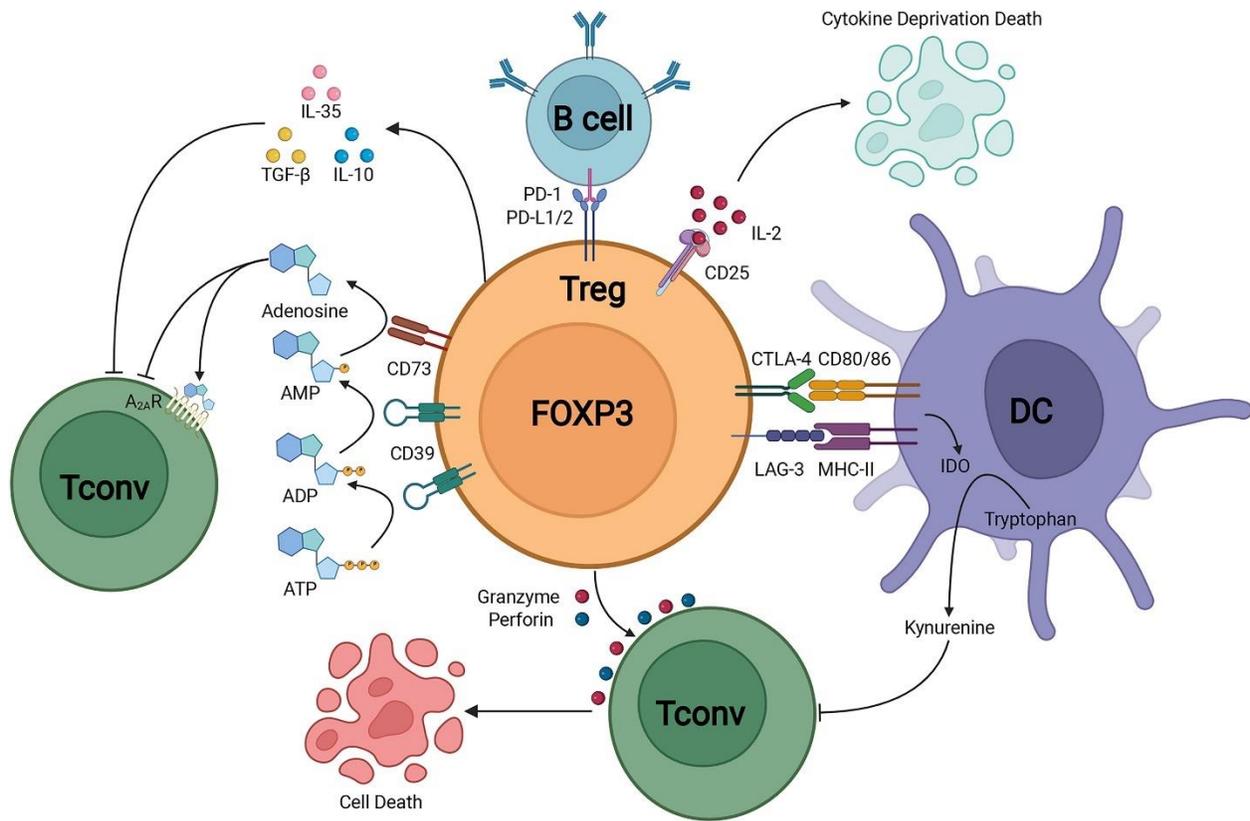
### **3.4.2.3 SUPRESIÓN MEDIANTE ALTERACIÓN METABÓLICA**

Las Treg tienen una alta afinidad por la interleucina-2 (IL-2), una citocina que es esencial para la función y la supervivencia de las Treg (Figura 2) (Harris, *et al.*, 2023). Esto ocurre gracias al receptor  $\alpha$  de esta interleucina IL-2R (CD25), que se encuentra en la superficie de Tregs. La alta expresión de IL-2R provoca una reducción en las concentraciones de IL-2 en el microambiente, dando como una menor respuesta proliferativa en linfocitos CD4+ y CD8+. Sin embargo, el mecanismo es menos significativo en linfocitos CD4+ debido a la diferencia en la sensibilidad a la IL-2 entre linfocitos CD4+ y CD8+ (Shevyrev y Tereshchenko, 2020).

Además, la coexpresión de enzimas ectópicas CD39 y CD73 por parte de las Tregs, catalizan la producción de ATP en adenosina (Figura 2). La adenosina suprime la función de las células T efectoras mediante la activación del receptor de adenosina 2A. (Liberal, *et al.*, 2015). La activación de este receptor también promueve la producción de TGF- $\beta$  mientras que disminuye la expresión de IL-6, favoreciendo la generación de Tregs (Xu *et al.*, 2022). También se ha documentado que la producción de adenosina altera la diferenciación de células dendríticas, afectando la efectividad de los linfocitos CD8+, induciendo un estado tolerogénico (Challier, *et al.*, 2013).

#### **3.4.2.4 SUPRESIÓN POR CITOCINAS INHIBIDORAS**

Participan las citocinas IL-10, IL-35 y TGF-  $\beta$  (Figura 2). Los efectos de supresión de estas citocinas, han sido descritos ampliamente (Dambuz, *et al.*, 2017). Pueden suprimir la activación y proliferación de linfocitos T y B efectoras; también pueden inducir directamente pTregs y Bregs. TGF- $\beta$  e IL-10 también inhiben la presentación de antígenos para estimular la generación de células dendríticas tolerogénicas, las cuales a su vez permiten la inducción de pTregs (Shevyrev y Tereshchenko, 2020).



**Figura 2. Mecanismos de supresión de las células Treg.** Las Treg pueden suprimir diferentes tipos de células a través de mecanismos dependientes o independientes de contacto. Estos incluyen la secreción de citocinas inhibitorias como IL-10, el TGF- $\beta$  y la IL-35, supresión de células presentadoras de antígeno mediada por CTLA-4 y LAG-3, citólisis de células diana de manera dependiente e independiente de perforina. Los mecanismos de supresión también incluyen la competencia por la IL-2 endógena, gracias al receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25), así como la producción de adenosina inmunosupresora por las ectoenzimas CD39 y CD73. Las Treg también inhiben la actividad de células B cuando ocurre la interacción PDL1/PD-1. Imagen tomada de Xu et al. (2022).

### 3.4.3 ESTABILIDAD DE CÉLULAS T REGULADORAS

En condiciones homeostáticas, las Treg son poblaciones de células T estables. Sin embargo, en entornos inflamatorios, algunas células Treg pueden producir citocinas proinflamatorias y adquirir un fenotipo similar al de las células T efectoras (plasticidad), o incluso perder la expresión de Foxp3 (inestabilidad). Estos cambios pueden desencadenarse en diversos entornos, incluidas las enfermedades autoinmunes, alérgicas e infecciosas (Piconesse, *et al.*, 2020). Estas células se denominan "exTreg" o "exFoxp3" (Saxena, *et al.*, 2021).

En 2019 Giovangiulio y colaboradores demostraron que las Treg de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) activa tienen un fenotipo similar al de Th1. Además, establecieron un modelo de colitis en ratones, en el que demostraron que la expresión de T-bet en Tregs es necesaria para el desarrollo de la enfermedad. Los ratones con Treg KO para T-bet presentaron una colitis más leve. Por otra parte, Pelly *et al.* (2017) demostraron en un modelo de ratón con alergia en las vías respiratorias inducida por helmintos intestinales (*Heligmosomoides polygyrus*) que las células Foxp3+ CD25 se convierten en células exTreg-Th2 de manera dependiente de IL-4. También se ha demostrado que un pequeño porcentaje de células Treg en modelos de ratón de esclerosis múltiple (EM) pierden la expresión de Foxp3 y se convierten en células T efectoras, produciendo citocinas proinflamatorias (IFN $\gamma$  e IL-17) y contribuyendo a la gravedad de la enfermedad (Piconesse, *et al.*, 2020).

### **3.5 MODIFICACIONES EPIGENETICAS EN EL ADN**

Actualmente el término epigenética se refiere a los cambios heredables en la estructura y organización del ADN que no involucran cambios en la secuencia de nucleótidos y que regulan la expresión génica. En eucariotas el ADN se encuentra empaquetado como cromatina en el núcleo, la cual se encuentra en dos formas: heterocromatina y eucromatina (García, *et al.*, 2012). La heterocromatina es una forma compacta y densamente empaquetada de cromatina, inaccesible para los factores de transcripción. Mientras que, la eucromatina es una forma menos compacta de cromatina y contiene genes que se transcriben activamente (Raya-Pérez, 2004).

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en 147 pb envueltos alrededor de un octámero de histonas. El núcleo de histonas en un nucleosoma está formado por dos histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Margueron y Reinberg, 2010). Las diferentes modificaciones en las histonas, que incluyen metilación en los residuos de lisina y arginina, acetilación en residuos de lisina,

ubiquitinación y sumoilación de lisinas, y fosforilación de serinas y treoninas; así como la metilación en el ADN, dirigen cambios en la condensación de la cromatina que regulan el ingreso la maquinaria transcripcional y por lo tanto la expresión génica (García, *et al.*, 2012).

### **3.5.1 METILACIÓN DEL ADN**

La metilación del ADN es un proceso epigenético que regula la expresión génica en mamíferos mediante el reclutamiento de proteínas implicadas en la represión génica o mediante la inhibición de la unión de factores de transcripción al ADN (Moore, *et al.*, 2013). Se considera que es un proceso bien conservado durante las divisiones celulares (García *et al.*, 2012). Además, participa en varios procesos como el desarrollo embrionario, la impronta génica y la inactivación del cromosoma X (Salozhin *et al.*, 2005). También se han descrito múltiples enfermedades, las cuales están asociadas a la alteración en los patrones de metilación del ADN, incluyendo cáncer, enfermedades del sistema nervioso y enfermedades cardiovasculares (Kandi y Vadakedath, 2015).

Este proceso epigenético implica la transferencia de un grupo metilo de la *S*-adenil metionina (SAM) al carbono 5 de la citosina, formando 5-metilcitosina (5mC) en dinucleótidos CpG, donde una citosina y una guanina están unidas. Estas modificaciones se concentran en regiones cortas de ADN, de aproximadamente 1000 pb con alta densidad de CpG, denominadas islas CpG (Salozhin, *et al.*, 2005). Las islas CpG están presentes en el 70% de las regiones promotoras en vertebrados (Goel, *et al.*, 2017). La metilación de citosinas impide la unión de factores de transcripción, que únicamente reconocen secuencias no metiladas. Además, pueden reclutar proteínas de unión a ADN metilado (MBD) que producen la compactación de la cromatina (Salozhin, *et al.*, 2005).

La metilación del ADN es catalizada por la familia de las metiltransferasas del ADN (DNMT) y se dividen en dos categorías: las DNMT *de novo*, DNMT3a y DNMT3b, establecen patrones de

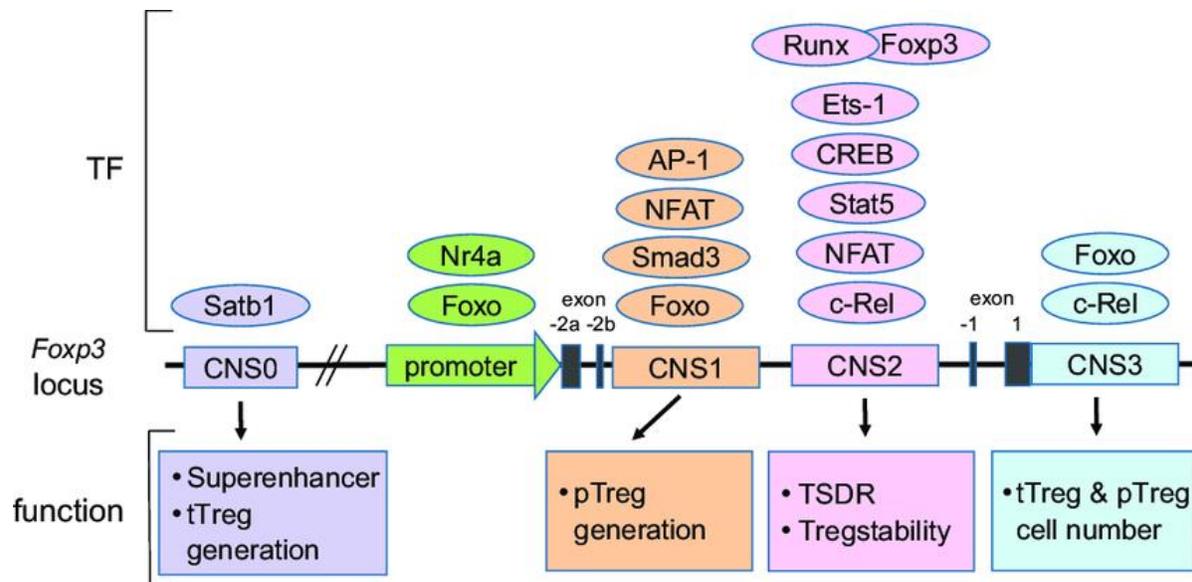
metilación iniciales en ADN no metilado (Morris y Monteggia, 2014); mientras que la DNMT *de mantenimiento*, DNMT1 recrea patrones de metilación ya establecidos en ADN durante la replicación celular (Neri, *et al.*, 2015).

### **3.5.2 DESMETILACIÓN DEL ADN Y ENZIMAS TET**

Las DNMTs juegan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la metilación del ADN, así como en la desmetilación pasiva del ADN. En este proceso, la ausencia o reducción de los niveles de DNMT, elimina gradualmente la metilación del ADN cuando las células se dividen. Por otra parte, la desmetilación activa del ADN implica una familia de enzimas de translocación diez-once (TET), que oxidan la 5-metilcitosina (5mC) a intermediarios como 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxicitosina (5caC). Estos intermediarios son luego eliminados por mecanismos de reparación del ADN, restaurando la citosina no metilada en ausencia de división celular (Bhutani, *et al.*, 2011).

### **3.6 REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE CÉLULAS T REGULADORAS**

La expresión estable de *Foxp3* depende en gran medida de la desmetilación de islas CpG en el segundo intrón del gen *FOXP3*, que también se conoce como secuencia conservada no codificante 2 (CNS2) o TSDR (región desmetilada específica de Treg) (Zhuo, *et al.*, 2013). La desmetilación de TSDR permite el reclutamiento de varios factores de transcripción, incluidos STAT5, NFAT, Runx1/Cbfb, CREB y el propio *Foxp3* (Figura 3) (Someya, *et al.*, 2017). Además de la región TSDR, el locus *Foxp3* está compuesto por un promotor y otros elementos regulatorios: CNS0, CNS1, CNS3, que participan en la activación inicial de *Foxp3*, su inducción en células periféricas y la mejora de la accesibilidad del promotor, respectivamente (Colamatteo, *et al.*, 2019).



**Figura 3. Regulación transcripcional del locus *Foxp3*.** Se muestran las regiones reguladoras del locus *Foxp3*, que incluyen el promotor CNS1, CNS2, CNS3 y el recientemente descubierto CNS0. Además, se muestran los factores de transcripción (TF) que se unen a cada región reguladora y la función de cada región reguladora. Imagen tomada de Lee y Lee. (2018).

En particular, la desmetilación extensiva de la región TSDR o CNS2 es un determinante esencial de la expresión constitutiva de *Foxp3* por las tTregs, también denominadas nTregs (células T reguladoras naturales). Por otro lado, las pTregs o iTregs, las cuales mantienen un TSDR altamente metilado, requieren de manera constante la suplementación con citocinas como IL-2 y TGF- $\beta$  para mantener la expresión de *Foxp3* (Figura 4) (Ohkura N. et al. 2013).



genética ha pasado por tres generaciones distintas. Inicialmente, se utilizaban endonucleasas programables, como las meganucleasas y las nucleasas de dedos de zinc (ZFN). La segunda generación consistió en nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) para mejorar la precisión. Actualmente se utiliza el sistema de repetición palindrómica corta agrupada y regularmente interespaciada (CRISPR), el cual ha sido un gran avance en la edición genética debido a su alta eficiencia y versatilidad en una amplia gama de aplicaciones (Li, *et al.*, 2024).

### **3.7.1 SISTEMA CRISPR/Cas**

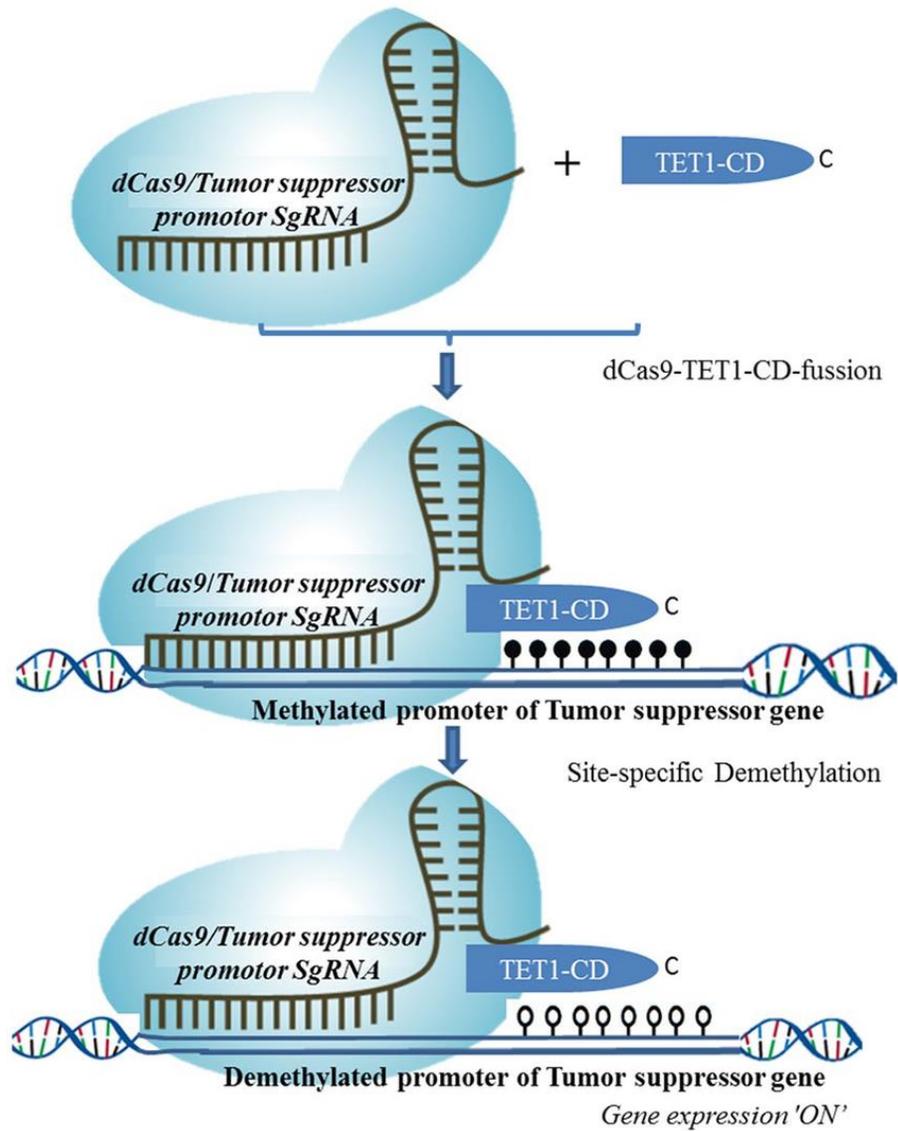
El sistema CRISPR pertenece a la inmunidad adaptativa de bacterias y arqueas, y se encarga de eliminar material genético extraño, como bacteriófagos. Se divide en dos clases principales (1 y 2) y seis tipos (I-VI) (Hillary y Ceasar, 2022). En el sistema de clase 1, se emplea una guía de ARN y varias proteínas efectoras (I, III y V). Por otro lado, el sistema de clase 2, solo necesita una endonucleasa efectora (Cas9) guiada por ARN (tipos II, V y VI). El sistema CRISPR/Cas9 pertenece a la categoría de tipo II (Cai, *et al.*, 2023) y es ampliamente utilizado para introducir mutaciones específicas, eliminar genes que causan enfermedades, realizar knock-ins de genes, cambiar los niveles de expresión génica, etc. (Bhattacharya y Satpati, 2022).

CRISPR/Cas9 se compone de la proteína Cas9 y un complejo crRNA:tracrRNA, que brinda estabilidad y especificidad al sistema, también conocido como ARN guía (sgRNA). El sgRNA se une a Cas9 para formar el complejo ribonucleoproteico (RNP), que reconoce aproximadamente 20 pares de bases en el genoma, la especificidad depende de la secuencia de sgRNA. Además, Cas9 reconoce el motivo adyacente al protoespaciador (PAM), una secuencia de tres nucleótidos (NGG) (Morán-Garay y Rojo-Arreola, 2023) y genera cortes de doble cadena a 3 pares de bases aguas arriba del PAM. (Hillary y Ceasar, 2022). Después se activan mecanismos de reparación del ADN, como la recombinación homóloga (HDR) para knock-ins o inserciones de secuencias específicas;

o la unión de extremos no homólogos (NHEJ) que da lugar a mutaciones inespecíficas que alteran o interrumpen el marco de lectura, para knock-outs o desactivación de los genes de interés (Bhattacharya y Satpati, 2022).

### **3.7.1.1 SISTEMA CRISPR dCas9 Y EDICIÓN EPIGENÉTICA**

La enzima Cas9 está compuesta por varios dominios, que incluyen el lóbulo de reconocimiento (REC I), el dominio REC II, la hélice puente rica en arginina, el dominio de interacción con PAM, y los dominios HNH y RuvC. Estos dos últimos dominios se encargan de producir las rupturas de doble cadena. Mientras que el dominio HNH escinde a la secuencia complementaria de 20 nucleótidos del ARN guía (sgRNA), el dominio RuvC escinde la cadena de ADN opuesta a la complementaria (Hillary y Ceasar, 2022). La mutación de ambos dominios provoca la pérdida de su actividad endonucleasa dentro del ADN. Sin embargo, Cas9, conserva su capacidad de unirse al ADN objetivo con la ayuda del sgRNA, esto da lugar a la proteína dCas9 (“dead” Cas9) (Cai, *et al.*, 2023). De esta manera, dCas9 puede fusionarse a dominios “efectores” de otras enzimas para silenciar o activar la expresión de genes específicos al realizar modificaciones epigenéticas como metilaciones y desmetilaciones respectivamente, en regiones de control de la expresión génica como promotores y “enhancers” (Liu XS *et al.* 2016). En particular, en el sistema CRISPR-TET1, dCas9 se fusiona con el dominio catalítico de la Tet metilcitosina dioxigenasa 1 (TET1-CD), para inducir la desmetilación de sitios específicos de un gen de interés, lo que lleva a la relajación de la cromatina necesaria para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y así inducir la expresión génica de manera constitutiva y heredable (Choudhury *et al.* 2016) (Figura 5).



**Figura 5. Desmetilación sitio-específica basada en dCas9-TET1-CD (CRISPR-TET1).** En este ejemplo, la dCas9 fusionada al dominio catalítico (CD) de la enzima TET1 (en azul oscuro) y la guía de ARN (sgRNA) dirigida al promotor hipermetilado de un gen supresor de tumores, es usada como herramienta para activar la expresión de dicho gen. Tomado de (Neja S. A. 2020).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

En años recientes, se han hecho múltiples esfuerzos para aprovechar el potencial terapéutico de las células Treg como tratamiento para enfermedades autoinmunes y asociadas a la inflamación, ya que no solo limitan la inflamación causada por distintas poblaciones inmunitarias, sino que además favorecen el proceso de reparación de los tejidos afectados por estos procesos (Nayer B. *et al.* 2024). Sin embargo, aspectos de su biología como su falta de estabilidad, diversidad fenotípica y funcional y bajo número en circulación, han limitado su aplicación más allá de modelos animales o ensayos clínicos pilotos. Es por este motivo que resulta crucial el desarrollo de estrategias que permitan la generación *in vitro* de células Treg con un fenotipo potente y estable, y que puedan expandirse *in vitro* en gran número sin pérdida de su capacidad supresora, para su potencial uso seguro y eficiente como inmunoterapias de transferencia adoptiva de células contra enfermedades de índole inflamatoria y autoinmune.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Generar linfocitos humanos con un fenotipo T regulador mediante la técnica CRISPR-TET1 dirigida a la desmetilación de la región TSDR del gen *FOXP3* en la línea celular Jurkat

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Diseñar una guía de ARN (sgTSDR) dirigida hacia la región TSDR del gen *FOXP3* humano y clonarla junto con el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP)
2. Analizar la eficiencia y viabilidad de las células transfectadas en función de la cantidad de ADN y el tiempo post-electroporación
3. Medir la expresión de ARNm de los marcadores FoxP3, IL-10, CTLA-4, PD1, TGF- $\beta$ , asociados con la función de Treg, en células desmetiladas a través de CRISPR Cas-9.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Líneas celulares y cepas bacterianas

#### 7.1.1. Líneas celulares

Para la transfección celular se utilizaron las cubetas de electroporación BTX Plus junto con el sistema de electroporación BTX ECM 630, así como células T Jurkat en suspensión. La línea celular T Jurkat es una línea celular T humana inmortalizada establecida a partir de la sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Yang, *et al.*, 2019). Estas células representan una ventaja ante cultivos primarios, ya que son capaces de evadir la senescencia y proliferar indefinidamente en cultivo, lo cual permite mantener un número suficiente de células para realizar experimentos moleculares de manera eficiente y económica (Osborne, *et al.*, 2022).

#### 7.1.2. Cepas bacterianas

En la clonación de vectores, se utilizó la cepa TOP10 de *Escherichia coli*, al igual que *Escherichia coli* químicamente competente en calcio.

### 7.2 Buffer y medios de cultivo

**Tabla 1: Buffer y medios**

<b>Buffer/Medio</b>	<b>Componentes</b>	
Stock de ampicilina (100 mg/mL)	5 mL 500 mg	Agua destilada Ampicilina
Medio LB sólido	20 g/L 10 g/L 10 g/L 5 g/L	Agar NaCl Tripona Extracto de levadura
Medio LB líquido	10 g/L 10 g/L 5 g/L	NaCl Tripona Extracto de levadura
Medio completo RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	Medio RPMI	
	10% 100 U/mL 100 mg/mL	Suero fetal bovino (FSC) Penicilina Estreptomicina

PBS	138 mM 3 mM 8.1 mM 1.5 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
FACS	PBS	
	0.5% 0.1%	Suero fetal bovino (SFB) NaN <sub>3</sub>
Cytomix	120 mM 0.15 mM 10 mM 25 mM 2 mM 5 mM	KCl CaCl <sub>2</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Hepes EDTA MgCl <sub>2</sub>
Buffer TRIS-borato-EDTA (TBE)	89 mM 89 mM 2.53 mM	Tris Ácido bórico EDTA

### 7.3 Plásmidos utilizados

**Tabla 2: Plásmidos**

Plásmidos	Origen	Tamaño (pb)
pSpCas9(BB)-2A-GFP (pSpCas9-EGFP)	#48138, Addgene, Watertown, MA, USA	9288
pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry (pSpdCas9-TET1-mCherry)	#129027, Addgene, Watertown, MA, USA	11,403
pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-mCherry (pSpdCas9-dTET-mCherry)	#129028, Addgene, Watertown, MA, USA	11,348

### 7.4 Enzimas y fluorocromos

**Tabla 3: Enzimas**

Enzimas	Origen
<i>BbsI</i>	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
<i>PvuII HF</i>	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
<i>XbaI</i>	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
<i>BamHI</i>	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
<i>HindIII</i>	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
Fosfatasa antártica	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
T4 DNA-Ligasa	New England Biolabs, MA, Estados Unidos
Taq DNA polimerasa	Ampliqon, Odense, Dinamarca

## 7.5 Oligonucleótidos

**Tabla 4: Primers utilizados para la generación de los plásmidos pSpdCas9-huTSDR TET1CD-T2A-EGFP y pSpdCas9-huTSDR dTET1CD-T2A-EGFP**

Primer	Secuencia	Origen
sg huTSDR fw	5'-caccGGGCTTCATCGACACCACGG-3'	T4 OLIGO, Guanajuato, México
sg huTSDR rev	5'-aaacCCGTGGTGTGCGATGAAGCCC-3'	T4 OLIGO, Guanajuato, México
hU6 fw	5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3'	T4 OLIGO, Guanajuato, México
TET1 fw	5'-CGTGTCCCCTTATGCTCTCA-3'	T4 OLIGO, Guanajuato, México
EGFP rev	5'-GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC-3'	T4 OLIGO, Guanajuato, México
dTET fw	5'-TGCTCATCCCTACAGGGC-3'	T4 OLIGO, Guanajuato, México

**Tabla 5: Primers utilizados para qRT-PCR**

Primer	Secuencia
Foxp3 fw	5'-ACCTTCCCAAATCCCAGTGC-3'
Foxp3 rev	5'-CATCCAGAAGATGGTCCGCC-3'
TGF- $\beta$ fw	5'-CGGCCTTTCCTGCTTCTCAT-3'
TGF- $\beta$ rev	5'-AGTTGGCATGGTAGCCCTTG-3'
CTLA-4 fw	5'-CCTGAACACCGCTCCCATAA-3'
CTLA-4 rev	5'-TCACACACAAAGCTGGCGAT-3'
PD-1 fw	5'-TCTGGGCGGTGCTACAAC-3'
PD-1 rev	5'-CGTTGTCCCCTTCGGTCAC-3'
STAT6 fw	5'-AGCCACTACAAGCCTGAACA-3'
STAT6 rev	5'-AATCAGGGGCCATTCCAAGG-3'
IFN $\gamma$	5'-ATCGTTTTGGGTCTCTTGGC-3'
IFN $\gamma$	5'-TTTTTCTGTCACTCTCCTTTCC-3'
ROR $\gamma$ t	5'-TCAGCTGTGAGCATGGAGGA-3'
ROR $\gamma$ t	5'-AGACGACTTGTCCCCACAGA-3'
18S fw	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
18S rev	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

## 7.6 Kits comerciales

**Tabla 6: Kits comerciales**

Kit	Origen
EasySC Plasmid Mini Purification Kit	ABP Biosciences, MD, Estados Unidos
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Alemania
Kit de extracción de gel rápida PureLink™	Thermo Fisher Scientific, Waltham,

	MA, Estados Unidos
All-In-One DNA/RNA/Protein Miniprep Kit	Bio Basic, ON, Canadá

## 7.7 Equipos

**Tabla 7: Equipos**

<b>Equipo</b>	<b>Origen</b>
Cámara de Neubauer (0.0025 mm <sup>2</sup> )	IsoLab, Alemania
Centrífuga	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos
Cell sorter BD FACSAria™ II	BD Biosciences, NJ, Estados Unidos
Citómetro de flujo Attune NxT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos
Incubadora CO <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos
Microcentrífuga	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos
Sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96	Bio-Rad, SF, Estados Unidos
Sistema Compacto de Electroforesis “GEL XL”	Biogen, MA, Estados Unidos
Termociclador T100	Bio-Rad, SF, Estados Unidos

## 7.8 Software, bases de datos y herramientas online

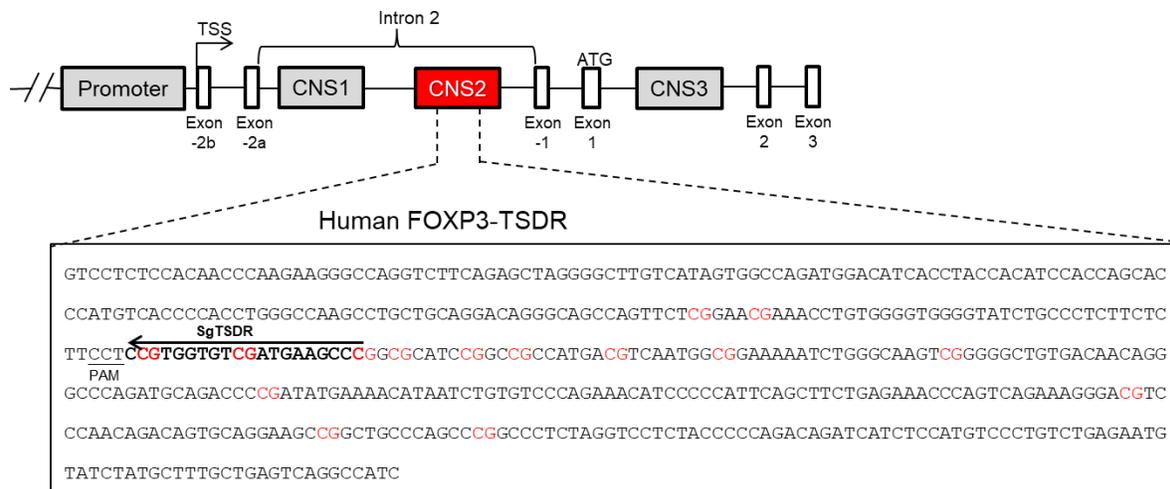
**Tabla 8: Software, bases de datos y herramientas online**

<b>Software/ bases de datos/ herramientas online</b>	<b>Origen</b>
Addgene	<a href="https://www.addgene.org/">https://www.addgene.org/</a>
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
NEBio Calculator	<a href="https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation">https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation</a>
Software FlowJo™ v10	BD Biosciences, OR, Estados Unidos
Software GraphPad Prism 8	GraphPad Software, MA, Estados Unidos
Software SnapGene®	Dotmatics, MA, Estados Unidos

## 7.9 Construcción de plásmidos

### 7.9.1 Diseño de ARN guía dirigida a la desmetilación del TSDR del gen *FOXP3* humano

El diseño de la guía de ARN se elaboró a partir de secuencia de la región intrónica CNS2, como se muestra en la Figura 6:



**Figura 6. Diseño del ARN guía dirigido hacia la desmetilación del TSDR humano.** En la parte de arriba se observa la segmentación del gen FOXP3 en regiones codificantes y no codificantes, haciendo énfasis en la región TSDR (CNS2) del gen humano FOXP3. Esta región está compuesta por varios pares de dinucleótidos CG. En medio de ella, se encuentra una flecha que va de izquierda a derecha, y representa una región blanco, a partir de la cual se elaborará la guía de ARN (sgTSDR). PAM: motivo adyacente protoespaciador, es una secuencia específicamente reconocida por dCas9 para su unión al ADN junto con el ARN guía.

### 7.9.2 Síntesis y alineamiento de ARN guía

El diseño de la guía de ARN se realizó con la ayuda de <https://www.benchling.com/crispr>. Una vez verificada, se sintetizaron los oligonucleótidos Forward (5'-caccGGGCTTCATCGACACCACGG-3') y Reverse (5'-aaacCCGTGGTGTGTCGATGAAGCCC-3'), los cuales conforman la guía de ARN. Cada oligonucleótido se diluyó en una concentración de 100 µM en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Después, se realizó la hibridación de oligos en presencia de ATP y de la enzima T4 polinucleótido cinasa para fosforilar los extremos 5' del oligo dúplex resultante. La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C y después durante 5 min a 95 °C. La incubación se completó con una rampa de descenso a 25°C a 5°C/min.

### 7.9.3 Clonación de la guía de ARN en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP

Los oligonucleótidos alineados fueron clonados dentro del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene: #48138) (Figura). Este plásmido contiene un sitio de clonación para ARN guía (gRNA scaffold), un cassette de resistencia a la ampicilina (AmpR) y codifica la proteína verde fluorescente (EGFP).

#### a) Digestión del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP con BbsI

Se inició con la digestión del plásmido base (pSpCas9 (BB)-2A-GFP) con la enzima BbSI. La mezcla de digestión fue incubada a 37 °C durante una hora. Posteriormente se verificó la digestión mediante una electroforesis den gel de agarosa al 0.8 %, y se cortó la banda de mayor tamaño, correspondiente al vector. Los reactivos utilizados para la digestión se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9: Digestión de pSpCas9(BB)-2A-GFP**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen/cantidad</b>
ADN (pSpCas9(BB)-2A-GFP)	1-2 µg
NEBuffer 10x	2 µL
<i>BbSI</i> (NEB)	1 µL
Agua libre de nucleasas	-
Total	20 µL

#### b) Ligación de la guía de ARN en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP

Una vez cortada la banda, se realizó la purificación de ADN del fragmento, con ayuda del kit MinElute Gel Extraction de QIAGEN y se continuó con la ligación del fragmento de ADN purificado con la guía de ARN. La reacción de ligación se hizo con 50 ng del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (digerido con BbSI) con un tamaño de 9266 pb y 2 µL del oligo dúplex de la guía de ARN (diluidos 1:200), con un tamaño de 20 pb. En la Tabla 10 se enumeran los reactivos utilizados para la ligación.

**Tabla 10: Ligación de sgRNA en pSpCas9(BB)-2A-GFP**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen/cantidad</b>
------------------	-------------------------

Inserto	2 $\mu$ L
Plásmido	50 ng
Buffer ligasa T4 (10x)	2 $\mu$ L
Ligasa T4	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	x $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

La reacción fue incubada a 16 °C toda la noche. Después se realizó la transformación bacteriana con células TOP 10 de *E. coli* (capítulo 7.9.7). Las colonias que crecieron en el medio LB sólido con ampicilina, fueron sometidas a una PCR de colonia para verificar que se haya realizado la clonación de manera exitosa (capítulo 7.9.9). Se utilizaron los oligonucleótidos Forward (5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3'), parte del promotor U6 y Reverse (5'-aaacCCGTGGTGTTCGATGAAGCCC-3'), parte de la guía de ARN. Se elaboraron minipreps y stocks de glicerol (capítulo 7.9.8) a partir de las colonias positivas.

De aquí en adelante, la incubación y la transformación bacteriana, así como la elaboración de minipreps y stocks de glicerol, se realizaron de la misma forma en las siguientes clonaciones.

#### 7.9.4 Clonación del cassette pU6-sgRNA en el vector pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry

La construcción de un plásmido con la capacidad de desmetilar de forma activa la región Foxp3-TSDR se logró a través de la clonación de la región pU6-sgRNA, en el vector pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry (Addgene #129027). Este plásmido contiene un sitio de restricción para pU6-sgRNA, un cassette de resistencia a la ampicilina (AmpR). Además, codifica dCas9, TET1 y mCherry.

#### **a) Digestión de pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry y pSpCas9(BB)-2A-GFP con PvuI-HF y XbaI**

Se realizó la digestión de los plásmidos pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry y pSpCas9(BB)-2A-GFP con las enzimas PvuI y XbaI. La mezcla de digestión fue incubada a 37 °C durante una hora y media. Después se verificó la digestión mediante una electroforesis den gel de agarosa al 0.8 %. Se cortó la banda de mayor tamaño, correspondiente al vector y la banda de menor tamaño, correspondiente al inserto.

**Tabla 11: Digestión de pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry y pSpCas9(BB)-2A-GFP**

Reactivos	Volumen/cantidad
ADN (pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry) (pSpCas9(BB)-2A-GFP)	1.5 µg
NEBuffer 10x	2 µL
<i>PvuI</i> -HF (NEB)	0.5 µL
<i>XbaI</i> (NEB)	1 µL
Agua libre de nucleasas	-
Total	20 µL

#### b) Ligación del cassette pU6-sgRNA en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry

Para este paso de ligación, se utilizó una proporción inserto-vector de 4:1, calculada con la ayuda de <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation> con la siguiente fórmula:

$$\text{masa requerida del inserto (g)} = \text{relación molar del inserto/vector deseado} \times \text{masa del vector (g)} \\ \times \text{relación del inserto a las longitudes del vector}$$

La reacción de ligación se hizo con 50 ng del plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry (digerido con PvuI y XbaI) con un tamaño de 9713 pb y 47 ng del fragmento pU6-sgRNA (digerido con PvuI y XbaI), con un tamaño de 1688 pb.

**Tabla 12: Ligación de pU6-sgRNA en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry**

Reactivos	Volumen/cantidad
Inserto	47 ng
Plásmido	50 ng
Buffer ligasa T4 (10x)	2 µL

Ligasa T4	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	x $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

Se llevó a cabo la incubación y la transformación bacteriana. En el ensayo de PCR de colonia, se utilizaron los oligonucleótidos Forward (5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3'), parte del promotor U6 y Reverse (5'-(5'-aaacCCGTGGTGTTCGATGAAGCCC-3'), parte de la guía de ARN, utilizados en la clonación anterior. Se elaboraron minipreps y stocks de glicerol.

#### 7.9.5 Clonación de EGFP en el vector pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry

La proteína verde fluorescente mejorada (o EGFP, por sus siglas en inglés, enhanced green fluorescent protein) fue clonada en el vector pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry, construido anteriormente. Esta clonación servirá para clasificar las células positivas para EGFP tras la transfección con los plásmidos pSpdCas9-huTET1CD y pSpdCas9-hudTET1CD.

#### **a) Digestión de pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry y pSpCas9(BB)-2A-GFP con EcoRI**

Los plásmidos pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry y pSpCas9(BB)-2A-GFP fueron digeridos con la enzima EcoRI. La mezcla de digestión fue incubada a 37 °C durante una hora y media. En los últimos 30 minutos de la reacción de digestión del plásmido que contiene mCherry, se añadieron 2.3  $\mu$ L de fosfatasa antártica y 1  $\mu$ L de buffer para fosfatasa. La reacción se inactivó calentándola a 80 °C durante 2 minutos. Posteriormente se verificó la digestión mediante una electroforesis den gel de agarosa al 0.8 %. Se cortó la banda de mayor tamaño, correspondiente al vector y la banda de menor tamaño, correspondiente al inserto.

**Tabla 13: Digestión de pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry y pSpCas9(BB)-2A-GFP**

Reactivos	Volumen/cantidad
ADN (pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry) (pSpCas9(BB)-2A-GFP)	1.5 $\mu$ g
NEBuffer 10x	2 $\mu$ L

<i>PvuI</i> -HF (NEB)	0.5 µL
<i>XbaI</i> (NEB)	1 µL
Buffer para fosfatasa	2.3 µL
Fosfatasa antártica	1 µL
Agua libre de nucleasas	-
Total	23.3 µL

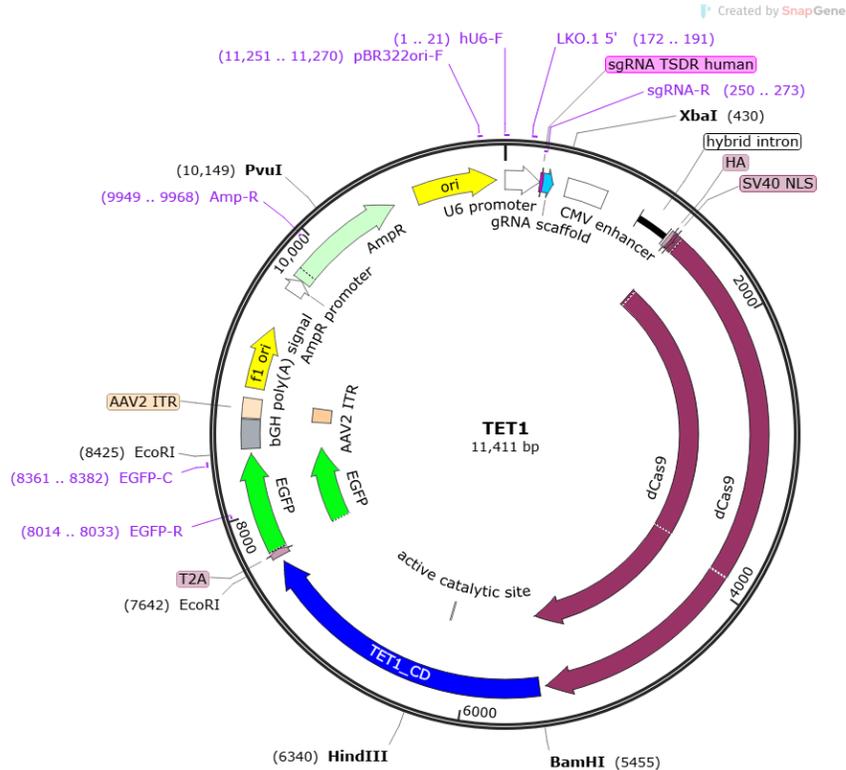
#### b) Ligación de EGFP en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry

Se utilizó una proporción inserto-vector de 5:1. La reacción de ligación se hizo con 50 ng del plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry (digerido con EcoRI) con un tamaño de 10624 pb y 19 ng del fragmento EGFP (digerido con Eco RI), con un tamaño de 783 pb.

**Tabla 14: Ligación de EGFP en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen/cantidad</b>
Inserto	19 ng
Plásmido	50 ng
Buffer ligasa T4 (10x)	2 µL
Ligasa T4	1 µL
Agua libre de nucleasas	x µL
Total	20 µL

Nuevamente, se llevó a cabo la incubación y la transformación bacteriana. En el ensayo de PCR de colonia, se utilizaron los oligonucleótidos Forward (5'-CGTGTCCCCTTATGCTCTCA-3'), parte de TET1 y Reverse (5'-GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC-3') parte de EGFP. Se elaboraron minipreps y stocks de glicerol. La construcción generada, pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP, se denominó TET1 (Figura 7).



**Figura 7. Plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP (TET1).** El mapa de la secuencia del plásmido muestra los elementos necesarios para realizar la electroporación en células Jurkat y producir desmetilación en la región TSDR-Foxp3: sgRNA, dCas9, TET1 y EGFP.

### 7.9.6 Clonación del dTET en el vector pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP

Una forma inactiva de la proteína TET1 (dTET) fue clonada en el vector pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP, construido anteriormente. Esta clonación sirvió para obtener un plásmido control, el cual no tiene la capacidad de desmetilar, y será utilizado al momento de evaluar la expresión de ARNm, junto con pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP.

#### a) Digestión de pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP y pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-mCherry

Se realizó la digestión de los plásmidos pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP y pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-mCherry con las enzimas HindIII y BamHI. La mezcla de digestión fue incubada a 37 °C durante una hora y media. Después se verificó la digestión mediante una

electroforesis den gel de agarosa al 0.8 %. Se cortó la banda de mayor tamaño, correspondiente al vector y la banda de menor tamaño, correspondiente al inserto.

**Tabla 15: Digestión de pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP y pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-mCherry**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen/cantidad</b>
ADN (pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP) (pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-mCherry)	2 µg
NEBuffer 10x	2 µL
<i>HindIII</i> (NEB)	1 µL
<i>BamHI</i> (NEB)	1 µL
Agua libre de nucleasas	-
Total	20 µL

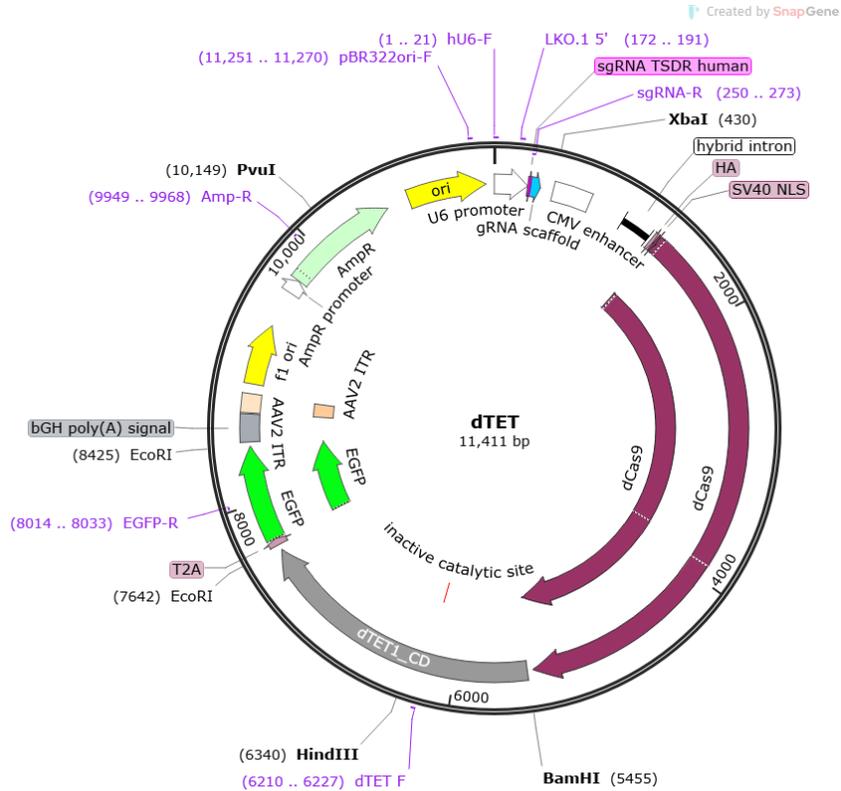
**b) Ligación de dTET en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP**

Se utilizó una proporción inserto-vector de 5:1. La reacción de ligación se hizo con 100 ng del plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP (digerido con BamHI y HindIII) con un tamaño de 10,522 pb y 25 ng del fragmento dTET (digerido con EcoRI), con un tamaño de 885 pb.

**Tabla 16: Ligación de dTET en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen/cantidad</b>
Inserto	19 ng
Plásmido	100 ng
Buffer ligasa T4 (10x)	2 µL
Ligasa T4	1 µL
Agua libre de nucleasas	x µL
Total	20 µL

Se realizó nuevamente la incubación y transformación bacteriana. Para el ensayo de PCR de colonia, se utilizaron los oligonucleótidos Forward (5'-TGCTCATCCCTACAGGGC-3'), parte de dTET, y Reverse (5'-GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC-3'), parte de EGFP. También se prepararon minipreps y se hicieron stocks de glicerol. La construcción generada, sin actividad catalítica de TET1, pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-EGFP, se denominó pdTET (Figura 8).



**Figura 8. Plásmido pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-EGFP (pdTET).** El mapa de la secuencia del plásmido muestra los elementos necesarios para realizar la electroporación en células Jurkat sin producir actividad desmetilasa: sgRNA, dCas9, dTET y EGFP.

### 7.9.7 Transformación bacteriana

Para la transformación se utilizaron bacterias químicamente competentes (*E. coli* TOP10) y se prepararon 400 µl de suspensión bacteriana en hielo. Para iniciar la reacción de ligación, se añadieron 10 µL de plásmido a las bacterias, y la mezcla se incubó durante 30 min. La transformación se realizó por choque térmico a 42°C durante 45 seg. Después la mezcla se incubó en hielo por dos minutos y se añadieron 600 µL de medio SOC sin antibiótico. Las bacterias se incubaron con agitación a 37 °C durante 30 min y se sembraron en placas de agar con ampicilina. Las placas de agar se incubaron toda la noche a 37 °C.

### 7.9.8 Preparación de stocks de glicerol

Las colonias positivas, se cultivaron en medio LB con ampicilina (100 mg/mL) en una proporción de 1:1000 durante 20 hrs. Posteriormente, las colonias cultivadas se almacenaron en tubos de criopreservación (Thermo Fisher Scientific), utilizando 250 µL de glicerol y 750 µL de bacterias que hayan crecido en el medio LB con ampicilina. Los tubos fueron almacenados a -80°C.

### 7.9.9 PCR de colonia

Se realizaron diferentes reacciones de PCR a partir de las colonias crecieron en medio LB sólido con ampicilina, con el fin de identificar aquellas colonias que contienen el plásmido de interés. Las muestras se prepararon con la siguiente master mix (Ampliqon). Se utilizó el termociclador T100 (Bio-Rad) para ejecutar el programa de temperatura para PCR por touchdown.

**Tabla 17: Master mix para reacción de PCR**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Taq 2x Master Mix	7.5 µL
10 µM fw	0.5 µL
10 µM rev	0.5 µL
ADN de colonia	1.5 µL
H <sub>2</sub> O	4.8 µL
Total	15 µL

**Tabla 18: Programa de temperatura para reacción de PCR por touchdown**

<b>Número de ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
4 ciclos (-1 °C)	95 °C	2'
	95 °C	20''
	63 °C	20''
	72 °C	30''
29 ciclos	95 °C	20''
	58 °C	20''
	72 °C	20''
1 ciclo	72 °C	5'

### 7.9.10 Determinación fotométrica de la concentración de ARN/ADN

La concentración de ácidos nucleicos se determinó al medir la absorción a una longitud de onda de 260 y 280 nm con un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher).

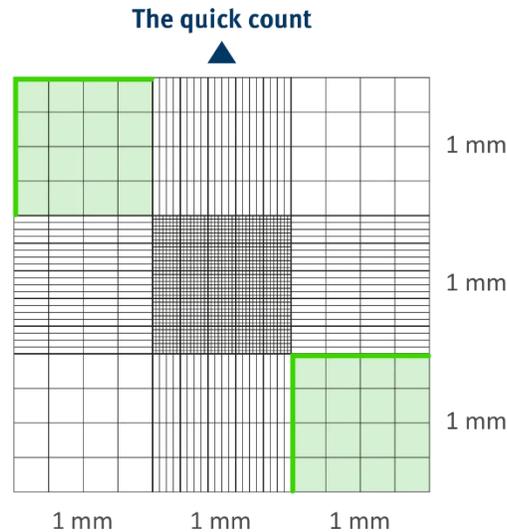
### ***7.10 Cultivo celular***

Las células T Jurkat se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de FCS, 100  $\mu$ M de piruvato de sodio, MEM aminoácidos no esenciales (100x) y 2-mercaptoetanol (1000x). Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora de aire humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 2-3 días, las células se pasaban dentro del mismo matraz T75 para cultivo celular. Los cultivos se realizaron bajo la campana estéril SMARTFLOW clase II (AIRTECH ANTECH). Para los experimentos de transfección, se sembraron  $7 \times 10^5$  células Jurkat en placas individuales para cultivo celular, tres días antes de la transfección, con el propósito de obtener alrededor de  $5 \times 10^6$  células al momento de realizar el ensayo.

#### **7.10.1 Viabilidad celular**

Se determinó mediante la prueba de exclusión de colorante. Las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el azul tripán, la eosina o el propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. En esta prueba se mezcló una suspensión celular (10  $\mu$ L) con un colorante, en este caso azul tripán (10  $\mu$ L) con 30  $\mu$ L de medio RPMI incompleto o PBS, manteniendo una proporción 1:5 de células. Es posible cambiar esta proporción, dependiendo si hay demasiadas o pocas células en el cultivo celular. Después se aplicó una gota de la mezcla de azul tripán y células en la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer es un portaobjetos que divide el espacio en dos cámaras de recuento, cada una cuenta con nueve cuadrantes, que a su vez se dividen en doce cuadrados por cuadrante (Figura 9). En el protocolo utilizado se hizo un “recuento rápido en el cual se toman en cuenta dos cuadrantes, y se utilizó la siguiente fórmula:

número de células/mL = promedio de células vivas de ambos cuadrados  $\times 10,000 \times$  factor de dilución



**Figura 9. Cuadrante representativo para el conteo en la cámara de Neubauer mejorado.** La cámara de Neubauer mejorado es un portaobjetos en forma de H que posee dos cámaras de recuento. Cada cámara es un cuadrado de  $3 \times 3$  mm, que se subdivide en nueve cuadrados de  $1 \times 1$  mm. A su vez cada cuadrado se divide a su vez en 16, 100 o 400 cuadrados más pequeños. El “conteo rápido” se realiza contando las células en dos cuadrados que están diagonalmente opuestos entre sí.

### 7.11 Transfección

La transfección es un proceso por el cual se introducen ácidos nucleicos exógenos en una célula eucariota para modificar la composición genética de la célula huésped. Estos ácidos nucleicos incluyen ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN) y pequeños ARN no codificantes (siRNA, shRNA y miRNA). Los métodos de transfección se clasifican en tres categorías principales: *a*) métodos biológicos (utilización de vectores virales), *b*) métodos químicos (lipofección, fusión de membrana, polímeros catiónicos y fosfato de calcio) y *c*) métodos físicos (microinyección y electroporación) (Chong, *et al.*, 2021).

#### 7.11.1 Electroporación de células T Jurkat

En el primer ensayo se utilizaron diferentes concentraciones (0, 5, 7.5 y 10  $\mu\text{g}$ ) del plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP en cuatro placas, cada una con  $5 \times 10^6$  células. Se evaluó la viabilidad celular post-electroporación a las 2 y 20 horas con una cámara de Neubauer. También se determinó el porcentaje de células positivas para EGFP y la intensidad media de fluorescencia mediante citometría de flujo a las 20 horas, utilizando Attune Nxt (Thermo Fisher). En el segundo ensayo se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de ADN en cuatro placas con  $5 \times 10^6$  células cada una. Cada placa corresponde a un tiempo diferente después de la electroporación (2, 24, 48 y 72 horas), en el cual se evaluó la viabilidad celular. Después, las células fueron fijadas con paraformaldehído para determinar el porcentaje de células positivas para EGFP y la intensidad media de fluorescencia.

Tres días antes del ensayo de electroporación se pusieron a crecer  $7 \times 10^5$  células en placas individuales con 4 mL de RPMI suplementado con un 10% de FCS y se preincubaron a  $37^\circ\text{C}$  con el fin de obtener  $5 \times 10^6$  células. Se realizó conteo en la cámara de Neubauer y se hizo el cálculo (mL) que corresponde a  $5 \times 10^6$  células. Las células T Jurkat se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en un volumen determinado ( $\mu\text{L}$ ) de Cytomix, sin exceder los 400  $\mu\text{L}$ . El pellet resuspendido se colocó en la cubeta de electroporación y se agregó la cantidad correspondiente de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), obteniendo un volumen final de 400  $\mu\text{L}$ . La cubeta se colocó en el sistema de electroporación BTX ECM 630. Se utilizaron las siguientes condiciones del equipo: 280V (LV), 1000  $\Omega$  y 950  $\mu\text{F}$ .

Por último, se realizó un ensayo de electroporación en dos placas, con  $5 \times 10^6$  células cada una, cada placa fue electroporada con 10  $\mu\text{g}$  de un plásmido diferente; en la primera se utilizó pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP (TET1) y en la segunda pSpdCas9-hudTET1CD-T2A-EGFP (pdTET). Tras 24 h de cultivo las células positivas para EGFP se clasificaron mediante FACS o Cell sorting.

### ***7.12 Citometría de flujo***

La citometría de flujo es un método analítico que permite medir de manera rápida y cuantitativa las características físicas y químicas de células individuales en suspensión. Las células se marcan con fluoróforos, que emiten fluorescencia al ser excitados por un láser. A medida que las células pasan por el citómetro, se mide la dispersión frontal de luz (FSC), que indica el tamaño de la célula, mientras que la dispersión lateral de luz (SSC) revela su complejidad interna o granularidad. Las señales de fluorescencia y dispersión se recolectan y se convierten en datos electrónicos para su análisis (Patiño y Velázquez, 2022). En este estudio se utilizó el citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Fisher) y los datos, fueron analizados con el software FlowJo™ v10 (BD Biosciences).

#### 7.12.1 Tinción de citometría

Las células fueron lavadas con RPMI sin suplementar y después se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Cada muestra se resuspendió en 50  $\mu$ L de PBS y 0.18  $\mu$ L del fluorocromo Zombie NIR (1:250). Después de incubar a 4°C en la oscuridad por 10 minutos, las células se lavaron con 900  $\mu$ L de 1x PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 400  $\mu$ L de FACS.

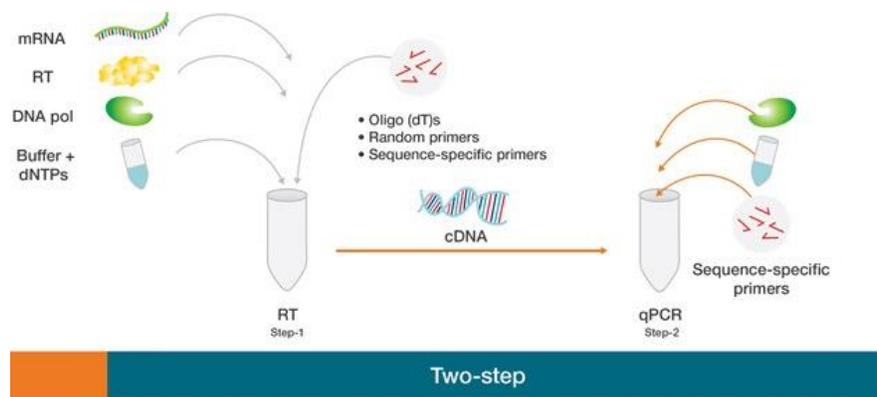
#### **7.13 Cell sorting**

Las células Jurkat transfectadas con pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP se clasificaron en medio RPMI utilizando el BD FACSAria™ II (BD Biosciences) 24 h después de la transfección. Los datos se visualizaron y analizaron con el software FlowJo™ v10 (BD Biosciences). En el cultivo post-sorting se utilizaron 50  $\mu$ M de vitamina C (un coactivador de la TET dioxigenasa).

#### **7.14 Extracción de ARN/ADN**

La extracción de ARN de células Jurkat aisladas por cell-sorting se realizó 72 horas después del ensayo de cell-sorting y 96 horas después de la electroporación. El kit All-In-One

DNA/RNA/Protein Miniprep Kit (Bio Basic) se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído fue transcrito en ADNc (ADN complementario) (capítulo 7.15). La columna de ARN se eluyó dos veces con 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsa, y se calentó a 50°C. Posteriormente se almacenó a -80°C. Para la cuantificación de la expresión de ARNm se siguió una estrategia de PCR cuantitativa con transcripción reversa en dos pasos (Bustin S. (ed) (2004)) (Figura 10)



**Figura 10. PCR cuantitativa con transcripción reversa en dos pasos.** Primero el ARN mensajero (ARNm) se convierte en ADN complementario (ADNc) mediante la transcriptasa inversa. En el segundo paso, el ADNc se amplifica mediante qPCR, se pueden utilizar diferentes tipos de oligonucleótidos como oligo(dT)s, aleatorios o específicos de secuencia. En el segundo paso (qPCR), el ADNc resultante se amplifica mediante PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos dirigidos a una secuencia específica. Tomado de Bustin S. (ed) (2004).

### 7.15 Conversión a ADNc (Transcripción reversa)

La síntesis de ADNc se sintetizó a partir del ARN extraído (capítulo 7.14) con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher). Se utilizaron 30-60 ng de ARNm para generar la primera cadena de ADNc mediante la hibridación del oligo (dT) (Tabla 19) La reacción se incubó por 5 min a 65 °C y después se colocó en hielo.

**Tabla 19: Master mix para la hibridación del oligo (dT)**

Reactivos	Volumen
ARN	22 ng
Primer oligo (dT)	1 $\mu\text{L}$
Agua libre de nucleasas	-
Total	12 $\mu\text{L}$

Posteriormente se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de Master Mix (Tabla 20) para la transcripción reversa.

**Tabla 20: Master mix para la transcripción reversa**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Buffer de reacción 5x	22 $\mu\text{L}$
Inhibidor de RNasa Ribolock	1 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ dNTP	2 $\mu\text{L}$
RevertAid M-MuLV RT	1 $\mu\text{L}$
Total	8 $\mu\text{L}$

Finalmente, la reacción se incubó durante 60 min a 42°C, luego durante 5 min a 70°C, y por último a 8°C en el Termociclador T100 (Bio-Rad) hasta su almacenamiento a -20°C.

#### **7.16 PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR)**

La RT-qPCR se llevó a cabo con 0.2  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido, 1  $\mu\text{L}$  de ADNc y 5  $\mu\text{L}$  de 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó el sistema CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) aplicando los siguientes parámetros: desnaturalización a 95 °C durante 5 min, luego de 42 ciclos en los cuales, las muestras se mantienen a 95 °C durante 15 s, después ocurre un descenso de la temperatura, esta cambiará dependiendo la  $T_a$  de cada oligonucleótido (Tabla 21) durante 20 s y las muestras se calientan nuevamente a 72 °C durante 20 s. La evaluación de la curva estándar y el umbral del ciclo se realizó con ayuda del software CFX Manager™ software (Bio-Rad).

**Tabla 21: Primers y Temperatura de anillamiento ( $T_a$ )**

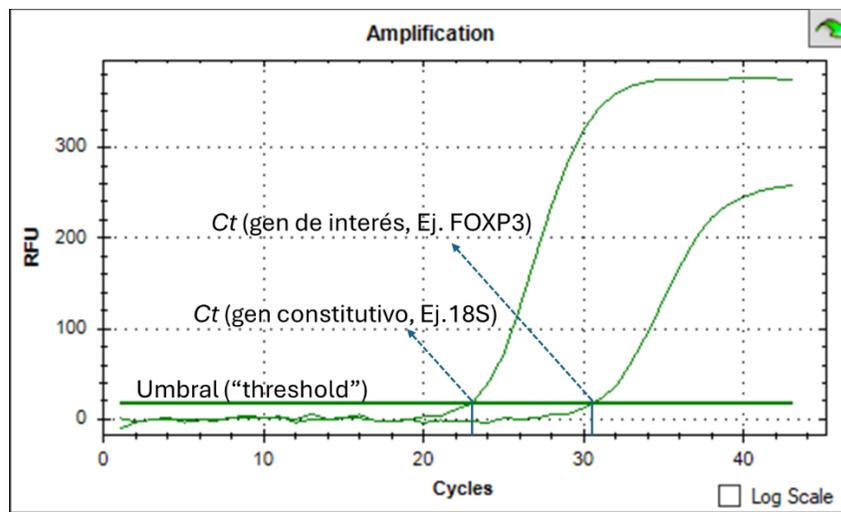
<b>Primers</b>	<b>Temperatura de anillamiento (<math>T_a</math>)</b>
Foxp3	60.0 °C
TGF- $\beta$	59.3 °C
CTLA-4	59.3 °C
PD-1	60 °C
STAT6	58.4 °C
IFN $\gamma$	59.1 °C

ROR $\gamma$ t	59.9 °C
18S	58.8 °C

Los valores de expresión de ARNm de los genes analizados se obtuvieron de acuerdo con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando 18S como gen constitutivo (Livak y Schmittgen, 2001). Primero, se calculó  $\Delta Ct$  para cada gen de interés normalizando contra 18S:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen de interés}) - Ct(\text{gen constitutivo: 18S})$$

En la Figura 11 se presentan las curvas de amplificación obtenidas mediante qPCR para el gen de interés (*FOXP3*) y el gen constitutivo (18S), donde la fluorescencia relativa (RFU) se grafica a partir del número de ciclos de amplificación. Se observa que el gen 18S sobrepasa el umbral antes que *Foxp3*, esto indica que 18S mantiene una expresión estable, por lo tanto, fue utilizado como control endógeno, permitiendo la normalización de datos.



**Figura 11.** Curvas de amplificación de qPCR para *FOXP3* y *18S*. El umbral de detección se establece en la fase exponencial de la amplificación.

Posteriormente, para comparar la expresión relativa entre muestras, los datos fueron normalizados como la fracción de la expresión promedio en el grupo control transfectado con pdTET, así que se calculó  $\Delta\Delta Ct$  restando el  $\Delta Ct$  del grupo control (pdTET) al  $\Delta Ct$  de cada muestra experimental:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ muestra} - \Delta CT \text{ promedio grupo control (pdTET)}$$

Finalmente, la expresión relativa se obtuvo aplicando la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Un valor  $>1$  indica sobreexpresión en la condición experimental (*TET1*), mientras que un valor  $<1$  indica represión en comparación con el control (*pdTET*).

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Validación del diseño de la guía de ARN**

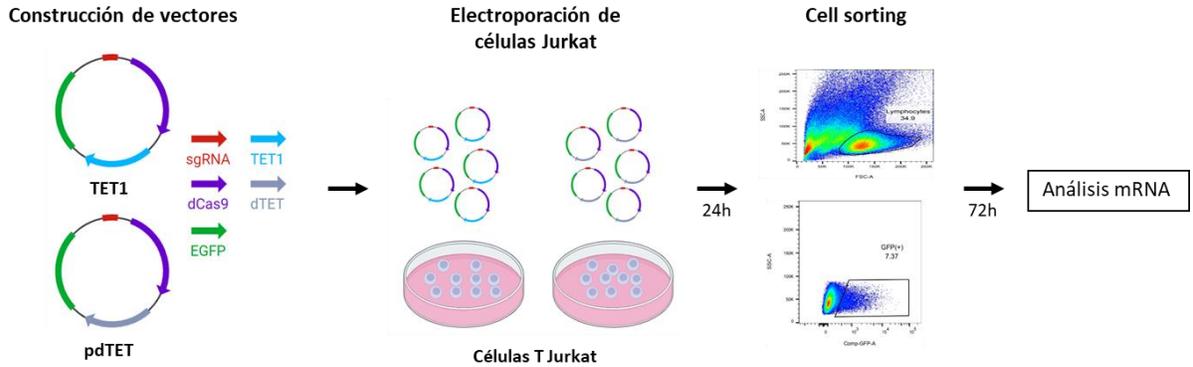
El diseño y verificación de la guía de ARN se llevó a cabo mediante el uso de <https://www.benchling.com/crispr>. La guía fue escogida con base en dos parámetros, los cuales se refieren a la especificidad de la guía de ARN para dirigir la enzima Cas9 al sitio genómico específico donde se espera que ocurra la modificación genética deseada. O sitios fuera del objetivo que pueden provocar modificaciones genéticas no deseadas. Los parámetros se conocen como on-target y off-target, respectivamente. Se obtuvieron 99 guías en total dentro de la región TSDR. Sin embargo, se decidió utilizar la guía GGGCTTCATCGACACCACGG, al ser la que obtuvo el mayor puntaje on-target (Figura 12).

Export ▾		Save	Assemble	1 selected	1-99 of 99		Prev	Next
<input type="checkbox"/>	Cut Position ^	Strand	Guide Sequence	PAM	On-Target Score	Off-Target Score		
<input checked="" type="checkbox"/>	193	-	GGGCTTCATCGACACCACGG	AGG	76.6*	47.4		
<input type="checkbox"/>	196	-	GCCGGGCTTCATCGACACCA	CGG	66.8*	45.7		
<input type="checkbox"/>	206	+	TCCGTGGTGTGATGAAGCC	CGG	55.8*	44.7		
<input type="checkbox"/>	213	-	TCATGGCGCCGGATGCGCC	GGG	45.2*	48.4		
<input type="checkbox"/>	214	-	GTCATGGCGCCGGATGCGC	CGG	30.3*	48.0		
<input type="checkbox"/>	215	+	TCGATGAAGCCCGGCATC	CGG	46.6*	48.6		
<input type="checkbox"/>	223	-	GCCATTGACGTCATGGCGGC	CGG	47.5*	47.2		
<input type="checkbox"/>	227	-	TTCCGCCATTGACGTCATGG	CGG	70.3*	46.5		

**Figura 12. Selección de guías de ARN para la región TSDR utilizando Blenching.** La guía de ARN seleccionada (indicada) muestra el mayor valor en el parámetro on-target (76.6) y un valor en off-target (47.4) similar al de otras guías de ARN, lo que sugiere una alta eficacia y especificidad para la región objetivo. También se muestran otras guías de ARN con sus respectivos valores en los parámetros on-target y off-target para comparación.

## 8.2 Estrategia experimental

Para desmetilar el locus FOXP3-TSDR, se construyó el plásmido pSgTSDR-SpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP, que incluye una sgRNA dirigida a la región TSDR del gen *FOXP3* humano y una dCas9 fusionada al dominio catalítico de TET1 para inducir desmetilación activa, junto con EGFP para evaluar su expresión en células electroporadas. También se construyó el plásmido pSgTSDR-SpdCas9-hudTET1CD-T2A-EGFP, con un dominio TET1 inactivo, que no produce desmetilación en ADNc. La PCR de colonia confirmó la correcta clonación de las construcciones plasmídicas. Se electroporaron células Jurkat con estos plásmidos y, 24 horas después, se seleccionaron células Jurkat EGFP+ para el análisis FACS y expresión de ARNm (Figura 13).

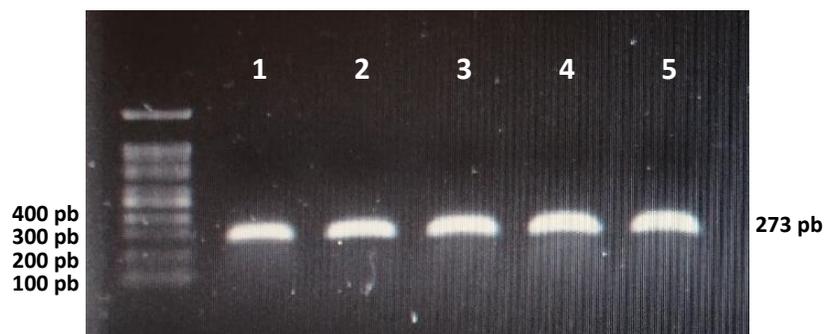


**Figura 13. Estrategia utilizada para la desmetilación activa de FOXP3-TSDR en células T Jurkat.** Se construyeron dos plásmidos, ambos contienen la sgRNA dirigida a la región TSDR, la enzima Cas9 desactivada y EGFP; uno de los plásmidos incluye el dominio catalítico de TET1, mientras que el otro contiene dTET. Después, se electroporaron células T Jurkat utilizando un plásmido diferente. El fluorocromo permitió clasificar las células transfectadas mediante FACS después de 24 horas. Las células fueron cultivadas nuevamente y, a las 72 horas, se realizó PCR en tiempo real para analizar la expresión de ARN de marcadores específicos de células Treg y Th.

### 8.3 Clonación de vectores

#### 8.3.1 Clonación de la sgRNA en pSpCas9(BB)-2A-GFP

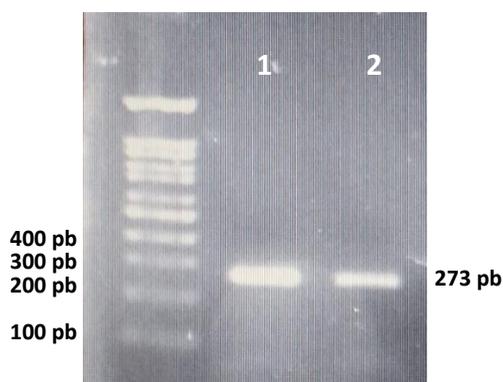
Una vez validada, la sgRNA se hibridó mediante un protocolo de temperatura, y después se clonó en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP utilizando el sitio de restricción *BbsI*. Se obtuvieron 5 colonias positivas que contenían el fragmento del promotor U6 y la guía de ARN, con un tamaño correspondiente de 273 pb (Figura 14).



**Figura 14. PCR de colonia con fragmentos U6 y sgRNA.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se observa el marcador de peso molecular y 5 colonias positivas para el amplicón que contiene el promotor U6 y la guía de ARN del TSDR humano.

#### 8.3.2 Clonación de pU6-sgRNA en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry

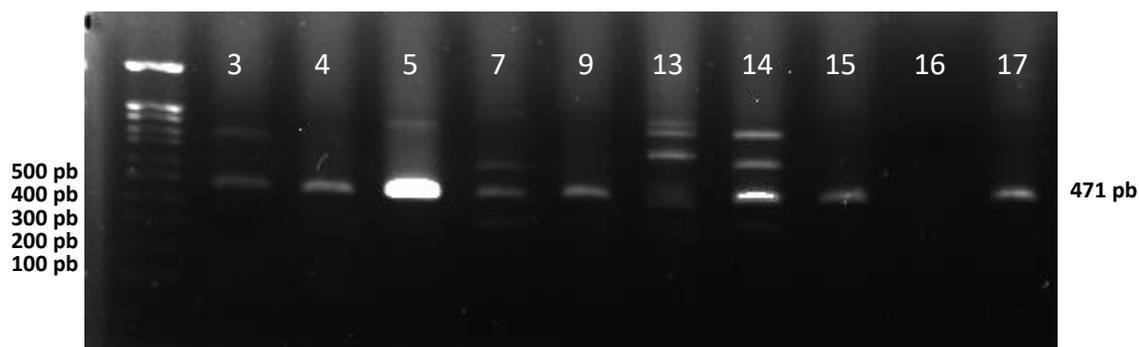
De las 5 colonias positivas, se seleccionó la colonia número 2, se extrajo un fragmento que contiene el promotor U6 y la guía de ARN, y se clonó en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry utilizando los sitios de restricción PvuI-HF y XbaI. Se amplificó el mismo fragmento de la clonación anterior y se obtuvieron 2 colonias positivas, con un tamaño de 273 pb (Figura 15).



**Figura 15. Segunda PCR de colonia con fragmentos U6 y sgRNA.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se observa el marcador de peso molecular y 2 colonias positivas para el amplicón que contiene el promotor U6 y la guía de ARN del TSDR humano.

### 8.3.3 Clonación de EGFP en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-mCherry

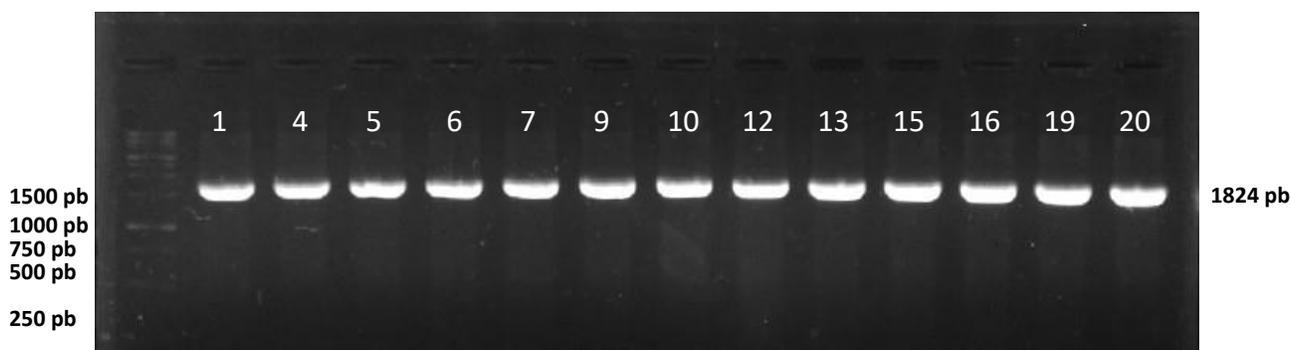
La proteína verde fluorescente (EGFP) proveniente de pSpCas9(BB)-2A-GFP fue clonada dentro de la colonia número 1 utilizando el sitio de restricción EcoRI. Al haber demasiadas colonias satélites, se seleccionaron 20 colonias y se volvieron a sembrar en una placa nueva, únicamente crecieron las colonias 3, 4, 5, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, las cuales resultaron positivas para el fragmento de TET1 y EGFP, con un tamaño correspondiente de 471 pb (Figura 16).



**Figura 16. PCR de colonia con fragmentos TET1 y EGFP.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se observa el marcador de peso molecular y 9 colonias positivas que amplifican fragmentos correspondientes a TET1 y EGFP.

#### 8.3.4 Clonación del dTET en pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP

Una forma inactiva de la proteína TET1 (dTET) proveniente de pSpdCas9-dTET-mCherry fue clonada dentro de la colonia número 5 utilizando los sitios de restricción BamHI y HindIII. Al haber demasiadas colonias satélites, se seleccionaron 13 colonias y se volvieron a sembrar en una placa nueva. Todas las colonias resultaron positivas para el fragmento de dTET y EGFP, con un tamaño correspondiente de 1824 pb (Figura 17).



**Figura 17. PCR de colonia con fragmentos dTET y EGFP.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se observa el marcador de peso molecular y 13 colonias positivas que amplifican fragmentos correspondientes a dTET y EGFP.

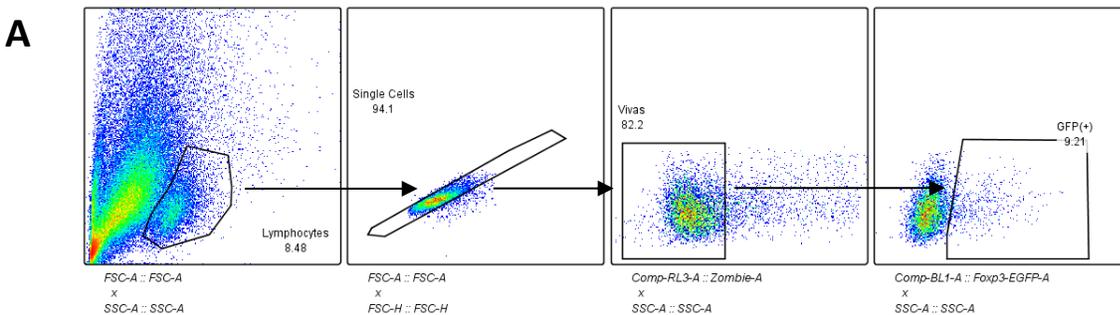
#### **8.4 Efecto de la concentración ADNc**

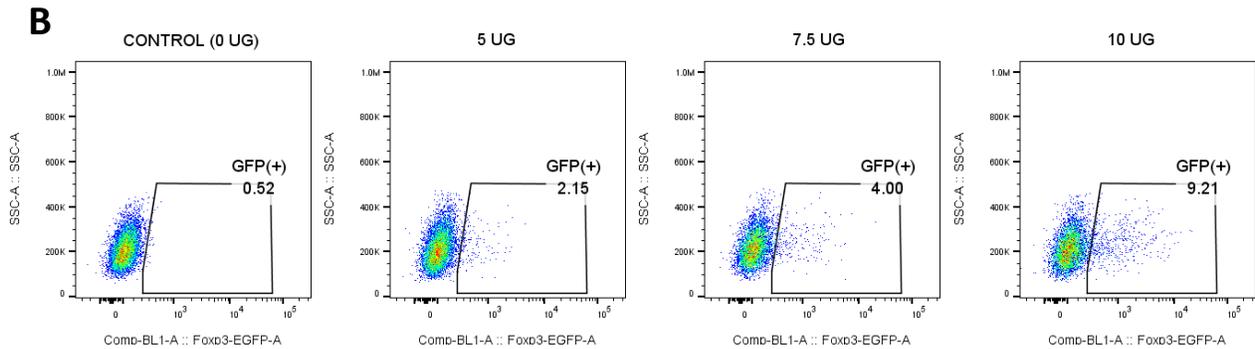
Se utilizaron cuatro placas, con  $5 \times 10^6$  de células cada una, y diferentes concentraciones (0, 5, 7.5 y 10  $\mu\text{g}$ ) del plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP. Se realizó citometría de flujo a las 20 horas post electroporación para evaluar el porcentaje de células positivas para EGFP y la intensidad media de fluorescencia (FMI). En la Figura 18 se muestra la estrategia de gating empleada y los plots de citometría de flujo representativos del porcentaje de células EGFP positivas en cada condición.

En el panel A se observa la estrategia de gating utilizada para identificar células positivas para EGFP. En el primer plot se seleccionaron células a partir de dos parámetros FSC-A (tamaño) y

SSC-A (granularidad). Los linfocitos suelen tener un nivel medio de FSC-A y un nivel bajo de SSC-A debido a que son células pequeñas y no son rugosas. En el segundo plot se seleccionaron eventos individuales, al comparar FSC-A contra el parámetro FSC-H (altura), el cual mide la altura máxima de la señal de dispersión de luz. Esta comparación permite evitar la selección de agregados de células, para analizar únicamente una población de células individuales. En el tercer plot se identificaron células vivas al comparar SSC-A con Zombie-Aqua, este último marcador de fluorescencia tiñe proteínas intracelulares de células que mueren. Por último, se seleccionaron células positivas a EGFP, al comparar SSC-A con este marcador de fluorescencia.

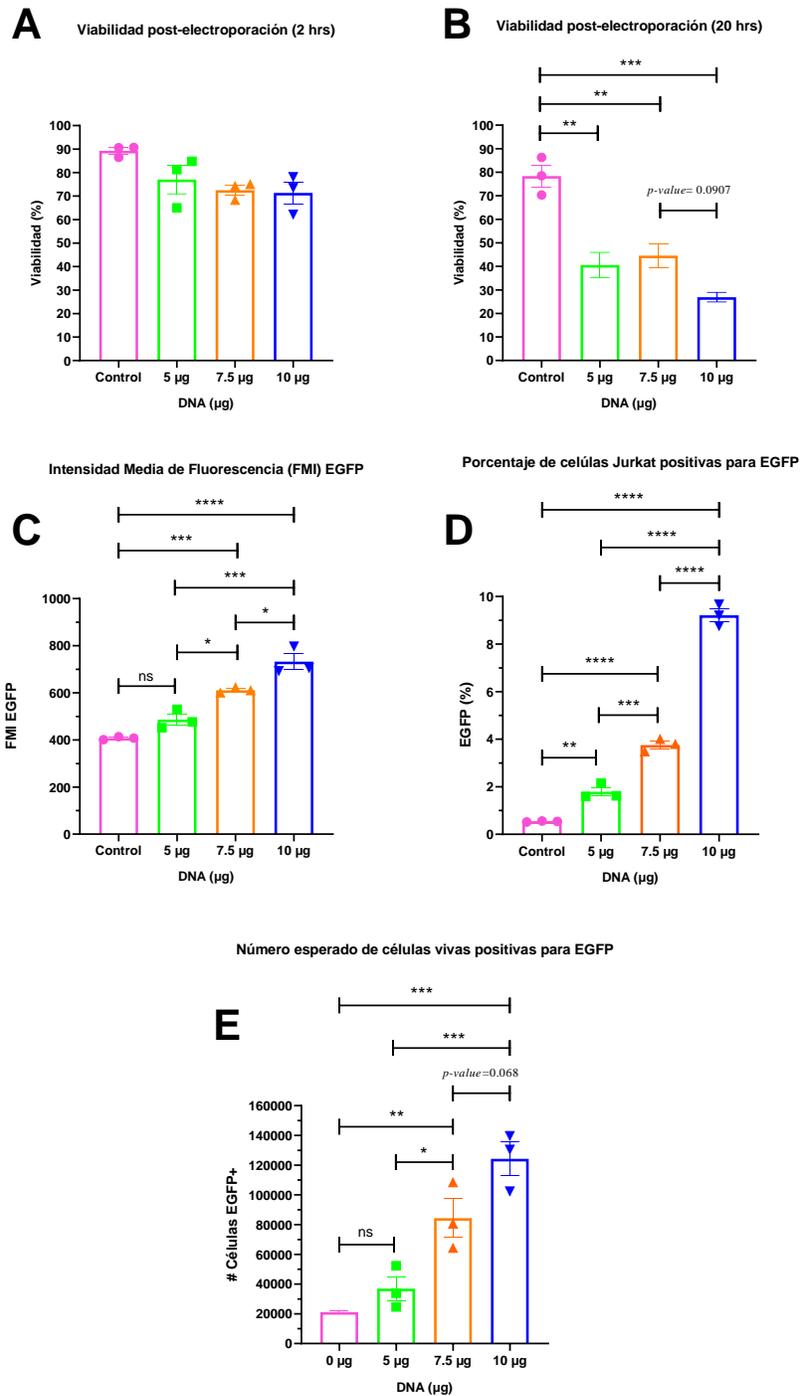
Una vez establecida la estrategia de gating, esta fue utilizada para identificar células EGFP en células transfectadas con diferentes cantidades ( $\mu\text{g}$ ) del plásmido (Panel B). Se puede observar que a medida que aumenta medida que aumenta la concentración de ADN utilizada para la transfección, se incrementa el porcentaje de células positivas para EGFP, debido a que se introducen más cantidad de plásmido dentro de las células Jurkat. Al utilizar 10  $\mu\text{g}$  del plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP, se obtuvo el mayor porcentaje de células positivas para EGFP (9.21%).





**Figura 18. Estrategia de gating y plots de citometría de flujo representativos de cada condición.** (A) Estrategia de gating utilizada. A partir de los linfocitos totales, se seleccionaron las single cells, seguidas de las células vivas, para finalmente identificar las células positivas para EGFP. (B) Plots representativos del porcentaje de células EGFP positivas para cada una de las concentraciones de ADN evaluadas (0, 5, 7.5 y 10  $\mu$ g).

Además de la citometría, se evaluó la viabilidad celular utilizando la cámara de Neubauer a las 2 y 20 horas post-electroporación. A las 2 horas, se observó una disminución de la viabilidad con el aumento de la concentración de ADN, aunque esta disminución no fue significativa. A las 20 horas, la viabilidad también disminuyó conforme aumentaba la concentración de ADN. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular, siendo 10  $\mu$ g la concentración que produjo la menor viabilidad. Los resultados también indican que, con 10  $\mu$ g de ADN, se obtuvo el mayor porcentaje de células positivas para EGFP y la mayor FMI. El cálculo del número esperado de células positivas para EGFP confirmó que 10  $\mu$ g de ADN resultó en el mayor número de células positivas (Figura 19).

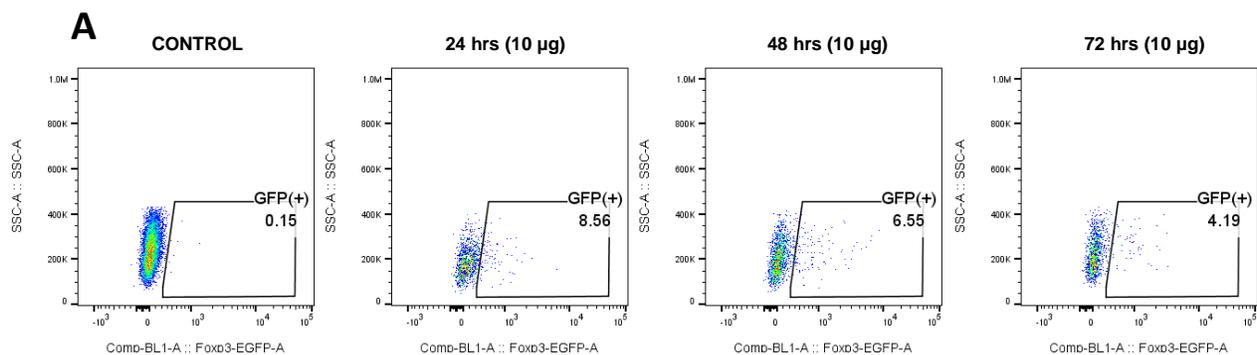


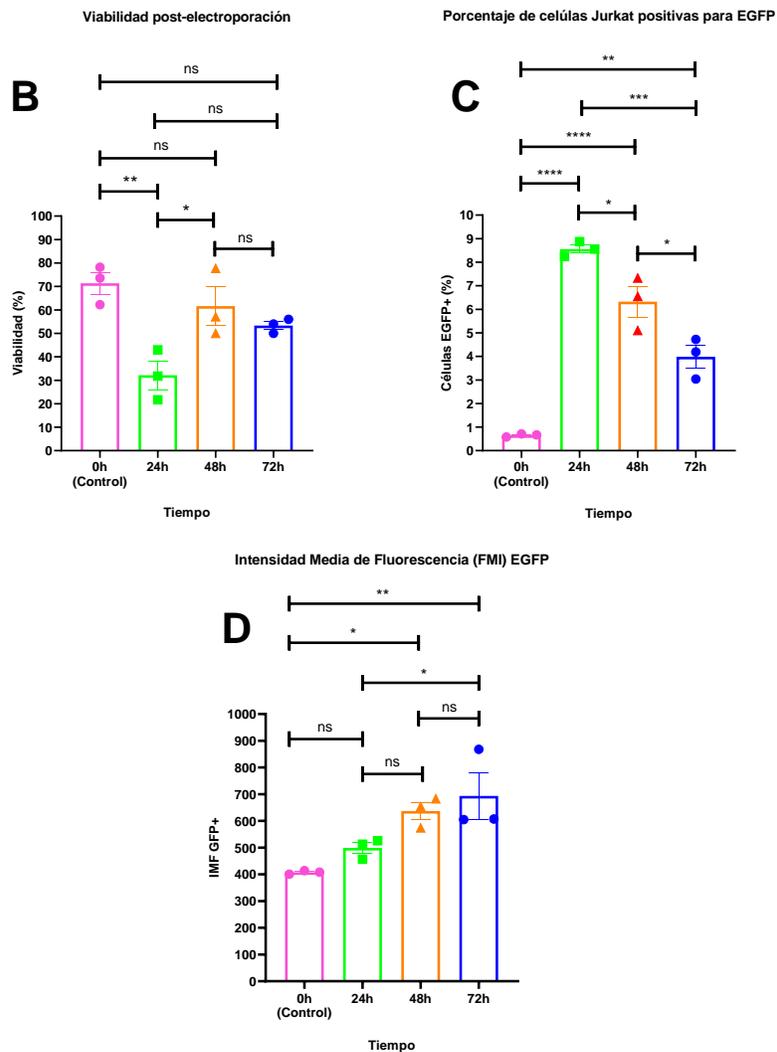
**Figura 19. Efectos de la electroporación con diferentes cantidades de ADN (0, 5, 7.5 y 10 µg).** Viabilidad celular post-electroporación a las A) 2 y B) 20 horas. C) Porcentaje de células positivas para EGFP. D) Intensidad media de fluorescencia (FMI) E) Número esperado de células vivas positivas para EGFP para electroporaciones con  $5 \times 10^6$  células iniciales. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 8.5 Duración de la expresión de EGFP en células transfectadas

Tras determinar que 10  $\mu\text{g}$  fue la mejor concentración de ADN, se realizó un segundo ensayo para evaluar la expresión de EGFP en células transfectadas. Se utilizó esta concentración de ADN para transfectar tres placas, cada una con  $5 \times 10^6$  de células, con el plásmido pSpdCas9-huTET1CD-T2A-EGFP, mientras que una placa, fue utilizada como grupo control y únicamente recibió el choque eléctrico. Después de la electroporación, se realizó citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células positivas para EGFP (Figura 20A) en diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 horas). El ensayo se realizó por triplicado y se elaboraron las gráficas correspondientes (Figura 20C). Se observa que, a las 24 horas, se alcanzó el mayor porcentaje de células positivas para EGFP, aunque este porcentaje disminuyó a las 48 y 72 h post-electroporación.

También se evaluó la MFI en los diferentes intervalos de tiempo, los valores de este parámetro aumentan hasta alcanzar su punto máximo a las 72 horas (Figura 20D). Por último, se evaluó la viabilidad celular con la cámara de Neubauer mejorada. Las gráficas obtenidas demuestran que la este parámetro disminuyó a las 24 horas; no obstante, se recuperó después de 48 horas, mostrando un aumento en la viabilidad, y manteniendo valores similares hasta las 72 horas (Figura 20B).





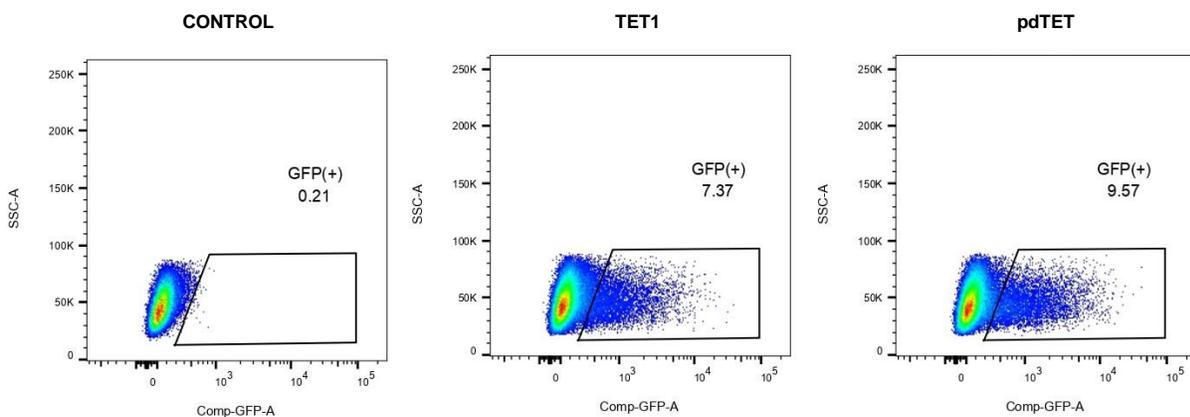
**Figura 20. Efectos de la electroporación a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h) utilizando 10 µg de ADN plasmídico.** A) Plots representativos del porcentaje de células EGFP positivas en diferentes días. B) Viabilidad celular post-electroporación. C) Porcentaje de células positivas para EGFP. D) Intensidad media de fluorescencia (MFI).

## 8.6 Cell sorting

Una vez que se estandarizaron las condiciones experimentales, se realizó un último ensayo de electroporación utilizando tres placas, cada una con  $5 \times 10^6$  de células. Una placa se utilizó como control, la cual incluye células que no se transfectaron con ningún plásmido, mientras que las otras dos placas se transfectaron con un plásmido diferente: pSpdCas9-TET1-EGFP (TET1) y pSpdCas9-dTET-EGFP (pdTET), respectivamente. Se realizó el ensayo de cell-sorting 24 horas

después, con el fin de aislar células positivas para EGFP y evaluar la expresión de ARNm posteriormente. Al ser positivas para este marcador de fluorescencia, las células deberían incluir el plásmido que expresa EGFP, así como la enzima dCas9 y TET1CD o dTET (Figura 21).

Se obtuvieron los siguientes plots de citometría de flujo del porcentaje de células positivas para EGFP al comparar la fluorescencia emitida (Comp-GFP-A) con la granularidad celular (SSC-A), utilizando diferentes plásmidos y un grupo control. Las células transfectadas con pdTET mostraron un mayor porcentaje de células EGFP (9.57%) en comparación con el grupo TET1 (7.37%) (Figura 19). Estos valores junto con el número de eventos que proporcionó el equipo, con 8,245 eventos en TET1 y 10,724 en pdTET, indican una aproximación en el número de células obtenidas a partir de un total de  $5 \times 10^6$  de células, las cuales serán cultivadas para evaluar la expresión de ARNm.

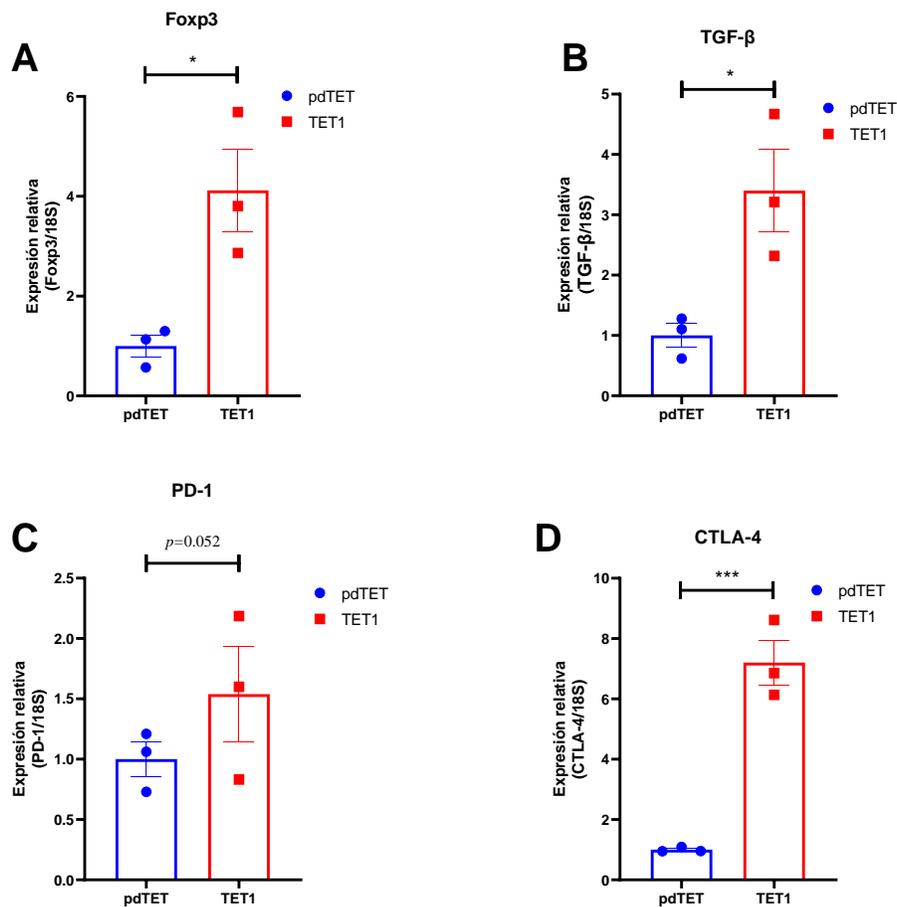


**Figura 21. Plots representativos del ensayo de cell-sorting.** Porcentaje de células positivas para EGFP utilizando A) un control vacío, así como los plásmidos B) TET1 y C) pdTET.

### 8.7 Análisis de la expresión de genes en células T Jurkat transfectadas

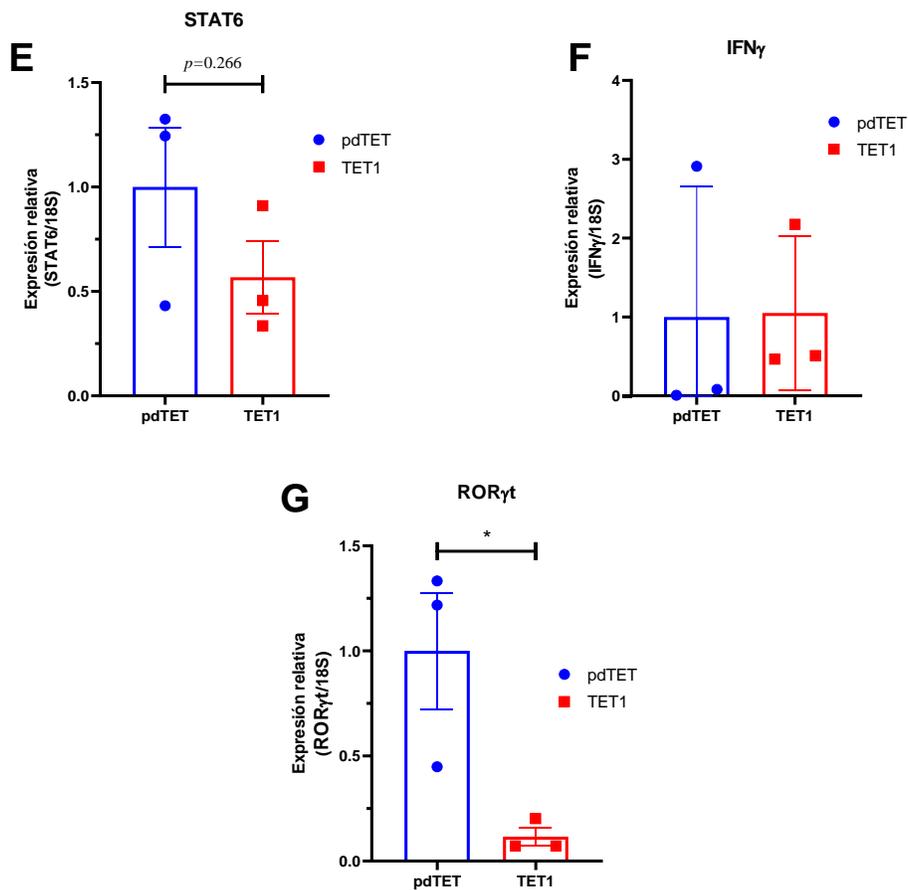
Una vez que se aislaron las células mediante FACS, se cultivaron durante 72 horas en presencia de vitamina C. Después se realizó la extracción de ARN y la conversión en ADNc. Finalmente se realizó RT-qPCR para evaluar genes asociados a Treg. Se observó un aumento de 3 veces en el ARNm de Foxp3 en células Jurkat transfectadas con TET1 en comparación con aquellas

transfectadas con pdTET. Por otra parte, los niveles de ARNm de TGF- $\beta$  mostraron un patrón similar, ya que se observó un aumento de aproximadamente 2.5 veces al transfectar con TET1. No se detectaron cambios significativos en los niveles de la expresión del ARNm de PD-1. Curiosamente las células Jurkat transfectadas con TET1 mostraron un aumento más notable en la expresión de ARNm de CTLA-4, alcanzando hasta 7 veces más, a diferencia de las células transfectadas con pdTET (Figura 22).



**Figura 22. Niveles de expresión de ARNm asociados a Treg.** Expresión de ARNm de genes asociados a Treg: A) Foxp3, B) PD-1, C) CTLA-4 D) TGF- $\beta$ . \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Para analizar si la desmetilación de la región TSDR mediada por dCas9-TET1 CD también afecta la expresión de genes asociados a otros linajes de células T auxiliares (Th) (Th1, Th2, Th17) se evaluó la expresión de ARNm de STAT6, IFN $\gamma$  y ROR $\gamma$ t después de la transfección. A pesar de que se observó una ligera disminución en la expresión de ARNm del regulador maestro de células Th2, STAT6 en células Jurkat transfectadas con TET1, no se registran diferencias significativas con respecto a las células transfectadas con pdTET. Los niveles de expresión de ARNm de la citocina IFN $\gamma$ , asociada a linfocitos Th1, tampoco se ven afectados entre ambos grupos. Por último, los niveles de ARNm del regulador de transcripción maestro de células Th17, ROR $\gamma$ t muestran una disminución significativa con valor de 1 en células Jurkat transfectadas con TET1 en comparación con las células transfectadas con pdTET (Figura 23).



**Figura 23. Niveles de expresión de ARNm asociados a Th.** Expresión de ARNm de genes asociados a Th2: E) STAT6, Th17: F) ROR $\gamma$ t y Th1: G) IFN  $\gamma$ . \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 9. DISCUSIÓN

Las células T reguladoras (Treg). se encargan de mantener la homeostasis inmunitaria al suprimir respuestas inmunitarias excesivas o inadecuadas contra una amplia gama de antígenos, incluyendo los antígenos propios (Lee y Lee, 2018). Foxp3 se considera el factor de transcripción maestro de las Treg, el cual participa en la diferenciación, el mantenimiento y la función de Treg. La deficiencia de Foxp3 provoca la falta de células Treg, lo que da como resultado múltiples enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Kanamori, *et al.*, 2016). La desmetilación en la región TSDR (CNS2) dentro del locus Foxp3 se ha considerado un elemento necesario para la diferenciación estable y la función supresora de Tregs (Wilk, *et al.*, 2022). Por lo tanto, este proyecto tuvo como objetivo desmetilar el TSDR de células Jurkat y evaluar su fenotipo hacia Treg.

Primero se diseñó una guía de ARN dirigida a la región TSDR del gen *FOXP3* humano, y después se clonó dentro del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP. Este plásmido no cuenta con los elementos necesarios para la desmetilación en la región TSDR, pero incluye los sitios de restricción PvuI y XbaI, que permiten digerir el fragmento hU6-sgRNA e insertarlo en el plásmido pSpdCas9-TET1-mCherry. Este plásmido permite la desmetilación activa del TSDR. Sin embargo, el marcador de fluorescencia mCherry fue sustituido por EGFP, debido a que el citómetro utilizado no contaba con un canal de detección para el espectro de emisión de mCherry (610 nm). Una vez construido el plásmido pSpdCas9-TET1-EGFP, se sustituyó la enzima TET1 por dTET para obtener el plásmido pSpdCas9-dTET-EGFP, el cual se utilizó como control en los ensayos de transfección en células Jurkat.

El ensayo sobre el efecto de la concentración de ADN en células Jurkat tras la electroporación con pSpdCas9-TET1-EGFP muestra que la viabilidad celular depende de la cantidad de plásmido utilizada, ya que la entrada de ADN plasmídico, mediada por endocitosis, puede desencadenar mecanismos de defensa celular, que inducen la muerte celular programada (Chopra, *et al.*, 2020). Sin embargo, se obtuvo un mayor porcentaje de células positivas para EGFP, ya que un aumento en la concentración de ADN, permite una mayor cantidad de plásmido en las células. El uso de hasta 10 µg de ADN fue posible gracias al protocolo de electroporación empleado, que supera la limitación de cantidad de ADN en la transfección mediada por lípidos. Como ocurre al utilizar TransIT<sup>®</sup>-Jurkat donde la cantidad máxima para  $2 \times 10^6$  de células es de 2.5 µg de ADN y para  $5 \times 10^6$  de células es de 6.25 µg de ADN (Arroyo-Olarte *et al.*, 2024).

Al determinar la viabilidad celular y la duración de EGFP en células transfectadas, así como la intensidad media de fluorescencia (MFI), se observó que la electroporación, así como el plásmido pSpdCas9-TET1-EGFP solo afectan la viabilidad celular después de 24 h post-electroporación. Además, la disminución en las células positivas para EGFP, sugiere que las células Jurkat van perdiendo el plásmido, debido a que se realizó es una transfección transitoria. Esta transfección se caracteriza por la pérdida del material genético a medida que las células se dividen, ya que el plásmido se mantiene de manera episomal (Chong, *et al.*, 2021). A pesar de esto, la MFI continuó aumentando. Esto podría deberse al promotor CBh, el cual combina el promotor temprano del citomegalovirus (CMV) y el promotor híbrido de CMV/ $\beta$ -actina de pollo (CBA) y proporciona una expresión robusta y constitutiva en una amplia gama de células de mamífero (Gray, *et al.*, 2011).

Se evaluó la expresión de marcadores típicos de Treg (Foxp3, CTLA-4, PD-1, TGF- $\beta$ ). El aumento en la expresión de Foxp3 al utilizar la herramienta dCas9 TET1CD coincidió con los resultados de Kressler, *et al.* (2021) confirmando que la desmetilación inducida de TSDR es suficiente para

aumentar la expresión de Foxp3 en células Jurkat. En este proyecto, también se obtuvo un aumento en la expresión de ARNm de CTLA-4, a diferencia del estudio de Kressler, donde no se registró un aumento en CTLA-4 ni CD25. Esta diferencia, puede ocurrir debido a que no se midió CTLA-4 por citometría de flujo. Es importante medir la expresión de los marcadores a nivel de transcrito y a nivel de proteína, ya que existen modificaciones post-traduccionales que pueden afectar la síntesis del péptido, lo cual no se detecta mediante RT-qPCR.

La edición epigenética del TSDR también favorece otros mecanismos de supresión de Treg. Esto se demuestra con el aumento en la expresión de ARNm de TGF- $\beta$ , un marcador de Treg importante para evitar la presentación de antígenos y para diferenciar las células hacia Treg en la periferia e *in vitro* (Shevach, *et al.*, 2014). Por otra parte, no se observó un aumento significativo en la expresión de PD-1. Esta falta de cambios significativos sugiere que no hubo un compromiso completo con el linaje Treg.

Las Treg que expresan niveles reducidos de Foxp3 provocan la aparición de un síndrome autoinmune grave, así como la pérdida del fenotipo, y la polarización hacia linfocitos T efectores (Wan y Flavell, *et al.*, 2007). Por lo tanto, se evaluó la expresión de ARNm de marcadores asociados a linfocitos Th (STAT6, ROR $\gamma$ t, IFN $\gamma$ ). La utilización del sistema dCas9 TET1CD debería producir una mayor expresión de los marcadores Treg, mientras que disminuiría la expresión de los marcadores Th, manteniendo el fenotipo Treg, lo cual coincide con nuestros resultados, excepto en el caso de ROR $\gamma$ t, el cual no muestra cambios en su expresión.

El transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) promueve la diferenciación hacia células Th2; mientras que, en ausencia de este marcador, las iTregs mantienen una mayor capacidad supresora *in vitro* (Arroyo-Olarte, *et al.*, 2024). Los resultados obtenidos demuestran que el uso de la herramienta dCas9 TET1CD dirigida a la desmetilación del TSDR, aunque muestra

una tendencia a la baja, no es suficiente para disminuir de manera significativa, la expresión de STAT6. Se sugiere utilizar la herramienta dCas9 TET1CD junto con algún inhibidor específico de STAT6, por ejemplo, AS1517499 (Li, *et al.*, 2022) para evitar la diferenciación hacia el fenotipo Th2.

También se analizó la expresión de ROR $\gamma$ t, un marcador asociado a linfocitos Th17, se observó una disminución en su expresión en células transfectadas con TET1 a las 72 horas post-electroporación. En células Jurkat transfectadas con diferentes sgRNA dirigidos a la región TSDR, no se observó un aumento de ROR $\gamma$ t (Wilk, *et al.*, 2022). De manera similar, Arroyo y colaboradores (2024) reportaron resultados similares al utilizar una sola sgRNA. En ambos ensayos, el análisis de la expresión de genes se realizó en diferentes tiempos post-electroporación: 48 horas y 72 horas respectivamente. Estos hallazgos sugieren que, es suficiente una única sgRNA dirigida específicamente a la región TSDR, junto con un incremento en el tiempo post-electroporación, para promover el aumento en la expresión de ROR $\gamma$ t y, a su vez, evitar la diferenciación hacia el linaje Th17.

Por último, se evaluó la expresión de IFN $\gamma$ , este marcador está relacionado con la respuesta inmune mediada por linfocitos Th1. No se observaron diferencias significativas en la expresión de este marcador entre las células transfectadas con TET1 y pdTET, lo cual sugiere, que la desmetilación de la región TSDR, no favorece completamente un fenotipo regulador capaz de evitar la diferenciación hacia linfocitos Th1.

Por otro lado, Arroyo *et al.* (2023, 2024) también demostraron que la desactivación de STAT6 lleva a una disminución significativa en los niveles de expresión de IFN $\gamma$ . De esta manera, también se podría sugerir el uso de un inhibidor de STAT6 en conjunto con la herramienta dCas9-TET1CD para prevenir la diferenciación de las iTreg a los linajes Th1, Th2 y Th17. Finalmente, si bien

nuestros resultados muestran un aumento significativo en los niveles de ARNm de Foxp3, en futuros estudios se debe comprobar el grado de desmetilación de las islas CpG del TSDR.

## **10. CONCLUSIÓN**

Se estableció un protocolo para la transfección eficiente del editor epigenético CRISPR-TET1 dirigido a la desmetilación del locus FOXP3-TSDR en la línea celular Jurkat de linfocitos T CD4+ humanos. Se encontraron aumentos significativos en los niveles de expresión de ARNm de genes asociados al fenotipo Treg como FOXP3 y CTLA-4. También se registró una disminución en los niveles de expresión de genes asociados a otros linajes Th como ROR $\gamma$ T. Estos resultados sugieren una desmetilación efectiva del gen FOXP3, y además que el protocolo establecido puede hacer parte de una estrategia para aumentar la capacidad supresora y la estabilidad de las terapias basadas en células Treg contra enfermedades inflamatorias y autoinmunes, lo cual debe ser analizado en futuros estudios.

## 11. REFERENCIAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2014). *Inmunología Básica + Studentconsult + Studentconsult En Español: Funciones y Trastornos del Sistema Inmunitario* (4a ed.). Elsevier.

Aubert, A., Jung, K., Hiroyasu, S., Pardo, J., & Granville, D. J. (2024). Granzyme serine proteases in inflammation and rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, 20(6), 361–376. <https://doi.org/10.1038/s41584-024-01109-5>

Bhattacharya, S., & Satpati, P. (2022). Insights into the mechanism of CRISPR/Cas9-based genome editing from molecular Dynamics simulations. *ACS Omega*, 8(2), 1817–1837. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05583>

Bettini, M. L., & Vignali, D. A. A. (2010). Development of thymically derived natural regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05129.x>

Bustin S. (ed) (2004) *A-Z of Quantitative PCR*. IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, California.

Cai, R., Lv, R., Shi, X., Yang, G., & Jin, J. (2023). CRISPR/dCas9 tools: Epigenetic mechanism and application in gene transcriptional regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/ijms241914865>

Challier, J., Bruniquel, D., Sewell, A. K., & Laugel, B. (2013). Adenosine and cAMP signalling skew human dendritic cell differentiation towards a tolerogenic phenotype with defective CD8+ T-cell priming capacity. *Immunology*, 138(4), 402–410. <https://doi.org/10.1111/imm.12053>

Chávez Sánchez, F. R., Rojas-Lemus, M., Fortoul van der Goes, T. I., & Tenorio Zumárraga, E. P. (2017). Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México*, 60(5), 36–44. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422017000500036](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422017000500036)

Choudhury, S. R., Cui, Y., Lubecka, K., Stefanska, B., & Irudayaraj, J. (2016). CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*, 7(29), 46545–46556. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10234>

Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G. T., Di Rella, F., de Candia, P., & De Rosa, V. (2020). Molecular mechanisms controlling Foxp3 expression in health and autoimmunity: From epigenetic to post-translational regulation. *Frontiers in immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03136>

Corripio-Miyar, Y., Hayward, A., Lemon, H., Sweeny, A. R., Bal, X., Kenyon, F., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., Nussey, D. H., & McNeilly, T. N. (2022). Functionally distinct T-helper cell phenotypes predict resistance to different types of parasites in a wild mammal. *Scientific Reports*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07149-9>

Cortés Hernández, Arimelek (2020). Aislamiento y expansión de células T reguladoras aloespecíficas con potencial terapéutico en pacientes con trasplante renal. Facultad de Química, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3622946>

Dambuza, I. M., He, C., Choi, J. K., Yu, C.-R., Wang, R., Mattapallil, M. J., Wingfield, P. T., Caspi, R. R., & Egwuagu, C. E. (2017). IL-12p35 induces expansion of IL-10 and IL-35-expressing regulatory B cells and ameliorates autoimmune disease. *Nature Communications*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00838-4>

García Robles, R., Ayala Ramírez, P. A., & Perdomo Velásquez B., S. P. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de la Salud*, 10(1), 59-71.

Goel, N., Karir, P., & Garg, V. K. (2017). Role of DNA methylation in human age prediction. *Mechanisms of Ageing and Development*, 166, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.012>

González Parias, J. L., Duque Giraldo, V. E., & Velásquez-Lopera, M. M. (2010). FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología (Barcelona, Spain: 1987)*, 29(2), 74–84. [https://doi.org/10.1016/s0213-9626\(10\)70013-5](https://doi.org/10.1016/s0213-9626(10)70013-5)

Gray, S. J., Foti, S. B., Schwartz, J. W., Bachaboina, L., Taylor-Blake, B., Coleman, J., Ehlers, M. D., Zylka, M. J., McCown, T. J., & Samulski, R. J. (2011). Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Human Gene Therapy*, 22(9), 1143–1153. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.245>

Göschl, L., Scheinecker, C., & Bonelli, M. (2019). Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Seminars in Immunopathology*, 41(3), 301–314. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00741-8>

Harris, F., Berdugo, Y. A., & Tree, T. (2023). IL-2-based approaches to Treg enhancement. *Clinical and Experimental Immunology*, 211(2), 149–163. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac105>

Hernández, D. S. (2013). La molécula CD28 y su función en la activación de células T. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*, 29(4). <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/59/89>

Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. (2022). A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*, 65(3), 311–325. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>

Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2016). Induced regulatory T cells: Their development, stability, and applications. *Trends in Immunology*, 37(11), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012>

Kandi, V., & Vadakedath, S. (2015). Effect of DNA methylation in various diseases and the probable protective role of nutrition: A mini-review. *Cureus*, 7(8). <https://doi.org/10.7759/cureus.309>

- Klein, L., Robey, E. A., & Hsieh, C.-S. (2019). Central CD4<sup>+</sup> T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nature Reviews. Immunology*, 19(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0083-6>
- Lee, W., & Lee, G. R. (2018). Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(3), e456–e456. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.313>
- Lee, J., Lozano-Ruiz, B., Yang, F. M., Fan, D. D., Shen, L., & González-Navajas, J. M. (2021). The multifaceted role of Th1, Th9, and Th17 cells in immune checkpoint inhibition therapy. *Frontiers in immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625667>
- Leung, S., Liu, X., Fang, L., Chen, X., Guo, T., & Zhang, J. (2010). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cellular & Molecular Immunology*, 7(3), 182–189. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.22>
- Li, M. O., & Rudensky, A. Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nature Reviews. Immunology*, 16(4), 220–233. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.26>
- Li, Tianxiang, Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., He, X., Liu, M., Li, P.-F., & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
- Li, Tianye, Li, S., Kang, Y., Zhou, J., & Yi, M. (2024). Harnessing the evolving CRISPR/Cas9 for precision oncology. *Journal of Translational Medicine*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05570-4>
- Liberal, R., Grant, C. R., Longhi, M. S., Mieli-Vergani, G., & Vergani, D. (2015). Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease: Regulatory T Cells in Autoimmune Liver Disease. *IUBMB Life*, 67(2), 88–97. <https://doi.org/10.1002/iub.1349>
- Liu, X. S., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., Shu, J., Dadon, D., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167(1), 233–247.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.056>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature Reviews. Genetics*, 11(4), 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrg2752>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Morales-Puerto y Esther O’Shea, N. (2023). Neurobiology of the kynurenine pathway and cannabis misuse: A new narrative. En *Cannabis Use, Neurobiology, Psychology, and Treatment*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89862-1.00033-7>

- Morán-Garay, S. Y., & Rojo-Arreola, L. (2023). CRISPR-Cas9 como herramienta para describir la función genética en metazoarios marinos: CRISPR-Cas9: a genetic tool to study gene functions in marine metazoans. *Revista de biología marina y oceanografía*, 57(2), Press. <https://doi.org/10.22370/rbmo.2022.57.2.3525>
- Morris, M. J., & Monteggia, L. M. (2014). Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), 359–371. [sal](https://doi.org/10.1186/s12918-014-0188-8)
- Nayer, B., Tan, J.L., Alshoubaki, Y.K. et al. (2024) Local administration of regulatory T cells promotes tissue healing. *Nat Commun* 15, 7863. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51353-2>
- Neri, F., Incarnato, D., & Oliviero, S. (2015). DNA methylation and demethylation dynamics. *Oncotarget*, 6(33), 34049–34050. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6039>
- Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Rodríguez, T., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2020). Relevance of regulatory T cells during colorectal cancer development. *Cancers*, 12(7), 1888. <https://doi.org/10.3390/cancers12071888>
- Ohkura, N., Kitagawa, Y., & Sakaguchi, S. (2013). Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity*, 38(3), 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.002>
- Osborne, D. G., Domenico, J., & Fujita, M. (2022a). Expression of IL-37 induces a regulatory T-cell-like phenotype and function in Jurkat cells. *Cells (Basel, Switzerland)*, 11(16), 2565. <https://doi.org/10.3390/cells11162565>
- Osińska, I., Popko, K., & Demkow, U. (2014). Perforin: an important player in immune response. *Central-European Journal of Immunology*, 1(1), 109–115. <https://doi.org/10.5114/ceji.2014.42135>
- Parra-Ortega, I., Salceda-Rangel, K. S., Nájera-Martínez, N., López-Martínez, B., Ortiz-Navarrete, V., & Olvera-Gómez, I. (2019). Determinación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T y células natural killer en sangre periférica de individuos sanos por citometría de flujo. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 76(2), 66–78. <https://doi.org/10.24875/bmhim.18000083>
- Patiño Uriostegui, L., & Velazquez Cruz, R. (2022). Fundamentos de citometría de flujo. *Mensaje Bioquímico*, 46, 67-77. Facultad de Medicina, UNAM. <http://biosensor.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2022/06/7-Patin%CC%83o.pdf>
- Pelly, V. S., Coomes, S. M., Kannan, Y., Gialitakis, M., Entwistle, L. J., Perez-Lloret, J., Czieso, S., Okoye, I. S., Rückerl, D., Allen, J. E., Brombacher, F., & Wilson, M. S. (2017). Interleukin 4 promotes the development of ex-Foxp3 Th2 cells during immunity to intestinal helminths. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(6), 1809–1826. <https://doi.org/10.1084/jem.20161104>
- Piconese, S., Walker, L. S. K., & Dominguez-Villar, M. (2021). Editorial: Control of regulatory T cell stability, plasticity, and function in health and disease. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611591>

Raya Pérez, J. C. (2004). La Estructura de la Cromatina y la Regulación de la Transcripción. *Acta universitaria*, 14(1), 59–66. <https://doi.org/10.15174/au.2004.240>

Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., & Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology*, 21(10), 1105–1111. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp095>

Saravia, J., Chapman, N. M., & Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(7), 634–643. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6>

Saxena, V., Lakhan, R., Iyyathurai, J., & Bromberg, J. S. (2021). Mechanisms of exTreg induction. *European Journal of Immunology*, 51(8), 1956–1967. <https://doi.org/10.1002/eji.202049123>

Schlenner, S. M., Weigmann, B., Ruan, Q., Chen, Y., & von Boehmer, H. (2012). Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(9), 1529–1535. <https://doi.org/10.1084/jem.20112646>

Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological Reviews*, 259(1), 88–102. <https://doi.org/10.1111/imr.12160>

Shevyrev, D., & Tereshchenko, V. (2020). Treg heterogeneity, function, and homeostasis. *Frontiers in immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100>

Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>

Someya, K., Nakatsukasa, H., Ito, M., Kondo, T., Tateda, K.-I., Akanuma, T., Koya, I., Sanosaka, T., Kohyama, J., Tsukada, Y.-I., Takamura-Enya, T., & Yoshimura, A. (2017). Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. *International Immunology*, 29(8), 365–375. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx049>

Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH (2008). IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *J Immunol* 181 (9): 5948–5955 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.5948>

Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., Hasegawa, E., Shizuya, S., Hara, T., Nomura, M., & Yoshimura, A. (2010). Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF- $\beta$ -mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *The Journal of Immunology*, 185(2), 842–855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904100>

Toche. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70335-8)

Universidad Nacional del Nordeste. (s/f). Capítulo VIII Sistema inmune. Recuperado el 21 de septiembre de 2022, de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Fisio/cap%208%20sistema%20inmune.pdf>

Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews. Immunology*, 8(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>

Xu, Z., Jiang, X., Dai, X., & Li, B. (2022). The dynamic role of FOXP3+ Tregs and their potential therapeutic applications during SARS-CoV-2 infection. *Frontiers in immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.916411>

Yang, T., Peng, J., Shu, Z., Sekar, P. K., Li, S., & Gao, D. (2019). Determination of the membrane transport properties of Jurkat cells with a microfluidic device. *Micromachines*, 10(12), 832. <https://doi.org/10.3390/mi10120832>

Zhu, X., & Zhu, J. (2020). CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8011. <https://doi.org/10.3390/ijms21218011>

Zhuo, C., Li, Z., Xu, Y., Wang, Y., Li, Q., Peng, J., Zheng, H., Wu, P., Li, B., & Cai, S. (2014). Higher FOXP3-TSDR demethylation rates in adjacent normal tissues in patients with colon cancer were associated with worse survival. *Molecular Cancer*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-153>