



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DE INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Identificación y caracterización de las señales  
moleculares inducidas por TGF- $\beta$  en linfocitos T  
reguladores dentro del microambiente tumoral”**

TESIS

Que presenta:

**B.Q.D Diana Berenice Rios Ramirez**

Para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de Tesis:

Dr. Vianey Ortiz Navarrete

Dra. Paula Licona Limón

## **Directores de tesis**

### **Dr. Vianey Ortiz Navarrete**

Investigador titular del departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav -IPN.

### **Dra. Paula Licona Limón**

Investigadora Titular del departamento de Biología celular y del desarrollo, IFC-UNAM

## **Asesores de Tesis**

### **Dra. Rosaura Hernández Rivas**

Investigadora titular del departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav -IPN.

### **Dr. José Carlos Crispin Acuña**

Investigador titular del departamento de Inmunología y Reumatología, INCMNSZ.

### **Dr. Leopoldo Santos Argumedo**

Jefe de departamento e investigador titular del departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav -IPN.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Paula Licona Limón del departamento de Biología celular y del desarrollo del Instituto de Fisiología celular-UNAM.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado a través de la beca otorgada a C. Diana Berenice Rios Ramirez con CVU: 935753.

## Resumen

En el microambiente tumoral existe una respuesta inmune mediada por células innatas y adaptativas; por otro lado, las células cancerosas evaden esta respuesta mediante diversos mecanismos que promueven un entorno inmunorregulador. Uno de los mecanismos de evasión es la liberación de mediadores solubles, y uno de los principales es el TGF- $\beta$ , que induce la proliferación y diferenciación de linfocitos T reguladores que a su vez suprimen la función de los linfocitos T efectores. La señalización del TGF- $\beta$  está mediada río abajo por un complejo proteico llamado SMAD2/3/4 que se transloca al núcleo e induce la expresión génica, también se ha descrito que existe otro factor de transcripción llamado TIF1- $\gamma$  que puede interactuar con el complejo SMAD2/3 e inducir la expresión de un grupo distinto de genes. En este trabajo nos centramos en generar modelos para el estudio de la señalización de TGF- $\beta$  en linfocitos T reguladores con el fin de establecer dianas moleculares para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Estos modelos se basaron en la generación de una cepa de ratón transgénico para obtener linfocitos T reguladores específicos de antígeno  $\gamma$ , en el diseño de ARN guía para la posterior edición de SMAD4 y TIF1- $\gamma$  en linfocitos T reguladores primarios. Además, evaluamos el nivel de expresión de TIF1- $\gamma$  en distintas poblaciones de los linfocitos y demostramos que los linfocitos T reguladores expresan mayores niveles de este gen en comparación con otras poblaciones del bazo y los ganglios linfáticos. Finalmente, realizamos ensayos preliminares de transferencia adoptiva de linfocitos Treg en ratones con melanoma y evaluamos si había un efecto en la progresión tumoral.

# Abstract

In the tumor microenvironment there is an immune response mediated by innate and adaptive cells; on the other hand, cancer cells evade this response by various mechanisms that promote an immunoregulatory environment. One of the evasion mechanisms is the release of soluble mediators, and one of the main ones is TGF- $\beta$ , which induces the proliferation and differentiation of regulatory T lymphocytes that in turn suppress the function of effector T lymphocytes. TGF- $\beta$  signaling is mediated downstream by a protein complex called SMAD2/3/4 that translocates to the nucleus and induces gene expression, it has also been described that there is another transcription factor called TIF1- $\gamma$  that can interact with the SMAD2/3 complex and also induces gene expression. In this work we focused on generating models for the study of TGF- $\beta$  signaling in regulatory T lymphocytes in order to establish molecular targets for the design of new therapeutic strategies. These models were based on the generation of a transgenic mouse strain to obtain antigen-specific regulatory T lymphocytes and, on the design of guide RNA for the subsequent editing of SMAD4 and TIF1- $\gamma$  in primary regulatory T lymphocytes. In addition, we analyze the expression level of TIF1- $\gamma$  in different lymphocyte subsets and demonstrated that regulatory T lymphocytes express higher levels compared to other spleen and lymph node populations. Finally, we performed preliminary adoptive transfer assay with Treg into melanoma bearing mice and evaluated its effect in tumor progression.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>6</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>6</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>Melanoma</b> .....	<b>7</b>
Incidencia.....	7
Factores de riesgo .....	8
Fisiopatología.....	10
Diagnóstico y Terapia .....	12
<b>Respuesta inmune contra en melanoma</b> .....	<b>15</b>
<b>Linfocitos T reguladores en Melanoma</b> .....	<b>17</b>
TGF- $\beta$ en melanoma.....	19
<b>Antecedentes</b> .....	<b>22</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>28</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>30</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>30</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>31</b>
Separación de diferentes poblaciones de linfocitos T a partir de Bazo y Ganglio. ....	31
Extracción de RNA .....	31
Obtención de cDNA.....	32
RT-qPCR .....	32
Animales .....	32
Genotipificación.....	33
Fenotipificación .....	35
Diseño de RNA guías .....	36
Modelo de melanoma y transferencia adoptiva de linfocitos Tregs. ....	36
<b>Resultados</b> .....	<b>39</b>
Expresión de SMAD4 y TIF1- $\gamma$ en diferentes poblaciones de linfocitos a partir de Bazo y Ganglio. ....	39
Generación de un modelo murino de linfocitos Tregs deficientes de TIF1- $\gamma$ y tumor específicos.....	40
Tipificación de los ratones.....	40
Edición de linfocitos Tregs tumor específicos para la eliminación de TIF1- $\gamma$ y SMAD4 mediante CRISPR.	
Diseño de RNA guías. ....	44
Progresión tumoral. ....	49
<b>Discusión</b> .....	<b>51</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>57</b>

<b>Perspectivas.....</b>	<b>58</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>59</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Incidencia a nivel mundial estandarizada por edad de melanoma en hombres y mujeres en 2018.).....	7
Figura 2. Vías de señalización alteradas en melanoma.....	9
Figura 3. Progresión de melanocitos a melanoma.....	11
Figura 4. Tratamientos en Melanoma.....	13
Figura 5. Respuesta antitumoral en melanoma.....	14
Figura 6. Escape inmunológico en melanoma.....	16
Figura 7. Linfocitos T reguladores en Melanoma.....	18
Figura 8. Vía de señalización de TGF- $\beta$ .....	20
Figura 9. Efecto de TGF- $\beta$ en células del sistema inmune en melanoma.....	21
Figura 10. El bloqueo de la señal de TGF- $\beta$ en linfocitos T impide el crecimiento tumoral.....	23
Figura 11. Uso de bloqueadores de TGF-B influyen en el crecimiento tumoral.....	25
Figura 12. La ausencia de SMAD4 en linfocitos T aumenta la incidencia tumoral.....	26
Figura 13. La deficiencia de TIF1- $\gamma$ disminuye el crecimiento tumoral.....	26
Figura 14. Expresión de SMAD 4 y TIF1- $\gamma$ en Bazo y Ganglios. A y B.....	39
Figura 15. PCR de TIF1- $\gamma$ .....	40
Figura 16. PCR de GFP.....	41
Figura 17. PCR de Rip-mOVA.....	42
Figura 18. PCR de CD4cre.....	42
Figura 19. Caracterización de linfocitos OTII.....	43
Figura 20. Mapa genético de SMAD4.....	45
Figura 21. Mapa genético TIF1- $\gamma$ .....	46
Figura 22. RNA's guías para exones 2-4 de SMAD4 de Breaking cas.....	47
Figura 23. RNA's guías para exones 2-4 de SMAD4 de CRISPOR.....	47
Figura 24. RNA's guías para exones 3-4 de TIF1- $\gamma$ de CRISPOR.....	48
Figura 25. RNA's guías para exones 3-4 de TIF1- $\gamma$ de Breaking cas.....	48
Figura 26. Guías prediseñadas de IDT.....	48
Figura 27. Crecimiento tumoral.....	50

## Índice de tablas

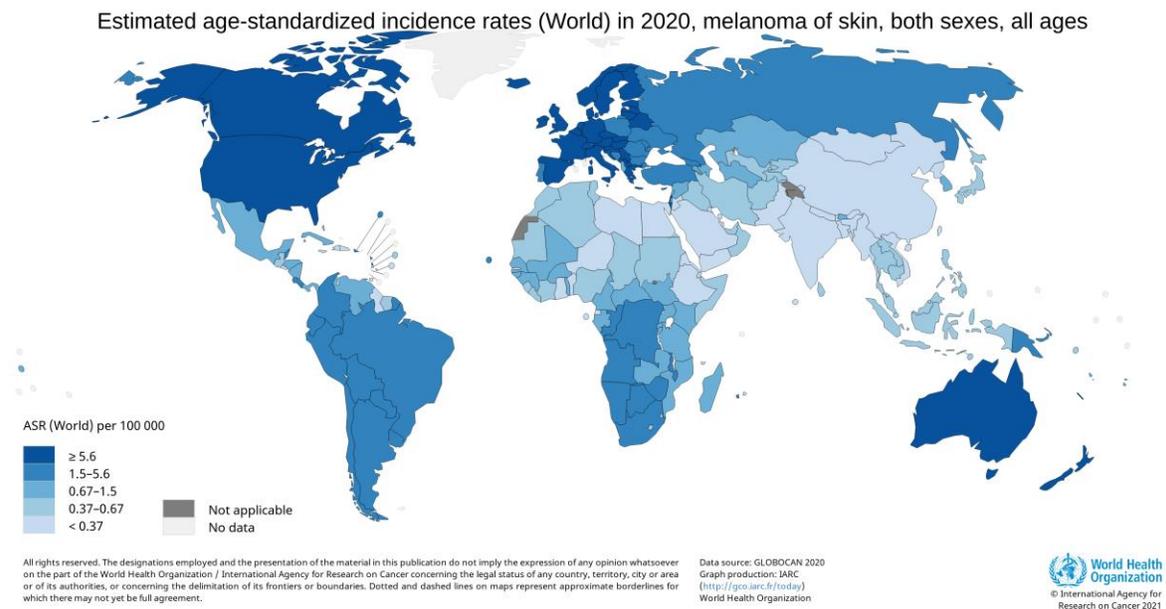
Tabla 1. Clasificación de melanoma de acuerdo con el comité de la unión americana en cáncer.....	12
Tabla 2. Se requiere del bloqueo de TGF-B en linfocitos T para controlar el crecimiento tumoral.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3. Número de ratones por cada cepa.....	44
Tabla 4. Guías candidato para SMAD4 y TIF1- $\gamma$ .....	49

# Introducción

## Melanoma

### Incidencia

En el año 2020 la OMS reportó que dentro de los cánceres con mayor incidencia se encuentran aquellos que afectan la piel, siendo el melanoma maligno dentro de este grupo el de mayor letalidad (Rastrelli, M y cols.,2014). De acuerdo con la incidencia estandarizada por edad en 2020, países como Nueva Zelanda, Australia, Noruega y Suecia oscilaron en rangos  $\geq 36.6$  por cada 100 000 personas, colocándolos como los de mayor incidencia a nivel mundial. En el caso de México se estima una incidencia de 1.5 por cada 100 000 personas (Figura 1), (GLOBOCAN, 2021).



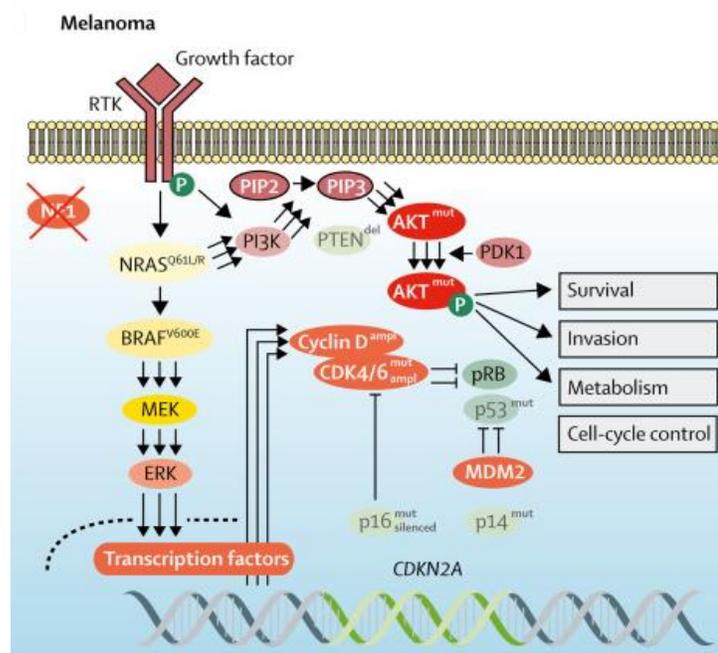
**Figura 1. Incidencia a nivel mundial estandarizada por edad de melanoma en hombres y mujeres en 2018. EL mapa de calor muestra la incidencia estimada estandarizada por edad de mayor a menor correspondiendo a una gamma de azules de mayor y menor intensidad respectivamente (GLOBOCAN, 2021).**

## Factores de riesgo

Al igual que otros cánceres el melanoma se considera una enfermedad multifactorial donde se involucran factores genéticos (alteraciones multifactoriales), ambientales y hereditarios (alteraciones de nacimiento). La radiación UV juega un papel importante como factor de riesgo ambiental debido a su capacidad genotóxica, con frecuencia conduce a mutaciones en el DNA. El melanoma suele presentarse después de los 55 años y originarse en zonas de mayor exposición como cabeza, cuello y extremidades. Por otro lado, algunos otros factores como antecedentes familiares, tendencia a nevos melanocíticos y características fenotípicas como cabello, piel y ojos claros también predisponen al desarrollo de melanoma (Schadendorf, D. y cols.,2018; Shain, A., Bastian, B., 2016).

Los factores más importantes involucrados para el desarrollo de melanoma maligno y que este pueda tener una progresión metastásica son los asociados con alteraciones genéticas en moléculas de vías principalmente relacionadas con proliferación, supervivencia, ciclo celular y apoptosis (Russo, A. y cols., 2009). Dentro de las moléculas con mayor índice de mutación se encuentra BRAF el cual pertenece a una familia de protooncogenes que participa en la vía de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) y promueve crecimiento y proliferación celular. Es la principal mutación encontrada en casi el 50-70% de melanomas metastásicos, esta genera una ganancia de función resultando en una proliferación celular no controlada repercutiendo en el desarrollo y crecimiento tumoral (Gray-Schopfer, V.,2007; Schadendorf, D. y cols.,2018). Otra mutación que induce un mecanismo de ganancia de función es la GTPasa NRAS con un 15-20 % de presencia en pacientes con melanoma. Otros estudios han identificado algunos genes mutados solo en el 5% de los pacientes que participan río abajo de la vía MAPK como MITF, BRN-2 y reguladores de ciclinas (CDK4 y CDK2A), moléculas que también se encuentran implicados en la regulación de ciclo celular (Gray-Schopfer, V.,2007). También se han encontrado alteraciones de la vía PI3-K/AKT

ocasionando hiperactivación o una pobre retroalimentación negativa, dado por mutaciones puntuales o aumento en el número de copias de genes en el cromosoma, que conducen a un aumento en la supervivencia celular, ciclo celular descontrolado y cambios en metabolismo (Figura 2), (Russo, A. y cols., 2009; Schadendorf, D. y cols.,2018). Existen otras moléculas que pueden estar alteradas como el receptor de melanocortina (MC1R) activado por la hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos (MSH) propiciando el proceso de melanogénesis; aunque las variantes alélicas de dicho receptor no son suficientes para el desarrollo de melanoma; dado su papel en la pigmentación de la piel, una baja en la producción de melanina genera una mayor vulnerabilidad a mutagénesis por radiación UV en locus de BRAF, NRAS y CDKN2A (Russo, A. y cols., 2009). Se han descrito algunas otras moléculas como las involucradas en adhesión celular, regulación de la estructura de cromatina, entre otros (Russo, A. y cols., 2009; Schadendorf, D. y cols.,2018).

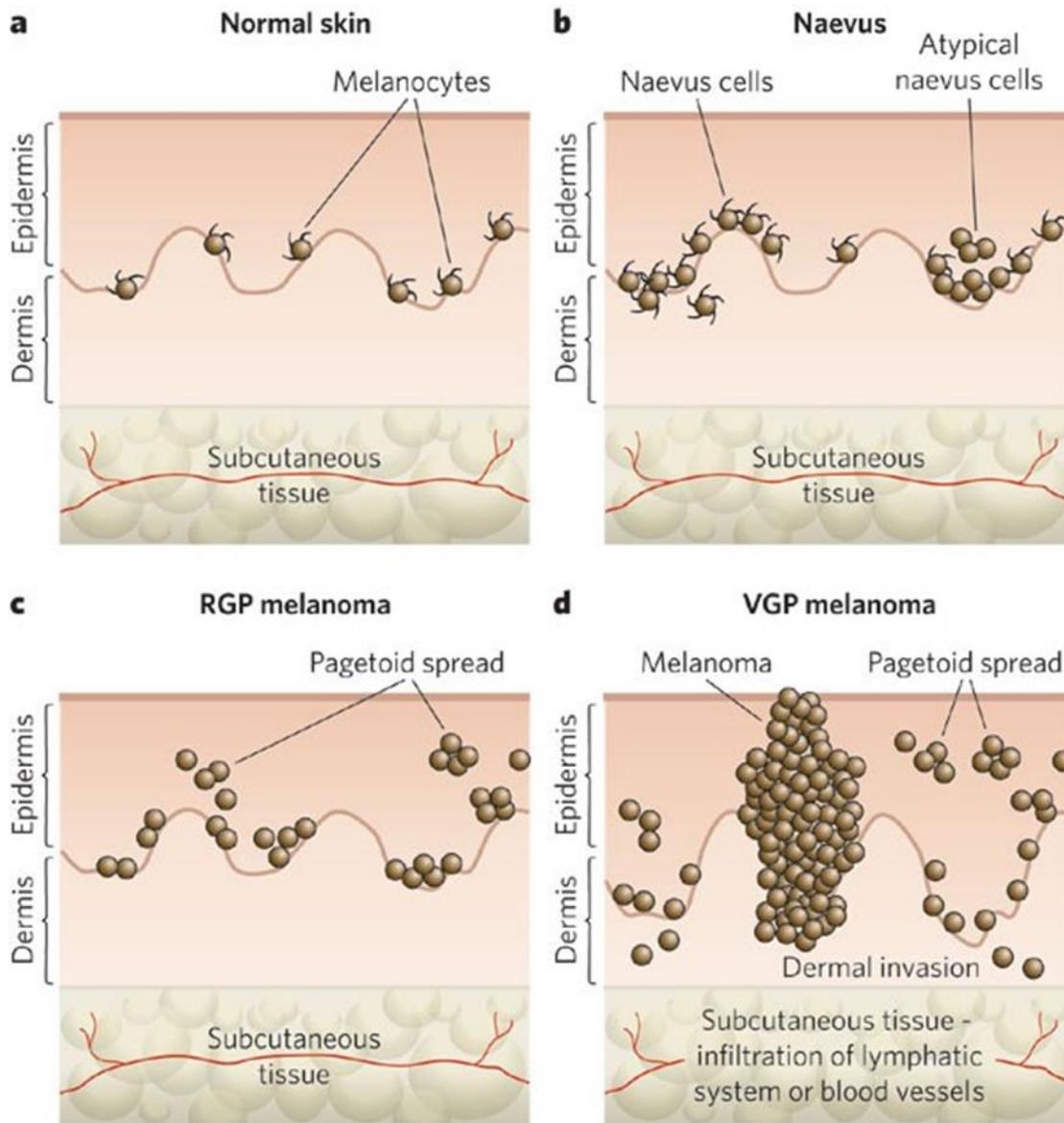


**Figura 2. Vías de señalización alteradas en melanoma.** Principales vías afectadas en melanoma por mutaciones puntuales y/o aumento en el número de copias de genes (Schadendorf, D. y cols.,2018).

### Fisiopatología

Los melanocitos son células localizadas principalmente en la epidermis y los folículos pilosos, especializadas en la producción de melanina responsable de la pigmentación de piel y cabello. En una exposición a rayos UV, los queratinocitos producen la hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH), esta se unirá al receptor MC1R expresado en melanocitos induciendo el proceso de melanogénesis, trayendo consigo la proliferación y diseminación de melanocitos que conlleva a la formación de un nevo. La melanina es una molécula que tiene la capacidad de absorber los rayos UV y así proteger daño al DNA (Gray-Schopfer, V.,2007; Shain, A., Bastian, B., 2016).

En condiciones normales los melanocitos se encuentran localizados en la capa basal de la epidermis, a lo largo de la mucosa, meninges y la capa coroidea del ojo, se sabe que el cuerpo humano posee alrededor de 3 mil millones de melanocitos cutáneos. De acuerdo con la zona donde se restringe la proliferación de melanocitos, los nevos pueden denominarse nevo de unión (epidermis), nevo dérmico (dermis) o nevo compuesto (superpuesto en ambas regiones). Generalmente los nevos son benignos, sin embargo, existen diferentes aspectos que deben tomarse en cuenta como la forma, tamaño y color, un nevo displásico suele presentar melanocitos con una morfología atípica. Una vez que aparece un nevo displásico este puede progresar con un crecimiento radial, lo que implica una lesión intraepidérmica con ligera invasión local de la dermis, este puede evolucionar a una fase de crecimiento vertical en donde las células suelen adquirir un potencial metastásico. Cabe mencionar que no todos los melanomas pasan por todas y cada una de las fases de crecimiento, y que en algunos casos puede desarrollarse de melanocitos aislados (Figura 3), (Gray-Schopfer, V.,2007).



**Figura 3. Progresión de melanocitos a melanoma.** a. Disposición en la zona epidérmica de melanocitos en piel normal. b. En la aparición de un nevo los melanocitos adquieren una disposición en la dermis y o compuesta. Aquellos melanocitos con morfología atípica son llamados nevos displásicos c. En la primera etapa maligna se da una fase de crecimiento radial (RGP). d. Crecimiento en fase vertical (VPG) con alto potencial metastásico por capacidad de infiltración del sistema vascular y linfático (Gray-Schopfer, V., 2007).

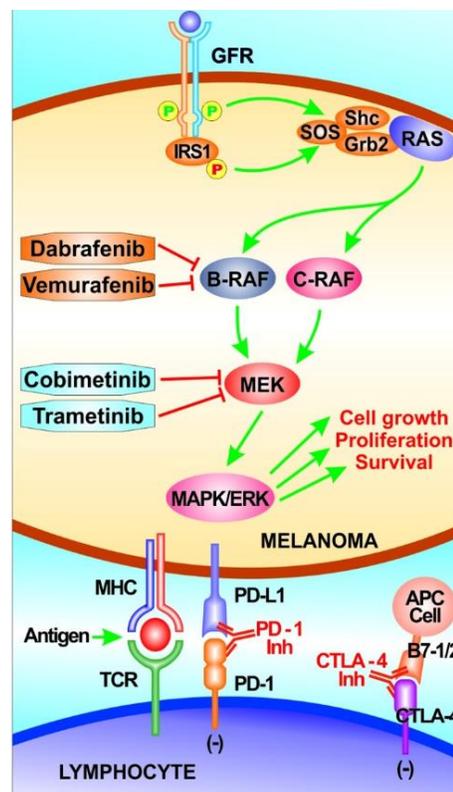
## Diagnóstico y Terapia

Para el diagnóstico de melanoma suele tomarse en cuenta las características de las lesiones en la piel de acuerdo con los criterios de ABCDE indicando A: asimetría, B: borde irregular, C: variación de color, D: diámetro >6mm y E: superficie evaluada (Russo, A. y cols., 2009). En la actualidad también se pueden buscar alteraciones genéticas en cualquiera de las moléculas mencionadas con anterioridad o ciertos marcadores para un diagnóstico certero y se pueda brindar la terapia más adecuada. De acuerdo con el comité de unión americana en cáncer, el melanoma se puede clasificar bajo diversas escalas de acuerdo con: el grosor (estadio de reslow; T), afección de ganglios linfáticos (estadio N) y presencia de metástasis (estadio M) (Tabla 1), (Schadendorf, D. y cols.,2018).

**Tabla 1. Clasificación de melanoma de acuerdo con el comité de la unión americana en cáncer. (Schadendorf, D. y cols.,2018).**

Definition	
<b>T classification</b>	
T1	
A	<0.8 mm thickness, no ulceration
B	0.8-1 mm thickness (<0.8 mm with ulceration)
T2	
A	>1-2 mm thickness, no ulceration
B	>1-2 mm thickness with ulceration
T3	
A	>2-4 mm thickness, no ulceration
B	>2-4 mm thickness with ulceration
T4	
A	>4 mm thickness, no ulceration
B	>4 mm thickness with ulceration
<b>N classification</b>	
N0	No regional lymph nodes affected
N1a-c	One lymph node affected, micro-metastasis or macro-metastasis, or in-transit or satellite metastasis
N2a-c	Two to three lymph nodes affected, or at least one lymph node affected and in-transit or satellite metastasis
N3a-c	At least four lymph nodes affected or at least two lymph nodes affected and matted nodes
<b>M classification</b>	
M0	No evidence of distant metastasis
M1	
a	Distant metastasis to skin
b	Distant metastasis to lung
c	Distant non-CNS metastasis
d	CNS metastasis

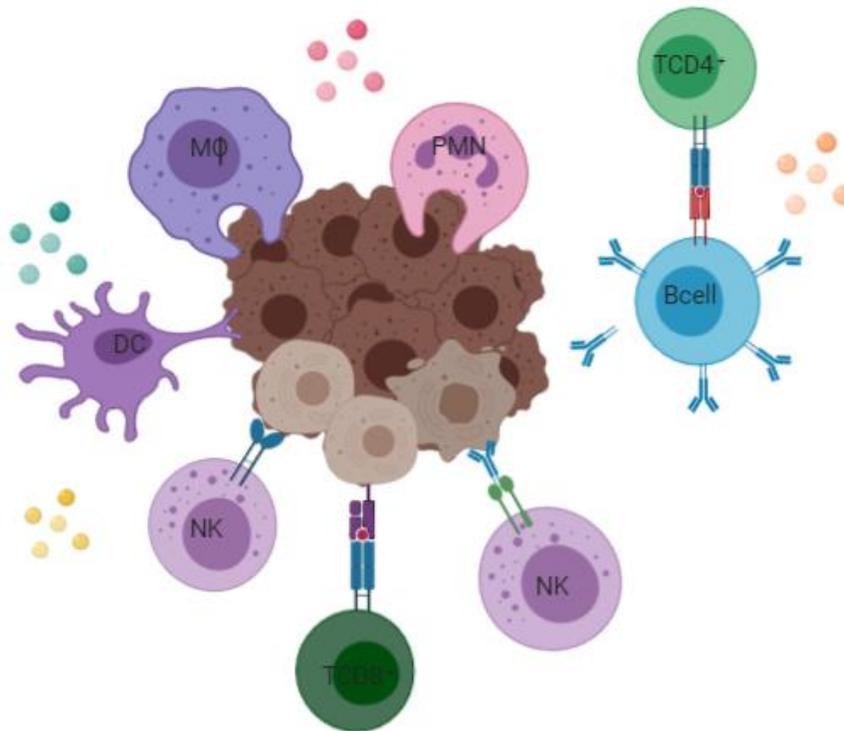
Actualmente existen diversos tratamientos para pacientes con melanoma, cuando se trata de un melanoma primario la escisión es el tratamiento de elección. Sin embargo, en estadios más avanzados la administración de alguno de ellos dependerá del estadio y principalmente la molécula alterada en este. Dentro de los principales fármacos se encuentran los inhibidores de BRAF<sup>V600E</sup>: vemurafenib y dabrafenib, MEK : trametinib y cobimetinib, además el uso de inmunoterapias como anticuerpos anti-PD1: pembrolizumab, nivolumab y anti-CTLA4: ipilimumab), que permitirá una respuesta por parte de las células T efectoras en contra del tumor (Figura 4). En cambio, el uso



**Figura 4.. Tratamientos en Melanoma.** Durante el desarrollo de melanoma existen diferentes moléculas que se encuentran alteradas siendo los principales blancos terapéuticos (Leonardi, G. y cols., 2018).

de terapias combinadas es muy frecuentemente dado en aquellos melanomas metastásicos (Leonardi, G. y cols., 2018).

Además de los tratamientos antes mencionados también se han realizado estudios para que se puedan aumentar la cantidad de linfocitos infiltrantes como la administración de IL-2 e INF- $\alpha$ , aunque no todos los pacientes responden de manera positiva al tratamiento. Por esta razón, en la actualidad existen diversos estudios que buscan nuevas terapias combinatorias como el uso de péptidos inmunogénicos, células CART y el diseño de estrategias que disminuyan a las células T reguladoras, mismas que se sabe juegan un papel muy importante en la progresión tumoral (Liu, Y., y Sheikh, M. S., 2014).

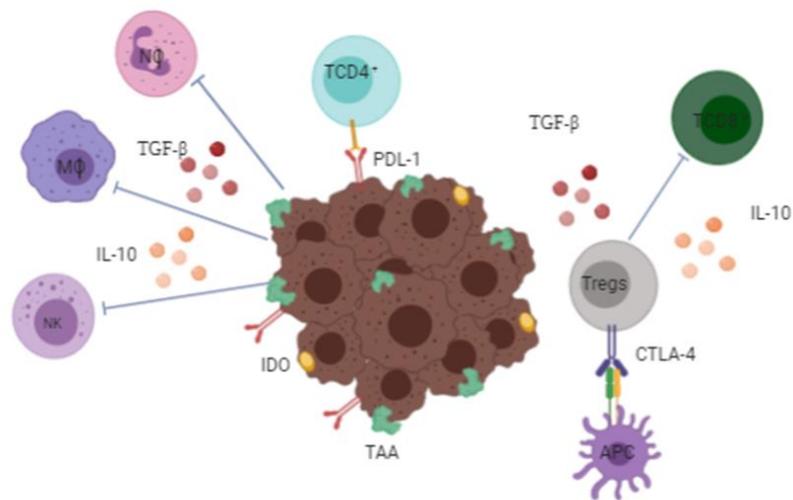


**Figura 5. Respuesta antitumoral en melanoma.** La participación de ambos brazos de la respuesta inmune es primordial para la eliminación del tumor (Biorender).

## **Respuesta inmune contra en melanoma**

Durante la homeostasis el sistema inmune se encarga de examinar y eliminar constantemente células precancerosas para evitar la progresión de tumores. El melanoma es considerado uno de los cánceres más inmunogénicos y con un mayor potencial de evasión inmune, debido a su alta carga mutacional y un alto grado de plasticidad, lo que conduce a un escape inmune (Marzagalli, M.,2019). Para evitar la progresión tumoral es necesaria la participación de la inmunidad innata y la adaptativa en las etapas tempranas de transformación celular. Dentro de las células innatas que participan en la respuesta antitumoral se encuentran las células NK, las cuales son las principales en montar una respuesta citotóxica mediante interacciones de receptores de citotoxicidad natural y ligandos expresados en células de melanoma, también pueden contribuir indirectamente con el reclutamiento y maduración de células presentadoras de antígeno por la liberación de diferentes quimiocinas como CXCL1, CCL5. De este modo los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (DC) llegan al tejido tumoral para ejercer funciones como fagocitosis, secreción de moléculas tumorocidas (ROS, NO e INF- $\gamma$ ) y quimiocinas. La fagocitosis de células apoptóticas o desechos de estas, impulsará la respuesta adaptativa mediante la presentación antigénica una vez que las células dendríticas migran al ganglio más cercano para realizar la presentación a células T vírgenes. Del mismo modo, éstas células fagocíticas secretan citocinas para el desarrollo adecuado de células T efectoras, las cuales juegan un papel fundamental, como en el caso de linfocitos TCD8+, que son las encargadas de liberar perforina y granzimas, mientras que los linfocitos TCD4+ interactúan con los linfocitos B originando la producción de anticuerpos específicos para los antígenos asociados a tumores (TAA) conllevando así a una citotoxicidad mediada por anticuerpos por parte de células NK (figura 5), (Marzagalli, M.,2019 y Passarelli, A.,2017).

Ya hemos hablado de la respuesta antitumoral por parte del sistema inmune, sin embargo, se sabe que las células del melanoma tienen un alto potencial de la evasión de dicha respuesta y esto involucra diferentes factores como la liberación continua y exacerbada de TAA, agotando a los linfocitos T o disminuyéndolos (Marzagalli, M.,2019). Además, se ha observado que pueden modificar el comportamiento de células como fibroblastos que contribuyen a la liberación de moléculas inmunosupresoras y al mismo tiempo inducir la expresión de PDL1 en las células de melanoma que promueve el agotamiento de linfocitos efectores T CD4 y CD8, lo que ayuda en la progresión tumoral. También se ha demostrado que tienen la capacidad de inducir una expresión baja de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y moléculas co-estimuladoras en células presentadoras de antígeno y producción defectuosa de quimiocinas (Margolin, K., 2014; Marzagalli, M.,2019). Todo este ambiente protumoral da pauta al reclutamiento y/o diferenciación de linfocito T reguladores que podrán inhibir las respuestas antitumorales por la expresión de moléculas como CTLA4 y la producción de IL-10, TGF-B e IDO (Figura 6), (Margolin, K., 2014).



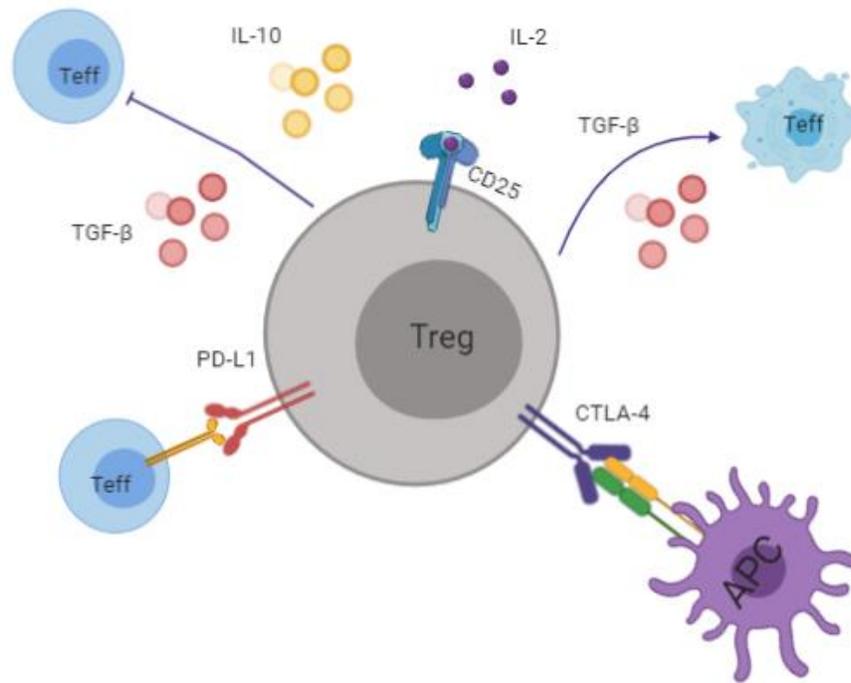
**Figura 6. Escape inmunológico en melanoma.** Las células tumorales en melanoma adquieren la capacidad de evadir el sistema inmune por diferentes mecanismos de inmunosupresión (Biorender).

## Linfocitos T reguladores en Melanoma

Como ya se mencionó anteriormente, la modulación reguladora persistente del microambiente tumoral es determinante para la progresión del melanoma, esto también se ha corroborado en la clínica ya que la administración de terapias con  $\text{INF-}\alpha$  e  $\text{IL-}2$  que ayudan a aumentar la respuesta antitumoral por linfocitos T efectores y NK, después de un tiempo dejan de funcionar, buscando respuesta a esto se encontraron aumentadas citocinas como  $\text{IL-}10$  y  $\text{TGF-}\beta$  sugiriendo que su persistencia reguladora es un punto fundamental en la modulación de la respuesta antitumoral (Leonardi, G. y cols., 2018).

Dentro de este ambiente regulador se encuentran los linfocitos del mismo nombre, se sabe que en condiciones de homeostasis estas células son las encargadas de proporcionar tolerancia y la eliminación de estas células induce autoinmunidad.

En diversos estudios se ha demostrado que la presencia de linfocitos T reguladores dentro del microambiente tumoral contribuye de manera positiva a la persistencia de melanoma, por ello el reclutamiento de estos linfocitos es clave y se ha descrito que la migración de estos se debe a las quimiocinas  $\text{CCL}22$  y  $\text{CCL}3$ . Además, la presencia de otros mediadores como  $\text{IDO}$  e  $\text{IL-}10$  en este entorno puede inducir una conversión de linfocitos efectores a un fenotipo regulador y la presencia de  $\text{TGF-}\beta$  promueve la supervivencia de linfocitos T reguladores y la apoptosis de T efectores. Asimismo, la expresión de moléculas inhibitorias como  $\text{CTLA}4$  y  $\text{PDL-}1$  evitan la activación de linfocitos por parte de células presentadoras de antígeno (Figura 7), (Ouyang, Z., 2016).



**Figura 7. Linfocitos T reguladores en Melanoma.** Durante la progresión del melanoma se han descrito diversas funciones para los linfocitos T reguladores en el microambiente tumoral en melanoma como: secreción de citocinas inmunosupresoras y expresión de moléculas inhibitorias (Biorender).

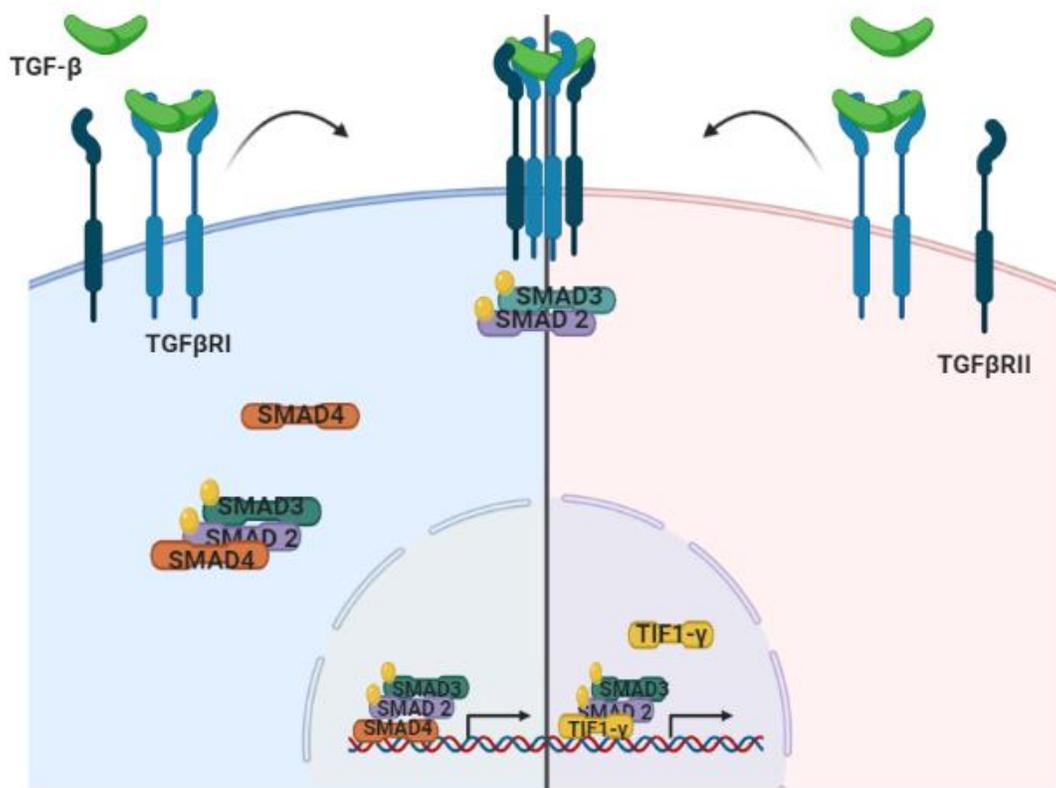
Mc Carter y cols. en 2007 informaron que los pacientes con melanoma conforme avanzan en la progresión tumoral muestran aumento del número de linfocitos T reguladores en sangre periférica. Cuando observaron la relación de estas células con respecto al total de linfocitos CD4 se observó que los linfocitos T reguladores constituían una proporción significativa en pacientes con melanoma metastásico en comparación con los controles normales. En este mismo estudio se determinó los niveles de TGF-B en suero, observando que eran significativamente mayores en pacientes con melanoma primario y metastásico. Los hallazgos anteriores sugieren que conforme avanza la enfermedad el ambiente regulador es indispensable para la persistencia del tumor. Aunado a esto se observó que la acumulación de estas células dentro de microambiente tumoral era directamente proporcional a la disminución en la supervivencia.

En otros estudios con modelos de melanoma murino el agotamiento de linfocitos T reguladores mejora la respuesta antitumoral y la supervivencia (Ouyang, Z.,2016). Como la mayoría de los antígenos tumorales son autoantígenos se ha informado que estos también pueden inducir linfocitos T reguladores tumor específico y de este modo suprimir la respuesta antitumoral de una manera más eficaz (Fujii, H., 2016). Por otro lado, Vence, L. y cols. en 2007 demostraron que, en sangre periférica de pacientes con melanoma metastásico, existían grupos de linfocitos Tregs tumor específicos y que estos mantenían la expresión de FoxP3 y la producción de citocinas reguladoras, sugiriendo nuevamente que la presencia de estos linfocitos es clave para persistencia tumoral.

#### TGF- $\beta$ en melanoma

Se sabe que la familia de los factores de crecimiento transformante está conformada por más de 30 proteínas, involucrados en acciones pleiotrópicas como el crecimiento, supervivencia, migración y diferenciación (Yu, Y. y cols., 2019). La señalización de TGF- $\beta$  comienza con la unión de ligando al receptor T $\beta$ RII y luego el reclutamiento y fosforilación de T $\beta$ RI formando un complejo heterotetramérico el cual activara vías dependientes e Independientes de SMAD's (Hata, A., y Chen, Y. G., 2016). Las proteínas SMAD son factores moleculares conformado por 8 proteínas que a su vez se dividen en tres grupos funcionales: regulados por receptores (R-SMAD: 1, 2,3, 5 y 8), SMAD común (co-SMAD:4) y SMAD inhibidores (I-SMAD: 6 y 7), (Yu, Y. y cols., 2019). Una vez activo el complejo de receptores recluta y fosforila a SMAD 2 y 3, induciendo la interacción con SMAD4, una vez formado este complejo se traslocará a núcleo para regular la expresión de genes (Hata, A., y Chen, Y. G., 2016; Yu, Y. y cols., 2019). Se ha descrito que además de SMAD 4 existe otro factor llamado TIF-1 y que puede interactuar con SMAD2/3, sustituyendo la función de co-SMAD, pero también regulando la expresión de genes (figura 8), (Yu, Y. y cols., 2019).

El rol de TGF- $\beta$  dentro del microambiente tumoral es controvertido dado que en algunos cánceres la presencia de este suele asociarse con un mejor pronóstico, en el caso de melanoma no es así y se ha relacionado con el avance en el estadio del paciente (Javelaud, D.,2008). Laudén, L. y cols. en 2014 demostraron en muestras de pacientes y líneas celulares, que los melanomas metastásicos producen mayor cantidad de TGF- $\beta$ , en este mismo estudio demostraron que TGF- $\beta$  es necesario para la supervivencia y proliferación y que la ausencia de este, conlleva a una progresión defectuosa del ciclo celular y por ende a una eliminación del tumor.

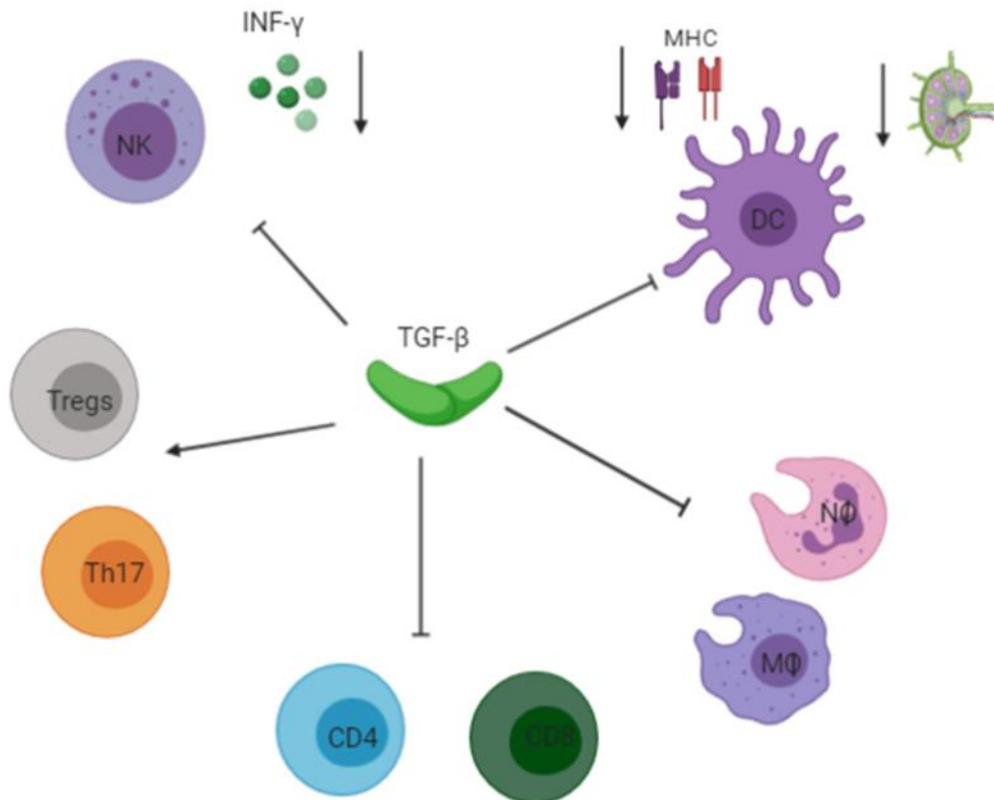


**Figura 8. Vía de señalización de TGF- $\beta$ .** La unión de TGF- $\beta$  activará el receptor desencadenando una señal río abajo mediada por SMAD's (Biorender).

En un estudio realizado por Tuncer, E, y cols. en 2019 observaron en células de melanoma que la inhibición de la señalización río abajo de TGF- $\beta$  por SMAD's previene la progresión tumoral, mientras que la actividad sostenida por ausencia de regulación por SMAD7 aumenta el potencial metastásico.

Por otro lado, en algunos otros estudios se han descrito diversos mecanismos en los que participa el TGF- $\beta$  como: la activación de folistatina que inhibe la apoptosis, suprime la expresión de SKI un oncogén y filamina ambos asociados con la inactivación de proteínas SMAD y la regulación de la expresión de MHC de clase I (Hussein M. R.,2005).

Dentro de este microambiente, la presencia de TGF- $\beta$  juega otro papel que involucra su señalización en células del sistema inmune (Figura 9) donde su funcionalidad se basa en la supresión de una respuesta contra el tumor. Esta citocina ejerce efectos sobre las diferentes células que comprenden el sistema inmune como las células NK donde disminuye la producción de INF- $\gamma$  y su actividad lítica por la inhibición de receptores en la superficie de estas células. En el caso de células dendríticas fomenta una disminución en la presentación de antígeno y/o que estas induzcan tolerancia, además afecta la migración de estas a ganglios linfáticos. Por otra parte, en macrófagos y



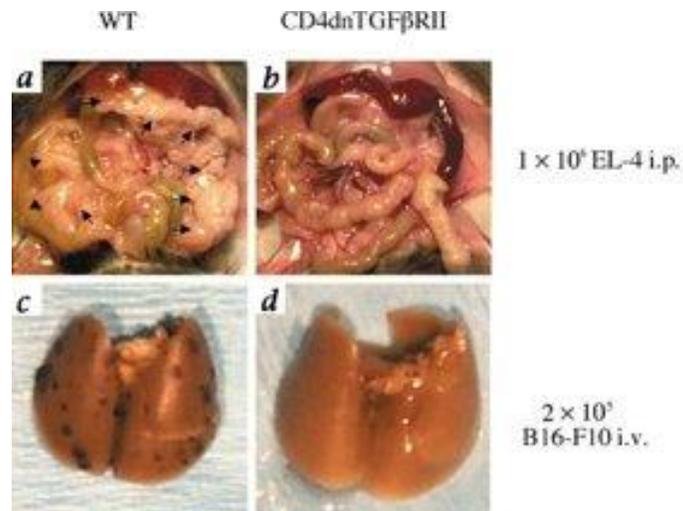
**Figura 9. Efecto de TGF- $\beta$  en células del sistema inmune en melanoma.** TGF- $\beta$  tiene efectos pleiotrópicos en diferentes células del sistema inmune, disminuyendo la respuesta antitumoral y promoviendo un ambiente regulador.

neutrófilos provoca una transición de un fenotipo antitumoral a uno regulador, que también podrán influir sobre la respuesta de linfocitos T efectores (Flavell, R. y cols.,2010, y Lee, N., y cols., 2015). Con lo que respecta a linfocitos T ya se sabe que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tienen un papel crucial en la inmunidad antitumoral ya que ejercen actividad citotóxica específica, sin embargo, esta se ve afectada con la presencia de TGF- $\beta$  y cuando la señalización de este se bloquea en linfocitos T recuperan su capacidad efectora (Flavell, R. y cols.,2010). Para los linfocitos CD4<sup>+</sup> la señalización de TGF- $\beta$  induce un cambio en el fenotipo, propiciando la expresión de FoxP3 y ROR $\gamma$ t, provocando la diferenciación a células Treg y Th17, respectivamente. En consecuencia, la inducción de linfocitos T regs y el reclutamiento de estos al tumor propicia un ambiente de inmunosupresión dado que estas células además de producir citocinas reguladoras también pueden expresar moléculas en su membrana con la capacidad de inhibir a linfocitos efectores y células presentadoras de antígeno y de este modo evitar aún más una respuesta contra el tumor (Flavell, R. y cols.,2010, y Lee, N., y cols., 2015).

## **Antecedentes**

Dado que TGF- $\beta$  tiene un papel dual ya que puede inducir, inhibir o promover la respuesta de los diferentes subtipos de linfocitos T, algunos estudios han explorado el bloqueo de esta vía para tratar de definir su influencia sobre el crecimiento tumoral. En el trabajo realizado por Gorelik, L. y Flavell, R. en 2001 demostraron que la inhibición de la señal de TGF- $\beta$  en linfocitos T inhibe al crecimiento tumoral. Usando un modelo transgénico que expresan un receptor dominante negativo TGF- $\beta$ RII en linfocitos T que las hace insensibles a la señalización de TGF- $\beta$ ; se observó que los ratones transgénicos no desarrollaron tumores mientras que los ratones silvestres sí, cuando se les inoculaban células de tumor EL-4. Así mismo, se desafiaron con células de melanoma metastásico (B16-F10) por vía intravenosa, después

de 3 semanas, los ratones silvestres tuvieron metástasis en los pulmones no siendo así en los ratones transgénicos (figura 10).



**Figura 10. El bloqueo de la señal de TGF-  $\beta$  en linfocitos T impide el crecimiento tumoral.** a y c ratones silvestres y b y d ratones transgénicos. Se inocularon con líneas tumorales de timoma (cavidad peritoneal) y melanoma (metástasis pulmonar), por vía peritoneal o intravenosa, respectivamente. Se observa crecimiento tumoral (a y b) o metástasis (c y d) (Gorelik, L. y Flavell, R., 2001).

En este mismo trabajo se preguntaron si una de las subpoblaciones de linfocitos tenía una mayor participación en la respuesta antitumoral, por ello, se eliminaron linfocitos T mediante el uso de anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8. En ratones transgénicos se observó que al eliminar uno u otra subpoblación los ratones presentaron tumores y murieron en los mismos días, en conclusión, se requiere de ambas subpoblaciones para montar una eficiente respuesta antitumoral (Tabla 2).

Como ya se ha mencionado anteriormente una de las terapias utilizadas en pacientes con melanoma es la administración de IL-2 para inducir la proliferación de células citotóxicas. En un estudio realizado por Park, J. y cols. en 2012 se planteó el uso de una terapia combinatoria de IL-2 y un fármaco inhibidor del receptor de TGF-B tipo I en nanopartículas de polímeros, estas se administraron con dosis semanales a ratones C57BL/6 que previamente se les inoculó células de melanoma B16-F10. El sólo uso

**Tabla 2. Se requiere del bloqueo de TGF-B en linfocitos T para controlar el crecimiento tumoral.** Reconstitución de ratones deficientes de Rag con combinaciones de linfocitos transgénicos y silvestres en un modelo de melanoma (Gorelik, L. y Flavell, R., 2001).

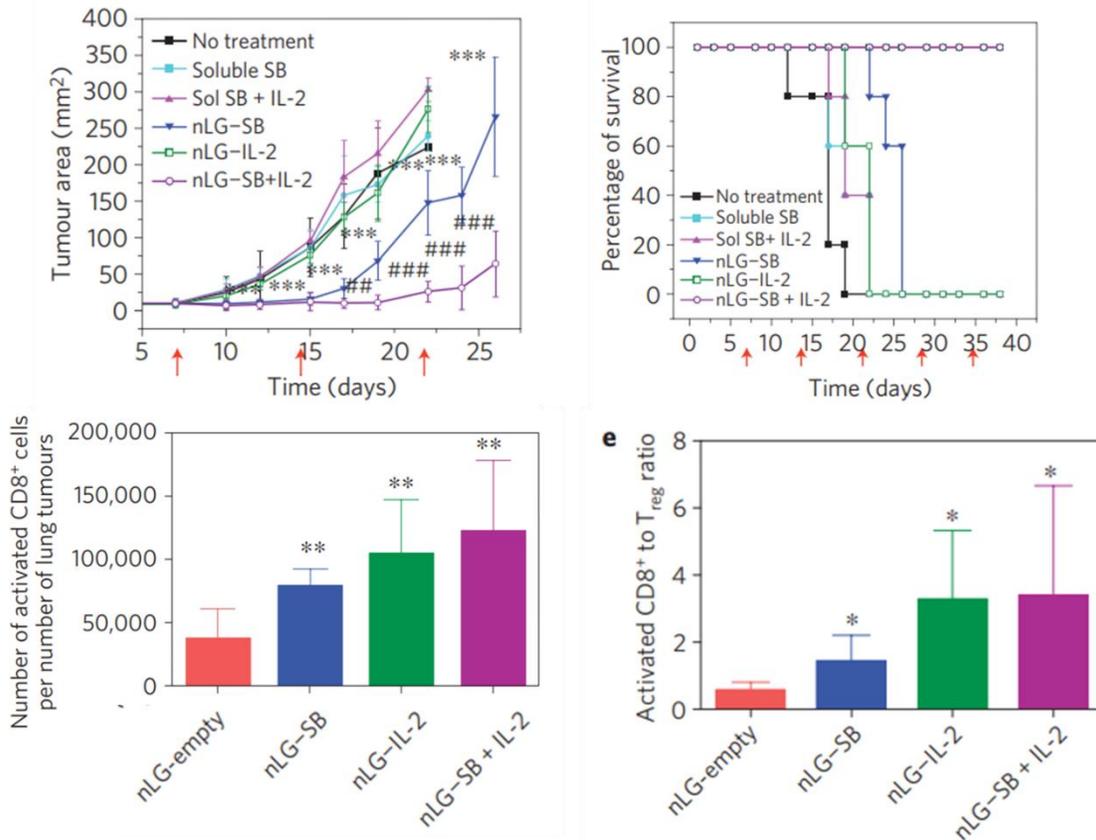
**Table 1 Requirement for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in tumor resistance of CD4dnTGF-RII mice.**

Treatment*	Percent of mice tumor free/survival time	
	WT	dnTGF-RII
PBS	0/14	100/>90
anti-CD4	0/13	0/13
anti-CD8	0/12	0/12

\*, Mice were treated with 0.2 mg per mouse per injection of indicated antibodies or PBS as control on days -1, 2 and 5, and injected with  $1 \times 10^6$  EL-4 cells on day 0. Three mice per treatment group were used.

del inhibidor o en combinación con IL-2, disminuyó el tamaño del tumor y aumentó la sobrevivencia de los animales, así mismo, se demostró que el número de células CD8 aumentó cuando se inhibió la vía de TGF-B y que la relación CD8/Tregs aumentó, sin embargo, en este punto no se sabe si este cambio en la relación se debe a que el bloqueo de la señal repercute más en una subpoblación que en otra (Figura 11).

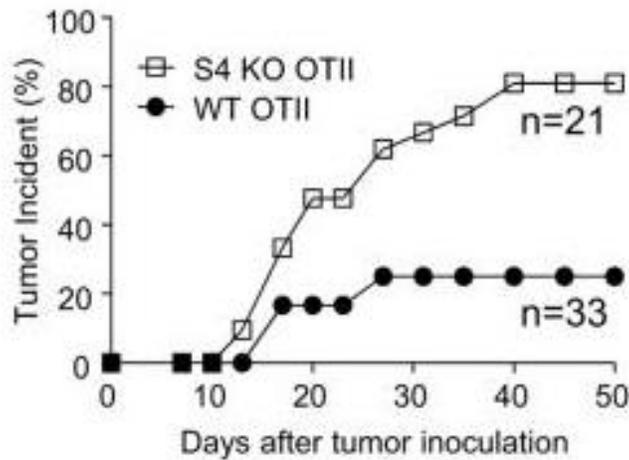
Como se ha mencionado antes la señalización río abajo del receptor de TGF-B esta dado por una familia de proteínas denominada SMAD las cuales activarán diversos genes, una de estas proteínas es SMAD 4. En un estudio utilizaron ratones condicionales en los que se eliminó SMAD4 en linfocitos T CD4 y se cruzaron con ratones OTII (TCR específico para un péptido de Ovalbúmina), estos fueron inoculados con células B16-OVA y se midió la incidencia de tumores encontrando que en aquellos ratones cuyos linfocitos T carecían de SMAD 4 la incidencia era mayor comparada con los ratones control. Con este dato se puede sugerir que TGF-B influye sobre las



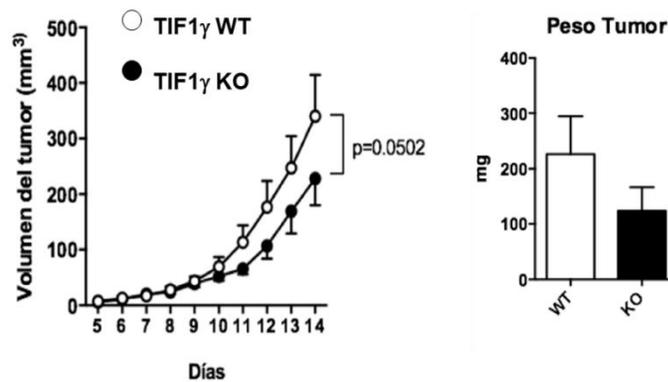
**Figura 11. Uso de bloqueadores de TGF- $\beta$  influyen en el crecimiento tumoral.** Usando un fármaco inhibidor del receptor tipo I de TGF- $\beta$ , se limita el crecimiento tumoral y se aumenta la respuesta antitumoral (Park, J. y cols., 2012).

poblaciones de linfocitos T, sin embargo, nuevamente no se sabe si la ausencia de la vía en linfocitos efectores o reguladores es el que influye sobre el crecimiento tumoral (Figura 12), (Gu, A. D. y cols., 2019).

Por otro lado, se sabe que además de SMAD 4 la señal de TGF- $\beta$  se puede llevar a cabo por otra proteína llamada TIF1- $\gamma$ , en el laboratorio de la Dra Licona se realizó un experimento donde se utilizaron ratones cuyos linfocitos T son deficientes de TIF1- $\gamma$  o silvestres, se inocularon con la línea de melanoma B16-F10 y se observó que aquellos ratones cuyos linfocitos T eran carentes de TIF1- $\gamma$  tenían una disminución significativa en el crecimiento tumoral en comparación con los ratones silvestres (Figura 13), (datos sin publicar, tesis de maestría de Eugenio Contreras, 2019).



**Figura 13.** La ausencia de *SMAD4* en linfocitos *T* aumenta la incidencia tumoral. Ratones condicionales deficientes de *SMAD 4* se cruzaron con *OTII* y se inocularon con melanoma *B16-OVA*. Se midió la incidencia de tumores (Gu, A. D. y cols., 2019).



**Figura 12.** La deficiencia de *TIF1-y* disminuye el crecimiento tumoral. Se inoculó la línea de melanoma *B16* en ratones silvestres y condicionales deficientes de *TIF1-y* en linfocitos *T*, se siguió el crecimiento y el peso del tumor (Eugenio Contreras, 2019).

Con todo lo anterior sabemos que la señalización de TGF- $\beta$  tiene efectos sobre las diferentes poblaciones de linfocitos *T* presentes en el microambiente tumoral, también se ha descrito que algunas terapias ya utilizadas en clínica fomentan la respuesta antitumoral, pero va perdiendo

efectividad con el paso del tiempo, y se ha atribuido al ambiente inmunosupresor influenciado principalmente por TGF-  $\beta$  en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Por esto es de suma importancia disectar el efecto a nivel molecular en cada subtipo en estas células. Dentro de estas subpoblaciones ya se ha mencionado que los linfocitos Tregs juegan un papel muy importante por lo que en este trabajo se dilucidará la vía molecular que regula su fenotipo y como afecta el entorno tumoral, lo que permitirá diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

## **Justificación**

Dada la influencia de la señal de TGF-  $\beta$  en la respuesta antitumoral por linfocitos T; la evidencia que si esta señal es mediada por SMAD 4 o TIF1-  $\gamma$  promueve efectos opuestos en esta respuesta, y conociendo el importante papel de linfocitos Tregs en la progresión del tumor. Es imprescindible dilucidar como se regula molecularmente la vía de TGF-  $\beta$  en esta subpoblación con la finalidad de establecer blancos moleculares que permitan diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

## **Hipótesis**

La señal de respuesta al TGF- $\beta$  a través de TIF1- $\gamma$  controla la función de linfocitos T reguladores durante la respuesta inmune contra melanoma.

## Objetivo general

Caracterizar el fenotipo de linfocitos T reguladores tumor específicos y su respuesta a la señal del TGF-  $\beta$  en ausencia de TIF1 $\gamma$  en un modelo de melanoma murino.

## Objetivos particulares

1. Medir la expresión de SMAD4 y TIF1- $\gamma$  en diferentes poblaciones de linfocitos de bazo y ganglios linfáticos.
2. Generar un modelo murino de linfocitos T reguladores deficientes de TIF1- $\gamma$  tumor específicos.
3. Editar genéticamente poblaciones de linfocitos T reguladores tumor específicos para la eliminación de TIF1- $\gamma$  o SMAD 4 mediante CRISPR.
4. Caracterizar el fenotipo de linfocitos T reguladores deficientes de TIF1- $\gamma$  y SMAD 4 tumor específicos y su impacto en el crecimiento tumoral.

## Materiales y métodos

Separación de diferentes poblaciones de linfocitos T a partir de Bazo y Ganglio.

Para medir la expresión de SMAD 4 y TIF1- $\gamma$  en diferentes poblaciones de linfocitos T, primeramente, se obtuvieron Bazo y Ganglios a partir de un ratón reportero para Foxp3 (Foxp3-GFP), estos fueron colocados en cajas petri Corning que contenían un par de mallas y 1 mL de RPMI suplementado (10 % de SFB + 1x antibiótico y 1x de aminoácidos). A continuación, se disgregaron, se tomó la suspensión celular y cada uno se colocó en un tubo falcon de 15 mL, se lavaron colocando medio RPMI y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante, se colocó 1 mL de buffer de lisis de eritrocitos y se incubó por 3 minutos a T° amb, se colocaron 2mL de RPMI frío, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 3mL de FACS-flow a cada muestra y se separaron en 3 tubos, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se incubaron usando 2 cocteles de anticuerpos: 1) viabilidad-zombie red,  $\alpha$ -CD4-Percp-Cy5.5,  $\alpha$ -CD25-PB,  $\alpha$ -CD62L-PE,  $\alpha$ -CD44-PE-Cy7 y GFP (Foxp3-GFP), y 2) viabilidad-zombie red,  $\alpha$ -CD4-Percp-Cy5.5,  $\alpha$ -CD8- PB y  $\alpha$ -CD19-PE, de esta manera pudimos identificar y purificar por citometría de flujo: Linfocitos B, CD4 naives, efectores, de memoria, reguladores y totales, y CD8 totales.

Extracción de RNA.

Las 100000 células purificadas de cada población se recolectaron en tubos de ensayo de 5mL con 500  $\mu$ L de Trizol y se congelaron a -20°C. Al día siguiente las muestras fueron descongeladas y luego se colocaron en tubos eppendorf. Se agregaron 100  $\mu$ L de cloroformo, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos. Las muestras contenían dos fases, una acuosa y otra orgánica, se tomó la fase acuosa y se colocó en otro tubo eppendorf se agregaron 10  $\mu$ g de glicógeno y 250  $\mu$ L de isopropanol, se agitaron gentilmente e incubaron 10 minutos a

T° amb. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregaron 500 µL de Etanol 75%, seguido de una agitación vigorosa. Después se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos, se retiró el Etanol (dejar una gota para que la muestra no se seque). Por último, se coloca 20 µL de agua, se cuantificó y se almacenó a -70°C.

#### Obtención de cDNA

A partir de la extracción se colocaron alrededor de 760 ng de RNA en un tubo y se adicionaron 1 µL de dNTP's y 1 µL oligo dT, se incubó a 65°C por un minuto y se colocó en hielo inmediatamente. A continuación, se añadieron 4 µL de buffer 5X First-Strand y 2 µL de DTT 0.1M, se mezcló e incubó a 42°C por 2 minutos, se agregó 1 µL de Super Script II Reverse Transcriptase (invitrogen) e incubó a 42°C por 50 minutos, terminado este periodo se inactivó por 70°C por 15 minutos. Finalmente se adicionaron 60 µL de agua y se almacena a -20°C.

#### RT-qPCR

En una placa de 96 pozos para PCR se colocó 1 µL de cDNA de las muestras (por triplicado) y a cada uno se le agregaron 9 µL de mix (5 µL de master mix, 0.2 µL de primers, 0.2 Rox high, 0.3 µL de DMSO y 3.2 µL de agua). Una vez hecho se colocó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 95-3 minutos, 90- 3 segundos, 60-20 segundos y melt core continua.

#### Animales

Con la finalidad de obtener linfocitos Tregs tumor específicos y deficientes en TIF1-γ, se generaron ratones reporteros para Foxp3 (Foxp3-GFP), deficientes de TIF1-γ y tumor específicos (OTII). Para ello se utilizaron 4 cepas diferentes. Para la cepa OTII/Foxp3 (Foxp3-GFP) se cruzaron ratones hembra reporteros para Foxp3 (Foxp3-GFP) y un ratón macho OTII (Donado por el Dr. Leopoldo Santos Argumedo) y posteriormente se hicieron cruza entre la progenie de esta primera cruz, generando ratones de la cepa OTII-Foxp3. En el caso de la cepa OTII/ TIF1-γ f/f/CD4cre/Foxp3-GFP se cruzaron

ratones hembra reporteros OTII (Donado por el Dr. Leopoldo Santos Argumedo) con un ratón macho TIF1- $\gamma$  f/f/CD4cre/Foxp3-GFP y posteriormente la progenie se sigue cruzando. Por otro lado, se cruzaron ratones hembra OTII/Foxp3 con un ratón Rip-mOVA/Foxp3/OTII continuando con la cruce de la progenie para generar la cepa Rip-mOVA/Foxp3/OTII. Por último, para la cepa OTII/Rip-mOVA/Foxp3/ TIF1- $\gamma$  f/f/CD4cre se cruzarán ratones hembra Rip-mOVA/Foxp3/OTII con un ratón macho OTII/ TIF1- $\gamma$  f/f/CD4cre/Foxp3. A la par de estas cepas se expanden los ratones CD45.1 que serán el grupo receptor de los linfocitos Tregs transferidos.

#### Genotipificación

Para genotipificar los ratones se realizó PCR de punto final para determinar la presencia o ausencia de: Foxp3-GFP, TIF1- $\gamma$  flox, CD4cre y Rip-mOVA.

En primer lugar, se realizó una extracción de DNA a partir de una biopsia de dedos tomada a los 10-12 días del nacimiento, se colocaron en un tubo y se adicionó 150  $\mu$ L de buffer de lisis (50mM Tris pH8 .0, 50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 0.45% NP40 (Nonident-40) y 0.45% Tween 20) + 1  $\mu$ L de proteinasa K (Goldbio DBK-P480; 20  $\mu$ g/mL) y se incubó a 56°C por toda la noche. Transcurrido esto se centrifugaron a 130000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 150  $\mu$ L de buffer de lisis. Se procedió a realizar la PCR de acuerdo con las siguientes condiciones de reacción: H<sub>2</sub>O: 6.9  $\mu$ L, Buffer: 1  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>: 0.4  $\mu$ L, dNTP´s: 0.2  $\mu$ L, Primers: 0.4  $\mu$ L, Taq: 0.1  $\mu$ L y DNA: 1  $\mu$ L. A continuación, se desglosan las condiciones para cada uno de los transgenes y los oligos que se usaron:

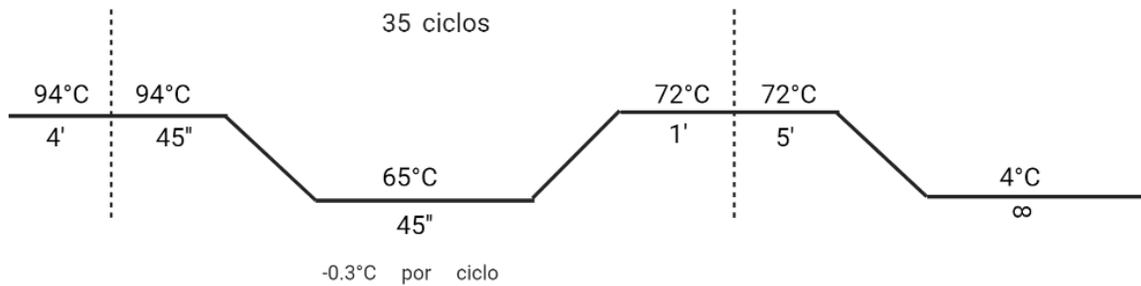
#### Oligos CD4 Cre.

Fwd: 5' TAGTTTGGCAGGACCTTTGG 3'

Rev<sub>WT</sub>: 5' TGGTCCCCAAGTCAGAAAC 3'

Rev<sub>CD4cre</sub>: 5' GCAAACGGACAGAAGCATTT 3'

Productos esperados: CD4 Cre: 400pb CD4 WT: 297pb

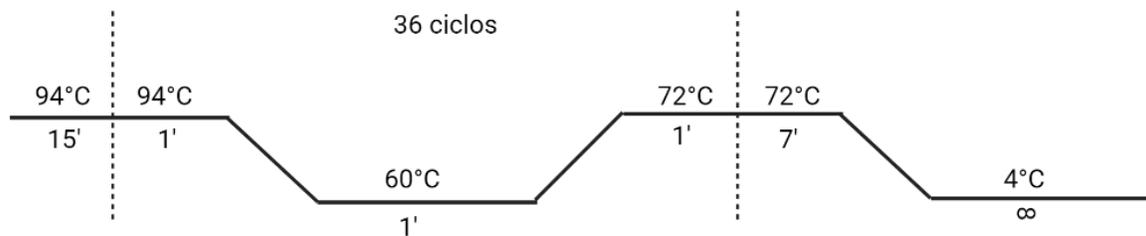


### Oligos TIF1g fx/fx

Fwd: 5' CCCCAGTTGTCCTGGA ACTA 3'

Rev: 5' CCATCTGGGAAAGGAAAACA 3'

Productos esperados: TIF1g fx/fx: 180 pb WT: 237pb

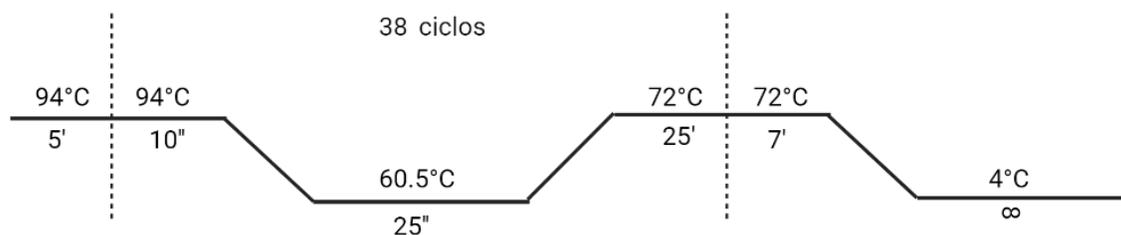


### Oligos Foxp3 GFP

Fwd: 5' CACCTATGCCACCCTTATCC 3'

Rev: 5' ATTGTGGGTCAAGGGAAG 3'

Productos esperados: Foxp3 GFP: 400 pb WT: 350 pb

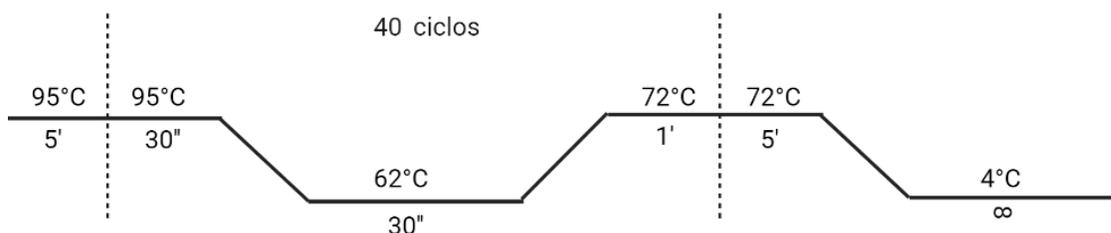


### Oligos Rip-mOVA

Fwd: 5' CAA GCA CAT CGC AAC CA 3'

Rev: 5' GCA ATT GCC TTG TCA GCA T 3'

Productos esperados: Rip-mOVA : 475pb



### Fenotipificación

Para determinar la expresión del receptor TCR-OTII se realizó una tinción de citometría. Para ello se colocaron 50 µL de EDTA [5µM] en un tubo eppendorf de 1.5mL, después se tomó una muestra de sangre realizando un pequeño corte en la cola de los ratones. Acto seguido se centrifugó el tubo a 1500 rpm por 5 minutos se decantó el sobrenadante, se colocó 1mL de buffer de lisis de eritrocitos y se incubó por 3 minutos a T° amb. Las muestras se colocaron en tubos de ensayo de 5 mL, una vez transcurrido el tiempo se adicionó 2mL de RPMI frío, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, y se decantó el sobrenadante. Por último, se colocaron anticuerpos: α-CD4-PB, α-TCR α2-PE y α-TCR β5.1 y 5.2-Percp-Cy5.5 (Biolegend) y se incubaron a 4°C por

30 minutos, después se lavaron con FACS-flow y centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, las células se resuspendieron en 300 µL de FACS-flow. Las muestras se analizaron en un citómetro FACS-Melody.

#### Diseño de RNA guías

Para el diseño de RNA guías se buscó la secuencia de SMAD4 y TIF1-γ en ENSEMBL. Esta secuencia se analizó y se eligieron algunos exones candidatos en base a los dominios funcionales de estas proteínas. Una vez elegidos los blancos moleculares se procedió a la generación de las guías en dos programas diferentes (Crispor y Breaking cas). Se escogieron las de mayor puntaje en especificidad y eficacia en ambos programas y posteriormente se compararon con las guías prediseñadas en IDT (compañía donde se comprará el material para la edición genómica). De esta manera se eligieron los mejores candidatos que nos den mayor garantía de que con la edición se genere una deficiencia de SMAD4 ó TIF1-γ en linfocitos Tregs.

#### Modelo de melanoma y transferencia adoptiva de linfocitos Tregs.

Primeramente, se cultivaron células de melanoma murino B16-OVA en un matraz de cultivo U75 con medio DMEM suplementado (medio DMEM + 10 % de SFB + 1x antibiótico y 1x de aminoácidos). Se realizaron dos pases, en el segundo pase se tomaron 750000 células y se colocaron en cultivo nuevamente durante dos días, una vez pasado este tiempo se retiraron con 1mL de tripsina y se incubaron a 37°C por 3 minutos. La suspensión se colocó en un tubo falcon de 15 mL, se lavaron colocando medio DMEM y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, luego se contaron y se ajustaron a una dilución de  $1.25 \times 10^6$  células por mL. Después se indujo la formación de tumores en dos grupos de ratones CD45.1 (control y transferidos) inyectando por vía subcutánea 100 µL de la suspensión celular, 3 días antes de la transferencia adoptiva.

Los linfocitos Tregs para la transferencia se obtuvieron a partir de 2 ratones reporteros para Foxp3 (Foxp3-GFP de 6-8 semanas). Se realizó eutanasia por dislocación cervical, posteriormente se obtuvo bazo y ganglios, estos fueron colocados en cajas petri Corning con un par de mallas y 1 mL de RPMI suplementado (10 % de SFB + 1x antibiótico y 1x de aminoácidos). A continuación, se disgregaron con la parte trasera de un émbolo, friccionándolo contra las mallas hasta el que tejido quedó completamente desintegrado, se tomó el medio con el tejido disgregado y se colocó en un tubo falcon de 15 mL. Se lavaron con medio RPMI y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se resuspendieron en 500  $\mu$ L de FACS-flow (PBS1x + 10% SFB). Enseguida se realizó una purificación de linfocitos CD4 mediante MagniSort™ Mouse CD4 T cell Enrichment Kit (Invitrogen), las células se colocaron en un tubo de ensayo de 5mL, se agregaron 70  $\mu$ L del cóctel de anticuerpos y se incubó por 10 minutos a T° ambiente, seguido de esto se adicionaron 2 mL de FACS-flow y se centrifugaron a 1500 rpm por 5min se decantó el sobrenadante y se colocaron 500  $\mu$ L de FACS-flow. Finalmente, se adicionaron 60  $\mu$ L de perlas y se agregan 2 mL de FACS-flow, una vez hecho esto se insertaron el tubo en el imán y se incubaron por 5 minutos, pasado el tiempo las células se decantaron en otro tubo.

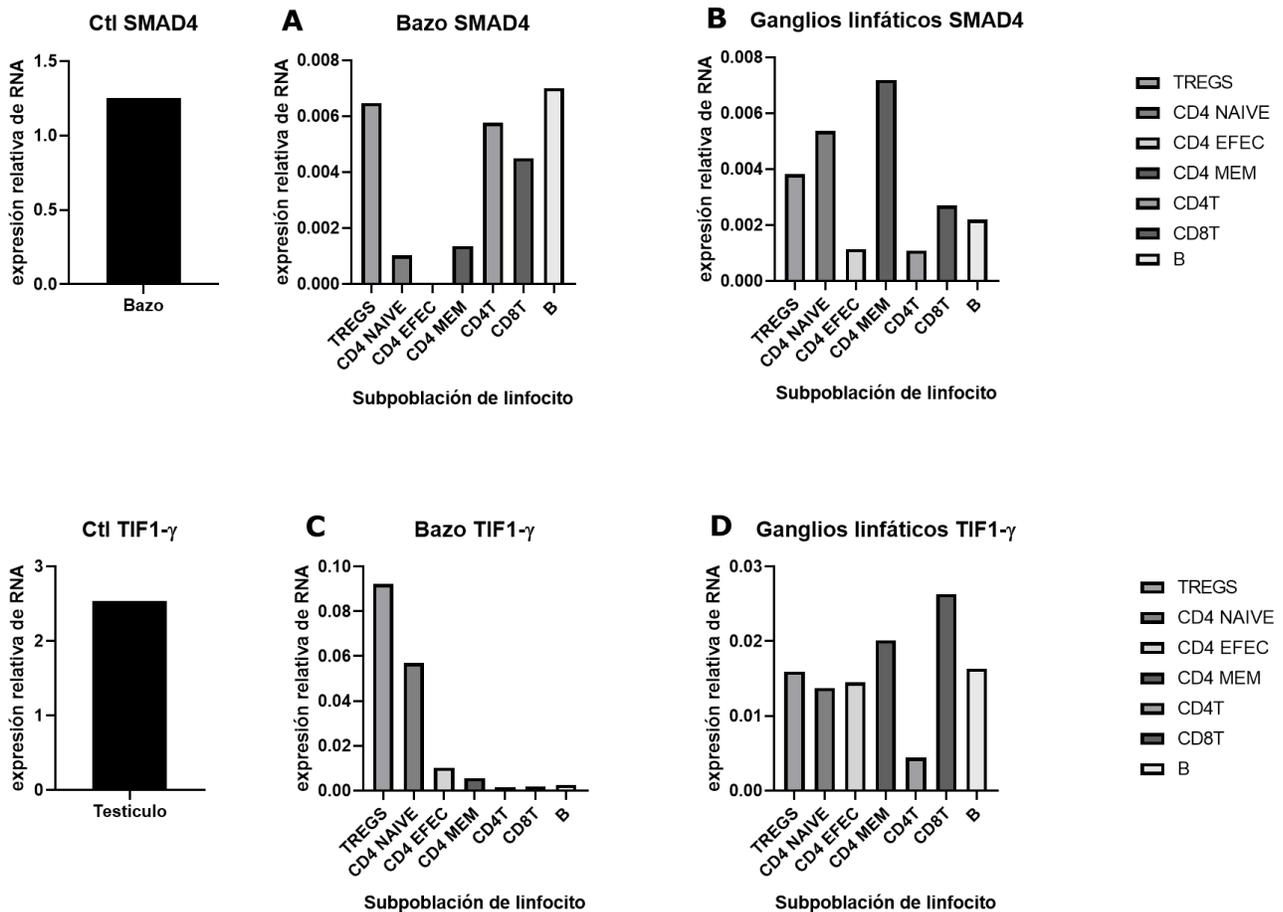
Una vez obtenidas las células se hizo una tinción con otro cóctel de anticuerpos: viabilidad-Zombie red,  $\alpha$ -CD4-Percp-Cy5.5,  $\alpha$ -CD25-PB (Biolegend) y Foxp3 se siguió por la marca de fluorescencia GFP, se incubaron a 4°C por 30 minutos, después se lavaron con FACS-flow y centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, las células se resuspendieron en 3 mL de FACS-flow. Se realizó una separación de linfocitos Tregs por citometría de flujo en un citómetro FACS- Aria II, siendo estos seleccionados como CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3-GFP<sup>+</sup>. Una vez obtenidos los linfocitos Tregs se centrifugaron, contaron y se llevaron a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL y otro tubo de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL.

Se tenían 2 grupos de ratones: grupo control o sin transferir (1 ratón), grupo de ratones transferidos (3 ratones), que a su vez esos ratones se dividieron en dos grupos: transferidos con  $2 \times 10^5$  células (2 ratones) y aquel con  $4 \times 10^5$  células (1 ratón). Las células se inocularon intraperitonealmente. Finalmente, se siguió el crecimiento tumoral dado por volumen y peso durante 16 días.

# Resultados

Expresión de SMAD4 y TIF1- $\gamma$  en diferentes poblaciones de linfocitos a partir de Bazo y Ganglio.

La expresión de TIF1- $\gamma$  y SMAD 4, se midió en diferentes poblaciones de linfocitos de Bazo y ganglios linfáticos purificados por citometría de flujo de un ratón reportero Foxp3-GFP. Una vez separados las siguientes subpoblaciones: Linfocitos B, CD4 naives, efectores, de memoria, reguladores y totales, y CD8 totales, se aisló RNA y a partir de este se generó cDNA el cual se utilizó en una reacción para RT-qPCR. Como controles se



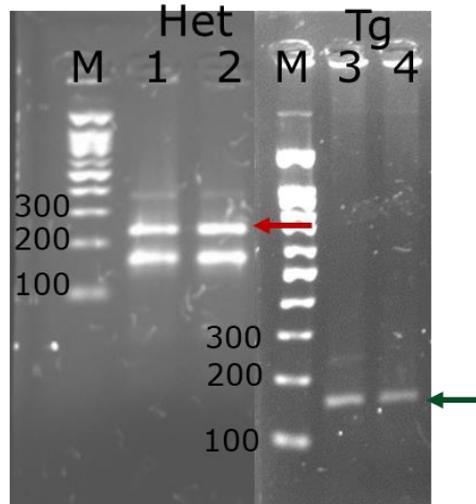
**Figura 14 Expresión de SMAD 4 y TIF1- $\gamma$  en Bazo y Ganglios. A y B.** En la gráfica se muestra la expresión relativa de SMAD 4 en diferentes subpoblaciones de linfocitos de Bazo y Ganglios, respectivamente. **C y D.** Se muestra la expresión relativa de TIF1- $\gamma$  en diferentes subpoblaciones de linfocitos en Bazo y Ganglios, respectivamente. Como control se usaron células totales de Bazo (SMAD 4) y testículos (TIF1- $\gamma$ ). Las muestras se obtuvieron de un ratón (Foxp3-GFP) y se analizaron por triplicado.

usaron Bazo y testículo. En la figura 14 se observa que las subpoblaciones presentan diferente expresión de SMAD 4 y TIF- $\gamma$  en ambos organos, en el caso particular de linfocitos T reguladores, estos presentan una mayor expresión de TIF1-  $\gamma$  en comparación con SMAD 4 tanto en bazo como en ganglios y, también más que otras poblaciones.

Generación de un modelo murino de linfocitos Tregs deficientes de TIF1- $\gamma$  tumor específicos.

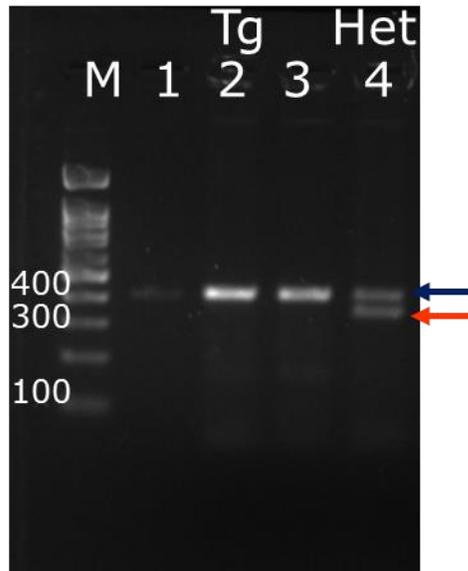
Tipificación de los ratones.

Para tipificar los ratones se usaron dos estrategias metodológicas la primera de ellas fue mediante PCR de punto final para corroborar si los ratones portaban los transgenes. En el caso particular de TRIM se esperaba una banda para el gen transgénico de 180 pb y de 237 pb para el gen silvestre, la presencia de ambas bandas corresponde a un ratón heterocigoto (figura 15). Esta tipificación se ha realizado en 28 ratones.



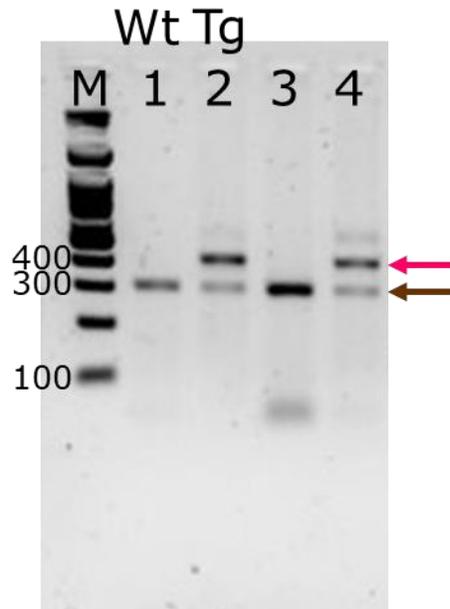
**Figura 15 PCR de TIF1- $\gamma$ .** Gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el fragmento de 237 pb esperado para el gen silvestre (flecha roja), mientras que el fragmento de 180 pb denota la presencia del transgén (flecha verde). La imagen representa a ratones heterocigotos (carriles 1 y 2) y ratones transgénicos (carriles 3 y 4).

Para la tipificación de ratones reporteros de Foxp3 se realizó otra PCR para detectar la presencia del transgén. En este sentido las bandas esperadas fueron de: 350 pb para el gen silvestre y 400 pb para el transgén (figura 16) Se han realizado alrededor de 101 tipificaciones.

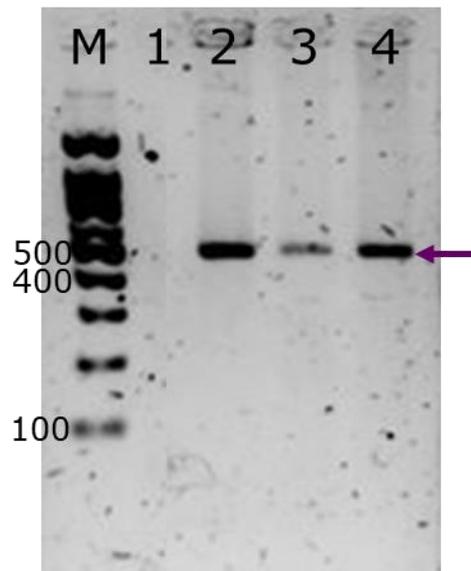


**Figura 16. PCR de GFP.** Gel de agarosa 1.5%, representa 3 ratones transgénicos (carriles 1-3) y 1 ratón heterocigoto (carril 4). Determinados por la presencia de un fragmento de 350 pb indicando el gen silvestre (flecha anaranjada) y 400 para el transgén (flecha azul).

Por otro lado, para identificar el transgén CD4cre también se realizó una PCR punto final en la cual se observa una banda de 297pb para el gen silvestre y 400 pb para el transgén, en el caso particular de este ratón la presencia de las dos bandas indica un ratón transgénico (figura 17). Cabe señalar que en este caso particular se han tipificado 22 ratones. Finalmente, la última tipificación por PCR punto final fue para identificar los ratones transgénicos RIP-mOVA, en la cual se espera una banda de 475 pb lo que indica la presencia del transgén mientras que para el gen silvestre se espera la ausencia de banda (figuras 18), hasta ahora se han tipificado 18 ratones.

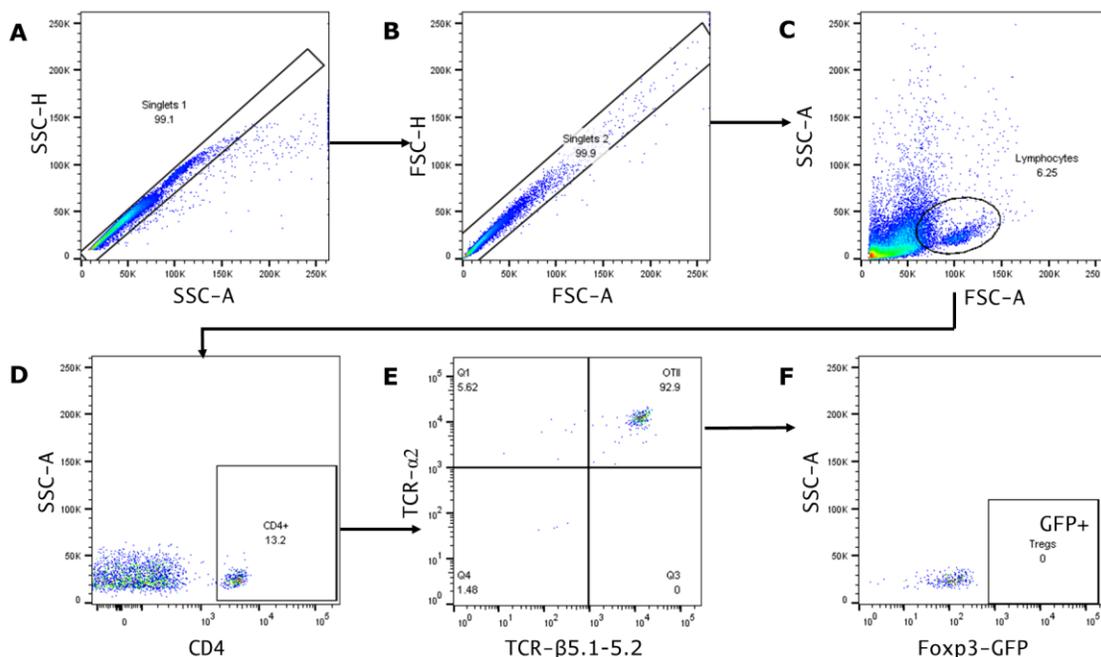


**Figura 17. PCR de CD4cre.** Gel de agarosa 1.5%, se observan dos fragmentos: uno de 297 pb para el gen silvestre (flecha café) y otro de 400pb para el transgén (flecha rosa). en la imagen se representan dos ratones silvestres (carriles 1 y 3) y dos ratones transgénicos (carriles dos y 4).



**Figura 18. PCR de Rip-mOVA.** Gel de agarosa 1.5%, se representan tres ratones transgénicos (carriles 2-4) y un ratón silvestre (carril 1). El transgén corresponde a un fragmento de 475 pb (flecha morada).

En cuanto al transgén TCR-OTII su expresión se observó mediante una tinción de citometría donde se usaron diferentes marcadores de superficie: CD4, TCR- $\alpha$ 2, TCR- $\beta$ 5.1 y 5.2 para identificar en primera instancia a los linfocitos CD4 con TCR  $\alpha$ 2/  $\beta$ 5.1 y 5.2 y a partir de estos, aquellos que expresara GFP que corresponderían a linfocitos T reguladores. Para esta determinación se extrajo una muestra de sangre a partir de cola de los ratones y posteriormente se realizó la tinción. Los datos obtenidos se analizaron de la siguiente manera: primero se eligieron los singuletes por tamaño y granularidad, a partir de estos se seleccionan los linfocitos. En base en estos se eligieron aquellos que fuera positivos para CD4, basándose en estos se seleccionan los dobles positivos para ambas cadenas de TCR. Una vez hecho esto se observó si algunos expresaban Foxp3 (Foxp3-GFP) (Figura 19).



**Figura 19. Caracterización de linfocitos OTII.** Se muestran distintas gráficas de puntos para mostrar la estrategia de caracterización de linfocitos CD4 TCR  $\alpha$ 2/  $\beta$ 5.1 y 5.2. A. Se muestran los eventos simples en base a granularidad. B. y tamaño. C. Selección de Linfocitos. D. Elección de CD4<sup>+</sup>. E. Linfocitos dobles positivos para ambas cadenas. F. Expresión de Foxp3 (Foxp3-GFP).

A manera de resumen se muestra en la tabla 3 la cantidad de ratones que se tiene por cada cepa actualmente.

**Tabla 3. Número de ratones por cada cepa.** La tabla muestra el nombre de cada cepa, generación a la que pertenece cada ratón y número de ratones existentes hasta este momento.

<b>Cepa de ratón</b>	<b>F</b>	<b>Número de ratones</b>
OTII/Foxp3-GFP (+/+)	2	23
OTII/Foxp3-GFP (+/+) / TIF1- $\gamma$ (f/f) /CD4cre	2	5
RIP-mOVA/Foxp3-GFP (+/+) /OTII/CD45.2	1	5
CD45.1	-	31

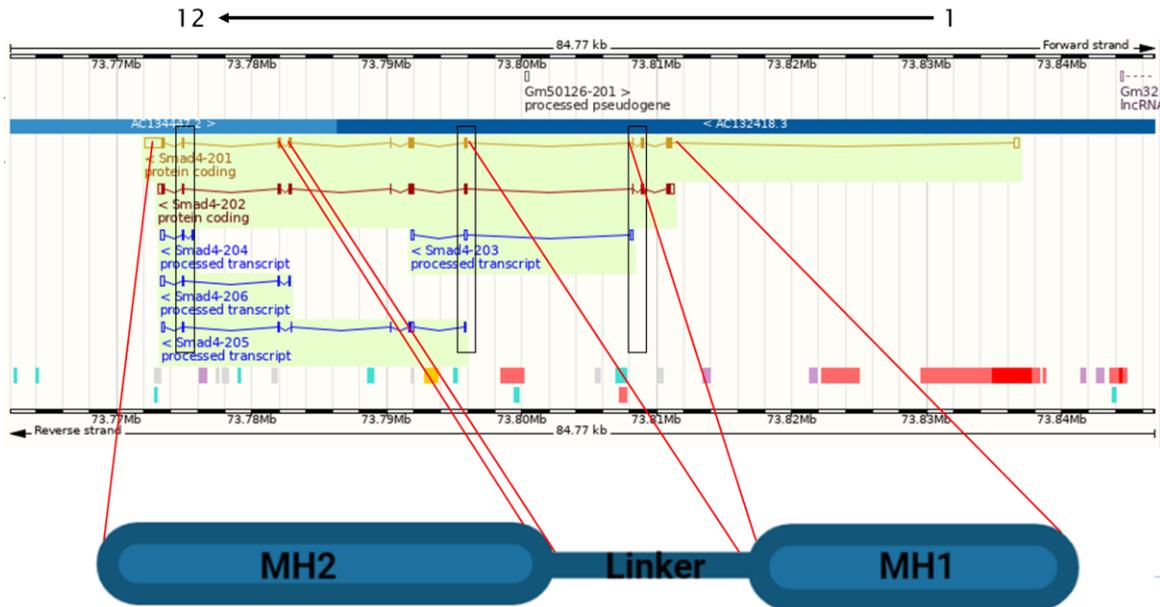
Edición de linfocitos Tregs tumor específicos para la eliminación de TIF1- $\gamma$  y SMAD4 mediante CRISPR. Diseño de RNA guías.

Para la edición de linfocitos T reguladores lo primero que se realizó fue el diseño de RNA guías. Para ello lo primero fue analizar la secuencia tanto de SMAD 4 como de TIF1- $\gamma$ , las cuales se obtuvieron de ENSEMBL. En el caso particular del gen de SMAD4, se han descrito 6 transcritos de los cuales solo dos son codificantes 201 y 202, están conformados por 12 exones y 11 exones, respectivamente. En el caso del transcrito 201 los exones 2-4 codifican para el dominio MH1, del 5-8 codifican la región denominada enlazadora o de unión y finalmente del 9-11 el dominio MH2 (figura 20). Una vez conociendo esto se consideraron los exones 2-4, 5-6 y 9-10 para generar las guías contra estas regiones del gen.

Para TIF1- $\gamma$  se han descrito 7 transcritos de los cuales 4 son codificantes (201, 202, 204 y 205). A partir de los transcritos 201 y 202 se codifica la proteína completa, de manera particular el transcrito 201 está constituido por 20 exones y estos codifican para diferentes dominios como: exones 1-8 que codifican dominio de ubiquitina ligasa, exones 8-14 para un dominio llamado enlazador intermedio, exón 15 codifica el dominio PHD y, por último, los exones 16-20 para el bromodominio (Figura 21). A partir de esta

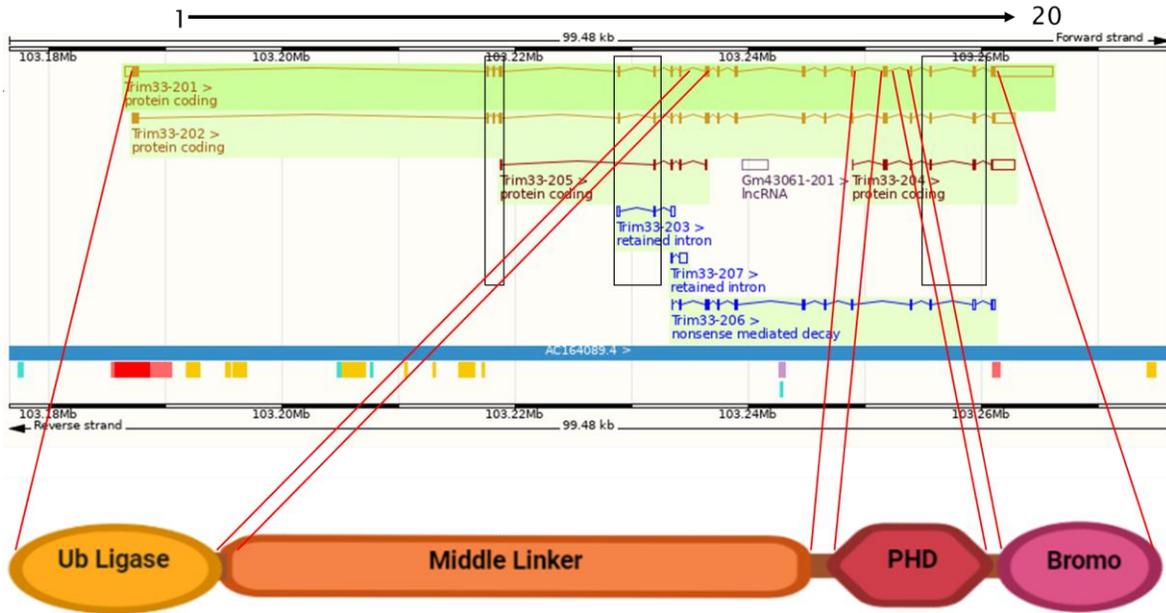
información se eligieron los exones 2-4, 6-7 y 16-17 para el desarrollo de las guías.

Una vez hecha la selección de los exones blanco, se prosigió con el uso de



**Figura 20. Mapa genético de SMAD4.** La imagen muestra la posición del gen dentro del cromosoma 18 (ratón), también muestra los 6 transcritos descritos hasta ahora. Se exhibe la proteína codificada por el transcrito SMAD4-201 está compuesta por 12 exones (uno de los dos codificantes). Los cuales codifican para tres dominios de la proteína: MH1, enlazador y MH2 (ENSEMBL 2021, 2021; creado con BioRender.com)

los programas CRISPOR y Breaking cas para generar las guías. Se tomaron las secuencias de los exones de la plataforma de ENSEMBL; cuando se trataban de exones seguidos también se contemplaron los intrones. En el caso de CRISPOR ofrece una lista de las guías candidato para la secuencia analizada donde además nos proporciona una serie de parámetros evaluados con cierto puntaje que ayudaron a elegir a las mejores candidatas (Figura 22 y 24).



**Figura 21. Mapa genético TIF1-γ.** En la imagen se muestra la posición del gen dentro del genoma (cromosoma 3). También se presentan los 7 transcritos descritos hasta el momento. Se expone la proteína codificada por el transcrito TIF1-γ-20, este consta de 20 exones que codifican una proteína con múltiples dominios: ubiquitina ligasa, enlazador intermedio, PHD y un bromodominio.

Al mismo tiempo se utilizó la misma secuencia para realizar un segundo análisis en el programa Breaking cas, de manera similar nos arroja una lista de las posibles guías candidatas, además de algunos parámetros de evaluación relacionados a la eficacia y eficiencia (Figura 23 y 25).

Una vez que se tenían ambos análisis se consultó la lista de RNA's guías prediseñadas por la compañía IDT (Integrated DNA Technologies), la cual simplemente se consulta colocando el nombre del gen y la especie. En la página aparece una lista de 6 guías, donde las 3 primeras aparecen con una leyenda de recomendada y otras solo aprobadas (aunque también garantizan su uso) (Figura 26). Esta lista se comparó con las guías de CRISPOR y Breaking cas para todos y cada uno de los análisis hechos. Se encontraron algunas coincidencias y se consideraron como los posibles candidatos.

1	2	3	4	5	6	7	8
Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency  Doench '10 Mor-Mateos	Outcome  Out-of-Frame Lindel	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chr18 only
139 / rev	ACAACCCGCTCATAGTGATA TGG Enzymes: <i>HinfI, PfuI</i> Cloning / PCR primers	95	96	42	28	55 71	4intergenic: Ncam2-Gm23355 4intergenic: Gm12010-Gm12011 4intergenic: Ttc7b-Rps6ka5 show all... 73 off-targets
429 / rev	CTCTAACTCTTGAGGCACGC TGG Enzymes: <i>OliI, SmaII, BstC8I</i> Cloning / PCR primers	92	96	60	25	66 89	3intron: Smad4 4intron: Tef2 3intron: Pde4d show all... 53 off-targets
46 / fw	ATGTGATCTATGCCGCTCTG TGG Enzymes: <i>BstI</i> Cloning / PCR primers	89	95	62	63	76 90	4intron: Srsbia2 3intergenic: Gm7763-Gm5185 4intergenic: Pknox2b-Pk3cg show all... 87 off-targets
22 / rev	AGACGGCATAGATCACATG AGG Enzymes: <i>NlaIII</i> Cloning / PCR primers	88	96	68	49	71 82	4intron: Limch1 4intergenic: Usp51-Mageh1 4intergenic: Gm26035-Usp51 show all... 62 off-targets
166 / rev	GCAGTCAACTTACCAATCC AGG Inefficient Enzymes: <i>AsuHPI, MtuCI, LpnPI, BstNI, BseDI, LpnPI, StyD4I, Cfr9I, BstC8I</i> Cloning / PCR primers	85	94	49	21	73 75	4intergenic: Cadm2-Gm24681 4intergenic: Gm24680-4921530L21Rik 4intergenic: Gm22353-Ubr5 show all... 90 off-targets
347 / fw	CTAGGTCTCATGTCCGGGCTGG Enzymes: <i>BmeT110I, NciI, MspI, BseDI, BstDEI, LpnPI, StyD4I, Cfr9I, BstC8I</i> Cloning / PCR primers	85	89	52	51	76 79	4intergenic: Nbeal1-Cyp20a1 3intron: Rap1gds1 4intron: Gm14371 show all... 67 off-targets

Figura 22. RNA's guías para exones 2-4 de SMAD4 de CRISPOR. Se muestra la lista representativa de guías generadas en CRISPOR que contempla diferentes parámetros marcados en cada casilla con un número. En cuadro rojo se muestran las candidatas a que coincidían con IDT y Breacking cas.

1	2	3	4	5	6	7	8
START↑	END↑	STRAND↑	OLIGO↑	ONTARGETS↑	OFFTARGETS↑	GENES↑	SCORE↓
142	161	-	ACAACCCGCTCATAGTGATA TGG	1	21	12	95.2
432	451	-	CTCTAACTCTTGAGGCACGC TGG	1	52	39	92.5
26	45	+	ATGTGATCTATGCCGCTCTG TGG	1	86	33	89.8
25	44	-	AGACGGCATAGATCACATG AGG	1	56	36	89.4
169	188	-	GCAGTCAACTTACCAATTC AGG	1	88	55	85.4
327	346	+	CTAGGTCTCATGTCCGGGCTGG	1	65	50	85.3

Figura 23. RNA's guías para exones 2-4 de SMAD4 de Breacking cas. Lista representativa de guías en el programa Breacking cas, se muestran en casillas numeradas, con los parámetros proporcionados por dicho programa. Cuadro rojo se marcan las guías que coinciden IDT y CRISPOR.

Posteriormente se consideró que tan cercano estaba el sitio blanco de las guías al inicio de la transcripción para elegir los mejores RNA's guías. Al final se eligieron 6 guías para SMAD4 y 5 para TIF1-γ de la cuales solo se eligieron un par para cada gen. En el caso de SMAD4 fueron para el exón 3 y para TIF1-γ contra los exones 2 y 3 (Tabla 4).

1	2	3	4	5	6	7	8
Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency <small>Show all scores</small> Benchmark 16 Non-Matches	Outcome Out-of-Frame In-Frame	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chr3 only
18 / rev	CTACATTCTTGACGACATAC TGG Enzymes: <i>BseII</i> Cloning / PCR primers	96	97	40	15	56 80	0-0-0-3-38 0-0-0-0-0 41 off-targets 4:intron:Gri92 4:intergenic:Gm9848-Gzmk 4:exon:E230013L22Rik show all...
813 / fw	TGTGCCGAGTGCTATTTG TGG <small>inefficient</small> Enzymes: <i>BsiI, BbsCI</i> Cloning / PCR primers	89	93	50	48	72 83	0-0-0-6-67 0-0-0-0-0 73 off-targets 3:intergenic:Stm2-Gm24235 3:intron:EsrD 4:intergenic:Gm23679-Gm8036 show all...
131 / fw	TCAGAACAGGTATGACCTC AGG Enzymes: <i>BstDEI, Bse21I, BspCNI, MniI</i> Cloning / PCR primers	87	95	48	56	67 76	0-0-0-8-104 0-0-0-0-0 112 off-targets 4:intron:Nid1 4:intergenic:Ttc33-Ptger4 4:intron:Sic2a13 show all...
639 / fw	TCACTAAAGACCACCTGATC AGG Enzymes: <i>Ksp22I, Hpy188III, NdeII</i> Cloning / PCR primers	87	95	40	36	62 73	0-0-0-13-81 0-0-0-1-0 94 off-targets 4:intergenic:Ehd3-Xdh 4:intergenic:Sp4-Gm25577 4:intron:Cacna2a3 show all...
789 / rev	AAATAGGCACTGCGGCACAC AGG Enzymes: <i>OsiI, SmaI</i> Cloning / PCR primers	83	92	60	60	69 91	0-0-1-10-78 0-0-0-0-1 89 off-targets 4:intergenic:Apol7d-Gm5528 4:intergenic:Gm9521-Gm24200 4:intergenic:Gm22475-Tmem242 show all...
257 / rev	TTCTACCAAGTCTAGGGTG TGG Enzymes: <i>MboI</i> Cloning / PCR primers	78	87	49	56	63 77	0-0-2-15-113 0-0-1-1-2 130 off-targets 2:intron:Net2 3:intron:Stard8 4:intergenic:Gm5105-1110002E22Rik/Gm5105 show all...

Figura 24. RNA's guías para exones 3-4 de TIF1-y de CRISPOR. Imagen representativa de la lista de guías proporcionada por CRISPOR para la secuencia de los exones 3—4. Cuadro rojo guías que coinciden con las prediseñadas en Breaking cas y IDT.

Filter boxes [Export Oligos](#) (text-tabulated format)

START↑	END↑	STRAND↑	OLIGO↑	ONTARGETS↑	OFFTARGETS↑	GENES↑	SCORE↓
21	40	-	CTACATTCTTGACGACATACTGG	1	41	26	96.1
793	812	+	TGTGCCGAGTGCTATTTGTGG	1	73	46	89.5
619	638	+	TCACTAAAGACCACCTGATCAGG	1	92	56	87.3
111	130	+	TCAGAACAGGTATGACCTCAGG	1	110	65	87.1
792	811	-	AAATAGGCACTGCGGCACACAGG	1	87	54	83.7
531	550	+	GAAGATAATGCAAGTGCAAGTGG	1	141	80	81.3

Figura 25. RNA's guías para exones 3-4 de TIF1-y de Breaking cas. Se observa en la imagen la lista representativa para los exones 3-4 de TIF1-y. Los parámetros proporcionados por el programa se encuentran en las casillas enumeradas. Cuadro rojo guías coincidentes con CRISPOR y IDT.

Design ID: Mm.Cas9.SMAD4.1.AB **SMAD4**  RECOMMENDED ? Predesigned Alt-R CRISPR-Cas9 gRNA

Position Strand Sequence PAM On-target score Off-target score crRNA, 2 nmol tube \$3,488.40 MXN

73675784 + ACAACCCGCTCATAGTGATA TGG 59 85

Show off-target details + | Show related products + ADD TO DESIGN SET

Design ID: Mm.Cas9.SMAD4.1.AD **SMAD4** Predesigned Alt-R CRISPR-Cas9 gRNA

Position Strand Sequence PAM On-target score Off-target score crRNA, 2 nmol tube \$3,488.40 MXN

73675901 + AGACGGGCATAGATCACATG AGG 63 60

Show off-target details + | Show related products + ADD TO DESIGN SET

Figura 26. Guías prediseñadas de IDT. Imagen representativa de las guías prediseñadas en la página de IDT (IDT, 2021).

**Tabla 4. Guías candidato para SMAD4 y TIF1- $\gamma$ .** Lista de guías candidato para SMAD 4 y TIF1- . En rojo se muestran las guías elegidas para la edición genética.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia de Guía</i>	<i>Cadena</i>	<i>Región</i>	<i>Crispor</i>	<i>Breaking cas</i>	<i>IDT</i>
SMAD4	ACAACCCGCTCATAGTGATA TGG	-	Exón 3	95	95	*
	AGACGGGCATAGATCACATG AGG	-	Exón 3	88	89.4	*
	TGAATCGAATGTCCTTCAGT GGG	-	Exón 5	80	79	
	GAGTACGTTACGACTTTGA AGG	-	Exón 5	95	96	*
	GTATATGAGCTTAAATATCG AGG	+	Exón9	89	90	
	AACTCTGTACAAAGACCGCG TGG	-	Exón 10	95	95	
TIF1- $\gamma$	CTACATTCTTGACGACATAC TGG	-	Exón 2	96	96.1	*
	TCACTAAAGACCACCTGATC AGG	+	Exón 3	87	87.3	*
	GACTAACAAACGTGTAGAAC AGG	+	Exón 6	88	88.2	*
	TCATAACATGCTTCACCTGC CGG	-	Exón 7	85	85	*
	ATGGAAACGAATTGATCCAT TGG	-	Exón16	84	86	

Progresión tumoral.

Por otro lado, se realizó un ensayo preliminar de transferencia adoptiva de linfocitos T reguladores. A partir de un ratón reportero para Foxp3 (Foxp3-GFP) se purificaron linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3-GFP<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo. Después se transfirieron 2x10<sup>5</sup> o 4x10<sup>5</sup> linfocitos en ratones CD45.1, que previamente fueron inoculados con células tumorales B16-Ova, se siguió el crecimiento tumoral dado por peso y volumen. En la figura 27 se observa que los ratones que recibieron 4x10<sup>5</sup> linfocitos T reguladores parecen tener ligeramente mayor crecimiento, sin embargo en el peso del tumor, el grupo de ratones con 2x10<sup>5</sup> son los que

parecen generar tumores más grandes. Tendrá que repetirse este experimento para hacer conclusiones al respecto.



Donador: C57BL/6-Foxp3-GFP/CD45.2  
 Receptor: C57BL/6-CD45.1

**Figura 17. Crecimiento tumoral.** A ratones CD45.1 se les transfirieron  $2 \times 10^5$  (rojo;  $n=2$  y  $4 \times 10^5$  (azul;  $n=1$ ) linfocitos T reguladores y control (negro;  $n=1$ ), tamaño: seguimiento por 16 días y peso: día 16 (sacrificio de ratones).

## Discusión

Teniendo en cuenta la participación de linfocitos T reguladores en el desarrollo de cáncer. Existen datos en humano donde la presencia de T reguladores correlaciona negativamente con sobrevida en múltiples cánceres como: carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático, gástrico, cervical, ovario, mama y colorrectal. Además, se ha descrito en modelos de melanoma murino que el 60-70% de linfocitos T CD4<sup>+</sup> son T reguladores (Foxp3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>) y que están estrechamente relacionados con la progresión tumoral ya que en modelos donde se eliminó esta población, mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD25, mostraron capacidad de disminuir la progresión tumoral (Stockis, J., Roychoudhuri, R., & Halim, T., 2019; Chen, X., Du, Y., Lin, X. y cols., 2016).

Así mismo se debe adicionar que la diferenciación y mantenimiento de linfocitos T reguladores dentro del microambiente tumoral esta mediada por múltiples señales, siendo una de ellas la señalización de TGF- $\beta$  que además se sabe que la secreción de esta citocina en gran parte se da por células tumorales, lo que promueve la persistencia de la función reguladora de estas células en dicho microambiente (Margolin, K., 2014; Stockis, J., Roychoudhuri, R., & Halim, T., 2019; Paluskievicz, C. M., Cao, X., Abdi, R. y cols., 2019). Ello propicia que los linfocitos T reguladores inhiban la función de otras poblaciones efectoras como T CD8<sup>+</sup>, NK, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L., 2010). Considerado la participación de TGF- $\beta$  para la función de este compartimento celular a lo largo de este trabajo nos enfocamos en la generación de modelos que permitan el estudio de esta señalización para ayudar a la generación de nuevas estrategias terapéuticas.

La señalización de TGF- $\beta$  se encuentra mediada canónicamente por un complejo de proteínas llamadas SMAD's, conformado por SMAD 2, 3 y 4,

este trasloca al núcleo e induce la transcripción de genes proapoptóticos, inhibidores de ciclinas y relacionados al arresto celular. En etapas tempranas de la vida participa en la embriogénesis, y en etapas adultas se sabe que actúa como un supresor de tumores inhibiendo la angiogénesis, proliferación celular e incrementando la permeabilidad vascular (McCarthy, A. J., & Chetty, R., 2018; Schwarte-Waldhoff, I., & Schmiegel, W., 2002). En contraste con esto también se sabe que existe otro factor de transcripción que puede interactuar con el complejo SMAD2/3, llamado TIF1- $\gamma$  el cual juega un papel importante regulando la proliferación, diferenciación, apoptosis, motilidad, invasión y la respuesta inmune (Yu, C., Ding, Z., Liang, H. y cols., 2019). Por ello, primero cuantificamos la expresión del RNA mensajero de ambos factores de transcripción en distintas poblaciones de linfocitos de bazo y ganglios, donde podemos observar que específicamente en T reguladores hay una mayor expresión de TIF1- $\gamma$  tanto en bazo como ganglios, lo que nos podría dar una aproximación de que la señalización de TGF- $\beta$  en este compartimento celular esta mediada por dicho factor.

Considerando esto nos propusimos el diseño de un modelo murino transgénico que permitiera la obtención de linfocitos T reguladores deficientes de TIF1- $\gamma$  para ello realizamos cruces de distintas cepas que nos permitieran llegar a un ratón con el siguiente fenotipo Rip-mOVA/Foxp3-GFP/OTII/TIF1- $\gamma$  (f/f) /CD4cre/CD45.2, hasta este punto solo tenemos ratones Rip-mOVA/Foxp3-GFP/OTII/CD45.2 (Tabla 3). Las características fenotípicas se eligieron ya que cada cepa proporcionaría una particularidad a nuestro modelo como el ratón OTII el cual presenta linfocitos T con un TCR (T cell receptor) de reconocimiento específico para el péptido OVA<sub>323-339</sub> presentado por el complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II-I<sup>ab</sup>), (Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. y cols., 1998), lo cual nos permitirá el uso de un modelo de melanoma antígeno específico. expresión de esta característica se detectó mediante una tinción de citometría para detectar linfocitos T CD4<sup>+</sup>/TCR $\alpha_2$ /TCR $\beta_5$  (Figura 19). Para el caso del

transgén Rip-mOVA, ayudará al enriquecimiento de linfocitos T reguladores, el ratón expresará de manera endógena el péptido de OVA<sub>139-385</sub> en la membrana celular de células tubulares de riñón y principalmente en células  $\beta$  de páncreas principal, lo que propicia que se puedan diferenciar linfocitos T reguladores (36. Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., 1996).

Avanzando en las peculiaridades del modelo también cuenta con un gen reportero para Foxp3 el cual es regulador maestro para la diferenciación de linfocitos T reguladores, el gen de GFP (Green fluorescent protein), se encuentra intercalado en el exón 11 del gen de Foxp3 lo que permite detectar a estos linfocitos como la población GFP<sup>+</sup> (Haribhai, D., Lin, W., Relland, L. M. y cols., 2007). Con respecto al gen TIF1- $\gamma$  este se encontrará floxeado en el intrón 1 e intrón 4, que permitirá la eliminación de los exones 2-4 y esto conllevará a la deficiencia de este gen (Kim, J., & Kaartinen, V., 2008). En relación con esto los ratones también deberán contener un transgén CD4cre se trata de una inserción al azar que permite la expresión de la proteína cre recombinasa bajo el promotor/potenciador /silenciador de CD4, esta expresión permitirá el corte de los sitios floxp solo cuando se exprese CD4 (Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., 2001; Sawada, S., Scarborough, J. D., Killeen, N. y cols., 1994). Para el resto de los genes se realizó una genotipificación mediante PCR punto final con fragmentos específicos para cada característica (Figuras 15-18).

Ahora bien, para caracterizar el impacto de la señal de TGF- $\beta$  en linfocitos T reguladores se hará una edición genética para eliminar la expresión de SMAD4 y TIF1- $\gamma$ . Con esta comparación podría proveer de blancos terapéuticos dirigidos a la vía relevante que regula esta población. En primer lugar, los linfocitos T reguladores se obtendrán de bazo y ganglios de ratones Rip-mOVA/Foxp3-GFP/OTII/CD45.2. Otro punto muy importante para el desarrollo de esta estrategia fue el diseño RNA guías para cada blanco molecular, lo primero fue realizar un análisis de la secuencia y que exones codificaban cada dominio de la proteína con la idea de deletar los sitios con

mayor impacto en la funcionalidad de la proteína en el caso de SMAD 4 se eligieron los exones 2-4 que codifican el dominio MH1 que le permite la interacción con DNA, 5-6 codifican la región de unión entre el dominio MH1 y 2 y además posee la señal de exporte nuclear y 9-10 los cuales codifican el dominio MH2 que permite la interacción con otras proteínas (Figura 20), (Zhao, M., Mishra, L., & Deng, C. X., 2018). En el caso particular de TIF1- $\gamma$  los exones 2-4 que codifican para una parte del dominio de ubiquitinligasa que le permite principalmente ubiquitilación de SMAD4, 6-7 codifican el dominio enlazador intermedio relacionado a la interacción con el complejo SMAD 2/3 y 16-17 para el bromodominio lo que adjudica su interacción con histonas y de esta forma tener una participación epigenética (Figura 21) (Yu, C., Ding, Z., Liang, H. y cols., 2019).

Conociendo esto se realizó el análisis de cada región en dos programas diferentes: CRISPOR y Breaking cas. En el primero de ellos se muestra una tabla detallada donde se proporcionan diferentes parámetros evaluados como la especificidad que es una predicción de que tan probable una guía puede conducir a una escisión fuera del objetivo, con un puntaje de 0 -10, siendo este último el mejor, que indicaría que el programa no logro encontrar una sola secuencia que difiera del objetivo en hasta 4 desajustes (columna 3, Figura 22 y 24). Otro valor importante es la eficiencia si se trata de una edición con el uso de vectores, este parámetro está relacionado que tan eficiente será la guía cortando el objetivo donde nuevamente el puntaje de 0 -100, siendo 100 el mejor, se muestran dos puntajes basados en 2 diferentes algoritmos Doench y Moreno Mateos, el cual debe ser considerado dependiendo el promotor de vector a usar (columna 4, figura 22 y 24). Para nuestro caso particular se ignora la comuna 5 dado que usaremos dos guías y este valor esta mas enfocado en el uso de una guía, pero en grandes rasgos se trata de la probabilidad de que se puedan realizar pequeñas eliminaciones cerca del objetivo debido a la microhomología del sitio. El último punto que consideramos es los posibles blancos fuera de objetivo considerando hasta

un máximo de 4 desajustes, y justo en la siguiente columna se muestran la localización, si es cae en un intrón o exón y cada uno tiene un valor asignado que determina la probabilidad de que la guía pueda cortar en ese objetivo, entre más cercano sea ese valor a 0.02 es menor la probabilidad de un error de corte (columna 6 y 7, Figuras 22 y 24), (Alkhnabashi, O. S., Meier, T., Mitrofanov, A. y cols., 2020; 43. Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H. y cols., 2016).

Al mismo tiempo se realizó un análisis de las mismas regiones en Breaking cas en donde al igual que CRISPOR se muestra una tabla donde los parámetros evaluados son menos, sin embargo, analiza los dos mas importantes a considerar que son el número de blancos fuera de objetivo, aunque solo se muestra el número se puede pulsar en la guía e inmediatamente se muestra una lista detallada con valores de probabilidad de corte y la localización de estos (columna 6, Figura 23 y 25). También proporciona un “score” que está directamente relacionado con la eficiencia dado por la probabilidad de que un blanco fuera de objetivo pueda actuar como un verdadero sitio de corte y la especificidad del “verdadero blanco” (columna 8, Figura 23 y 25), (Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D. y cols., 2016; Graham, D. B., & Root, D. E., 2015).

Considerando todo esto las guías con un mayor puntaje en especificidad y menor número de blancos fuera del objetivo se compararon con aquellas prediseñadas en IDT, para ambas moléculas se encontraron guías recomendadas, catalogadas así por su uso en otros trabajos con éxito, y otras que solo aparecen entre las primeras 6 que a pesar de no estar recomendadas IDT las garantiza para su uso en edición (Figura 26). Las guías candidato se muestran en la tabla 4 y con un recuadro rojo se señalan aquellas que son las elegidas para la posterior edición de linfocitos T reguladores mediante CRISPR-cas.

Como último punto tenemos el ensayo preliminar de la transferencia de linfocitos T reguladores de un ratón reportero para Foxp3 a dos grupos de

ratones donde previamente se indujo un tumor por la inyección de células B16-ova por vía subcutánea en el dorso de estos. Si observamos la Figura 27 se puede sugerir que la transferencia de linfocitos T reguladores policlonales influye en el crecimiento tumoral, aunque habría que repetir el experimento para determinarlo; sin embargo, creemos que al realizar estos ensayos con linfocitos Treg antígeno específico podremos observar una diferencia significativa en dicho crecimiento. Como se mencionó antes este compartimento celular está estrechamente relacionado con un mal pronóstico en distintos cánceres en humano y ahora también se sabe que la heterogeneidad en la estabilidad y expresión de distintas moléculas está relacionada con el estadio de algunos tipos de tumores (Wing, J. B., Tanaka, A., & Sakaguchi, S., 2019; 47. Wing, J. B., Tanaka, A., & Sakaguchi, S., 2019). Por todo lo anterior parece indispensable seguir con el estudio de esta subpoblación en un contexto tumoral influenciado particularmente por la vía de TGF- $\beta$  que además sabemos es primordial para su diferenciación y mantenimiento.

## Conclusión

De acuerdo con los datos presentados en este trabajo se demostró que los linfocitos T reguladores expresan una mayor cantidad de TIF1- en comparación con SMAD 4 y, con otras poblaciones de bazo y ganglios. Además los datos sugieren que la presencia de linfocitos T reguladores influye en la progresión tumoral,

## Perspectivas

1. Completar la generación de los ratones Transgénicos RIP-mOVA/GFP/OTII/CD45.2/TIF1- $\gamma$  (f/f) /CD4cre.
2. Realizar los ensayos de transferencia con ratones RIP-mOVA/GFP/OTII/CD45.2/TIF1- $\gamma$  (f/f) /CD4cre en ratones CD45.1
3. Generar clones de linfocitos Tregs deficientes de TIF1- o SMAD 4 mediante CRISPR
4. Caracterizar el fenotipo de linfocitos Tregs deficientes de TIF1-  $\gamma$  o SMAD4 y su impacto en el crecimiento tumoral.

## Bibliografía

- Alkhnbashi, O. S., Meier, T., Mitrofanov, A., Backofen, R., & Voß, B. (2020). CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods (San Diego, Calif.)*, 172, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.013>
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology*, 76(1), 34–40. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1998.00709.x>
- Chen, X., Du, Y., Lin, X., Qian, Y., Zhou, T., & Huang, Z. (2016). CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immunity. *International immunopharmacology*, 34, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.009>
- Contreras, E. (2019). Tesis de maestría Regulación de la expresión de Foxp3 por TIF1γ en células Treg. UNAM, México.
- Flavell, R., Sanjabi, S., Wrzesinski, S. et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nat Rev Immunol* 10, 554–567 (2010). <https://doi-org./10.1038/nri2808>
- Fujii, H., Josse, J., Tanioka, M., Miyachi, Y., Husson, F., & Ono, M. (2016). Regulatory T Cells in Melanoma Revisited by a Computational Clustering of FOXP3+ T Cell Subpopulations. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 196(6), 2885–2892. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402695>.
- GLOBOCAN 2018: Incidencia estimada por edad de melanoma de piel a nivel mundial en 2018. <https://gco.iarc.fr/>. (2020). Consultado el 29 de julio de 2020.
- Gorelik, L., Flavell, R. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-β signaling in T cells. *Nat*

*Med* 7, 1118–1122 (2001). [https://doi-org.acceso.biblio.cinvestav.mx/10.1038/nm1001-1118](https://doi.org/acceso.biblio.cinvestav.mx/10.1038/nm1001-1118)

- Graham, D. B., & Root, D. E. (2015). Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome biology*, 16, 260. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0823-x>
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130), 851–857. <https://doi.org/10.1038/nature05661>.
- Gu, A. D., Zhang, S., Wang, Y., Xiong, H., Curtis, T. A., & Wan, Y. Y. (2015). A critical role for transcription factor Smad4 in T cell function that is independent of transforming growth factor  $\beta$  receptor signaling. *Immunity*, 42(1), 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.019>
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J. B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., Joly, J. S., & Concordet, J. P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome biology*, 17(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
- Haribhai, D., Lin, W., Relland, L. M., Truong, N., Williams, C. B., & Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 178(5), 2961–2972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2961>
- Hata, A., & Chen, Y. G. (2016). TGF- $\beta$  Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9), a022061. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022061>
- Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., Gall, A., ... Flicek, P. (2021).

Ensembl 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>

- Hussein M. R. (2005). *Transforming growth factor-beta and malignant melanoma: molecular mechanisms*. *Journal of cutaneous pathology*, 32(6), 389–395. <https://doi.org/10.1111/j.0303-6987.2005.00356.x>
- Javelaud, D., Alexaki, V. I., & Mauviel, A. (2008). *Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma*. *Pigment cell & melanoma research*, 21(2), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00450.x>
- Kim, J., & Kaartinen, V. (2008). *Generation of mice with a conditional allele for Trim33*. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 46(6), 329–333. <https://doi.org/10.1002/dvg.20401>
- Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., & Kosaka, H. (1996). *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self-antigens in vivo*. *The Journal of experimental medicine*, 184(3), 923–930. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.923>
- Lauden, L., Siewiera, J., Boukouaci, W., Ramgolam, K., Mourah, S., Lebbe, C., Charron, D., Aoudjit, F., Jabrane-Ferrat, N., & Al-Daccak, R. (2014). *TGF-β-induced (TGFBI) protein in melanoma: a signature of high metastatic potential*. *The Journal of investigative dermatology*, 134(6), 1675–1685. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.20>
- Lee, N., Zakka, L. R., Mihm, M. C., & Schatton, T. (2016). *Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy*. *Pathology*, 48(2), 177–187. doi: 10.1016/j.pathol.2015.12.006
- Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Pérez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R., & Wilson, C. B. (2001). *A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival*. *Immunity*, 15(5), 763–774. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00227-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00227-8)

- Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghì, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J. A., Candido, S., & Libra, M. (2018). *Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review)*. *International journal of oncology*, 52(4), 1071–1080. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>
- Liu, Y., & Sheikh, M. S. (2014). *Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management*. *Molecular and cellular pharmacology*, 6(3), 228.
- Margolin, K. (2014). *Introduction to the Role of the Immune System in Melanoma*. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 28(3), 537–558. doi: 10.1016/j.hoc.2014.02.005
- Marzagalli, M., Ebelt, N. D., & Manuel, E. R. (2019). *Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment*. *Seminars in cancer biology*, 59, 236–250. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.002>
- McCarter, M. D., Baumgartner, J., Escobar, G. A., Richter, D., Lewis, K., Robinson, W., Wilson, C., Palmer, B. E., & Gonzalez, R. (2007). *Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients*. *Annals of surgical oncology*, 14(10), 2854–2860. <https://doi.org/10.1245/s10434-007-9488-3>
- McCarthy, A. J., & Chetty, R. (2018). *Smad4/DPC4*. *Journal of clinical pathology*, 71(8), 661–664. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205095>
- Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P., & Pazos, F. (2016). *Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes*. *Nucleic acids research*, 44(W1), W267–W271. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw407>
- Ouyang, Z., Wu, H., Li, L. et al. *Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma*. *Tumor Biol.* 37, 77–85 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4315-0>

- Paluskievicz, C. M., Cao, X., Abdi, R., Zheng, P., Liu, Y., & Bromberg, J. S. (2019). *T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment*. *Frontiers in immunology*, 10, 2453. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02453>
- Passarelli, A., Mannavola, F., Stucci, LS, Tucci, M. y Silvestris, F. (2017). *Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape* *Sistema inmunológico y biología del melanoma: un equilibrio entre inmunovigilancia y escape inmunológico*. *Oncotarget*, 8 (62), 106132–106142. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22190>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac, M. (2014). *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. *In vivo (Athens, Greece)*, 28(6), 1005–1011.
- Russo, A. E., Torrisi, E., Bevelacqua, Y., Perrotta, R., Libra, M., McCubrey, J. A., Spandidos, D. A., Stivala, F., & Malaponte, G. (2009). *Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review)*. *International journal of oncology*, 34(6), 1481–1489. [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000277](https://doi.org/10.3892/ijo_00000277)
- Sawada, S., Scarborough, J. D., Killeen, N., & Littman, D. R. (1994). *A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development*. *Cell*, 77(6), 917–929. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90140-6)
- Schadendorf, D., van Akkooi, A., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., & Ugurel, S. (2018). *Melanoma*. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 971–984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- Schwarte-Waldhoff, I., & Schmiegel, W. (2002). *Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis*. *International journal of gastrointestinal cancer*, 31(1-3), 47–59. <https://doi.org/10.1385/IJGC:31:1-3:47>
- Shain, A., Bastian, B. (2016). *From melanocytes to melanomas*. *Nat Rev Cancer* 16, 345–358.

- Shang, B., Liu, Y., Jiang, S. J., & Liu, Y. (2015). Prognostic value of tumor infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 5, 15179. <https://doi.org/10.1038/srep15179>
- Stockis, J., Roychoudhuri, R., & Halim, T. (2019). Regulation of regulatory T cells in cancer. *Immunology*, 157(3), 219–231. <https://doi.org/10.1111/imm.13064>
- Tuncer, E., Calçada, R. R., Zingg, D., Varum, S., Cheng, P., Freiburger, S. N., Deng, C. X., Kleiter, I., Levesque, M. P., Dummer, R., & Sommer, L. (2019). SMAD signaling promotes melanoma metastasis independently of phenotype switching. *The Journal of clinical investigation*, 129(7), 2702–2716. <https://doi.org/10.1172/JCI94295>
- Vence, L., Palucka, A. K., Fay, J. W., Ito, T., Liu, Y. J., Banchereau, J., & Ueno, H. (2007). Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20884–20889. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710557105>
- Wing, J. B., Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2019). Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*, 50(2), 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.020>
- Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in immunology*, 31(6), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>
- Yu, C., Ding, Z., Liang, H., Zhang, B., & Chen, X. (2019). The Roles of TIF1 $\gamma$  in Cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 979. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00979>
- Yu, Y., & Feng, X. H. (2019). TGF- $\beta$  signaling in cell fate control and cancer. *Current opinion in cell biology*, 61, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.007>

- Zhao, M., Mishra, L., & Deng, C. X. (2018). *The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. International journal of biological sciences, 14(2), 111-123. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23230>*