

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR
EL IMMUNEPOTENT CRP EN CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA
AGUDA DE CÉLULAS T**

Por

ANDREA PAOLA URDANETA PEINADO

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2024

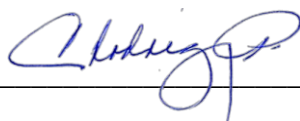
ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL
IMMUNEPOTENT CRP SOBRE LINFOCITOS T SANOS Y CANCEROSOS

COMITÉ DE TESIS



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Presidente



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal 1



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Vocal 2



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL
IMMUNEPOTENT CRP SOBRE LINFOCITOS T SANOS Y CANCEROSOS

DIRECCIÓN DE TESIS



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Directora



Dra. Helen Yarimet Lorenzo Anota

Director externo



Agradezco al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, al Instituto de Investigación en Obesidad del Tecnológico de Monterrey y al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONACYT) por el apoyo económico e infraestructura brindados para la realización de este trabajo de tesis.

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ana Carolina Martínez Torres por darme la oportunidad de realizar un trabajo de investigación en su laboratorio como parte de mis estudios dentro del programa de maestría en colaboración con científicos de alto nivel profesional.

Muchas gracias a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme trabajar en el LIV, la motivación y los consejos brindados, pero sobre todo por siempre impulsarnos a una constante mejora profesional incitado por el amor a la ciencia e investigación.

A los doctores, Pablo Zapata Benavides y José Manuel Vázquez Guillén por ser parte fundamental de mi formación durante la maestría como profesores y consejeros no solo laborales sino en mi desarrollo como científica.

De manera particular, me gustaría agradecer a la Dra. Diana Zárate, quien desde mi licenciatura fomento mi interés en la investigación científica y fue mi mayor mentora durante la maestría. Por toda la confianza, guía, apoyo, conocimientos, crecimiento tanto personal como laboral y dedicación que me brindó, tanto para mis estudios en la UANL como para los siguientes pasos en mi carrera, le estoy eternamente agradecida.

A la Dra. Helen Lorenzo, junto con el equipo de bioingeniería y médicos del instituto de investigación en obesidad del Tecnológico de Monterrey, por todo el apoyo teórico, práctico y financiero durante el proyecto.

Gracias a mi compañero de maestría, Rodolfo Mendoza, por ser mi mayor soporte y amigo. En todo lo que hemos vivido, para bien y para mal, siempre has estado ahí para mí. Espero que siempre seas consciente de la gran persona e investigador que eres y que tienes todo el derecho a vivir poniendo tus deseos y ambiciones como prioridad antes que los de otras personas. Solo puedo pedir siempre estar presente para poder verte cumplir cada uno de ellos.

A mi hermana, Paula Sofia, fuiste y siempre serás mi primera compañera en la vida, gracias por siempre haberme impulsado a ser yo misma y seguir mi propio camino. Eres la persona más valiente y fuerte que conozco, siempre has sido mi sol en cada día oscuro. La sangre nunca será lo único que nos une como hermanas. Gracias a mi madre, Soraya Peinado, por estar para apoyarme,

tanto de manera académica como personal, no solo durante este trabajo, sino en cada paso de mi carrera hasta el momento y en los siguientes pasos a dar. Espero que sepas que no importa cuán lejos llegue, siempre te llevaré conmigo en mente y corazón.

A Daniel Lemus, por ser, dentro de nuestro grupo de amigos, mi compañero en cada locura que se nos ocurría. Gracias por cada fiesta, baile, risa, lagrimas, conversación, abrazo y mensaje que ha habido dentro de nuestra amistad. Eres el tipo de persona que me mantiene creyente que nunca debemos disminuir nuestro brillo por lo que otras personas tengan para decir. A Roberto Rodríguez, por la gran persona que es. Tal vez puedas pensar que yo te he apoyado más a ti que tú a mí, pero tu amistad es una de las más verdaderas, dulces, divertidas y honestas que he tenido el placer de poseer. Eres un ejemplo de que todos podemos decidir quienes ser en cualquier momento y que nuestra realidad es una cadena de decisiones constantes.

Dentro del equipo de trabajo del L-14, me gustaría agradecer a Ana Rivera por asistirme, cuestionarme y enseñarme de manera tanto teórica como experimental en la realización de este proyecto, pero, sobre todo, atesoro cada momento en que estuviste para tanto las fallas como el éxito del trabajo, te agradezco estar conmigo para celebrar cada uno de mis logros.

Finalmente, agradezco a la UANL y la Facultad de Ciencias Biológicas, por darme la oportunidad de realizar mis estudios universitarios y obtener el título de Maestro en Ciencias. Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV), por la infraestructura proporcionada a lo largo de este trabajo y mis estudios en la maestría. Así como al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONACYT), por el apoyo económico brindado a lo largo del programa de maestría.

*A todas las personas que han sido afectadas por la leucemia, un verdadero guerrero lucha a
pesar del miedo*

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES.....	3
1.	El sistema inmune	3
2.	Linfocitos T.....	4
2.1	Activación de linfocitos T	5
2.2	Muerte celular de linfocitos T	9
3.	Leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL).....	12
3.1	Activación y muerte células de T-ALL	14
4.	Inmunoterapias.....	15
4.1	IMMUNEPOTEN CRP	16
III.	JUSTIFICACIÓN.....	19
IV.	HIPÓTESIS.....	20
V.	OBJETIVO GENERAL	21
VI.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
VII.	METODOLOGÍA	22
1.	Mantenimiento de las líneas celulares	22
2.	IMMUNEPOTENT CRP	22
3.	Inhibidores	23
4.	Ensayo de activación temprana.....	23
5.	Análisis del efecto citotóxico.....	24
6.	Análisis de los niveles de Ca ²⁺ intracelular	24
7.	Ensayo de muerte celular	25
8.	Análisis estadístico.....	25
VIII.	RESULTADOS	26
1.	El IMMUNEPOTENT CRP induce la activación de células de T-ALL.	26
2.	El IMMUNEPOTENT CRP induce activación dependiente de la entrada de Ca ²⁺ en células de T-ALL.	28
3.	La fosforilación de la fosfolipasa C (PLC) está involucrada tanto en la activación como en las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL.	29

4.	La actividad de las cinasas de la familia Abl está involucrada en la muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL, pero no en las alteraciones cálcicas ni en la activación.	32
5.	La activación de las proteínas G participa en tanto en la activación como en las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL.	34
IX.	DISCUSIÓN	36
X.	CONCLUSIÓN	41
XI.	PERSPECTIVAS	42
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático de la diferenciación de células T citotóxicas CD4+ y CD8+	5
Figura 2. Cascada de señalización esenciales para la activación de las células T	8
Figura 3. Las vías de la apoptosis: extrínseca e intrínseca	10
Figura 4. La regulación del Ca ²⁺ intracelular	11
Figura 5. Índices de incidencia de los distintos tipos de cáncer en edades infantiles a nivel mundial	13
Figura 6. Análisis de la expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con IMMUNEPOTENT CRP.	26
Figura 7. Evaluación de la expresión de CD69 a diferentes lapsos de tiempos en células CEM tratadas con IMMUNEPOTENT CRP	27
Figura 8. Determinación de la expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con IMMUNEPOTENT CRP en presencia del quelante Ca ²⁺ extracelular BAPTA	29
Figura 9. Evaluación de la muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL	30
Figura 10. Análisis de la muerte celular, alteraciones cálcicas y expresión de CD69 inducidas por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL en presencia del inhibidor farmacológico U73-122.	31
Figura 11. Determinación de la implicación de las tirosin cinasas en la muerte celular, alteraciones cálcicas y expresión de CD69 inducidas por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL	33
Figura 12. Análisis de la muerte celular, alteraciones cálcicas y expresión de CD69 inducidas por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL en presencia del inhibidor farmacológico suramina.	35
Figura 13. Representación esquemática de la activación y muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPasas de Ca ²⁺ del retículo endoplásmico	SERCA
Cadena transportadora de electrones	ETC
Calcio liberado por la entrada de calcio	CICR
Canales de calcio activados por liberación de calcio	CRAC
Catión de calcio	Ca ²⁺
Células dendríticas	DCs
Células mononucleares de sangre periférica	PMBC
Células presentadoras de antígeno	APCs
Células T citolíticas	CTL
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Concentración citotóxica media	CC ₅₀
Enfermedad injerto contra huésped	GVHD
Enlazador para la activación de células T	LAT
Extractos dializable de leucocitos	EDL
Factor de intercambio de nucleótidos de guanina	GEF
Factor nuclear κ b	NF- κ b
Fosfo-inositol-4,5-bifosfato	PIP ₂
Fosfolipasa C	PLC
Gen 1 relacionado con la transformación de eritroblastos	ERG-1
Imatinib	IMB
IMMUNEPOTENT CRP	ICRP
Inositol-1,4,5-trifosfato	IP ₃
Leucemia linfoblástica aguda de células T	T-ALL
Membrana mitocondrial externa	OMM
Microclusters	MC
Motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores	ITAM

Muerte autónoma de células T activadas	ACAD
Muerte celular inducida por activación	AICD
Muerte celular programada	MCP
Muerte celular regulada	MCR
Patrones moleculares asociados a daño	DAMP
Proteína activadora 1	AP-1
Proteína leucocitaria que contiene el dominio SH2 de 76 kDa	SLP-76
Proteína quinasa C	PKC
Proteínas quinasas activadas por mitógenos	MAPK
Receptor acoplado a proteínas G	GPCR
Receptor de linfocitos T	TCR
Receptor de tirosin cinasas	RTK
Receptores de inositol-1,4,5-trifosfato	IP ₃ R
Receptores de rianodina	RYR
Retículo endoplasmático	RE
Sinapsis inmunológica	IS
Suero Fetal Bovino	SFB
Tirosina quinasa de 70 kDa	ZAP-70
Vénulas endoteliales altas	HEV

RESUMEN

La respuesta inmune adaptativa es un mecanismo de defensa específico llevado a cabo por los linfocitos T y B. Dentro de su proceso de activación se destacan dos vías de señalización que se caracterizan por la participación de receptores asociados a tirosin cinasas o la actividad de proteínas G. Ambas vías promueven la fosforilación de fosfolipasas C (PLC), que llevan al aumento de inositol trifosfato en el citoplasma, el cual a su vez promueve la salida de Ca^{2+} del RE, que puede llevar a la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Los aumentos del Ca^{2+} citosólico se han visto relacionados con la expresión de marcadores de activación temprana (CD69) y la inducción de apoptosis. Las desregulaciones en los procesos de activación y muerte celular regulada (MCR) son características de patologías como la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). Las células de T-ALL poseen mutaciones que les confieren la capacidad de evadir al sistema inmune y procesos de muerte celular. Por lo que la mayoría de los tratamientos buscan la inducción de la MCR y/o la estimulación de una respuesta inmunitaria. En este sentido, el IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es una inmunoterapia pasiva que ha demostrado tener efecto inmunomodulador, induciendo la expresión de CD69 en linfocitos T sanos, y citotóxico, siendo un inductor de apoptosis dependiente de Ca^{2+} vía canales del RE en células de T-ALL. Sin embargo, su uso se ve limitado debido al limitado conocimiento de su mecanismo de acción. Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo evaluar si la activación y muerte celular inducida por el ICRP están asociadas a alteraciones cálcicas vía tirosin cinasas o GPCR en células de T-ALL. Para ello, se evaluó mediante citometría de flujo la expresión de CD69, así como la implicación del Ca^{2+} en la activación y el rol de la PLC, tirosin cinasas y proteínas G en la activación y muerte celular, utilizando inhibidores farmacológicos. Los resultados indican que el ICRP induce la activación y muerte celular de manera independiente a la actividad de las cinasas Src en células de T-ALL. De manera alterna, el ICRP activa a las proteínas G, las cuales promueven la entrada de Ca^{2+} extracelular, por medio de la actividad de la PLC, que resulta en activación y muerte celular. Además, se demostró que la actividad de cinasas Abl están implicadas en el mecanismo de muerte celular del ICRP en células de T-ALL, posiblemente en una manera independiente a las alteraciones cálcicas. Finalmente, este trabajo describe los eventos más tempranos, hasta el momento, en el mecanismo de acción del ICRP en células de T-ALL, aportando evidencia de su capacidad como un tratamiento prometedor contra malignidades hematológicas.

ABSTRACT

The adaptive immune response is a specific defense mechanism carried out by T- and B-lymphocytes. During the activation process, there are two signaling pathways that stand out, mainly characterized by the participation either of tyrosine kinases or G proteins activity. Both pathways involve the phosphorylation of PLC, which induces calcium alterations in the ER, generating the entry of Ca^{2+} from the extracellular space. These increases in cytosolic Ca^{2+} have been related to the expression of early activation markers (CD69) and the induction of apoptosis. Dysregulations in cell activation and regulated cell death (RCD) processes are hallmarks of pathologies such as T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). T-ALL cells possess mutations that give them the ability to evade the immune system's surveillance and cell death. Therefore, most treatments seek to induce RCD and/or stimulate an immune response. In this sense, IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) is a passive immunotherapy that has been shown to have immunomodulatory effect, inducing CD69 expression in healthy T lymphocytes, and cytotoxic, being an inducer of Ca^{2+} -dependent apoptosis via ER channels in T-ALL cells. However, its use is limited because some factors of its action mechanism are still unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether ICRP-induced cell activation and cell death are associated with calcium alterations via tyrosine kinases or GPCRs in T-ALL cells. Consequently, CD69 expression was evaluated, along with the involvement of Ca^{2+} in cell activation and the role of PLC, tyrosine kinases and G proteins in cell activation and cell death, using pharmacological inhibitors, through flow cytometry. The results indicate that ICRP induces activation and cell death independently of Src kinase activity in T-ALL cells. Alternatively, ICRP activates G proteins, which promote extracellular Ca^{2+} entry via PLC activity, resulting in activation and cell death. Furthermore, we demonstrate that Abl kinase activity is involved in the cell death mechanism of ICRP in T-ALL cells, possibly in a calcium-independent manner. Finally, this work describes the earliest events, to date, in the mechanism of action of ICRP in T-ALL cells, providing evidence of its capacity as a promising treatment against hematological malignancies.

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es la principal línea de defensa contra patógenos. Su efecto requiere de la respuesta inmune (RI) innata y adaptativa, esta última involucra la actividad de células inmunitarias especializadas (RI celular) y anticuerpos (RI humoral) (Marshall *et al.*, 2018). Los linfocitos T son los principales efectores de la inmunidad celular. Estos se definen como leucocitos que presentan proteínas membranales CD3+ y CD45+, se originan en médula ósea y maduran en el timo, diferenciándose en dos principales poblaciones: CD4+ y CD8+. Una vez localizados en tejidos linfoides, son activados mediante la presentación de antígenos (Varadé *et al.*, 2021).

La activación de los linfocitos T consiste en la comunicación mediada por receptores entre células T y células presentadoras de antígeno (APCs). En ella, el receptor de linfocitos T (TCR) recibe un estímulo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) al interactuar con el antígeno acoplado al MHC (Hwang *et al.*, 2020). Esto es acompañado por señales mediante receptores co-estimuladores, necesarios para delimitar el umbral de activación, y de la activación de agentes intermediarios como tirosin cinasas y proteínas G, que, a través de proteínas como la fosfolipasa C (PLC), conllevan a la movilización del Ca^{2+} intracelular, que culmina con la liberación de citocinas (Samakai *et al.*, 2018). Todo esto, resulta en la activación completa de los linfocitos, dando a lugar a sus funciones; la estimulación de células inmunitarias (CD4+ helper) y la destrucción de patógenos medida por células (CD8+ citotóxica) (Hwang *et al.*, 2020).

Con el propósito de tener un control efectivo sobre la vida útil de los linfocitos se llevan a cabo mecanismos de muerte celular regulada (MCR), como la apoptosis. Esta actúa mediante la muerte celular inducida por activación (AICD) y la muerte autónoma de células T activadas (ACAD) (Brenner *et al.*, 2008). En este sentido, AICD describe una muerte celular en linfocitos ya activados mediante la reestimulación de sus TCR, implicando vías de apoptosis extrínseca e intrínseca. Mientras que, la ACAD no implica la reestimulación de sus TCR y depende de la activación de la apoptosis intrínseca por medio de alteraciones mitocondriales relacionadas con desregulaciones cálcicas (Hajnóczky *et al.*, 2003, Brenner *et al.*, 2008).

Todo lo anterior demuestra la importancia del correcto funcionamiento de la activación y muerte celular en linfocitos T. Las desregulaciones en estos procesos, causadas por mutaciones del ADN de las células, conducen al desarrollo de diferentes patologías. Una de las patologías

asociadas a alteraciones en los procesos de activación y muerte de linfocitos T es la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). Este tipo de cáncer se define como una neoplasia maligna hematológica agresiva caracterizada por una proliferación aberrante de timocitos inmaduros (Van Vlierberghe & Ferrando, 2012). Actualmente figura entre los tipos de cáncer pediátrico más común y de mayor mortalidad por reincidencia en adultos a nivel mundial y su progresión se encuentra estrechamente ligada a mutaciones que afectan genes relacionados con sus TCRs (Marks & Rowntree, 2017).

Dentro los tratamientos convencionales contra el cáncer se encuentran la cirugía, quimioterapia y radioterapia que si bien pueden ser métodos efectivos no poseen un alto nivel de especificidad y presentar una serie de efectos secundarios perjudiciales para el individuo. Por otro lado, entre los nuevos tratamientos se encuentran las inmunoterapias, las cuales promueven la estimulación el sistema inmune contra las células cancerosas, sin embargo, no son ampliamente utilizadas (ASCO,2018).

Entre las inmunoterapias que poseen un efecto tanto inmunomodulador como citotóxico hacia células cancerosas (Bayón-Calderón, 2020) destaca el IMMUNEPOTENT CRP (ICRP), el cual es un extracto dializable de leucocitos de bazo bovino, que ha demostrado aumentar poblaciones de células inmunitarias en pacientes de cáncer de mama y pulmón tratados con quimioterapias (Moises A. Franco-Molina *et al.*, 2017; Lara *et al.*, 2010). Asimismo, posee un efecto quimio protector en células de médula ósea murina, mejorando el estado de salud de los ratones (Coronado-Cerda *et al*, 2016). Además, induce la activación de linfocitos NK y T de donantes sanos, a partir de un cambio en los receptores de las células (Lorenzo-Anota *et al.*, 2022). Por otro lado, el ICRP ha probado ser un inductor de apoptosis dependiente de Ca^{2+} , vía canales del RE, en células T-ALL sin afectar a células sanas (Lorenzo-Anota, 2020).

A pesar de los estudios realizados sobre las funciones del I-CRP, su uso se ve limitado debido a que se desconocen factores de su mecanismo de acción. Entre estos, se encuentran elucidar si el ICRP induce la activación de células de T-ALL, así como, demostrar si la activación y la muerte celular inducida por el ICRP están asociadas a alteraciones cálcicas vía tirosin cinasas o GPCR en células de T-ALL. Por lo anterior, este trabajo pretende evaluar si el tratamiento con ICRP es capaz de activar células de T-ALL, así como si la activación y la muerte celular inducida por el ICRP comparten una misma vía de señalización en células de T-ALL.

II. ANTECEDENTES

1. El sistema inmune

El sistema inmune se refiere a las células, factores solubles, tejidos y procesos que funcionan de manera interconectada para proteger el organismo y mantener la homeostasis tisular, contra agentes dañinos que incluyen microbios como bacterias, hongos, parásitos, virus, células cancerosas y toxinas (Marshall *et al.*, 2018). Más allá de las barreras estructurales y químicas que nos protegen de las infecciones, el sistema inmunitario puede ser clasificado como dos "líneas de defensa": la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Cohen *et al.*, 2019).

La inmunidad innata representa la primera línea de defensa ante un patógeno. Es un mecanismo no específico que es activado inmediatamente o a las pocas horas de entrar en contacto con un antígeno (Netea *et al.*, 2019). Este proceso no involucra la formación de una memoria inmunológica. Por otro lado, la inmunidad adaptativa, es específica hacia el antígeno y, por ende, implica un lapso de tiempo entre la exposición al antígeno y la respuesta máxima (Cohen *et al.*, 2019). Uno de los sellos distintivos de este mecanismo es la capacidad de desarrollar una memoria que permite al organismo generar una respuesta inmunitaria más rápida y eficaz tras la posterior exposición al mismo antígeno (Netea *et al.*, 2019).

El desarrollo de una memoria inmunológica es la base de una inmunización eficaz contra las enfermedades infecciosas (Netea *et al.*, 2020). Esta es llevada a cabo por las células del sistema inmunitario adaptativo que incluyen: linfocitos T, que se activan para proliferar mediante la acción de las APC y destruir patógenos por medio de la secreción de citocinas (citotoxicidad mediada por células), y linfocitos B que se diferencian en células plasmáticas para producir anticuerpos que se unan al patógeno y faciliten su eliminación (respuesta humoral) (Baazim *et al.*, 2022).

La inmunidad innata y adaptativa no son mecanismos mutuamente exclusivos, sino complementarios, las desregulaciones en cualquiera de los sistemas dan como resultado la vulnerabilidad del individuo o respuestas inapropiadas (Netea *et al.*, 2020).

2. Linfocitos T

La inmunidad celular depende principalmente de la participación de células conocidas como linfocitos T. Estos leucocitos se caracterizan por la presencia de proteínas membranales CD3+ y CD45+ (Kumar *et al.*, 2018). En condiciones homeostáticas, las células T representan entre el 40 a 70% de la población total presente en células mononucleares de sangre periférica (PMBC) aisladas (Velardi *et al.*, 2020).

El proceso de desarrollo de células T en el timo se ha dividido en tres etapas según la expresión de los marcadores de superficie CD4+ y CD8+. Esto inicia en el timo, que es considerado el principal sitio de desarrollo de las células T, las cuales conciernen células hematopoyéticas que expresan complejos TCR $\alpha\beta$ /CD3+ o $\gamma\delta$ (Taniuchi, 2018). Este órgano primario provee de un microambiente específico, propicio para que progenitores procedentes de la médula ósea, doble negativos (DP), es decir que carecen de la expresión de los correceptores CD4+ y CD8+, experimenten un reordenamiento del receptor de las células T (TCR), llevándolos a la siguiente etapa, donde se generan timocitos CD4+CD8+, dobles positivos (DP) (Kumar *et al.*, 2018, Velardi *et al.*, 2020).

Posteriormente estas se someten a un estado de cambios epigenéticos, que involucran la expresión de distintos factores de transcripción. Esto da lugar a la formación de timocitos positivos únicamente (SP) para CD4+ vírgenes, que expresan particularmente MHC de clase dos (MHC-II), destinados a funcionar como linfocitos cooperadores o CD8+ vírgenes, que presentan exclusivamente MHC de clase uno (MHC-I) adjudicándoles la capacidad de actuar como células t citotóxicas (Figura 1) (Taniuchi, 2018).

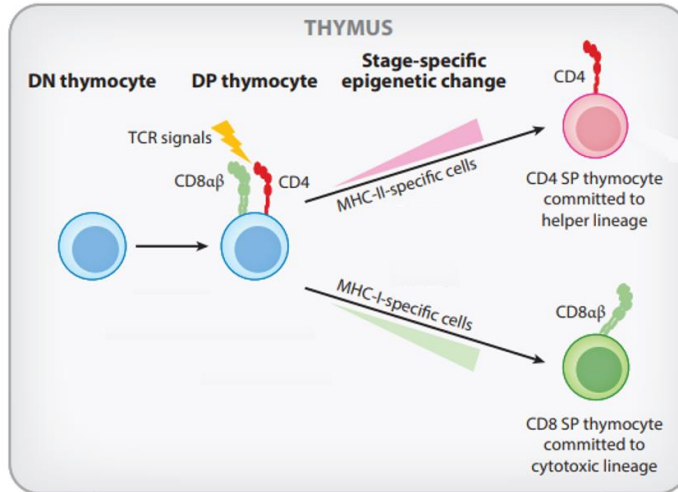


Figura 1. Modelo esquemático de la diferenciación de células T CD4+ auxiliares y CD8+ citotóxicas (Taniuchi,2018).

A partir de este punto, los linfocitos vírgenes atraviesan un proceso de verificación, en el timo, para evitar el paso de células autorreactivas hacia los órganos secundarios del sistema inmune. Una vez pasado esto, las células se dirigen hacia tejido linfoide por medio del sistema circulatorio, específicamente a través de regiones vasculares especializadas llamadas vénulas endoteliales altas (HEV) (Hunter *et al.*, 2016). Es aquí, donde iniciarán una variedad de procesos necesarios para la activación de los linfocitos (Tai *et al.*, 2018).

2.1 Activación de linfocitos T

Dentro de los mecanismos participes de la respuesta inmune adaptativa, la activación de los linfocitos T es presuntamente el más importante. El resultado se resume en un aumento en el número de linfocitos capaces de reconocer antígenos específicos y llevar a cabo una respuesta que contribuya a su eliminación con el fin de defender al organismo hospedero (Tai *et al.*, 2018).

Tradicionalmente el proceso es descrito por la comunicación entre el linfocito en cuestión (CD4+ o CD8+) y una APC (Luckheeram *et al.*, 2012). Estas representan un grupo heterogéneo de agentes inmunitarios que incluyen macrófagos, células de Langerhans, linfocitos B y células dendríticas (DCs), estas últimas son consideradas las APCs por excelencia. Existen tres etapas durante la activación de las células T por parte de las DCs: la presentación del antígeno, el reconocimiento del antígeno por parte de las células T y la formación de señales coestimuladoras. Asimismo, la formación de una sinapsis inmunológica (IS), que se define como una compleja

estructura que se forma a partir de las regiones de contacto de las células T y las DC, este proceso tiene como propósito permitir la interacción entre ambas células y juega un papel importante para llevar a cabo la respuesta inmunológica (Tai *et al.*, 2018).

Durante la sinapsis formada entre DCs y células T, se requieren tres señales para la activación de células T específicas de antígeno (Hwang *et al.*, 2020). La primera señal, involucra al TCR, que no solo identifica simultáneamente a complejos de péptido-MHC derivados de células huésped infectadas por patógenos, sino que también reconoce estructuras similares derivadas de células sanas del huésped, llamados autoantígenos. La especificidad del TCR por el antígeno se encuentra en el segmento V, que está compuesto por el N-terminal de dos polipéptidos TCR (Govers *et al.*, 2010). Tanto V alfa como V beta tienen 3 regiones hipervariables conocidas como la región determinante de la complementariedad. CDR3 es la región hipervariable más grande y determina directamente la especificidad de unión al antígeno de TCR a través de grandes cambios conformacionales (Feng *et al.*, 2015).

Cuando el segmento V del TCR identifica un complejo antígeno/MHC, el heterodímero TCR envía la señal de activación al núcleo celular a través de los componentes transmembrana constantes del complejo CD3 (Schamel *et al.*, 2005). Por lo tanto, la señalización de TCR tiene un papel clave en la determinación del destino de las células T.

Como segunda señal, se requiere la interacción de moléculas coestimuladoras en la interfaz entre DC y células T (B7/CD28, LFA-1/ICAM-1 e ICAM2, CD2/LFA-3). Existen distintas vías de señalización asociadas a la activación de los linfocitos T, que pueden variar en el origen de la señal y los mensajeros involucrados, así como converger en distintas etapas del proceso. Una de las mayormente descritas, inicia con la fosforilación en motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores (ITAM) en el lado citosólico del complejo TCR-CD3 por las quinasas de la familia, Lck y Fyn (Rossy *et al.*, 2013). Estos eventos permiten el reclutamiento y la activación de la proteína asociada a la cadena ζ de la tirosina quinasa de 70 kDa (ZAP-70). A su vez, esto potencia la fosforilación de la cadena ζ , promoviendo la formación de pequeños agregados de proteínas, conocidos como microclusters (MC), esenciales para las vías de señalización intracelular río debajo de la conexión con el TCR, como la señalización mediada por Ca^{2+} (Trebak *et al.*, 2019).

De particular importancia en la señalización de Ca^{2+} es el reclutamiento y la activación de la enzima intracelular, fosfolipasa C (PLC), específicamente en esta vía la $\text{PLC}\gamma 1$. Este proceso depende de varias moléculas de señalización, incluido el enlazador para la activación de células T (LAT); proteína leucocitaria que contiene el dominio SH2 de 76 kDa (SLP-76); Vav1, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF); Itk; y c-Cbl (Figura 2). La PLC induce la síntesis de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), que se produce por su acción hidrolítica sobre el fosfo-inositol-4,5-bifosfato (PIP_2). De esta manera, se da la activación de los receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3R), llevando a una salida de Ca^{2+} del RE (Joseph *et al.*, 2014).

Este aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular afecta la regulación de varios eventos fisiológicos. Por un lado, eventos como la disminución de la motilidad, el aumento de la propagación y la lisis de las células diana infectadas por parte de las células T citolíticas (CTL), son inducidas por un aumento moderado y transitorio del Ca^{2+} citosólico. En contraste, procesos como la proliferación, la producción de citocinas, la diferenciación de células T vírgenes en los subtipos efectores, la maduración y la transcripción de genes requieren una elevación intensa y prolongada del Ca^{2+} intracelular (Joseph *et al.*, 2014).

Además, la alza en los niveles de Ca^{2+} también promueve la motilidad mitocondrial, estas se translocan activamente hacia el IS y se localizan próximas a los canales CRAC. Esto permite que las mitocondrias reduzcan eficientemente la generación de microdominios locales de Ca^{2+} cerca de los canales CRAC (Schamel *et al.*, 2005). Asimismo, las mitocondrias inhiben la regulación positiva de PMCA dependiente de Ca^{2+} , lo que da como resultado una disminución de la eliminación de Ca^{2+} por parte de PMCA. En general, esta redistribución sirve para mantener la elevación global de Ca^{2+} de larga duración necesaria para la activación generalizada de los linfocitos T (Joseph *et al.*, 2014).

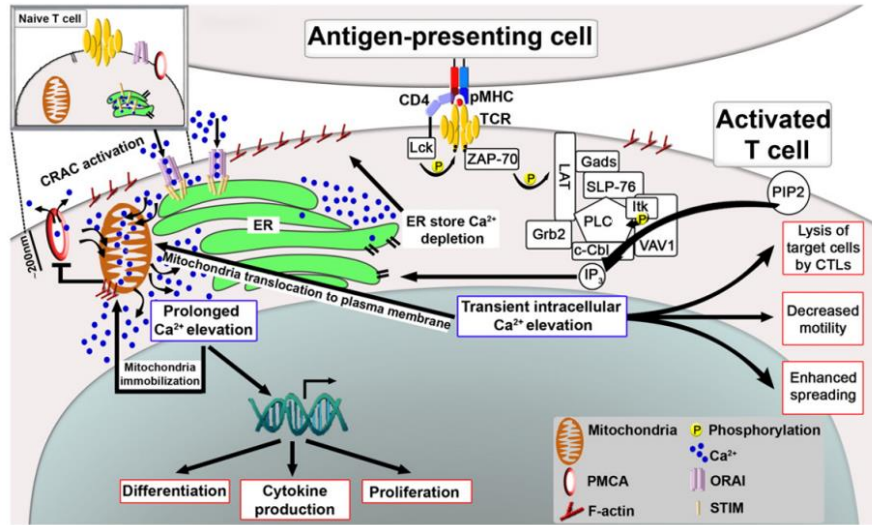


Figura 2. Vías de señalización participes durante la activación de las células T (Joseph *et al.*, 2014).

En contraste, existen estudios que han demostrado que hay antígenos capaces de inducir vías de señalización para la activación de los linfocitos T, independientes a la fosforilación de la quinasa Lck (Li *et al.*, 2018). Dentro del mecanismo se destaca la participación de las proteínas G, una familia de proteínas transductoras de señales, conformadas por tres subunidades (α , β y γ), que se encuentran normalmente acopladas a su receptor (GPCR) de manera inactiva (Kamoto *et al.*, 2015). Estas proteínas, específicamente la $G\alpha 11$, conducen a la activación de la $PLC\beta$, generando un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, a través de los canales de Ca^{2+} del RE y las mitocondrias, como se describió previamente. Así mismo, se ha observado que induce la activación de la proteína quinasa C (PKC), proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), ERK-1 y ERK-2 y la translocación de los factores de transcripción NF-AT y NF- κ B. Todos estos agentes actúan como segundos mensajeros en la proliferación, producción de citocinas y diferenciación de células T vírgenes (Bueno *et al.*, 2006, Joseph *et al.*, 2014).

Como se mencionaba anteriormente, la interacción del TCR con el MHC, la estimulación por correceptores y señalización de segundos mensajeros forman parte de las primeras dos señales del proceso de activación. Sin embargo, como ya fue citado, estas señales conducen la resolución de la tercera y última señal, que concierne a la liberación de citocinas por parte de las APC, que emiten señales a través de receptores de citoquinas a las células T para polarizarlas hacia un fenotipo efector (Curtsinger *et al.*, 2010).

A partir de este punto, los linfocitos adquieren la capacidad de realizar sus funciones específicas. En el caso de las células CD4+, se encargarán de la secreción de factores que sirvan como señales para la estimulación de otras células inmunitarias y las células CD8+, adquirirían capacidades para eliminar a patógenos específicos que sean dañinos para el organismo, por medio de la secreción de citocinas citotóxicas (Hwang *et al.*, 2020).

2.2 Muerte celular de linfocitos T

Después de la respuesta inmune, los linfocitos activados tienen que ser eliminados. La alta capacidad proliferativa de los linfocitos activados por antígenos requiere un control efectivo de su vida útil para mantener la homeostasis de los linfocitos (Brenner *et al.*, 2008). Para ello, se llevan a cabo señales que conducen a vías de muerte celular regulada (MCR), entre las cuales se ha descrito particularmente la participación de la apoptosis en el cese de la respuesta inmune adaptativa (Krammer *et al.*, 2007).

En el contexto de la MCR, existe una subclasificación denominada muerte celular programada (MCP), la cual está programada en la vida de la célula para preservar el funcionamiento de la homeostasis tisular fisiológica (Elmore, 2007). La apoptosis es un tipo de MCR coordinado y dependiente de la actividad de una familia de cisteín-proteasa, denominadas caspasas y una serie de cascadas de señalización que culminan en la muerte de las células (Galluzzi *et al.*, 2018).

Hasta el momento existen dos principales vías de muerte apoptótica. La primera es, la vía intrínseca, que se caracteriza por iniciar a partir de perturbaciones mitocondriales que incluyen, pero no se limitan, a alteraciones en los niveles de Ca^{2+} provenientes del retículo endoplasmático (RE) que pueden llevar a la activación y movilización de factores, normalmente relacionados con el metabolismo celular (proteínas de la familia BH3, BAX, BAK, SMAC y citocromo C) (Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016).

En contraste, la segunda es conocida como la vía extrínseca, que se origina a partir de alteraciones extracelulares, por medio de receptores de muerte presentes en la membrana plasmática (Galluzzi *et al.*, 2018). Ambos eventos, de manera individual o vinculada, culminan en la activación de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, -9 y -10) que conduce a la de aquellas caspasas

ejecutoras (caspasa-3 y -7) y por ende la inducción de la muerte celular (Galluzzi *et al.*, 2018, Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016) (Figura 3).

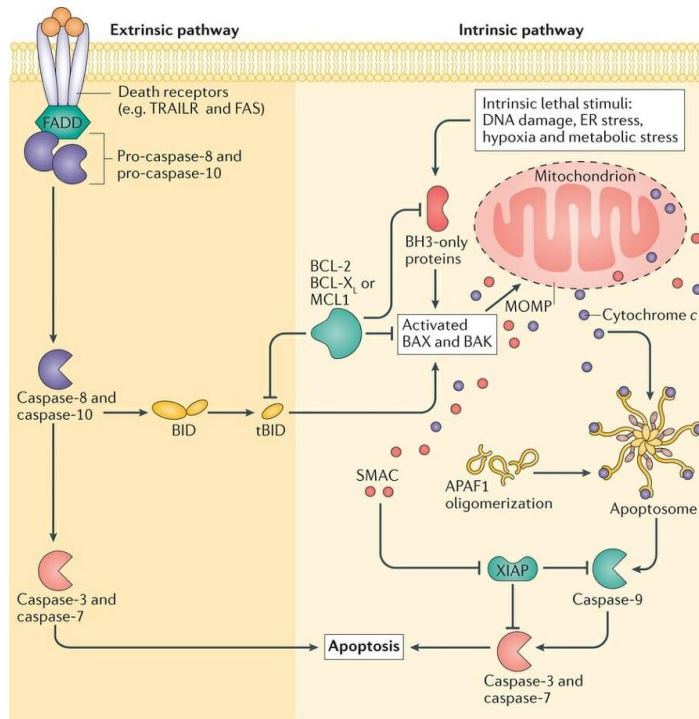


Figura 3. Las vías de la apoptosis: extrínseca e intrínseca (Ichim & Tait, 2016).

El papel del Ca^{2+} como desencadenante de la muerte ha sido ampliamente estudiado. Diversos estudios demostraron que inductores de apoptosis tanto extrínseca como intrínseca inducen una entrada letal de Ca^{2+} a la célula. A medida que se ha elucidado como se regula el Ca^{2+} dentro de la célula, las vías de señalización por las cuales las disregulaciones cálcicas conllevan a la muerte celular han quedado más claras.

Dentro de este contexto, se sabe que el Ca^{2+} está presente en medio externo e interno de la célula y que este es modulado por canales a lo largo de la misma. Estos se encuentran presentes en la membrana plasmática y algunos organelos, principalmente la mitocondria y el RE. Este último, es considerado el mayor reservorio de Ca^{2+} intracelular, en donde su regulación se da por medio de canales de entrada y salida, como son los IP_3R y receptores de rianodina (RYR), así como aquellos únicamente de entrada como lo son las ATPasas de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA) (Figura 4). La liberación de Ca^{2+} desde el RE es llevada a cabo principalmente por la estimulación agonista de los IP_3R , a través de la vía PLC, como se

describió previamente (Krebs et al, 2015). La activación de esta vía por parte de proteínas G y tirosin cinasas también se ha visto involucrada en procesos apoptóticos (Galluzzi *et al.*, 2018, Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016).

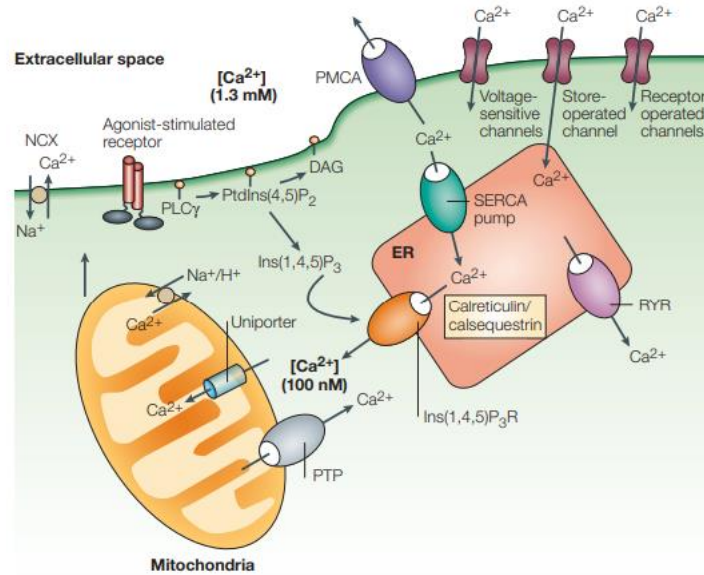


Figura 4. La regulación del Ca^{2+} intracelular (Krebs et al, 2015).

Dado que la mayoría del Ca^{2+} en la mitocondria proviene del RE, gracias a la existencia de microdominios del Ca^{2+} . Un exceso en la cantidad de Ca^{2+} en citosol y posteriormente en retículo, causa la acumulación de este ion en la mitocondria, resultando en la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), ya sea por una acción directa de Ca^{2+} o que cause alteraciones al complejo II de la cadena transportadora de electrones (ETC) que conlleva a una producción de ROS (Krebs et al, 2015). Estas desregulaciones generan la apertura en el mPTP, que provoca la ruptura de la membrana mitocondrial externa (OMM), terminando en la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo c, conduciendo a la muerte celular (Monteith et al., 2017).

En este sentido, se han descrito dos conceptos para la inducción de la muerte de células T durante el cierre de una respuesta inmune: muerte celular inducida por activación (AICD) y muerte autónoma de células T activadas (ACAD) (Brenner *et al.*, 2008).

La AICD describe la inducción de la muerte celular en células T ya activadas mediante la reestimulación de sus TCR. Durante la fase de expansión de la respuesta inmunitaria, las células

T poseen un fenotipo resistente a este tipo de muerte, mientras que cambian gradualmente hacia una sensibilidad a la AICD durante la fase de contracción. Esta vía de muerte puede depender o no de la actividad de receptores de muerte y, por lo tanto, involucra vías apoptóticas tanto extrínsecas como intrínsecas (Brenner *et al.*, 2008, Zhan *et al.*, 2017).

La ACAD es un tipo de muerte que se activa por la privación de factores de supervivencia en células T. Esta, a diferencia de la AICD, no está mediada por factores externos que interactúan con receptores de muerte. La falta de estimulación pro-supervivencia como factores de crecimiento, citocinas y otros segundos mensajeros inducen un aumento al alza en los niveles de proteínas pro-apoptóticas (proteínas BH3 y BID) que conllevan a alteraciones mitocondriales que culminan en la inducción de la muerte, evidenciando como se explicó previamente su relación con la vía intrínseca de la apoptosis (Zhan *et al.*, 2017).

Distintos autores sugieren que, por un lado, la AICD parece estar mayormente vinculada a la eliminación de células T crónicamente activadas y potencialmente autorreactivas, mientras que, la ACAD contribuye principalmente con la regulación a la baja del número de células T durante la fase de contracción. No obstante, se argumenta que estos procesos de muerte no son mutuamente exclusivos e incluso es probable que cooperen durante el cierre de una respuesta inmunitaria (Brenner *et al.*, 2008, Zhan *et al.*, 2017).

Asimismo, se ha descrito que las desregulaciones funcionales de una amplia variedad de proteínas implicadas en vías de MCR, como estas, se encuentran relacionadas con procesos oncogénicos. Esta actividad da origen al desarrollo de patologías como las leucemias, las cuales se caracterizan por presentar vías de supervivencia y proliferación constitutivas, sin poder realizar una correcta activación, así como por ser capaces de evadir la muerte celular.

3. Leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL)

Las leucemias consisten en un tipo de cáncer, que conciernen a una población específica de células sanguíneas (Chennamadhavuni *et al.*, 2022). Durante esta patología, el desarrollo de las células sanguíneas se ve interrumpido por el crecimiento descontrolado de aquellas anormales, impidiendo las funciones normales como combatir enfermedades o infecciones, así como, prevenir hemorragias graves (Allart-Vorelli *et al.*, 2015).

De acuerdo al grado en la tasa de proliferación, esta patología puede ser clasificada como aguda, refiriéndose a una progresión rápida de la enfermedad, en donde se crean células sanguíneas inmaduras en lugar de maduras, o crónica, cuando los leucocitos se desarrollan de una manera más lenta, demorando años en causar síntomas (Chennamadhavuni *et al.*, 2022). Asimismo, puede dividirse según el linaje celular progenitor, como: linfoide (linfocitos T, B y células natural killer (NKs)) y mieloide (fagocitos y monocitos) (Polychronakis *et al.*, 2013).

Estas malignidades representan el primer lugar en incidencias a nivel mundial en edades infantiles, atribuyéndoles un 34.1% (Globocan, 2020) (Figura 5). Dentro de estos casos, la leucemia linfocítica/linfoblástica aguda (ALL) es el tipo más común en niños con edades de 1 a 4 años (Siegel *et al.*, 2017). Particularmente la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), representa el 15-20% de los casos totales de ALL, presentando la tasa más alta de reincidencia dentro de esta categoría, con una tasa de supervivencia del 25% (Raetz & Teachey, 2016).

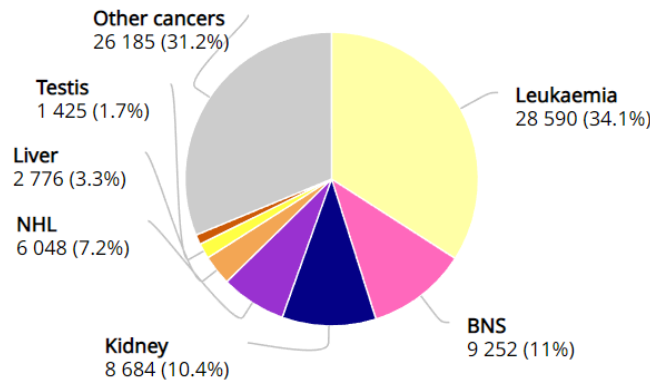


Figura 5. Índices de incidencia de los distintos tipos de cáncer en edades infantiles a nivel mundial (Globocan, 2020)

La T-ALL se origina de alteraciones genéticas en los progenitores hematopoyéticos destinados al desarrollo de células T. Esto ocurre como el resultado de un proceso oncogénico de varios pasos que involucra la activación constitutiva de NOTCH-1, factores de transcripción relacionados con el bloqueo de la maduración (como: TAL1, TLX1, TLX3, LMO1, LMO2, MEF2C, HOXA, y NKX2.1) y componentes claves de las diferentes vías de señalización (RAS, PTEN y proteínas de la vía IL7R–JAK–STAT) (Chiaretti & Foà, 2009, Van Vlierberghe & Ferrando, 2012). Estos factores son participes en los procesos que controlan el crecimiento, la

proliferación, el compromiso del linaje y la supervivencia de los progenitores de células T (Van Vlierberghe & Ferrando, 2012).

3.1 Activación y muerte células de T-ALL

Entre los diferentes mecanismos que conllevan a la mutación de los genes involucrados con la generación de T-ALL, en los últimos años se ha destacado la translocación de los genes relacionados al TCR, ya que, aun cuando no se ha encontrado una mutación específica del TCR, se ha reportado que esta vía de señalización puede ser un blanco terapéutico interesante (Lemonnier et al., 2016). Esto se debe a que, actualmente se conoce que la estimulación del TCR o del complejo CD3 conduce a la muerte de los linfocitos leucémicos en vez de inducir su activación. En donde, el mecanismo de muerte se asemeja al presentado en la selección negativa de células T en el timo. Trinquand et al., (2016), describen esta vía de muerte como un mecanismo apoptótico dependiente de la concentración y tiempo, en donde se observa la activación de las caspasas 3 y 7, la fosforilación de las proteínas ERK, AKT, JNK y de algunas tirosin quinasas involucradas en el reclutamiento de la PLC y el aumento de Ca^{2+} citosólico (LYN, FYN y LCK), además, de la exposición de los marcadores de activación temprana CD69/CD25. Asimismo, se demostró que al inhibir la activación del TCR/CD3 se reduce la inducción de muerte celular y la expresión de los marcadores CD69/CD25.

Asimismo, se ha reportado que el uso de otros blancos terapéuticos involucrados en la activación de la vía de señalización del TCR inducen un tipo de muerte celular similar al previamente descrito. Tal es el caso, de los anticuerpos dirigidos hacia CD1 y CD3, como UMG2, así como diversos corticosteroides que interactúan con el receptor NTAL (non-T-cell-activation linker). Los cuales promueven un aumento en la expresión de CD25/CD69 y la producción de citocinas proinflamatorias (IL-2, TNF- α y INF- γ), como si se tratara de una activación de las células T-ALL, pero culminan en la muerte de estas (Rillo *et al*, 2021, Svojgr *et al*, 2012).

Por último, al igual que en los linfocitos T sanos, se ha observado que esta vía de muerte celular por activación puede verse iniciada por la actividad de proteínas G o tirosin cinasas (Li et al, 2018). En donde se ha reportado en líneas de células de T-ALL que la expresión de CD69 está ligada a la actividad de la proteína G α 11 a través de la acción del GPCR. Estos eventos se ven relacionados a una cascada de señales que incluyen alteraciones cálcicas, activación de proteínas

como, PCK, ERK-1 y ERK-2 y la traslocación de factores de transcripción, como NF-AT y NF- κ B, que podrían participar en la inducción de la muerte celular (Bueno et al., 2006).

Es por esto que actualmente dentro de los tratamientos contra la T-ALL, se busca la implementación de agentes que interaccionen con las células del sistema inmune. Con el fin de encontrar terapias que logren inducir una activación de las células leucémicas que las redirija a su destino de muerte.

4. Inmunoterapias

Para seleccionar el o los tratamientos contra la leucemia se consideran factores que incluyen; el tipo de leucemia, su localización y estado de progresión, al igual que el estado funcional, la edad y cualquier patología adicional del paciente (Hosseinzadeh *et al.*, 2017). Entre las opciones más utilizadas se encuentran las quimioterapias y el trasplante de médula ósea de donantes sanos (Abbas y Rehman, 2018). Sin embargo, ambas alternativas presentan desventajas como la citotoxicidad inespecífica y la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) que comprometen la funcionabilidad del sistema inmune, dejando al paciente propenso a infecciones y enfermedades (Damyanov *et al.*, 2018).

Es por esto, que en la actualidad se busca el desarrollo de otros tratamientos que vayan dirigidos hacia sellos distintos de las células cancerosas. Entre las cuales, se destaca la evasión a la destrucción por el sistema inmune y la resistencia a la muerte células, que juegan un papel fundamental para el desarrollo y progresión de la patología (Hanahan & Weinberg, 2011). En este escenario las inmunoterapias figuran como una alternativa, pudiendo generar un despertar en la respuesta inmune del paciente, así como poseer un efecto citotóxico sobre las células cancerosas (Cajaraville *et al.*, 2002).

Los términos bioterapia, modificación de la respuesta biológica o inmunoterapia son utilizados para referirse a las aproximaciones terapéuticas para su aplicación en una serie de padecimientos como son: inmunodeficiencias, enfermedades bacterianas, asma, alergias, enfermedades autoinmunes y cáncer (Casale *et al.*, 2014). Las inmunoterapias contra el cáncer se fundamentan en la liberación de puntos de control inmunológico y a su vez inhibir señales o moléculas derivadas de tumores que impiden una inmunidad tumoral efectiva (Baxevanis *et al.*, 2009). Se ha reportado que estas terapias eliminan a las células cancerosas, al mismo tiempo que

proporcionan señales y antígenos tumorales para promover el sistema inmunitario innato y adaptativo para apoyar simultáneamente la eliminación del tumor.

De manera general, las inmunoterapias pueden ser clasificadas en dos tipos: 1) Las inmunoterapias pasivas, consistiendo en la transferencia de anticuerpos o células previamente generados *in vitro* que se dirijan contra el tumor; 2) Las inmunoterapias activas, que se enfoca en activar *in vivo* el sistema inmunitario e inducir una respuesta específica contra los antígenos tumorales (Inogés *et al.*, 2004).

4.1 IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP® (ICRP, Extracto dializable de leucocitos de bazo bovino) es un tipo de inmunoterapia pasiva clasificado dentro de los extractos dializables de leucocitos (EDL). En el contexto del cáncer, el ICRP ha demostrado modular las células inmunes humanas y murinas e inducir citotoxicidad contra líneas celulares cancerosas humanas y murinas.

En cuanto al papel inmunomodulador del ICRP, se ha reportado que disminuyó citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL6 y NO en macrófagos humanos y murinos estimulados con lipopolisacárido (LPS) (Franco-Molina *et al.*, 2007, Franco-Molina *et al.*, 2004). Además, aumentó la actividad antioxidante de CAT, GPx y SOD y disminuyó la producción de NO, y TNF- α , COX-2 y PGD2 y la fosforilación de I κ B en este mismo modelo. Así como también, el ICRP demostró disminuir la actividad de unión de la subunidad p50 y p65 de NF- κ B al ADN en macrófagos humanos que habían sido estimulados con LPS (Franco-Molina *et al.*, 2006, Franco-Molina *et al.*, 2007).

Además, el ICRP demostró una actividad quimioprotectora, aumentando los porcentajes de granulocitos, mejorando los niveles de poblaciones hematológicas y recuperando la ganancia de peso de los ratones expuestos a la quimioterapia (Coronado-Cerda *et al.*, 2016). En ensayos clínicos de cáncer de mama y pulmón, se observó que la administración de ICRP, aumenta el número total de leucocitos, así como las subpoblaciones CD4+, CD8+, CD16+ y CD56+, mejorando la calidad de vida de los pacientes (Franco-Molina *et al.*, 2017; Lara *et al.*, 2010). Por último, ha demostrado inducir la activación de células NK, modulando su fenotipo hacia la población CD56dim/CD16 a partir de un cambio en los receptores expuestos en estas células, y de

linfocitos T de pacientes sanos, generando la expresión del marcador de activación temprana CD69 (Lorenzo-Anota *et al.*, 2022).

Dentro del repertorio de tipos de cáncer en los que se ha reportado que el ICRP presenta un efecto citotóxico se encuentran; melanoma murino (B16F10) (Franco-Molina *et al.*, 2006) cáncer de mama (MCF-7, BT-474, MDA-MB231 y 4T1) (Franco-Molina *et al.*, 2008; Martínez-Torres *et al.*, 2020; Reyes -Ruiz *et al.*, 2021), cáncer de pulmón (A-427, CALU, U937) (Martinez-Torres *et al.*, 2019), cáncer cervicouterino (HeLa) (Martinez-Torres *et al.*, 2019; Martínez-Torres *et al.*, 2018; Martínez -Torres *et al.*, 2020), linfoma murino (L5178Y-R) (M. A. Franco-Molina *et al.*, 2006) y T-ALL (CEM y Molt-4) (Lorenzo-Anota *et al.*, 2020).

Distintos estudios han demostraron que el ICRP promueve una producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduce a daño mitocondrial, degradación del ADN y detención del ciclo celular, lo que desencadena la muerte celular regulada dependiente de ROS en líneas celulares tumorales (MartinezTorres *et al.*, 2019; Martínez-Torres *et al.*, 2020; Martínez-Torres *et al.*, 2018; Reyes-Ruiz *et al.*, 2021). Específicamente en células de T-ALL, estas características se mantienen, difiriendo en la modulación de proteínas pro apoptóticas (Bax y Bcl-2) y, finalmente, la activación de caspasa-3, lo que induce apoptosis en las células.

Adicionalmente, el ICRP reveló que, en un modelo de cáncer de mama murino, induce MCI que involucra la maduración de DC en ganglios linfáticos y un aumento de linfocitos T CD8+ en ganglios linfáticos, sangre periférica y el sitio tumoral que conduce al desarrollo de una memoria inmunogénica (Reyes-Ruiz *et al.*, 2021). Asimismo, en un modelo de melanoma murino, el ICRP combinado con oxaliplatino aumentó la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP) y la tasa de ICD (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2017).

Por último, en cuanto a la participación del Ca^{2+} en el mecanismo de muerte celular inducido por el ICRP, se ha descrito que, en células de cáncer de mama y leucémicas, la MCR es dependiente de un aumento de Ca^{2+} citoplasmático, el cuál proviene inicialmente de una depleción del Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplasmático por la apertura de los receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃R) y receptores de rianodina (RYR). En la cual, se ha propuesto que la actividad de estos canales podría darse gracias a la producción de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) a partir de la hidrólisis de fosfo-inositol-4,5-bifosfato (PIP₂) por la fosfolipasa C (PLC) (Lorenzo-Anota, 2022).

Los datos mencionados previamente sugieren que el ICRP induce una activación del sistema inmune y apoptosis a través de alteraciones cálcicas en células de T-ALL. Sin embargo, se desconoce si esta activación se da en células de T-ALL y la activación y muerte celular provocadas por el ICRP se encuentran asociadas a alteraciones cálcicas vía tirosin cinasas o GPCR, en células de T-ALL.

Por todo lo anterior, este trabajo se enfoca en evaluar si el ICRP es capaz de inducir la activación temprana de células de T-ALL, así como determinar si la activación y muerte celular inducida por el ICRP comparten una misma vía de señalización mediante alteraciones cálcicas vía tirosin cinasas o GPCR, en células de T-ALL. Todo esto para ampliar el conocimiento de su mecanismo de acción en células leucémicas y proponer su uso en combinación con otros tipos de inductores de muerte celular en malignidades hematológicas.

III. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) se refiere a un tipo de cáncer derivado de médula ósea que afecta específicamente a los linfocitos T. Impidiendo su correcto desarrollo y activación, necesarios para ejecutar una óptima respuesta inmune ante patologías. Las células de T-ALL poseen mutaciones que les confieren la capacidad de evadir al sistema inmune y procesos de muerte celular. Por lo que la mayoría de tratamientos buscan la inducción de la MCR y/o la estimulación de una respuesta inmunitaria.

En este sentido, las inmunoterapias poseen la capacidad de mejorar el funcionamiento del sistema inmune del paciente contra el cáncer u optimizar la respuesta ante otros tipos de tratamientos. Entre ellas, se destaca el IMMUNEPOTENT CRP (ICRP), un extracto dializable obtenido de leucocitos de bazo bovino. Por un lado, esta terapia ha demostrado tener un efecto inmunomodulador, aumentando poblaciones de células inmunitarias en pacientes de cáncer de mama y pulmón tratados con quimioterapias y actuando como quimioprotector en células de médula ósea murina. Además de inducir la activación de células NK y linfocitos T de donantes sanos. Asimismo, este presenta un efecto citotóxico en una amplia variedad de células cancerosas, incluyendo líneas celulares de T-ALL. En este ultima, se ha observado que el ICRP, induce apoptosis dependiente de un aumento de Ca^{2+} citoplasmático, que inicia por medio de la depleción de la actividad de los canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (IP₃R y RyR).

No obstante, el uso de esta inmunoterapia se ve limitado debido a que se desconocen factores de su mecanismo de acción. Entre estos, se destaca la posibilidad de que el ICRP induzca la activación de células T-ALL, así como que la activación y la muerte celular compartan una misma vía de señalización. Por consecuente, este trabajo buscó evaluar si el ICRP induce la activación de células de T-ALL (CD69), así como, si la activación y muerte celular están asociadas a alteraciones cálcicas vía tirosin cinasas o GPCR. Todo esto con el objetivo de ampliar el conocimiento del mecanismo de acción del ICRP en células de T-ALL.

IV. HIPÓTESIS

El IMMUNEPOTENT CRP induce la activación y muerte celular por medio de alteraciones cálcicas vía tirosin cinasas o GPCR en células de T-ALL

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la activación y muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP están asociadas a alteraciones cálcicas y a la activación de tirosin cinasas o GPCR en células de T-ALL.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del ICRP en la activación de células de T-ALL
2. Determinar la implicación del Ca^{2+} en la activación inducida por el ICRP en células de T-ALL
3. Elucidar la participación de las PLC en la activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL
4. Analizar el rol de los receptores asociados a tirosin cinasas y proteínas G en la activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL

VII. METODOLOGÍA

1. Mantenimiento de las líneas celulares

Para este proyecto se utilizaron las líneas celulares de T-ALL humana: Molt-4 y CCRF-CEM, disponibles en el banco de líneas celulares del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) ubicado en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

Para ambas líneas, el cultivo celular se realizó en medio RPMI-1640 (Medio Roswell Park Memorial Institute /mezcla nutricional) (GIBCO®), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (CORNING Cellgro®) y 1% de penicilina, estreptomina, neomicina (PEN) (GIBCO®). Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera controlada con una humedad del 5% de CO₂.

Para llevar a cabo el mantenimiento de las células, primeramente, se retira el medio que contiene las células suspendidas, posterior a esto, se realiza un lavado del frasco de cultivo (CORNING®) mediante el uso de PBS con un pH de 7.4. Una vez recuperadas, se procede a centrifugarlas por 10 min a 400 rfc. En seguida, las células son teñidas con azul tripán (solución 0.4% SIGMA ALDRICH®) para realizar el conteo en una cámara de Neubauer a través del microscopio óptico (ZEISS PRIMO STAR) acatando el protocolo establecido por American Type Culture Collection (ATCC). Por último, se regresan células al frasco de cultivo en el respectivo medio. Esto se mantiene en la incubadora a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, permitiendo el uso posterior de las líneas celulares.

2. IMMUNEPOTENT CRP

El ICRP es un extracto dializable de leucocitos de bazo bovino, que es producido y distribuido por el LIV, propiedad de la FCB de la UANL, acorde al protocolo previamente descrito (Moisés A. Franco-Molina *et al.*, 2004). Con el propósito de cuantificar el ICRP, se implementó la unidad de medida de miligramo por mililitro (mg/mL), que corresponde a la cantidad total de 120mg de péptidos (5 unidades). El extracto fue almacenado a 4°C y disuelto en medio suplementado RPMI-1640 para su uso.

3. Inhibidores

Para cada uno de los ensayos que se describen a continuación (activación temprana, niveles de Ca^{2+} y muerte celular) se utilizaron distintos inhibidores para el análisis de la implicación de distintas moléculas en cada uno de los eventos, estos se mencionan a continuación:

- ✓ BAPTA (cat: B6769, Thermo Fisher Scientific), quelante de Ca^{2+} extracelular, utilizado a 1.5 mM.
- ✓ U73122 (cat: 112648-68-7, Thermo Fisher Scientific), inhibidor competitivo de la fosforilación de la PLC, utilizado a 0.8 μM .
- ✓ Suramina (cat: 129-46-4, Thermo Fisher Scientific), inhibidor competitivo del acoplamiento de proteínas G, utilizado a 0.7 μM .
- ✓ PP1 y PP2 (cat: 172889-26-8, 172889-27-9-Calbiochem), inhibidor competitivo de la activación de tirosin cinasas de la familia Src, utilizado a 2.5 μM .
- ✓ Imatinib (cat: 5906, Tocris), inhibidor competitivo de la activación de tirosin cinasas de la familia v-Abl, PDGFR y c-kit, utilizado a 10 μM

4. Ensayo de activación temprana

Para los ensayos sobre la activación de las células de T-ALL, primeramente, las células fueron sembradas a una confluencia de 1×10^5 en 100 μL por pozo en placas de fondo plano de 96 pozos (Corning Inc. Costar ®, NY, EE. UU.). Estas fueron tratadas utilizando concentraciones crecientes de ICRP (3, 6, 12 y 18 mg/mL) y se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C en una atmósfera controlada con una humedad del 5% de CO_2 . Una vez concluido el tratamiento, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo anti-CD69-alofoxicianina (CD69-APC, cat:555533, BD Biosciences) por 30min a 4°C. Finalmente, las células se lavaron utilizando buffer FACS (PBS y FBS al 2 %). La evaluación fue llevada a cabo mediante citometría de flujo (Clasificación de células activadas por fluorescencia [FACS]; BD Accury6; Becton Dickinson, San Jose, CA, EE. UU.)

Para llevar a cabo el time-lapse de activación en la línea CEM, las células fueron sembradas a la confluencia previamente establecida. Posteriormente, fueron tratadas con 3 mg/mL de ICRP y fueron incubadas a distintos lapsos de tiempo (30 min, 2, 6, 12 y 24 h). Una vez concluido el tratamiento, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo anti-CD69-APC por 30min a 4°C. Finalmente, la evaluación fue llevada a cabo mediante citometría de flujo.

Para el estudio de la implicación del Ca^{2+} , PLC, tirosin cinasas y proteínas G, las células fueron sembradas a la confluencia previamente establecida. A continuación, se realizó un pretratamiento con el inhibidor correspondiente que se incubó por 20 min, posterior a lo cual se trataron las células Molt-4 (12 mg/mL por 24h) y CEM (3 mg/mL por 12h) con ICRP. Una vez concluido el tratamiento, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo anti-CD69-APC por 30min a 4°C. Finalmente, la evaluación fue llevada a cabo mediante citometría de flujo.

5. Análisis del efecto citotóxico

Para determinar la concentración citotóxica media (CC_{50}) del ICRP, primeramente, las células fueron sembradas a una confluencia de 1×10^5 en 100 μ L por pozo en placas de fondo plano de 96 pozos (Corning Inc. Costar®, NY, EE. UU.) Después de esto, las células fueron tratadas con 6, 12 y 18 mg/mL de ICRP y sin tratamiento como control negativo, lo cual se incubó durante 24 horas a 37°C en una atmósfera controlada con una humedad del 5% de CO_2 . Una vez pasado el tiempo del tratamiento, las células fueron marcadas adicionando 100 μ L de buffer de unión de anexina (ABB) (10 mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4), ANN-APC (2.5 μ g/mL) (Molecular probes® by Life technologies™) y PI (0.5 μ g/mL) (Molecular probes® by Life technologies™) que se incubaron a 4°C por 20 min. Finalmente, esto fue analizado por citometría de flujo BD Accury C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

6. Análisis de los niveles de Ca^{2+} intracelular

Para evaluar los niveles de Ca^{2+} intracelular, se sembraron las células de T-ALL a la confluencia previamente establecida, posteriormente se trataron con la CC_{50} del ICRP, que se incubó durante 18 h a 37 °C. Para el estudio de la implicación de la PLC, tirosin cinasas y proteínas G, se realizó un pretratamiento con el inhibidor correspondiente que se incubó por 20 min. Una vez pasado el tiempo del tratamiento, las células fueron marcadas con Fluo-4 AM (Life Technologies) y 0,001 μ g/mL de Pluronic F-127 (Life Technologies), y se incubaron a 37 °C

durante 30 min. A continuación, se realizó un lavado con buffer RINGER y se analizó por citometría de flujo BD Accury C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

7. Ensayo de muerte celular

Para analizar la muerte celular, se sembraron las células de T-ALL a la confluencia previamente establecida. Con el propósito de estudiar la implicación de la PLC, tirosin cinasas y proteínas G, se realizó un pretratamiento con el inhibidor correspondiente que se incubó por 20 min. Posteriormente, las células fueron tratadas con la CC₅₀ del ICRP, que se incubó durante 24 h a 37 °C. Una vez pasado el tiempo del tratamiento, las células fueron marcadas adicionando 100µL de buffer de unión de anexina (ABB) (10 mM HEPES, 140Mm NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4), ANN-APC (2.5 µg/mL) (Molecular probes® by Life technologies™) y PI (0.5µg/mL) (Molecular probes® by Life technologies™) que se incubaron a 4°C por 20 min. Finalmente, esto fue analizado por citometría de flujo BD Accury C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos *in vitro* con una distribución normal se analizaron mediante prueba t de Student (paramétrica) para muestras pareadas. Para esto, se utilizó el software estadístico GraphPad Prism 7. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces y los valores de *p < 0.05 se consideraron significativos.

VIII. RESULTADOS

1. EL IMMUNEPOTENT CRP induce la activación de células de T-ALL.

Anteriormente se reportó que el ICRP genera la expresión del marcador de activación temprana, CD69, en células NK y, en un bajo porcentaje, en linfocitos T derivados de donadores humanos sanos (Lorenzo-Anota et al., 2022). Por lo cual, nos planteamos primeramente analizar si el ICRP induce la activación de células T cancerosas, por lo que utilizamos como modelo experimental células de T-ALL. Para esto, llevamos a cabo el análisis de la expresión de CD69, en líneas celulares de T-ALL tratadas con diferentes concentraciones de ICRP (3, 6, 12, 18 mg/mL) durante 24h. En la figura 6, se muestran los histogramas representativos (izquierda) y las gráficas (derecha) del análisis de activación. En la línea Molt-4 (figura 6A) se obtuvieron porcentajes promedio de activación del $3\pm 1.5\%$ con la concentración de 3 mg/mL, $20\pm 1.7\%$ con 6 mg/mL, $48\pm 3.1\%$ con 12 mg/mL y $83\pm 3.5\%$ con 18 mg/mL. Esto indica que el ICRP induce la activación de forma dependiente de la concentración en células Molt-4. En contraste, en la línea CEM (figura 6B) se observó que con todas las concentraciones se presentaron porcentajes de más del 80% de activación.

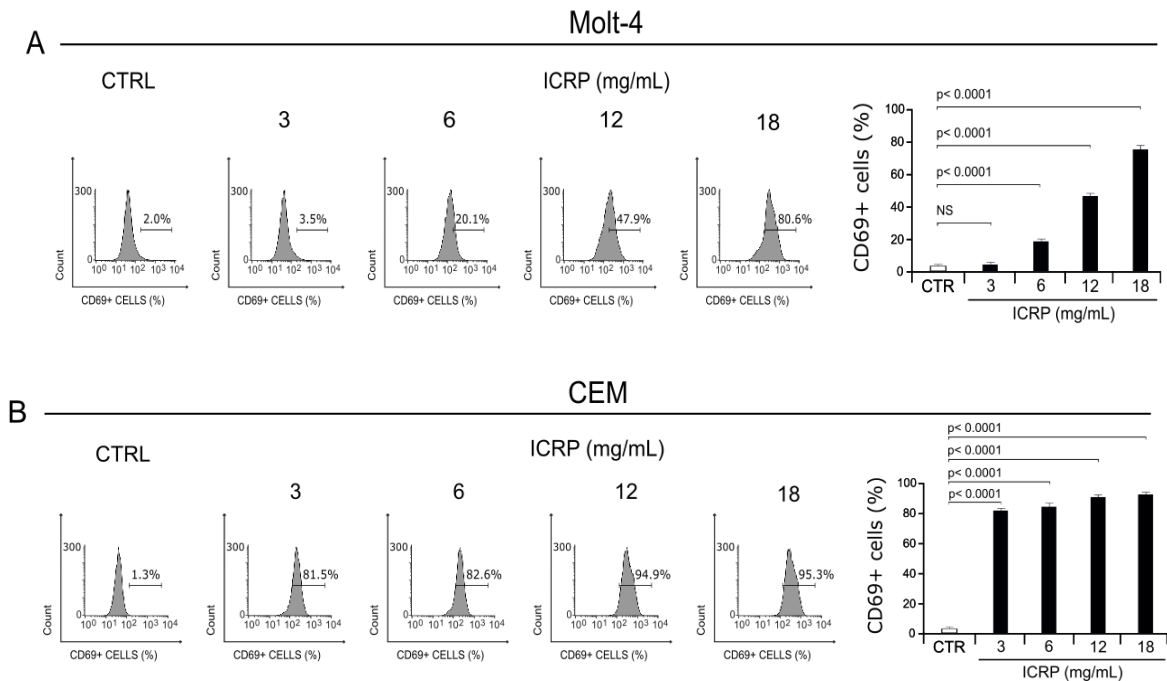


Figura 6. Análisis de la expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con IMMUNEPOTENT CRP. Histogramas representativos (izquierda) y graficas (derecha) de la expresión de CD69 utilizando el anticuerpo primario anti-CD69-APC

mediante citometría de flujo en líneas celulares de T-ALL, **A.** Molt-4 y **B.** CEM, tratadas con diferentes concentraciones de ICRP durante 24 h. El gráfico representa las medias (\pm DE) de los triplicados de al menos tres experimentos independientes.

Se ha reportado que la expresión transcripcional del gen CD69 puede presentarse desde tiempos tempranos durante de la activación, iniciando desde los 30min, y que su expresión como proteína se ha detectado desde las 2h después de la estimulación (Cibrián & Sánchez, 2017). Por esta razón decidimos analizar la expresión de CD69 a diferentes lapsos de tiempo (30min, 2, 6, 12, 16, 24h) utilizando 3 mg/mL de ICRP en la línea CEM. En la figura 7, se presentan los histogramas representativos (izquierda) y la gráfica (derecha) del análisis de activación. Como se puede apreciar, se obtuvieron porcentajes promedio de activación del $5\pm 1.3\%$ a los 30min, $9\pm 1.5\%$ a las 2h, $18\pm 2.2\%$ a las 6h, $55\pm 2.4\%$ a las 12h, $65\pm 3.6\%$ a las 16h y $83\pm 3.8\%$ a las 24h. Esto indica que el ICRP induce la activación de forma dependiente del tiempo de incubación del tratamiento en la línea CEM.

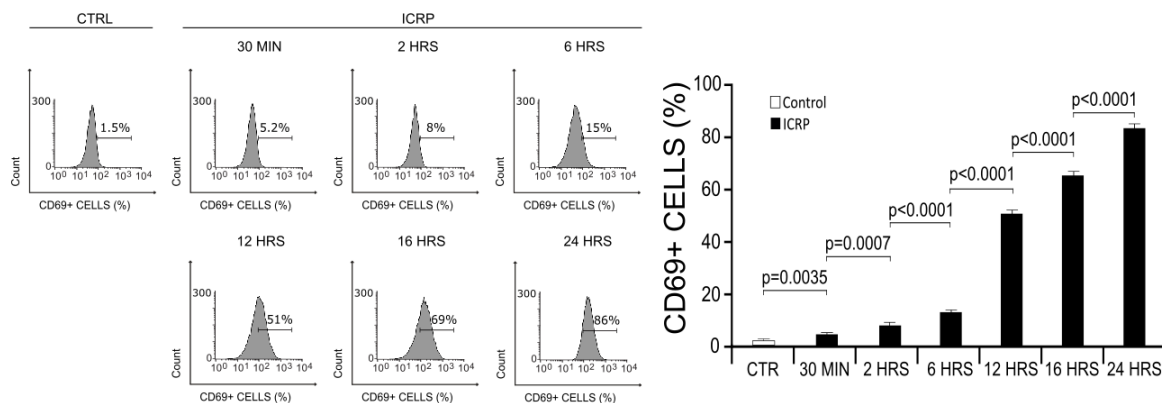


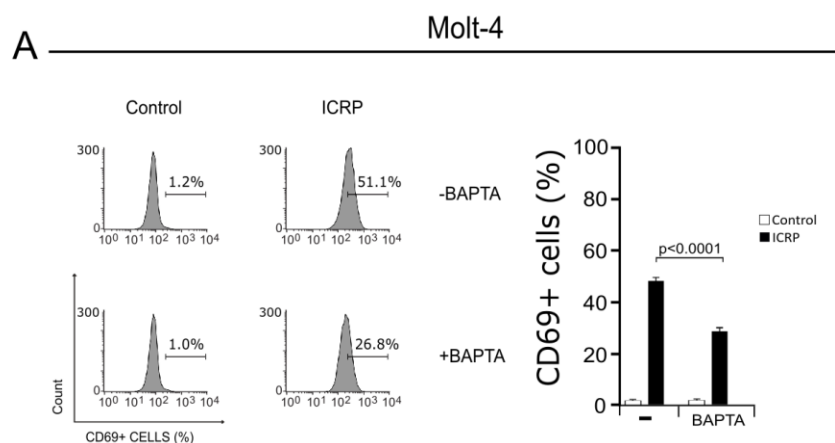
Figura 7. Evaluación de la expresión de CD69 a diferentes lapsos de tiempos en células CEM tratadas con IMMUNEPOTENT CRP. Histogramas representativos (izquierda) y grafica (derecha) de la expresión de CD69 utilizando el anticuerpo primario anti-CD69-APC mediante citometría de flujo en la línea celular CEM tratadas con 3mg/mL de ICRP a diferentes tiempos (30min, 2, 6, 12, 16, 24h). El gráfico representa las medias (\pm DE) de los triplicados de al menos tres experimentos independientes.

Cabe mencionar, que con el fin de analizar el mecanismo de activación inducido por el ICRP en células de T-ALL, el tratamiento de las células para experimentos posteriores se realizó utilizando la concentración de ICRP y tiempo de incubación, con los cuales se obtuvo un promedio de activación aproximado al 50% en cada una de las líneas celulares. En conjunto, estos resultados señalan que el ICRP induce la activación de células de T-ALL de manera dependiente del tiempo y concentración del tratamiento.

2. El IMMUNEPOTENT CRP induce activación dependiente de la entrada de Ca^{2+} en células de T-ALL.

Se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular es necesaria para completar de manera efectiva la activación de los linfocitos T, sirviendo entre otras funciones, como un segundo mensajero en la movilización de factores de transcripción relacionados con la expresión de marcadores de activación (Trebak & Kinet, 2019, Lewis, 2001). Una vez que observamos que el ICRP induce activación en células de T-ALL, nos propusimos elucidar si la entrada de Ca^{2+} está implicada en la activación inducida por el ICRP en células de T-ALL.

Para cumplir con este objetivo, realizamos un análisis de la expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con ICRP en ausencia o presencia del quelante Ca^{2+} extracelular BAPTA. En la figura 8 se muestran los histogramas representativos (izquierda) y las gráficas (derecha) del análisis de activación. Como se aprecia, en la línea Molt-4 (figura 8A), las células tratadas con ICRP presentaron un promedio del $48 \pm 4.3\%$ en la expresión de CD69. Este porcentaje se vio inhibido de manera significativa en las células tratadas con ICRP en presencia de BAPTA, las cuales obtuvieron un porcentaje promedio del $25 \pm 2.8\%$. De manera similar, en la línea CEM (figura 8B), se observó un porcentaje promedio en la expresión de CD69 del $51 \pm 3.7\%$ en las células tratadas con ICRP, lo cual fue inhibido de manera significativa en las células tratadas con ICRP en presencia de BAPTA, presentando un porcentaje promedio del $28 \pm 3.4\%$. Estos resultados indican que el ICRP induce la activación de células de T-ALL de manera dependiente de la entrada de Ca^{2+} .



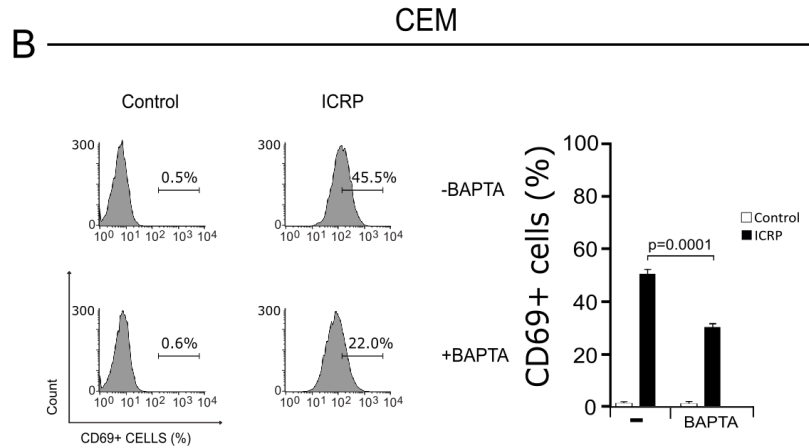


Figura 8. Determinación de la expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con IMMUNEPOTENT CRP en presencia del quelante Ca^{2+} extracelular BAPTA. Histogramas representativos (izquierda) y graficas (derecha) de la expresión de CD69 utilizando el anticuerpo primario anti-CD69-APC mediante citometría de flujo en líneas celulares de T-ALL, **A.** Molt-4 y **B.** CEM, tratadas con ICRP en ausencia y presencia de BAPTA. El gráfico representa las medias (\pm DE) de los triplicados de al menos tres experimentos independientes.

3. La fosforilación de la fosfolipasa C (PLC) está involucrada tanto en la activación como en las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL.

Dentro los diferentes segundos mensajeros que participan en el proceso de activación de linfocitos T, distintos autores han puntualizado que la fosforilación de la PLC participa, a través de la formación de IP_3 , en el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, proveniente del espacio tanto extracelular como intracelular (RE, mitocondria, etc.) (Bueno et al., 2006, Joseph et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, estas entradas de Ca^{2+} están implicadas en la expresión de marcadores de activación, que a su vez se han visto involucradas en una variedad de procesos que incluyen a la muerte celular (Trebak & Kinet, 2019, Lewis, 2001). Anteriormente se ha reportado que el ICRP induce apoptosis dependiente de la actividad de canales de Ca^{2+} del RE en células de T-ALL (Lorenzo-Anota et al., 2023). Además, previamente demostramos que el ICRP induce activación dependiente de Ca^{2+} en células de T-ALL. Por todo esto, nos propusimos determinar si la fosforilación de la PLC está involucrada en el mecanismo de activación y muerte celular inducido por el ICRP en células de T-ALL.

Con la finalidad de concretar este objetivo, primeramente, determinamos la concentración citotóxica media (CC₅₀) del ICRP en cada una de las líneas celulares de T-ALL, para utilizarla en los posteriores análisis del mecanismo de muerte celular. En la figura 9, se presentan las gráficas de la evaluación de muerte celular en las líneas Molt-4 (figura 9A) y CEM (figura 9B) tratadas con distintas concentraciones de ICRP (6, 12 y 18 mg/mL) por 24h. Como se puede observar, en ambas líneas, se obtuvo el 30±2.3% de muerte celular a 6 mg/mL, el 50±2.3% de muerte celular se obtuvo a 12 mg/mL, mientras que el 80±2.9% de muerte celular fue inducida a la concentración de 18 mg/mL. Estos resultados indican que 12 mg/mL es la CC₅₀ en ambas líneas celulares de T-ALL.

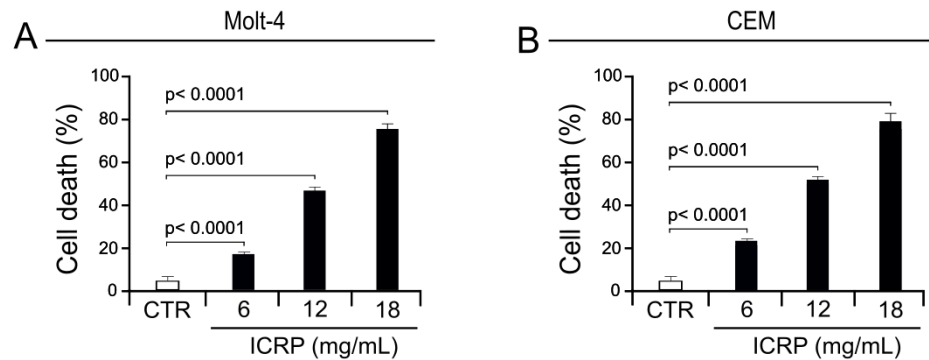


Figura 9. Evaluación de la muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL. Gráficas de la muerte celular utilizando los marcadores Anexina-V y yoduro de propidio (PI) mediante citometría de flujo en las líneas celulares de T-ALL, **A.** Molt-4 y **B.** CEM, tratadas con diferentes concentraciones de ICRP durante 24 h. El gráfico representa las medias (± DE) de los triplicados de al menos tres experimentos independientes.

Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de muerte celular, utilizando la CC₅₀ determinada anteriormente, análisis de los niveles de Ca²⁺ intracelular y expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con ICRP en ausencia o presencia del inhibidor competitivo de la fosforilación de la PLC, U73-122 (figura 10).

En la figura 10A, se muestran las gráficas del análisis de muerte celular, en donde se observa que la muerte celular inducida por el ICRP disminuye de manera significativa, de un porcentaje promedio aproximado de 52±4.1% a 26±2.8% en la línea Molt-4 y de 47±2.2% a 29±2.8% en la línea CEM, en presencia de U-73122. En la figura 10B, se presentan los histogramas significativos (izquierda) y las gráficas (derecha) de la evaluación de niveles de Ca²⁺ intracelular. De manera similar el pretratamiento con U-73122 demostró inhibir el

aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular inducido por el ICRP de un $43\pm 2.2\%$ a $22\pm 3.8\%$ en células Molt-4 y de $42\pm 3.6\%$ a $16\pm 4.7\%$ en células CEM. Por último, en la figura 10C, se encuentran los histogramas significativos (izquierda) y las gráficas (derecha) de los ensayos de activación. Como se puede apreciar, la expresión de CD69 inducida por el ICRP disminuye de manera significativa, de un porcentaje promedio aproximado de $54\pm 4.2\%$ a $33\pm 2.3\%$ en la línea Molt-4 y de $51\pm 2.9\%$ a $31\pm 1.9\%$ en la línea CEM, en presencia de U-73122. Todos estos resultados nos indican que el U-73122 inhibe la muerte celular, el calcio intracelular y la activación de células T-ALL, sugiriendo que la fosforilación de la PLC está involucrada tanto en la activación como en las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del ICRP en células de T-ALL.

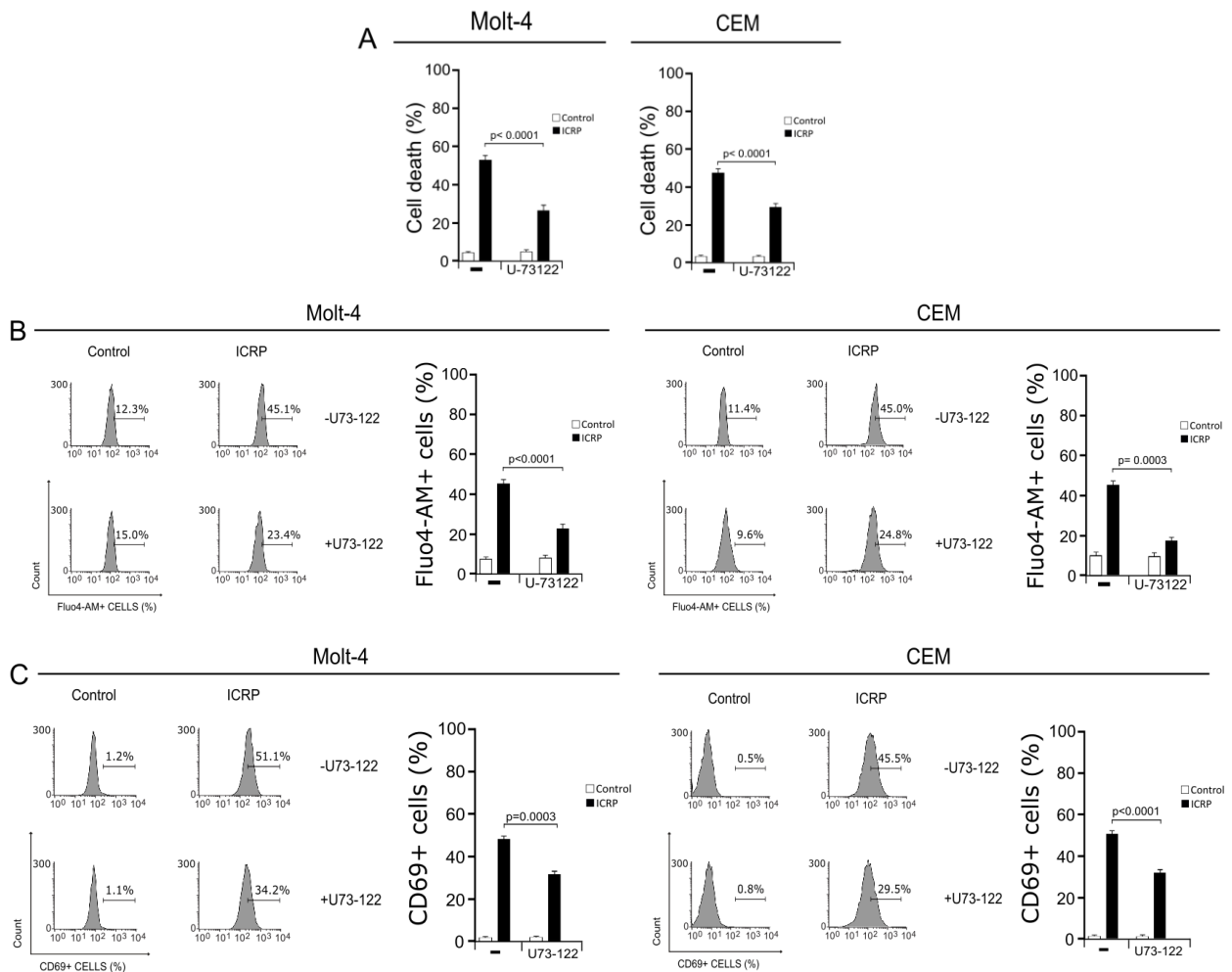


Figura 10. Análisis de la muerte celular, alteraciones cálcicas y expresión de CD69 inducidas por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL en presencia del inhibidor farmacológico U73-122. Histogramas representativos (izquierda) y graficas (derecha) de A. muerte celular mediante los marcadores Anexina-V y PI, B. niveles de Ca^{2+} intracelular por medio

del marcador Fluo4-AM y C. expresión de CD69 utilizando el anticuerpo primario anti-CD69-APC por citometría de flujo en las líneas celulares de T-ALL, Molt-4 y CEM, tratadas con ICRP en ausencia y presencia de U73-122. El gráfico representa las medias (\pm DE) de los triplicados de al menos tres experimentos independientes.

4. La actividad de las cinasas de la familia Abl está involucrada en la muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL, pero no en las alteraciones cálcicas ni en la activación.

En el contexto de activación de linfocitos T, la vía de señalización mayormente descrita se caracteriza por la participación de tirosin cinasas, a partir de la activación de sus receptores (RTKs) (Bueno et al., 2006). Entre estas, se encuentra la familia Src, que tienen la capacidad de llevar a cabo la fosforilación agente como la PLC u otras cinasas como las de la familia Abl. Esta actividad, como se mencionó anteriormente, lleva a alteraciones cálcicas relacionadas con expresión de marcadores de activación y posteriormente a la muerte celular (Joseph et al., 2014, Trebak & Kinet, 2019). Anteriormente evidenciamos que la PLC está implicada en el mecanismo de activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL. Por consiguiente, nuestro próximo objetivo fue analizar el rol de las tirosin cinasas en la activación y muerte inducida por el ICRP en células de T-ALL.

Para cumplir con este objetivo, se llevaron a cabo ensayos de muerte celular, análisis de los niveles de Ca^{2+} intracelular y expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con ICRP en ausencia o presencia de los inhibidores competitivos de la activación de las cinasas Src, PP1 y PP2 y de las cinasas Abl, imatinib (IMB) (figura 11). En la figura 11A, se presentan las gráficas del análisis de muerte celular. Como se puede apreciar, la muerte celular inducida por el ICRP no se ve disminuida en presencia de PP1 o PP2, en ninguna de las líneas de T-ALL. Lo cual nos indica que las cinasas Src no están implicadas en el mecanismo de activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL.

Sin embargo, en presencia de IMB, el porcentaje promedio de muerte celular se ve inhibido de manera significativa de $54\pm 2.2\%$ a $43\pm 2.0\%$ en la línea Molt-4 y de $55\pm 2.5\%$ a $40\pm 3.6\%$ en la línea CEM. Dado este resultado, se procedió a analizar los niveles de Ca^{2+} intracelular y expresión de CD69 en ausencia y presencia únicamente de IMB. En las figuras 11B y 11C, se presentan los histogramas significativos (izquierda) y las gráficas (derecha) de cada una de las

evaluaciones, respectivamente. En ambos ensayos, se puede observar que tanto las alteraciones cálcicas como la activación inducida por el ICRP no son disminuidas de forma significativa en las células tardas en presencia de IMB. Estos resultados evidencian que la actividad de las cinasas Abl participan en la muerte celular, pero no en las alteraciones cálcicas ni en la activación, inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL.

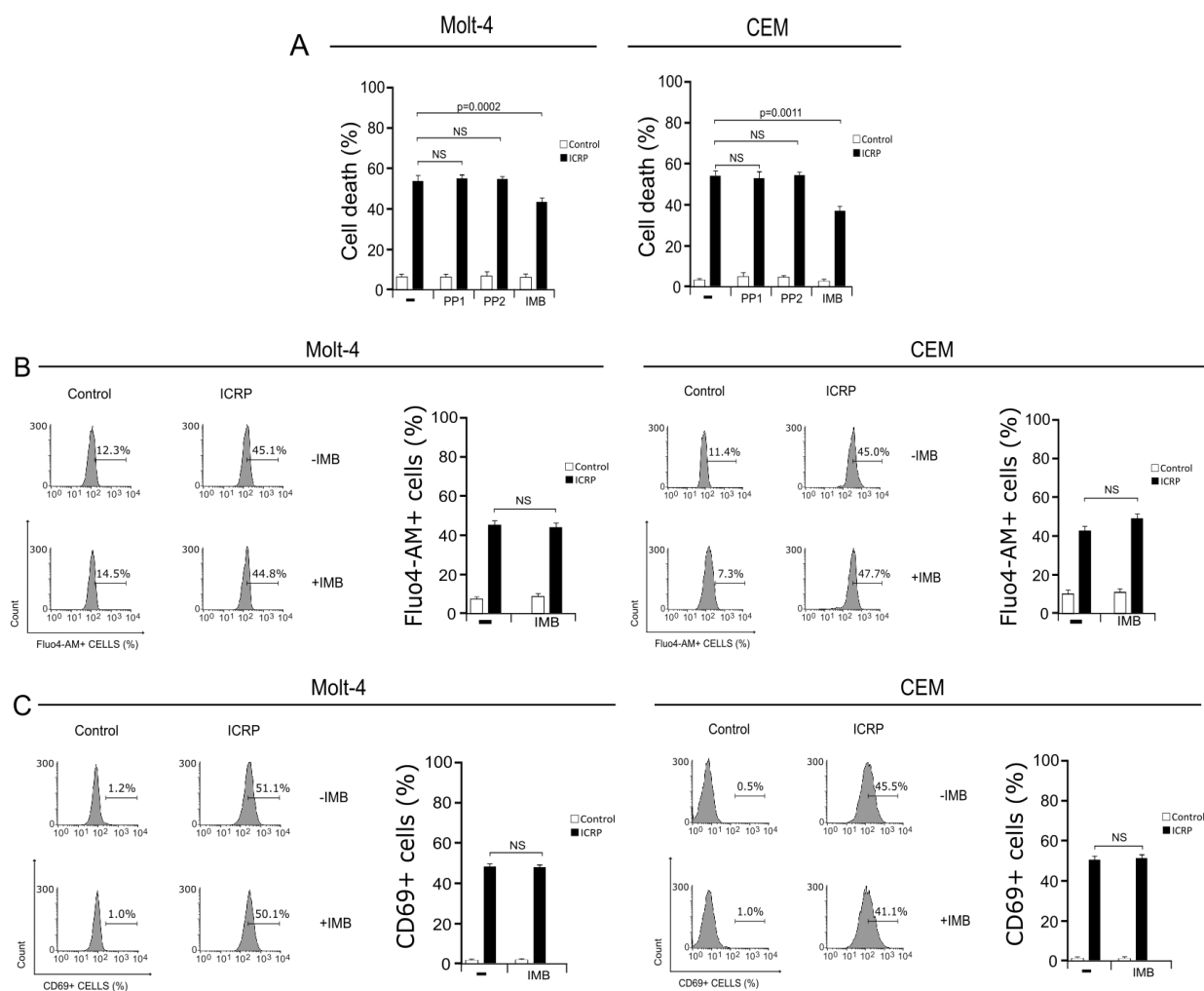


Figura 11. Determinación de la implicación de las tirosin cinasas en la muerte celular, alteraciones cálcicas y expresión de CD69 inducidas por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL. Histogramas representativos (izquierda) y graficas (derecha) de A. muerte celular mediante los marcadores Anexina-V y PI en ausencia y presencia de PP1, PP2 e IMB, B. niveles de Ca^{2+} intracelular por medio del marcador Fluo4-AM y C. expresión de CD69 utilizando el anticuerpo primario anti-CD69-APC en ausencia y presencia de IMB por citometría de flujo en líneas celulares de T-ALL, Molt-4 y CEM, tratadas con ICRP. El gráfico representa las medias (\pm DE) de los triplicados de al menos tres experimentos independientes.

5. La activación de las proteínas G participa en tanto en la activación como en las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL.

De manera alternativa a la vía de activación dependiente de la actividad de tirosin cinasas Src, se ha propuesto una vía de señalización que inicia con la estimulación del GPCR y la consecuente activación de proteínas G (Li et al, 2018). Esta ruta coincide en la fosforilación tanto la PLC como de otras cinasas como las de la familia Abl, que llevan al aumento de Ca^{2+} citosólico que resulta en la activación y eventualmente en la muerte celular (Kamoto et al., 2015). Una vez elucidado que las cinasas Src no están implicadas en el mecanismo de activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL, nos propusimos determinar la implicación de las proteínas G en la activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL.

Para concretar nuestro último objetivo, se llevaron a cabo ensayos de muerte celular, análisis de los niveles de Ca^{2+} intracelular y expresión de CD69 en células de T-ALL tratadas con ICRP en ausencia o presencia del inhibidor antagonista del acoplamiento de proteínas G, suramina (figura 12).

En la figura 12A, se encuentran las gráficas del análisis de muerte celular. Como se puede observar la muerte celular inducida por el ICRP es inhibida de manera significativa, presentando porcentajes de $55 \pm 2.6\%$ a $6 \pm 2.3\%$ en la línea Molt-4 y de $58 \pm 1.9\%$ a $7 \pm 2.5\%$ en la línea CEM, en presencia de suramina. En la figura 12B, se muestran los histogramas significativos (izquierda) y las gráficas (derecha) de la evaluación de niveles de Ca^{2+} intracelular. De manera similar el pretratamiento con suramina demostró inhibir el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular inducido por el ICRP de un $43 \pm 2.2\%$ a $19 \pm 2.2\%$ en células Molt-4 y de $42 \pm 3.6\%$ a $14 \pm 3.1\%$ en células CEM. Finalmente, la figura 12C presenta los histogramas significativos (izquierda) y las gráficas (derecha) de los ensayos de activación. El pretratamiento con suramina disminuye de manera significativa el porcentaje promedio de $54 \pm 4.2\%$ a $29 \pm 4.5\%$ en la línea Molt-4 y de $51 \pm 2.9\%$ a $30 \pm 3.1\%$ en la línea CEM. En conjunto, los resultados señalan que la activación de proteínas G está implicada en tanto en la

activación como en las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del ICRP en células de T-ALL.

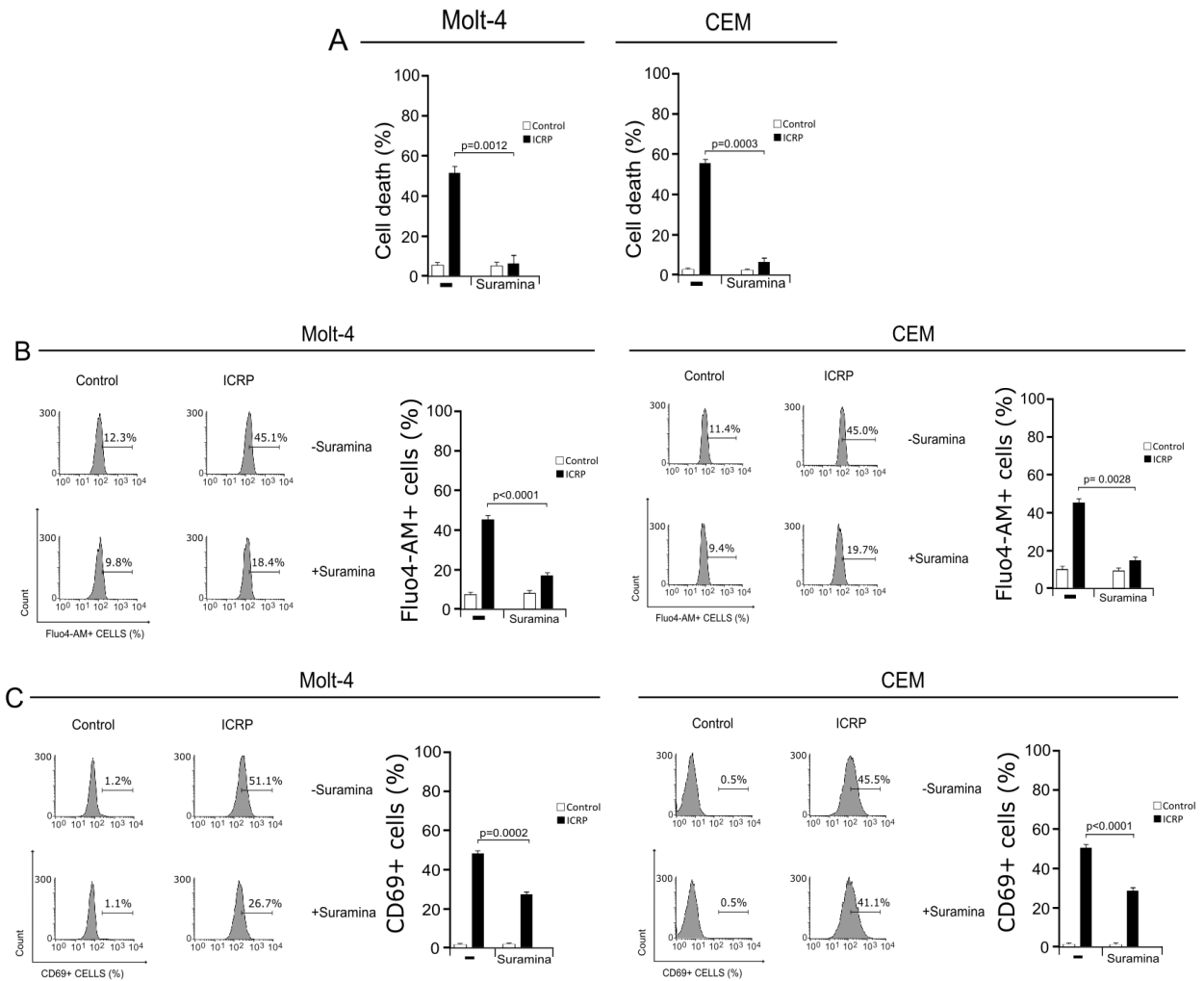


Figura 12. Análisis de la muerte celular, alteraciones cálcicas y expresión de CD69 inducidas por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL en presencia del inhibidor farmacológico suramina. Histogramas representativos (izquierda) y graficas (derecha) de A. muerte celular mediante los marcadores Anexina-V y PI, B. niveles de Ca^{2+} intracelular por medio del marcador Fluo4-AM y C. expresión de CD69 utilizando el anticuerpo primario anti-CD69-APC por citometría de flujo en las líneas celulares de T-ALL, Molt-4 y CEM, tratadas con ICRP en ausencia y presencia de suramina. El gráfico representa las medias (\pm DE) de los triplicados de al menos tres experimentos independientes.

IX. DISCUSIÓN

Distintos autores han descrito diferentes marcadores de la activación temprana de células T, entre los cuales se encuentra el receptor de lectina C tipo II, CD69 (Ziegler et al., 1993, López-Cabrera et al., 1993). CD69 no se encuentra expresado en células T en reposo, sin embargo, este es regulado a la alza tras el acoplamiento TCR/CD3 o la estimulación por citocinas de activación y/o mitógenos policlonales (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2019). Dentro de nuestros resultados, demostramos que el ICRP induce la expresión de CD69, de manera dependiente de la concentración y tiempo del tratamiento, en células de T-ALL. Los porcentajes de activación inducidos por el ICRP presentaron variación entre las líneas celulares (Molt-4 y CEM) en relación a la concentración y tiempo del tratamiento. En la línea Molt-4, se observó que, a las 24 h, el ICRP indujo porcentajes crecientes de activación de manera proporcional a cada una de las concentraciones utilizadas. Por otro lado, en la línea CEM, a las 24h, todas las concentraciones de ICRP empleadas presentaron un mínimo del 80% de activación. Sin embargo, una vez evaluada la activación a diferentes lapsos de tiempo (30 min, 2, 6, 12, 16, 24 h) utilizando la concentración de 3 mg/mL, se obtuvieron valores que incrementaban gradualmente a medida que aumentaba el tiempo de exposición al tratamiento.

Los resultados previamente descritos son similares a los reportados por Svojgr et al., (2012) y Riillo et al., (2022), donde tratamientos como anticuerpos dirigidos hacia CD1 y CD3 (UMG2), así como diversos corticosteroides que interactúan con el receptor NTAL demostraron inducir altos porcentajes de la expresión de CD69 de manera dependiente del tiempo y concentración del tratamiento en líneas celulares de T-ALL. Asimismo, se ha reportado que la línea CEM presenta mutaciones a la alza en factores de transcripción como el factor nuclear (NF)- κ B, el gen 1 relacionado con la transformación de eritroblastos (ERG-1) y la proteína activadora 1 (AP-1), los cuales se ha descrito que se unen a la secuencia promotora de CD69 y regulan su expresión dentro del proceso de activación (Rouillard et al., 2022, Cibrián & Sánchez-Madrid, 2019). Estas mutaciones no se encuentran presentes en la línea Molt-4 (Rouillard et al., 2022), pudiéndose postular como una de las razones que justifican las diferencias en el proceso de activación inducida por el ICRP en las líneas Molt-4 y CEM.

Anteriormente se ha reportado que el ICRP induce la activación de linfocitos T derivados de donadores humanos sanos, sin causar la muerte celular. Esto, a comparación de lo observado en células de T-ALL, se da en un bajo porcentaje, siendo este del 17% (Lorenzo-Anota et al, 2022).

Distintos autores han reportado que el aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico está relacionado con la movilización una variedad de proteínas, cinasas y factores de transcripción que participan en la expresión y regulación de marcadores de activación, como CD69 (Bueno et al., 2006, Joseph et al., 2014). Es por esto que se ha propuesto que los altos porcentajes en la expresión de CD69, inducidos por diversos tratamientos, en células de T-ALL pueden deberse a las desregulaciones hacia el alza en niveles de Ca^{2+} intracelular (Rodrigues et al, 2003). Es por esto, que posteriormente examinamos la implicación de la entrada de Ca^{2+} extracelular en la activación inducida por el ICRP en las células de T-ALL.

Los resultados obtenidos elucidaron que la activación inducida por el ICRP es dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular en las células de T-ALL. La dependencia de los flujos de Ca^{2+} para la expresión de CD69 en células de T-ALL, se ha observado anteriormente utilizando otros tratamientos, como, el anticuerpo monoclonal anti-CD3 y taspigargina. En donde, al utilizar un quelante de Ca^{2+} extracelular antes de aplicar el tratamiento, se observó una inhibición significativa en la expresión de CD25, una cadena del receptor de interleucina-2 y de CD69 en células Jurkat (Aussel et al 1996). Por otra parte, la apertura de los canales de Ca^{2+} del RE (IP_3R y RyRs), que generan la entrada de Ca^{2+} extracelular, es el evento más temprano reportado hasta ahora en el mecanismo de acción del ICRP en células de T-ALL (Lorenzo-Anota et al, 2023). Además, en linfocitos T, se ha descrito que las alteraciones en los niveles de Ca^{2+} citosólico están relacionadas con un estrés en el RE que genera la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de calcio activados por liberación de calcio (CRAC), la cual es necesaria para la expresión de CD69 dentro del proceso de activación (Bueno et al., 2006, Joseph et al., 2014). En conjunto, los resultados y antecedentes sugieren que la entrada de Ca^{2+} inducida por el ICRP genera la expresión de CD69 en células de T-ALL, lo cual podría suceder por medio de la apertura de canales de Ca^{2+} del RE. Es por esto que resultaría interesante evaluar la implicación de los canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático en la exposición de CD69 inducida por el ICRP en células de T-ALL.

El flujo de entrada o salida de Ca^{2+} del RE es regulado principalmente por la actividad de canales presentes en la membrana de este organelo, entre los más comunes se encuentran los IP_3R y RyRs (Monteith et al., 2017, Roderick et al., 2003). La activación de los IP_3R se da mediante la interacción con sus ligandos (IP_3), que son sintetizados por la acción de la PLC una vez que esta es fosforilada (Monteith et al., 2017). La salida de Ca^{2+} a través de estos canales, puede a su vez

activar a los RyRs a través de la vía de calcio liberado por la entrada de calcio (CICR) (Roderick et al., 2003). Estos procesos moleculares forman parte de la vía de señalización, mayormente descrita, sobre la implicación de los aumentos del Ca^{2+} citosólico en el proceso de activación. Los cuales en niveles exacerbados se han reportado que pueden conducir, entre otros procesos, a la muerte celular por apoptosis (Bueno et al., 2006, Joseph et al., 2014). Por consiguiente, se determinó la implicación de la fosforilación de la PLC en la activación y muerte celular inducida por el ICRP en las células de T-ALL.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que la fosforilación de la PLC participa en la activación y alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular inducido por el ICRP en las células de T-ALL. Esto concuerda con lo reportado por Trinquand et al., (2016), en donde, una inmunoterapia (anti-CD3) demostró inducir apoptosis (activación de caspasa 3 y 7) por una vía caracterizada por la fosforilación de proteínas, como la ERK, AKT, JNK y PLC, el aumento de Ca^{2+} citosólico y la exposición de los marcadores de activación CD69/CD25 en linfocitos leucémicos. Al mismo tiempo, dentro del contexto de activación, se ha reportado que la fosforilación de la PLC puede ser precedida principalmente por la actividad de las tirosin cinasas, tras la estimulación de los RTKs, o proteínas G, mediante la activación del GPCR (Bueno et al., 2006, Joseph et al., 2014). De manera aunada, lo anterior sugiere que el ICRP induce la activación y muerte celular de células de T-ALL mediante la fosforilación de la PLC, lo cual podría estar sucediendo mediante la actividad de tirosin cinasas o proteínas G.

Por último, se evaluó el rol de las tirosin cinasas y proteínas G en la activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL. Los resultados indicaron que el mecanismo de muerte celular inducido por el ICRP es independiente a la actividad de las cinasas Src en células de T-ALL. Además, demostramos que las cinasas ABL están involucradas en la muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL, pero no en las alteraciones cálcicas ni en la activación. En relación a las cinasas Abl, se ha reportada que participan en la activación y acumulación de p53 en núcleo ante un daño al ADN (Levav-Cohen et al., 2005, Westlund et al., 2009,). En este sentido, p53 puede participar en la detención del ciclo celular, mediante la activación de p21, que se encuentra relacionado con la inhibición de factores necesarios en los procesos de replicación y la activación de proteínas directamente involucradas en la síntesis de ADN (Abbas & Dutta, 2009). Además, p53 se ve involucrado en la inducción de la apoptosis sirviendo como un factor de

transcripción y regulador de la actividad de proteínas pro-apoptóticas como BAX, PUMA y NOXA (Ozaki & Nakagawara, 2011). Anteriormente se ha elucidado que el ICRP induce sobreexpresión de p53, detención del ciclo celular y degradación del ADN que culmina con apoptosis en células de T-ALL (Lorezo-Anota et al, 2020). Estos antecedentes nos permiten teorizar que las cinasas Abl pudiesen estar involucradas en el mecanismo de muerte celular del ICRP dentro de los daños nucleares de manera independiente a las alteraciones cálcicas en células de T-ALL.

En lo que respecta a las cinasas Src, se ha reportado que cinasas como Lck desempeña al menos dos funciones en la vía de señalización de TCR, la fosforilación de los motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor (ITAM) para reclutar a otras cinasas como, ZAP-70, y la activación de las mismas una vez ubicadas en la membrana plasmática, desencadenando el reclutamiento de la PLC γ y la posterior entrada de Ca²⁺ requerida para el proceso de activación (Yamasaki et al, 1997, Li et al, 2018, Bueno et al., 2006). Otras proteína-tirosina quinasa de la familia Src, que también se han visto implicadas en desempeñar un papel en la transducción de señales de TCR, incluyen a Fyn, que ha demostrado ser necesaria para la inducción de IL-2 y puede fosforilar específicamente los reguladores del citoesqueleto, incluidos WASP, FAK y Pyk2, los cuales son requeridos para procesos como proliferación, producción de citocinas, migración, propagación y adhesión celular (Palacios & Weiss, 2004, Chapman & Houtman, 2012, Yamasaki et al, 1997). Sin embargo, estudios previos han demostrado que los superantígenos también pueden activar las células T humanas a través de una vía independiente de tirosin cinasas de la familia Src, que requiere de la actividad de proteínas G, mediante la estimulación del receptor acoplado a proteína G (GPCR). Todo esto, sugiere que si bien la activación y muerte celular inducida por el ICRP es independiente a la actividad de las cinasas Src en células de T-ALL, su mecanismo de acción podría ser evaluado en relación a la actividad de las proteínas G.

Entre nuestros resultados, demostramos que las proteínas G participan en la activación y las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del ICRP en células de T-ALL. Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores los cuales han reportado que tratamientos como los superantígenos derivados del género *Staphylococcus* inducen la activación de células Jurkat y J.CaM1.6 (Lck deficientes), de forma independiente a la actividad de cinasas pertenecientes a la familia Src, mediante la acción del GPCR, que involucra alteraciones cálcicas vía PLC culminando en la inducción de apoptosis (Li et al, 2018, Yamasaki et al, 1997). Además,

dentro de esta vía de señalización se identificó la actividad de proteínas G, específicamente la subunidad $G\alpha 11$, que se reportó como una señal complementaria a la estimulación del TCR llevando a un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico vía PLC β (Bueno et al., 2006, Li et al, 2018, Yamasaki et al, 1997). En conjunto, esto nos sugiere que el ICRP induce, en una vía alterna, la activación y muerte celular de células de T-ALL mediante alteraciones cálcicas vía GPCR, elucidando las primeras señales, hasta el momento, en el efecto de este tratamiento en células leucémicas.

X. CONCLUSIÓN

De manera conjunta, estos resultados evidencian que el ICRP induce la activación y muerte celular de manera independiente a la actividad de las cinasas Src en células de T-ALL. De manera alterna, la activación y muerte celular inducida por el ICRP ocurre por medio de alteraciones cálcicas vía GPCR en células de T-ALL. Adicionalmente, dentro de esta vía de señalización, las proteínas G promueven la entrada de Ca^{2+} extracelular, por medio de la actividad de la PLC, que resulta en activación y muerte celular. Además, demostramos que la actividad de cinasas Abl están implicadas en el mecanismo de muerte celular del ICRP en células de T-ALL, posiblemente en una manera independiente a las alteraciones cálcicas.

Este trabajo describe los eventos más tempranos presentes, hasta el momento, en el mecanismo de acción del ICRP en células leucémicas, abriendo la puerta a profundizar en las características moleculares del mecanismo de activación y muerte celular inducidos por el ICRP en células de T-ALL, así como su combinación con otros tipos de inductores de muerte celular en malignidades hematológicas.

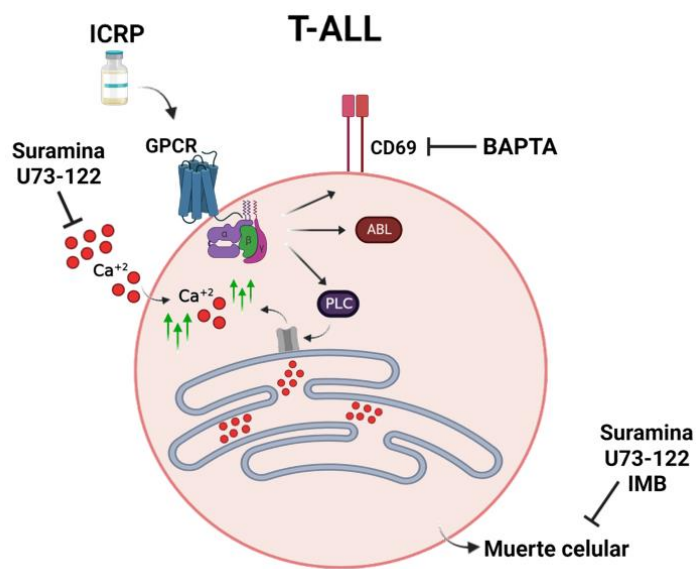


Figura 13. Representación esquemática de la activación y muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células de T-ALL. El ICRP induce la activación de proteínas G, que genera la fosforilación de la PLC, llevando a alteraciones cálcicas, que conducen a la entrada de Ca^{2+} extracelular, resultando en la activación temprana (CD69+) y muerte celular de las células de T-ALL. De manera independiente a las alteraciones cálcicas, el ICRP genera la activación de las cinasas Abl que participan en el mecanismo de muerte celular.

XI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar si la muerte celular inducida por el ICRP es dependiente de la exposición de CD69 en células de T-ALL.
2. Determinar la implicación de los canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (IP₃R y RyR) en la exposición de CD69 inducida por el ICRP en células de T-ALL.
3. Elucidar si la actividad de las cinasas Abl es dependiente de las alteraciones cálcicas presentes en el mecanismo de muerte celular del ICRP en células de T-ALL.
4. Analizar la expresión de PLC β en mecanismo de activación y muerte celular inducida por el ICRP en células de T-ALL.
5. Determinar si la expresión de CD69 está implicada en la activación de caspasas inducida por el ICRP en células de T-ALL.
6. Evaluar la actividad de (NF)- κ B, ERG-1 y AP-1 en la línea celular CEM tratadas con ICRP.

XII.BIBLIOGRAFÍA

Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;9(6):400-14. doi: 10.1038/nrc2657. PMID: 19440234; PMCID: PMC2722839.

Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). An overview of cancer treatment modalities. *Neoplasia*, 1, 139-57.

Allart-Vorelli, P., Porro, B., Baguet, F., Michel, A., & Cousson-Gélie, F. (2015). Haematological cancer and quality of life: a systematic literature review. *Blood cancer journal*, 5(4), e305. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.29>

Anguita, E., & Villalobo, A. (2018). Ca²⁺ signaling and Src-kinases-controlled cellular functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 650, 59–74. doi:10.1016/j.abb.2018.05.005

Aussel, C., Marhaba, R., Pelassy, C., & Breittmayer, J.-P. (1996). Submicromolar La³⁺ concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. *Biochemical Journal*, 313(3), 909–913. doi:10.1042/bj3130909

Baazim, H., Antonio-Herrera, L. & Bergthaler, A. The interplay of immunology and cachexia in infection and cancer. *Nat Rev Immunol* **22**, 309–321 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00624-w>

Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Cancer immunotherapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(4):167-89. doi: 10.1080/10408360902937809. PMID: 19650714.

Bayón-Calderón F, Toribio ML, González-García S. Facts and Challenges in Immunotherapy for T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 16;21(20):7685. doi: 10.3390/ijms21207685. PMID: 33081391; PMCID: PMC7589289.

Brenner, D., Krammer, P. H., & Arnold, R. (2008). Concepts of activated T cell death. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66(1), 52–64. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.01.002
10.1016/j.critrevonc.2008.01.002

Bueno, C., Lemke, C. D., Criado, G., Baroja, M. L., Ferguson, S. S. G., Rahman, A. K. M. N.-U., ... Madrenas, J. (2006). *Bacterial Superantigens Bypass Lck-Dependent T Cell Receptor Signaling by Activating a Gal1-Dependent, PLC- β -Mediated Pathway*. *Immunity*, 25(1), 67–78. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.012

Cajaraville, G., Carreras, L. M. J., Massó, L. J., & Tamés, L. M. J. (2002). *Oncología*. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria [sede Web]. [Acceso 10 de Junio de 2013]. Disponible en <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP14.pdf>, 1171-1126.

Casale, T. B., & Stokes, J. R. (2014). Immunotherapy: what lies beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(3), 612-619.

Chapman, N. M., Yoder, A. N., & Houtman, J. C. D. (2012). Non-Catalytic Functions of Pyk2 and Fyn Regulate Late Stage Adhesion in Human T Cells. *PLoS ONE*, 7(12), e53011. doi:10.1371/journal.pone.0053011

Chennamadhavuni A, Lyengar V, Shimanovsky A. Leukemia. [Updated 2022 May 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/>

Chiaretti S, Foà R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2009 Feb;94(2):160-2. doi: 10.3324/haematol.2008.004150. PMID: 19181788; PMCID: PMC2635412.

Cibrián D, Sánchez-Madrid F. *CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper*. *Eur J Immunol*. 2017 Jun;47(6):946-953. doi: 10.1002/eji.201646837. PMID: 28475283; PMCID: PMC6485631.

Cohen IR and Efroni S (2019) The Immune System Computes the State of the Body: Crowd Wisdom, Machine Learning, and Immune Cell Reference Repertoires Help Manage Inflammation. *Front. Immunol*. 10:10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00010

Coronado-Cerda, E. E., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Prado-García, H., Rivera-Morales, L. G., Zapata-Benavides, P., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2016). In vivo chemoprotective activity of bovine dialyzable leukocyte extract in mouse bone marrow cells against damage induced by 5-fluorouracil. *Journal of immunology research*, 2016.

Coronado-Cerda, E. E., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Prado-García, H., Rivera-Morales, L. G., Zapata-Benavides, P., ... Rodríguez-Padilla, C. (2016). In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil. *Journal of Immunology Research*, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/6942321>

Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol*. 2010 Jun;22(3):333-40. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.013. Epub 2010 Apr 2. PMID: 20363604; PMCID: PMC2891062.

Damyantov, C. A., Maslev, I. K., Pavlov, V. S., & Avramov, L. (2018). Conventional treatment of cancer realities and problems. *Ann. Complement. Altern. Med*, 1(1).

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Feng, Y., van der Veecken, J., Shugay, M., Putintseva, E. V., Osmanbeyoglu, H. U., Dikiy, S. & Rudensky, A. Y. (2015). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature*, 528(7580), 132-136.

Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Castillo-León, L., Tamez-Guerra, R. S., & Rodríguez-Padilla, C. (2004). Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS induced, murine endotoxic shock. *International Immunopharmacology*, 4(13), 1577–1586. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.06.014>

Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Castillo-Tello, P., Isaza-Brando, C. E., Vera García, M. E., Castillo-León, L., ... Rodríguez-Padilla, C. (2007). Bovine dialyzable leukocyte extract modulates cytokines and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated human blood cells. *Cytotherapy*, 9(4), 379–385 <http://doi.org/10.1080/14653240701320262>

Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Coronado-Cerda, E. E., Zarate-Triviño, D., Arizpe-Coronado, J. E., Zapata-Benavides, P., ... Rodríguez-Padilla, C. (2017). Clinical trial evaluating the effectiveness of biocompound IMMUNEPOTENT CRP in the third-

- molar extraction. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(1), 182–186.
<http://doi.org/10.1080/13102818.2016.1249408>
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Miranda-Hernández, D., Zapata- Benavides, P., Castillo-León, L., Isaza-Brando, C., ... Rodríguez-Padilla, C. (2006). In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*, 8(4), 408–414.
<http://doi.org/10.1080/14653240600847266>
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Zapata-Benavides, P., Vera-García, M. E., Castillo-Tello, P., García de la Fuente, A., ... Rodríguez-Padilla, C. (2008). IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: A phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*, 10(5), 490–496.
<http://doi.org/10.1080/14653240802165681>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., & Turk, B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Globocan. (2020). Globocan Cancer Observatory. Revisado en <https://gco.iarc.fr/> el 14 de enero de 2022.
- Govers, C., Sebestyén, Z., Coccoris, M., Willemsen, R. A., & Debets, R. (2010). T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. *Trends in molecular medicine*, 16(2), 77-87.
- Hajnóczky, G., Davies, E., & Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(3), 445-454.
- Hamm, H. E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9), 4819–4821. doi:10.1073/pnas.011099798
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hosseinzadeh, E., Banaee, N., & Nedaie, H. A. (2017). Cancer and Treatment Modalities. *Current Cancer Therapy Reviews*, 13(1).

- Hunter MC, Teixeira A and Halin C (2016) T Cell Trafficking through Lymphatic Vessels. *Front. Immunol.* 7:613. doi: 10.3389/fimmu.2016.00613
- Hwang, JR., Byeon, Y., Kim, D. *et al.* Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med* **52**, 750–761 (2020). <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>
- Joseph, N., Reicher, B., & Barda-Saad, M. (2014). The calcium feedback loop and T cell activation: How cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(2), 557–568. doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.009
- Kamato D, Thach L, Bernard R, Chan V, Zheng W, Kaur H, Brimble M, Osman N and Little PJ (2015) Structure, function, pharmacology, and therapeutic potential of the G protein, G α /q,11. *Front. Cardiovasc. Med.* 2:14. doi: 10.3389/fcvm.2015.00014
- Krammer, P., Arnold, R. & Lavrik, I. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**, 532–542 (2007). <https://doi.org/10.1038/nri2115>
- Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018 Feb 20;48(2):202-213. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.007. PMID: 29466753; PMCID: PMC5826622.
- Lara, H. H., Turrent, L. I., Garza-Treviño, E. N., Tamez-Guerra, R., & Rodriguez Padilla, C. (2010). Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(3), 425–431. http://doi.org/10.3892/etm_00000066
- Lemonnier, F., & Mak, T. W. (2016). Activating TCR Signaling to Thwart T-ALL. *Cancer Discovery*, 6(9), 946–948. doi:10.1158/2159-8290.cd-16-0789 10.1158/2159-8290.cd-16-0789
- Levav-Cohen, Y., Goldberg, Z., Zuckerman, V., Grossman, T., Haupt, S., & Haupt, Y. (2005). C-Abl as a modulator of p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 737–749. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.152

Lewis, R. S. (2001). CALCIUM SIGNALING MECHANISMS IN T LYMPHOCYTES. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 497–521. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.497

Li, Z., Zeppa, J. J., Hancock, M. A., McCormick, J. K., Doherty, T. M., Hendy, G. N., & Madrenas, J. (2018). *Staphylococcal Superantigens Use LAMA2 as a Coreceptor To Activate T Cells. The Journal of Immunology*, 200(4), 1471–1479. doi:10.4049/jimmunol.1701212

Lopez-Cabrera M, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*. 1993;178:537–547.

Lorenzo-Anota, H. Y., Martínez-Loria, A. B., Tamez-Guerra, R. S., Scott-Algara, D., Martínez-Torres, A. C., & Rodríguez-Padilla, C. (2022). Changes in the natural killer cell repertoire and function induced by the cancer immune adjuvant candidate IMMUNEPOTENT-CRP. *Cellular Immunology*, 374, 104511.

Lorenzo-Anota, H. Y., Martínez-Torres, A. C., Scott-Algara, D., Tamez-Guerra, R. S., & Rodríguez-Padilla, C. (2020). Bovine dialyzable leukocyte extract IMMUNEPOTENT-CRP induces selective ROS-dependent apoptosis in T-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Journal of Oncology*, 2020.

Lorenzo-Anota, H. Y., Reyes-Ruiz, A., Calvillo-Rodríguez, K. M., Mendoza-Reveles, R., Urdaneta-Peinado, A. P., Alvarez-Valadez, K. M., Martinez-Torres, A. C., & Rodríguez-Padilla, C. (2023). IMMUNEPOTENT CRP increases intracellular calcium through ER-calcium channels, leading to ROS production and cell death in breast cancer and leukemic cell lines. *EXCLI Journal*, 22, 352–366. <https://doi.org/10.17179/excli2022-5568>

Marks, D. I., & Rowntree, C. (2017). Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(9), 1134-1142.

Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* **14**, 49 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>

- Martinez-Torres, A. C., Gomez-Morales, L., Martinez-Loria, A. B., Uscanga Palomeque, A. C., Vazquez-Guillen, J. M., & Rodriguez-Padilla, C. (2019). Cytotoxic activity of IMMUNEPOTENT CRP against non-small cell lung cancer cell lines. *PeerJ*, 2019(9). <http://doi.org/10.7717/peerj.7759>
- Martínez-Torres, A. C., Lorenzo-Anota, Helen Yarimet, García-Juárez, M. G., Zarate Triviño, D. G., & Rodríguez-Padilla, C. (2019). Chitosan gold nanoparticles induce different ROS-dependent cell death modalities in leukemic cells. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 7173–7190. <http://doi.org/10.2147/IJN.S221021>
- Martinez-Torres, A. C., Reyes-Ruiz, A., Benítez-Londoño, M., Franco-Molina, M. A., & Rodríguez-Padilla, C. (2018). IMMUNEPOTENT CRP induces cell cycle arrest and caspase-independent regulated cell death in HeLa cells through reactive oxygen species production. *BMC Cancer*, 18(1), 13. <http://doi.org/10.1186/s12885-017-3954-5>
- Martínez-Torres, A. C., Reyes-Ruiz, A., Benítez-Londoño, M., Franco-Molina, M. A., & Rodríguez-Padilla, C. (2018). IMMUNEPOTENT CRP induces cell cycle arrest and caspase-independent regulated cell death in HeLa cells through reactive oxygen species production. *BMC Cancer*, 18. <http://doi.org/10.1186/S12885-017-3954-5>
- Martinez-Torres, A. C., Reyes-Ruiz, A., Calvillo-Rodriguez, K. M., Alvarez-Valadez, K. M., Uscanga-Palomeque, A. C., Tamez-Guerra, R. S., & Rodríguez-Padilla, C. (2020). IMMUNEPOTENT CRP induces DAMPS release and ROS-dependent autophagosome formation in HeLa and MCF-7 cells. *BMC Cancer*, 20(1), 1–11. <http://doi.org/10.1186/s12885-020-07124-5>
- Martínez-Torres, A. C., Reyes-Ruiz, A., Calvillo-Rodriguez, K. M., Alvarez-Valadez, 173 K. M., Uscanga-Palomeque, A. C., Tamez-Guerra, R. S., & Rodríguez-Padilla, C. (2020). IMMUNEPOTENT CRP induces DAMPS release and ROS-dependent autophagosome formation in HeLa and MCF-7 cells. *BMC Cancer* 2020 20:1, 20(1), 1–11. <http://doi.org/10.1186/S12885-020-07124-5>
- Monteith, G. R., Prevarskaya, N., & Roberts-Thomson, S. J. (2017). The calcium– cancer signalling nexus. *Nature Reviews Cancer*, 17(6), 367.

- Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B., & Schultze, J. L. (2019). *Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens*. *Cell Host & Microbe*, 25(1), 13–26. doi:10.1016/j.chom.2018.12.006 10.1016/j.chom.2018.12.006
- Netea, M.G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L.B. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* **20**, 375–388 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>
- Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2011 Mar 3;3(1):994-1013. doi: 10.3390/cancers3010994. PMID: 24212651; PMCID: PMC3756401.
- Palacios, E. H., & Weiss, A. (2004). Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, 23(48), 7990–8000. doi:10.1038/sj.onc.1208074
- Parsons, S., Parsons, J. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906–7909 (2004). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>
- Polychronakis I, Dounias G, Makropoulos V, Riza E, Linos A. Work-related leukemia: a systematic review. *J Occup Med Toxicol*. 2013 May 22;8(1):14. doi: 10.1186/1745-6673-8-14. PMID: 23697536; PMCID: PMC3668148.
- Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016 Dec 2;2016(1):580-588. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.580. PMID: 27913532; PMCID: PMC6142501.
- Redza-Dutordoir, Maureen; Averill-Bates, Diana A. (2016). *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, (), S0167488916302324–. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012
- Reyes-Ruiz, A., Calvillo-Rodriguez, K. M., Martínez-Torres, A. C., & Rodríguez-Padilla, C. (2021). The bovine dialysable leukocyte extract IMMUNEPOTENT CRP induces immunogenic cell death in breast cancer cells leading to long-term antitumour memory. *British journal of cancer*, 124(8), 1398-1410.

- Reyes-Ruiz, A., Calvillo-Rodriguez, K. M., Martínez-Torres, A. C., & Rodríguez Padilla, C. (2021b). The bovine dialysable leukocyte extract IMMUNEPOTENT CRP induces immunogenic cell death in breast cancer cells leading to long-term antitumour memory. *British Journal of Cancer*, 1–13. <http://doi.org/10.1038/s41416-020-01256-y>
- Riillo, C., Caracciolo, D., Grillone, K., Polerà, N., Juli, G., Scionti, F., ... & Tassone, P. (2021). A Novel Bispecific T Cell Engager (UMG2-BTCE) Targeting CD1a-CD3 ϵ Is Effective Against Cortical-Derived Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 138, 2259.
- Roderick, H. L., Berridge, M. J., y Bootman, M. D. (2003). Calcium-induced calcium release. *Current Biology*, 13(11), R425.
- Rodrigues Mascarenhas S, Echevarria-Lima J, Fernandes dos Santos N, Rumjanek VM. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. *Life Sci*. 2003 Jul 11;73(8):1037-51. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00377-1. PMID: 12818356.
- Rodríguez-Salazar, M. D. C., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Martínez Torres, A. C., Zapata-Benavides, P., López-González, J. S., ... Rodríguez-Padilla, C. (2017). The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology Letters*, 14(1), 844–852.
- Rossy, J., Owen, D. M., Williamson, D. J., Yang, Z., & Gaus, K. (2013). Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nature immunology*, 14(1), 82-89.
- Rouillard AD, Gunderson GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A. *The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins*. Database (Oxford). 2016 Jul 3;2016. pii: baw100.
- Samakai E, Go C, Soboloff J. Defining the Roles of Ca²⁺ Signals during T Cell Activation. In: Soboloff J, Kappes DJ, editors. *Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Chapter 10. Available

from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532321/> doi: 10.1201/9781315371689-10

Schamel, W. W., Arechaga, I., Risueño, R. M., Van Santen, H. M., Cabezas, P., Risco, C., & Alarcón, B. (2005). Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *The Journal of experimental medicine*, 202(4), 493-503.

Siegel, D. A., Henley, S. J., Li, J., Pollack, L. A., Van Dyne, E. A., & White, A. (2017). Rates and Trends of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia - United States, 2001-2014. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 66(36), 950–954. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6636a3>

Svojgr, K., Kalina, T., Kanderova, V., Skopcova, T., Brdicka, T., & Zuna, J. (2012). *The adaptor protein NTAL enhances proximal signaling and potentiates corticosteroid-induced apoptosis in T-ALL. Experimental Hematology*, 40(5), 379–385. doi:10.1016/j.exphem.2012.01.011

Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L and Wei W (2018) Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Front. Pharmacol.* 9:642. doi: 10.3389/fphar.2018.00642

Taniuchi, I. (2018). *CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. Annual Review of Immunology*, 36(1), 579–601. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053411

Trebak, M., & Kinet, J.-P. (2019). Calcium signalling in T cells. *Nature Reviews Immunology*, 19(3), 154–169. doi:10.1038/s41577-018-0110-7

Trebak, M., Kinet, JP. Calcium signalling in T cells. *Nat Rev Immunol* 19, 154–169 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0110-7>

Trinquand, A., dos Santos, N. R., Tran Quang, C., Rocchetti, F., Zaniboni, B., Belhocine, M., ... Asnafi, V. (2016). Triggering the TCR Developmental Checkpoint Activates a Therapeutically Targetable Tumor Suppressive Pathway in T-cell Leukemia. *Cancer Discovery*, 6(9), 972–985. doi:10.1158/2159-8290.cd-15-0675

Van Vlierberghe, P., & Ferrando, A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 122(10), 3398-3406.

Van Vlierberghe, P., & Ferrando, A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 122(10), 3398-3406.

Varadé, J., Magadán, S. & González-Fernández, Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell Mol Immunol* **18**, 805–828 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00530-6>

Wang, D. (2018). *The essential role of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling in regulating T cell immunity. Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 40(3), 187–192. doi:10.1080/08923973.2018.1434792 10.1080/08923973.2018.1434792

Westlund BS, Cai B, Zhou J, Sparrow JR. Involvement of c-Abl, p53 and the MAP kinase JNK in the cell death program initiated in A2E-laden ARPE-19 cells by exposure to blue light. Apoptosis. 2009 Jan;14(1):31-41. doi: 10.1007/s10495-008-0285-7. PMID: 19052872; PMCID: PMC3099593.

Yamasaki, S., Tachibana, M., Shinohara, N., & Iwashima, M. (1997). Lck-independent Triggering of T-cell Antigen Receptor Signal Transduction by Staphylococcal Enterotoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14787–14791. doi:10.1074/jbc.272.23.14787

Zhan Y, Carrington EM, Zhang Y, Heinzl S and Lew AM (2017) Life and Death of Activated T Cells: How Are They Different from Naïve T Cells? *Front. Immunol.* 8:1809. doi: 10.3389/fimmu.2017.01809

Ziegler SF, Ramsdell F, Hjerrild KA, Armitage RJ, Grabstein KH, Hennen KB, Farrah T, et al. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur J Immunol.* 1993;23:1643–1648.