

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA



UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INMUNOLOGÍA AVANZADA

Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología

**Caracterización de las alteraciones inmunológicas de células Treg en
pacientes pediátricos con errores innatos de la inmunidad, hacia
terapias dirigidas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN INMUNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTADA POR

Daniel Acevedo Gómez

Directoras

Dra. Laia Alsina Manrique de Lara

Dra. Ana Esteve-Solé

Tutora

Dra. Carme Roura i Mir

Barcelona

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

Caracterización de las alteraciones inmunológicas de células Treg en pacientes pediátricos con errores innatos de la inmunidad, hacia terapias dirigidas

Memoria para optar al grado de doctor presentado por

Daniel Acevedo Gómez

Tesis supervisada por

Dra. Laia Alsina Manrique de Lara (MD, PhD)

Unidad de Inmunología Clínica e Inmunodeficiencias Primarias, Servicio de Alergología e Inmunología Clínica, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona y Profesora Asociada del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universitat de Barcelona.

Dra. Ana Esteve Solé (PhD)

Unidad de Inmunología Clínica e Inmunodeficiencias Primarias, Servicio de Alergología e Inmunología Clínica, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Departamento de Medicina de Laboratorio, Clinical Center, National Institutes of Health.

Tesis tutorizada por

Dra. Carme Roura i Mir (PhD)

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Institut de Biotecnologia i Biomedicina. Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de doctorado en inmunología avanzada

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona

Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología

Julio 2025

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco



Esta tesis se llevó a cabo en el Hospital Sant Joan de Déu (Esplugues de Llobregat, Barcelona) y el Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona).

Estudiante de doctorado

Daniel Acevedo Gómez

(Firma)

Aprobación de los directores y tutor de la tesis

(Firma)

**Dra. Laia Alsina
Manrique de Lara**
(MD, PhD)

Dra. Ana Esteve- Solé
(PhD)

Dra. Carme Roura i Mir
(PhD)

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco



Programa de doctorado en Inmunología Avanzada

Facultad de medicina, Universidad Autónoma de Barcelona

Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología

El candidato/a doctoral y las directoras y tutora de la tesis declaran que la tesis titulada **"Caracterización de las alteraciones inmunológicas de células Treg en pacientes pediátricos con errores innatos de la inmunidad, hacia terapias dirigidas"** es original, contiene resultados e información derivados de su propia investigación y no contiene plagio de otras tesis, publicaciones o investigaciones de otros autores. Asimismo, certifican que han cumplido con los códigos éticos y las mejores prácticas en la realización del proyecto.

Reconocen que la presente memoria de tesis puede estar sujeta a procedimientos para verificar su originalidad.

Estudiante de doctorado

Daniel Acevedo Gómez

(Firma)

Aprobación de los directores y tutor de la tesis

(Firma)

**Dra. Laia Alsina
Manrique de Lara**
(MD, PhD)

Dra. Ana Esteve- Solé
(PhD)

Dra. Carme Roura Mir
(PhD)

El presente proyecto ha sido presentado, evaluado y aprobado por el Comité de Ética.

SJD

Sant Joan de Déu
Fundació de Recerca

Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica

C.I. PIC-173-21

CEIm Fundació Sant Joan de Déu

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dra. Neus Riba Garcia
Secretaria Técnica del CEIm Fundació Sant Joan de Déu

HACE CONSTAR:

Que el CEIm Fundació Sant Joan de Déu en su reunión del día **23/09/2021** y acta **17/2021**, evaluó la propuesta del promotor referida al estudio:

Título: *"Caracterización de las alteraciones inmunológicas, específicamente en células Treg, implicadas en la desregulación inmune en pacientes pediátricos con errores innatos de inmunidad, hacia terapias dirigidas"*

Investigador Principal: Laia Alsina Manrique de Lara

Código CEIm: PIC-173-21

Servicio: Alergia e inmunología clínica

Centro: Hospital Sant Joan de Déu - Esplugues HSJD.1 (FSJD)

Documentos con versiones:

Tipo - Subtipo	Fecha - Versión
Protocolo	Versión 2 - agosto 2021
Hoja Información de Paciente - padre o tutor legal y consentimiento	Versión 2 - agosto 2021
Hoja Información de Paciente - grupo control o padre tutor legal de grupo control	Versión 2 - agosto 2021
Hoja de información al paciente menor de edad - y consentimiento - Grupo control	Versión 2 - agosto 2021
Hoja de información al paciente menor de edad - y consentimiento informao	Versión 2 - agosto 2021
Memoria Económica	Versión agosto 2021

Y considera que:

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.

CEIm Fundació Sant Joan de Déu

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Por lo que este CEIm emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

Este CEIm acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes centros por los investigadores:

- **Laia Alsina Manrique de Lara** como investigador principal del centro **HOSPITAL SANT JOAN DE DEU**

Y hace constar que:

- 1º** En la reunión celebrada el día **23/09/2021**, acta **17/2021**, se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.
- 2º** El CEIm de la Fundació Sant Joan de Déu, tanto en su composición como en sus PNTs, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95)
- 3º** Listado de miembros:

Presidente:

- Jesús Pineda Sánchez - Medicina – Pediatría

Vicepresidente:

- Bernabé Robles Del Olmo - Medicina – Neurología

Secretaría:

- Neus Riba Garcia - Farmacología Clínica

Vocales:

- Fernando Aguiló Martínez - Medicina Tropical
- Clara Chamorro Pérez - Jurista
- Ofelia Cruz Martínez - Medicina – Oncología

CEIm Fundació Sant Joan de Déu

- Ángel del Campo Escota - Representante de las asociaciones de pacientes
- Beatriz Del Pino Gaya - Farmacia hospitalaria
- Rosa María Dueñas Herrero - Medicina – Psiquiatría
- Pau Ferrer Salvans - Farmacología Clínica
- Joan Vinent Genestar - Farmacia hospitalaria
- María Eugènia Rey Abella - Farmacia AP
- Laura Martínez Rodríguez - Enfermería
- Marisa Serra Alacid - Medicina – Unidad Atención al Usuario
- Ana Martín Ancel - Medicina – Neonatología
- Eduard Puig Vaquero - Jurista – Delegado protección de datos
- Carlota Romans Ruiz - Farmacología Clínica
- Antoni Noguera Julián - Medicina – Pediatría
- Edurne Mazarico Gallego - Medicina – Ginecología y Obstetricia
- Esther Via Virgili - Medicina – Psiquiatría
- Oriol Martín Solé - Medicina – Cirugía y representante del CR

****En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, este se ausenta de la reunión durante la discusión del proyecto.**

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor,

Lo que firmo en Esplugues de Llobregat (Barcelona),

Fdo:

RIBA GARCIA
NEUS (FIRMA)

Firmado digitalmente por
RIBA GARCIA, NEUS (FIRMA)
Fecha: 2021.09.30 08:58:06
+0200

Dra. Neus Riba García
Secretaria Técnica del CEIm Fundació Sant Joan de Déu

SOPORTE FINANCIERO Y RESPALDO AL PROYECTO

Soporte financiero

Este estudio fue apoyado por los proyectos PI18/00223 y PI21/00211 concedidos a LA, integrados en el Plan Nacional de I+D+I y cofinanciados por el ISCIII – Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria – y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); por el Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut (PERIS), Departament de Salut, Generalitat de Catalunya (SLT006/17/00199 a LA); por una Beca Pharming Group 2023 a LA, y por una Beca de Investigación Carmen de Torres 2022 de la Fundació per a la Recerca i la Docència Sant Joan de Déu a DA.

Soporte al proyecto

Agradecemos profundamente al Biobanco del Hospital Sant Joan de Déu para la Investigación, que forma parte de la Red Nacional de Biobancos del ISCIII, por facilitar la obtención de muestras y datos. Nuestro reconocimiento especial va dirigido al Servicio del Centro de Diagnóstico Biomédico del Hospital Clínic por su asistencia técnica. Queremos expresar nuestra gratitud a las especialistas pediatras del servicio de Alergología e Inmunología Clínica del Hospital Sant Joan de Déu, así como al equipo del Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid, por su compromiso y dedicación durante el extenso proceso de reclutamiento de pacientes y por el seguimiento clínico realizado.

También deseamos destacar la colaboración de Marco A. Fernández Sanmartín en el soporte técnico del análisis multiparamétrico, a Celia Martí Castellote y la Dra. Elena Seoane Reula en la recopilación de datos clínicos, y a Rama Hafian Al-Homsi y Alberto Meca Zapata por el soporte en el análisis bioinformático. De manera personal, quiero agradecer a Yiyi Luo, Rebeca Kennedy Batalla y Joaquim Coloma por su contribución esencial en la fase experimental del proyecto. Finalmente, nuestro más sincero agradecimiento a los voluntarios y sus familias por su participación en este estudio.

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

PREFACIO

Esta tesis doctoral se centra en la **caracterización inmunológica y la estratificación de pacientes pediátricos con Trastornos Primarios de Regulación Inmunológica** (PIRD, por sus siglas en inglés), un subgrupo emergente y heterogéneo dentro de los errores innatos de la inmunidad. Estos pacientes presentan una disfunción inmunitaria compleja, frecuentemente manifestada como autoinmunidad, linfoproliferación y afectación multiorgánica, lo que supone un gran reto diagnóstico y terapéutico en la práctica clínica.

El proyecto se desarrolló en un contexto multicéntrico, con la colaboración del **Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona** y el **Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid**. Se reclutó una cohorte de 51 pacientes pediátricos con sospecha clínica de PIRD y 6 controles sanos, con el objetivo de realizar una caracterización inmunológica exhaustiva, centrada especialmente en las células T reguladoras (Treg) y otras poblaciones inmunorreguladoras. Este trabajo fue dirigido por la Dra. Laia Alsina y la Dra. Elena Seoane Reula, a quienes agradezco profundamente su orientación y confianza.

Me incorporé a este proyecto durante mis estudios de **máster interuniversitario en Inmunología Avanzada** coordinado por la Universidad de Barcelona y la Universidad Autónoma de Barcelona, participando activamente en la fase de impacto de inmunosupresores sobre la función Treg, particularmente con la Ciclosporina A. A continuación, tras mi incorporación al **programa de doctorado en Inmunología Avanzada** de la Universidad Autónoma de Barcelona, participé en todas las fases del estudio: desde el diseño experimental y el reclutamiento de pacientes, hasta la adquisición y análisis de datos mediante citometría de flujo multiparamétrica, herramientas bioinformáticas y modelos estadísticos. Un enfoque importante del trabajo fue la aplicación de técnicas de reducción de dimensionalidad y aprendizaje automático para identificar firmas inmunológicas capaces de diferenciar subgrupos clínicos.

Este trabajo ha sido financiado en el marco del proyecto **PI21/00211**, financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y cofinanciado por la Unión Europea. Esta financiación ha sido clave para el desarrollo de los objetivos planteados y ha permitido llevar a cabo el trabajo de campo, el procesamiento de muestras y los análisis avanzados que sustentan esta tesis.

La tesis se presenta en formato **clásico**, cumpliendo con los estándares de calidad establecidos por la Universidad Autónoma de Barcelona. Como parte del proyecto, se ha publicado una revisión en ***Frontiers in Immunology***, una revista internacional de inmunología, que resume el hilo conductor del proyecto y su relevancia en el contexto actual de las inmunopatías pediátricas titulado ***Treg in inborn errors of immunity: gaps, knowns and future perspectives***. Asimismo, en los últimos meses de duración de la beca

de doctorado, se están preparando varios manuscritos con los resultados originales de investigación generados durante el desarrollo del trabajo experimental.

Este proyecto se ha desarrollado en un entorno exigente, tanto por la complejidad clínica de los pacientes como por los desafíos metodológicos asociados al estudio de la enfermedad. No obstante, hemos logrado una caracterización multidimensional robusta, que sienta las bases para futuras estrategias de inmunomonitorización y diseño de terapias dirigidas.

Esta tesis ha sido posible gracias al compromiso de los equipos clínicos, al esfuerzo de los investigadores involucrados y, sobre todo, a la generosidad de las familias que participaron. Los aprendizajes adquiridos a lo largo de este camino no solo han contribuido al avance del conocimiento sobre la disregulación inmune en pediatría, sino que también me han preparado para introducirme en el mundo de la seguridad de medicamentos, farmacovigilancia y monitorización de reacciones adversas.

Espero que este trabajo sea de utilidad para la comunidad científica y médica, y contribuya a mejorar el abordaje de los niños con inmunopatías complejas.

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco



"La verdad no tiene ningún color, no tiene forma, no tiene cuerpo. La verdad es la armonía en la mente."

— Hipatia de Alejandría



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco



*A mis padres, familia y amigos, porque gracias a su apoyo, amor y enseñanzas soy quien soy hoy. Siempre
llevaré su huella en mi corazón, como el más valioso regalo de la vida.*

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco



AGRADECIMIENTOS



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

Escribir esta tesis ha sido un viaje largo, a veces cuesta arriba, otras veces apasionante, muchas veces agotador, pero siempre lleno de aprendizajes. Mirando hacia atrás, no puedo evitar sentirme profundamente agradecido por todas las personas que, de una forma u otra, me han acompañado en este proceso. Porque una tesis no se escribe sola, y este logro también es de tod@s vosotr@s.

Primero, quiero dar las gracias a mis directoras de tesis, **Laia** y **Ana**. Gracias por confiar en mí incluso cuando yo mismo dudaba, por ofrecerme un proyecto ambicioso, pero con sentido, por enseñarme con exigencia, pero sobre todo con humanidad. Gracias por responder siempre (incluso los fines de semana), por abrirme puertas, por impulsarme a ir más allá. He aprendido muchísimo, no solo de ciencia, sino también del compromiso con los pacientes y con el trabajo bien hecho. Tenerlas como referentes ha sido un regalo y un privilegio que todos querrían tener.

A **Celia**, por ser una pediatra de diez (y de once también!). Gracias por tu entrega, por tu implicación incansable en la gestión de los pacientes, y por hacer fácil lo que a menudo era complicado. Esta tesis no habría llegado hasta aquí sin tu trabajo constante, tu mirada clínica y tu compromiso absoluto con cada paso del proceso. Pero más allá del trabajo, gracias por tu cercanía, por tu generosidad y por la alegría de haber compartido este camino contigo. Ha sido un enorme placer trabajar juntos.

A todo el **equipo clínico y de biobanco del HSJD**: gracias por vuestra colaboración, tiempo y disposición, especialmente en esos días donde nada parecía cuadrar. Al pedazo de equipo de Inmunología clínica, los técnicos, coordinadores de muestras, y a todas las personas que trabajaron detrás del telón para que esto saliera adelante: mil gracias.

Gracias a todas las familias y pacientes que participaron en el estudio. Su generosidad y confianza son el verdadero motor de esta tesis. Gracias por prestarnos sus historias, su tiempo y su valentía. Ellos son los verdaderos héroes de esta historia y no puedo estar más orgulloso de contribuir mi pequeño granito de arena para que puedan disfrutar de la vida que se merecen.

A **Tania**, la coordinadora del programa de doctorado, quiero dedicarle unas palabras muy especiales. Gracias por tu dedicación plena, por estar siempre disponible con una sonrisa y por resolver todos y cada uno de los problemas que surgieron durante este camino de una forma tan cercana, cálida y eficaz. Has sido un apoyo constante, una guía amable y, ante todo, una persona encantadora. Sin duda, eres la mejor coordinadora que cualquier estudiante predoctoral podría desear. Gracias por hacer que todo fuese más fácil.

A **Alexandru**, por tu tiempo, tu paciencia infinita y por todas las enseñanzas que me has regalado, especialmente aquellas lecciones "boomer" que solo tú podrías haber transmitido con tanto estilo. Pero, por encima de todo, gracias por tu enorme corazón. Has sido mucho más que un compañero de trabajo: has sido un apoyo constante, una fuente de sabiduría inesperada y una presencia cálida en los momentos más intensos. Gracias por estar ahí siempre, de verdad.

Quiero agradecer profundamente a **Manel Juan** por haberme ofrecido un lugar donde trabajar que, sin duda, puedo llamar mi casa: el Servicio de Inmunología del Hospital Clínic de Barcelona. A todo el equipo del laboratorio, a los técnicos, y muy especialmente a **Mar, Sara, Víctor y Umma**, gracias por ser mis inmunodeficientes y alérgicos favoritos, por estar ahí codo con codo cada día, y por hacer que el trabajo fuera mucho más que ciencia. Gracias por esas conversaciones sobre natación, Mar, que me ayudaban a desconectar sin salir del laboratorio, y a ti, Umma, por ser esa alegría de la huerta que iluminaba cada rincón del lab con tu energía diaria. Sin duda, una parte de vosotros se queda conmigo para siempre.

A todo el equipo del Hospital General Universitario Gregorio Marañón que ha hecho posible su colaboración en este proyecto, gracias de corazón. A la **Dra. Elena Seoane**, por su compromiso inquebrantable con los pacientes y su constante implicación. A **Rafa Correa**, por su excelencia científica y por aportar siempre esa mirada crítica y rigurosa tan valiosa. Pero muy especialmente, quiero dedicar unas palabras a **Rebeca**. Gracias, literalmente, por haber compartido este camino dándonos de la mano. Aunque esta no fuera tu tesis, has sido una compañera predoctoral a distancia, una postdoc extraordinaria involucrada hasta el final... y, por encima de todo, una amiga. Tu apoyo, tu entrega y tu compañía han sido un regalo en esta etapa tan importante que sin ti no habría sido posible.

A mis compañeros de trabajo, gracias por convertir el día a día en algo mucho más que rutina. A **Raquel y Laura**, porque no podría haber tenido mejores compañeras de despacho: las risas diarias estaban aseguradas, pero sobre todo vuestra compañía ha hecho que cada uno de los días mereciera la pena. A **Dani Lorca**, mi Co-R no oficial, tan cabezota como entrañable... al final es imposible no cogerle cariño. A **Guille**, por ser tú mismo, porque tu alegría se contagia y alegra cualquier espacio. A **Juanfra**, por ese cariño que repartes sin medida. A **Mario**, que es literalmente la definición de una persona adorable. A **Jen, Dani Martí, Cristina, Iñaki, Marta...** sois mucho más que compañeros: sois familia, y llevaré siempre conmigo un trocito de cada uno.

Una persona muy importante a la que quiero agradecer profundamente este trabajo es a mi compañera, y por encima de todo, amiga, **Yiyi**. No tengo palabras suficientes para expresar todo lo que has hecho por mí. Has sido un pilar fundamental en esta etapa, y a ti te debo muchas de las cosas que hoy sé, tanto en lo científico como en lo personal. Gracias por enseñarme con paciencia, por compartir tu conocimiento sin reservas, y sobre todo por mostrarme valores que van mucho más allá del laboratorio. Juntos hemos formado, sin lugar a dudas, el mejor dúo dinámico del hospital. En el laboratorio ya soy conocido como Dani Luo, y me hace una enorme ilusión que me identifiquen así, porque gran parte de lo que soy hoy es gracias a ti. Gracias por tu amistad, tu apoyo incondicional y por hacer este camino infinitamente más bonito.

Sin duda alguna, el equipo de **BD** merece los agradecimientos que se ganaron a pulso. Quiero dar las gracias especialmente a **Alberto y Mattia**, porque más que especialistas en aplicaciones, han sido mis auténticos mentores en citometría de flujo. Todo lo que sé, se lo debo a ellos. Gracias por vuestra infinita

paciencia, por la dedicación sincera que ponéis en todo lo que hacéis, y por acompañarme siempre con una sonrisa, incluso cuando los problemas parecían no tener solución. A **Beatriz**, aunque no hayamos trabajado directamente juntos, gracias por acordarte de mí siempre que coincidíamos, por regalarme unos minutos de tu tiempo y, sobre todo, por ser tan encantadora. Ha sido un verdadero placer contar con vosotros en este camino.

Otro gran mentor que sin duda merece su lugar en estos agradecimientos es **Marco**. Para mí (y me atrevería a decir que también a nivel nacional) eres un verdadero referente en citometría de flujo. Gracias por compartir generosamente tu conocimiento, por tu disposición constante y, sobre todo, por ser una persona extraordinaria. Trabajar contigo ha sido un verdadero placer y un privilegio. Contigo, los dot plots cobran sentido, y la citometría deja de ser solo técnica para convertirse en comprensión profunda. Gracias por estar siempre ahí, con claridad, paciencia y buen humor.

Si tuviese que escribir sobre mis **amigos**, sin duda necesitaría otra tesis entera solo para ellos. Porque sois, sin exagerar, una de las partes más importantes de mi vida. Mi corazón está (y siempre estará) dividido entre Madrid y Barcelona, y en ambas ciudades tengo raíces profundas, que sois vosotros. Gracias por estar ahí, por acompañarme sin condiciones, por celebrar mis logros como si fueran vuestros y por sostenerme cuando las fuerzas flaqueaban. Gracias por las risas interminables, los abrazos que curan, los momentos compartidos, y por recordarme, incluso en los momentos de más estrés o cansancio, quién soy y lo que realmente importa. Sin vosotros, este camino habría sido infinitamente más duro, más gris, más solitario. Sois mi refugio, mi cable a tierra, mi alegría cotidiana. No solo habéis sido testigos de esta etapa, la habéis vivido conmigo. Y por eso, esta tesis, también es vuestra. Gracias, de corazón.

A mis **compañeros de piso**, tanto a los que se fueron como a los que llegaron después, gracias por ser hogar cuando más lo necesitaba. Por compartir el día a día, las risas en la cocina y el “radio patio informa”, las noches eternas de conversación y también los silencios cómodos. Por respetar mis tiempos, por aguantarme y por animarme cuando parecía que no llegaba, y por hacer que el simple hecho de volver a casa fuese siempre algo bonito. Vivir con vosotros ha sido una parte esencial de esta etapa, y me llevo recuerdos que guardaré con enorme cariño siempre.

A mi **familia**, no hay palabras suficientes para expresar todo lo que significáis para mí. A todas mis tías, tíos y primos: gracias por formar parte de lo que sin duda considero la mejor familia del mundo. No os cambiaría por nada, porque no hay nada como nuestra locura compartida, nuestras reuniones llenas de risas, y el cariño incondicional que me habéis dado siempre. Gracias por estar ahí, sin necesidad de entender cada paso del camino, pero apoyándome en todos ellos, nunca me faltaron vuestros mensajes, llamadas o abrazos diciéndome “tú puedes!” en los momentos que más lo necesitaba. Vuestra energía, alegría y amor han sido un refugio constante, y sois una parte fundamental de todo lo que soy.

Y a mi **pareja**, gracias por caminar a mi lado con paciencia, comprensión y amor, incluso cuando mis días eran largos, las noches cortas, y mis pensamientos estaban perdidos entre gráficos, marcadores y células. Has sido un ancla en este proceso, mi calma cuando todo parecía acelerarse, y mi sonrisa cuando necesitaba recordar por qué merecía la pena seguir. Gracias por creer en mí incluso en esos momentos en los que yo dudaba.

A mis **padres**, no hay forma de agradecer lo suficiente todo lo que habéis hecho por mí. Desde el primer minuto creísteis en mí, sin reservas ni condiciones, apoyando cada paso que he dado, incluso cuando significaba recorrer caminos inciertos, difíciles o lejanos. Vuestra confianza y apoyo incondicional han sido mi fuerza más constante. Me habéis enseñado que el esfuerzo, la honestidad y la generosidad son los pilares sobre los que se construyen los sueños. Gracias por acompañarme en cada etapa de este largo viaje, por estar siempre al otro lado del teléfono, por preocuparos, por animarme, por entender mis silencios cuando estaba agotado, y por celebrar cada pequeño logro como si fuera el mayor de los triunfos. Esta tesis también es vuestra, porque sin vuestro amor, vuestro ejemplo y vuestro empuje, yo no estaría aquí. Gracias por darme tanto, siempre.

Y, finalmente, me gustaría dedicar unas palabras a alguien que ha estado en cada paso de este camino: **a mí mismo**. Esta tesis ha sido también un ejercicio de paciencia, de resistencia y de autoconocimiento. Me ha enseñado que el proceso importa más que el resultado. Porque, como diría la gran Paquita Salas, *“soy un superviviente”*, y no le falta razón. Porque he sabido mantenerme firme, avanzar con determinación incluso cuando todo se ponía cuesta arriba, y sostener este proyecto con trabajo, corazón y coraje. Y como bien dijo Úrsula Corberó: *“me lo dedico a mí también”*, por ser tan trabajador, tan valiente y, por ser tan majo. Porque he aprendido, he crecido y, sobre todo, no me he rendido.

Con esta tesis cierro una etapa que me ha transformado profundamente, con la certeza de que lo aprendido (en ciencia y en vida) me acompañará siempre. Lo mejor está aún por escribir.

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

Índice de contenidos

Resumen	IX
Abstract	XI
1. Introducción	1
1.1 El sistema inmunológico.....	1
1.1.1 Ontogenia del sistema inmunológico	1
1.1.2 Inmunidad innata	2
1.1.2.1 Células de la inmunidad innata.....	3
1.1.3 Inmunidad adaptativa	7
1.1.3.1 Inmunidad humoral: linfocitos B.....	8
1.1.3.2 Inmunidad celular: linfocitos T	9
1.1.4 Linfocitos T reguladores.....	14
1.1.4.1 Caracterización de células Treg	15
1.1.4.2 Mecanismos de supresión de las células Treg.....	17
1.2 Trastornos primarios de regulación inmunológica: PIRD.....	20
1.2.1 Rol central de las Treg en la fisiopatología: Tregopatías	21
1.2.2 Disfunción de las Treg en otros EII	25
1.2.3 Vías de señalización implicadas en la desregulación inmunológica	30
1.2.3.1 Vía de las MAPK	31
1.2.3.2 Vía de NF- κ B	32
1.2.3.3 Vía PI3K/AKT/mTOR.....	32
1.2.3.4 Vía de JAK-STAT	33
1.2.4 Tratamiento farmacológico de los PIRD	33
1.2.4.1 Inhibición de la calcineurina: tacrolimus	34
1.2.4.2 Inhibición de la síntesis de purinas: micofenolato de mofetilo	35
1.2.4.3 Inhibición de PI3K δ : leniolisib	35
1.2.4.3 Inhibición de mTOR: sirolimus	36
1.2.4.4 Inhibición de JAK: ruxolitinib	37
1.2.4.5 Efecto farmacológico sobre las células Treg	37
2. Hipótesis y objetivos	35

2.1 Hipótesis.....	35
2.2 Objetivos	36
3. Material y métodos.....	37
3.1 Aspectos éticos	37
3.2 Diseño del estudio de cohorte	38
3.2.1 Población de estudio: criterios de inclusión y de exclusión	38
3.2.2 Reclutamiento de pacientes y recolección de muestras.....	39
3.2.3 Estudios inmunológicos.....	39
3.3 Procesamiento de las muestras	41
3.3.1 Aislamiento y criopreservación del plasma	41
3.3.2 Tinción de sangre completa	42
3.3.3 Aislamiento de PBMCs y estudio funcional de linfocitos Treg	42
3.4 Impacto de inmunosupresores sobre el fenotipo Treg	44
3.4.1 Obtención de PBMCs de donantes sanos	44
3.4.2 Exposición de PBMCs a fármacos inmunosupresores	45
3.4.3 Estudio fenotípico de células Treg	46
3.5 Inmunofenotipado (paneles de citometría)	46
3.5.1 Paneles de sangre completa	47
3.5.2 Panel de funcionalidad Treg.....	53
3.5.3 Paneles de inmunofarmacología	54
3.6 Puesta a punto de la evaluación del estado de activación de las vías PI3K/AKT/ mTOR, JAK-STAT y NF-κB	56
3.7 Análisis de datos.....	59
3.7.1 Análisis de datos de citometría de pacientes PIRD.....	59
3.7.1.1 Análisis bioinformático del perfil inmunológico de pacientes PIRD	59
3.7.1.2 Análisis bioinformático de la funcionalidad Treg	61
3.7.1.3 Análisis bioinformático de la integración clínica.....	62
3.7.2 Análisis de datos de citometría de inmunofarmacología	63
3.7.3 Análisis de datos de fosfoproteínas	64
3.7.4 Softwares adicionales	64
4. Resultados.....	65
4.1 Población de estudio.....	65

4.2 Caracterización inmunológica de pacientes PIRD	69
4.2.1 Perfil inmunofenotípico	69
4.2.1.1 Evaluación de la naturaleza de los datos	69
4.2.1.2 Exploración de agrupamientos inmunológicos e identificación	71
4.2.1.3 Determinación de perfiles inmunológicos y búsqueda de biomarcadores	76
4.2.2 Inmunofenotipado de función Treg	82
4.2.2.1 Evaluación de la naturaleza de los datos	82
4.2.2.2 Aproximación funcional	83
4.2.2.3 Exploración de agrupamientos funcionales	88
4.2.2.4 Determinación de perfiles funcionales y búsqueda de biomarcadores	89
4.2.3 Integración clínica	95
4.2.3.1 Determinación de la distribución de los datos	95
4.2.3.2 Perfil tridimensional (inmunológico, funcional y clínico)	97
4.2.3.3 Exploración y estabilidad temporal de subgrupos inmunológicos	99
4.2.3.4 Distribución de variables clínicas por cluster: repercusiones clínicas	101
4.3 Inmunofarmacología	104
4.3.1 Impacto sobre células CD4 (I)	104
4.3.1.1 Topografía inmunofarmacológica	104
4.3.1.2 Clusterización y definición fenotípica	105
4.3.1.3 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco	107
4.3.2 Impacto sobre células CD4 (II)	118
4.3.2.1 Topografía inmunofarmacológica	118
4.3.2.2 Clusterización y definición fenotípica	119
4.3.2.3 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco	121
4.3.3 Impacto sobre células CD8	131
4.3.3.1 Topografía inmunofarmacológica	131
4.3.3.2 Clusterización y definición fenotípica	132
4.3.3.3 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco	133
4.3.4 Impacto sobre células Tr1	143
4.3.4.1 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco	144
4.4 Exploración del uso de un kit comercial para el estudio molecular PIRD	146
4.4.1 Concordancia de los controles	146

4.4.2 Aplicación sobre PBMCs humanas: sensibilidad y reproducibilidad	146
4.4.3 Rango dinámico y límites de detección	147
5. Discusión.....	149
5.1 PIRD pediátrico: una constelación clínica dominada por autoinmunidad, linfoproliferación y bases genéticas definidas.....	149
5.2 Heterogeneidad inmunológica en pacientes pediátricos PIRD	150
5.2.1 Análisis multivariante y descubrimiento de subgrupos inmunofenotípicos	150
5.2.2 Disfunción del eje inmunoregulador: una lectura desde las Tregs.....	152
5.2.3 Integración clínica e inmunológica: hacia una medicina de precisión	154
5.3 Cuando el silencio fenotípico habla: inmunomodulación T	155
5.3.1 Células T CD4+, estabilidad fenotípica y patrones de respuesta sutiles.....	155
5.3.2 Células T CD8+, preservación espacial y estabilidad de poblaciones.....	156
5.3.3 Células Tr1, exploración metodológica e implicaciones funcionales	157
5.4 Capturando la señal: validación fosfoproteica en PBMCs humanas	157
5.5 Revolución silenciosa: cómo la bioinformática transforma la inmunología clínica...	159
5.6 Limitaciones y perspectivas de futuro.....	160
6. Conclusiones	163
7. Bibliografía	167
8. Anexos	197
8.1 Anexo I: Consentimiento informado de pacientes	197
8.2 Anexo II: Plan de gestión de datos	201
8.3 Anexo III: Estrategia de gating.....	207
8.3.1 Panel de Linfocitos T	207
8.3.2 Panel de Linfocitos Treg	209
8.3.3 Panel de dendríticas (DC)	210
8.3.4 Panel de TBNK.....	211
8.3.5 Panel de TFH	213
8.3.6 Panel de Linfocitos B	215
8.3.7 Panel de funcionalidad Treg.....	217
8.4 Anexo IV: Códigos de R	219
8.5 Anexo V: Producción científica	315

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
A	
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIRE	<i>Autoimmune Regulator</i> (Regulador autoinmune)
AKT	<i>Protein Kinase B</i> (Proteína quinasa B)
ALPID	<i>Primary Autoimmune Lymphoproliferative Disorders</i> (Trastornos autoinmunes linfoproliferativos primarios)
ALPS	<i>Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome</i> (Síndrome linfoproliferativo autoinmune)
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula presentadora de antígeno)
APDS	<i>Activated PI3K Delta Syndrome</i> (Síndrome activado de PI3K delta)
B	
BCR	<i>B Cell Receptor</i> (Receptor de células B)
BD	<i>Becton Dickinson</i> (empresa de biotecnología)
BV	<i>Brilliant Violet</i> (Colorante de fluorescencia)
C	
CHAI	<i>CTLA-4 Haploinsufficiency with Autoimmune Infiltration</i> (Haploinsuficiencia de CTLA-4 con infiltración autoinmune)
CM	<i>Central Memory</i> (Memoria central)
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i> (Proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno citotóxico de linfocitos T tipo 4)
CV	Coefficiente de variación
CVID	<i>Common Variable Immunodeficiency</i> (Inmunodeficiencia común variable)
D	
DC	<i>Dendritic Cell</i> (Célula dendrítica)
DN	Dobles negativos (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP	Dobles positivos (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
E	
EII	Error innato de la inmunidad
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
EM	<i>Effector Memory</i> (Memoria Efectora)
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i> (Cinasa regulada por señales extracelulares)
F	
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Clasificación celular activada por fluorescencia)
FAS	Receptor de apoptosis (CD95)

Abreviatura	Significado
FDR	<i>False Discovery Rate</i> (Tasa de falsos descubrimientos)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Fluoresceína isotiocianato)
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Dispersión frontal)
FVS	<i>Fixable Viability Stain</i> (Tinte de viabilidad fijable)
G	
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced TNF Receptor</i> (Receptor TNF inducido por glucocorticoides)
GOF	<i>Gain of Function</i> (Ganancia de función)
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i> (Trifosfato de guanosina)
H	
HCB	Hospital Clínic de Barcelona
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno leucocitario humano)
HLH	<i>Hemophagocytic Lymphohistiocytosis</i> (Linfocitosis hemofagocítica)
HSJD	Hospital Sant Joan de Déu
I	
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i> (Enfermedad inflamatoria intestinal)
ICOS	<i>Inducible T-cell COStimulator</i> (Coestimulador inducible de células T)
IFN	Interferón
IKAROS	Factor de transcripción IKAROS
IL	Interleucina
IMPDH	<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i> (Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa)
IPEX	<i>Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked</i> (Inmunodeficiencia ligada al cromosoma X con poliendocrinopatía y enteropatía)
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i> (Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas)
IV	Inmunoglobulina intravenosa
J	
JAK	<i>Janus Kinase</i> (Quinasa Janus)
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i> (Cinasa N-terminal de c-Jun)
K	
KIR	<i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i> (Receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas)
L	
LAG	<i>Lymphocyte Activation Gene</i> (Gen de activación de linfocitos)
LAP	<i>Latency-Associated Peptide</i> (Péptido asociado a latencia)

Abreviatura	Significado
LRBA	<i>Lipopolysaccharide-Responsive and Beige-Like Anchor protein</i> (Proteína ancla sensible al lipopolisacárido y similar a Beige)
M	
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (Cinasa activada por mitógenos)
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (Intensidad media de fluorescencia)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo mayor de histocompatibilidad)
MMF	Micofenolato de mofetil
N	
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i> (Factor nuclear de células T activadas)
NK	<i>Natural Killer</i> (Célula asesina natural)
NKT	<i>Natural Killer T cells</i> (Células T asesinas naturales)
O	
OS	Omenn Syndrome (Síndrome de Omenn)
P	
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Solución salina tamponada con fosfato)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de componentes principales)
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i> (Proteína de Muerte Celular Programada 1)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PIRD	<i>Primary Immune Regulatory Disorder</i> (Trastorno primario de regulación inmunológica)
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> (Forbol 12-miristato 13-acetato)
R	
REF	Referencia
RRID	<i>Research Resource Identifier</i> (Identificador de recurso de investigación)
RTE	<i>Recent Thymic Emigrant</i> (Emigrante tímico reciente)
RUO	<i>Research Use Only</i> (Solo para uso en investigación)
S	
SSC	<i>Side Scatter</i> (Dispersión lateral)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (Transductor y activador de señal de transcripción)
T	
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor de célula T)
TEMRA	<i>T Effector Memory RA+</i> (Memoria efectora T con RA+)
TFH	<i>T Follicular Helper</i> (Células T foliculares colaboradoras)
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> (Factor de crecimiento transformante)
TIGIT	<i>T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i> (Inmunorreceptor de células T con dominios tipo inmunoglobulina e ITIM)

Abreviatura	Significado
TIM	<i>T-cell Immunoglobulin and Mucin domain</i> (Inmunoglobulina y dominio mucina de células T)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Factor de necrosis tumoral)
U	
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> (Proyección de aproximación de variedades uniformes)
V	
VEB	Virus de Epstein-Barr
VEO	<i>Very Early Onset</i> (Aparición muy temprana)
VEOIBD	<i>Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease</i> (Enfermedad inflamatoria intestinal de aparición muy temprana)
W	
WAS	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome</i> (Síndrome de Wiskott-Aldrich)
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i> (Proteína del Síndrome de Wiskott-Aldrich)
X	
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i> (Inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X)

Resumen

Los trastornos primarios de regulación inmunitaria (PIRD) constituyen un grupo emergente y heterogéneo dentro de los errores innatos de la inmunidad (EII), caracterizados por autoinmunidad, linfoproliferación y disfunción inmune multiorgánica. Su complejidad clínica y molecular supone un desafío importante para el diagnóstico precoz y el manejo terapéutico individualizado.

Métodos: Se llevó a cabo un estudio multicéntrico observacional prospectivo que incluyó 51 pacientes pediátricos que cumplieran criterios clínicos de PIRD, con muestras de sangre periférica recogidas en tres tiempos (T0, T1 y T2) y 6 controles sanos. Se aplicó citometría de flujo multiparamétrica para caracterizar de forma exhaustiva 114 poblaciones inmunes, centrándose en el perfil inmunofenotípico y la funcionalidad de las células T reguladoras (Treg). Además, se emplearon modelos de aprendizaje automático para la estratificación inmunológica. En paralelo, se llevó a cabo un análisis exploratorio mediante un kit funcional de fosfoproteínas, con potencial para la monitorización clínica y el diseño de terapias personalizadas, así como ensayos funcionales *in vitro* en PBMCs humanas con inmunosupresores de uso clínico habitual (sirolimus, ruxolitinib, micofenolato de mofetil, leniolisib y tacrolimus).

Resultados: El estudio reveló una heterogeneidad inmunológica marcada en los pacientes con PIRD, evidenciada tanto en el perfil fenotípico como en la respuesta funcional indirecta de las Treg. Se identificaron biomarcadores diferenciales robustos (como CD4⁺ EM, CD4⁺ CM, CD4⁺ RTE y células NK CD56⁺ CD16⁺) capaces de discriminar entre pacientes, controles y subgrupos clínicos. Aunque no alcanzaron significación estadística, las subpoblaciones Treg CM y Treg EM podrían tener un papel relevante en la regulación inmune alterada observada en pacientes, sugiriendo que su presencia, aunque poco abundante, está asociada a patrones inmunológicos distintivos que merecen atención en futuras investigaciones. Específicamente, se observó una sobreexpresión de niveles celulares de diferentes poblaciones inmunorreguladoras y subtipos Treg, así como de marcadores inmunorreguladores (CTLA-4, PD-1, IL-10, TIGIT, LAP) en células Treg y CD4⁺ no-Treg de pacientes PIRD frente a controles sanos, lo que sugiere una activación inmunitaria compensatoria desorganizada, corroborada por redes de coexpresión fragmentadas. El estudio de fosfoproteínas aportó una caracterización preliminar del perfil de señalización intracelular en condiciones basales y tras estimulación, abriendo la vía a estrategias de inmunomonitorización funcional. Por su parte, los ensayos con inmunosupresores mostraron alteraciones sutiles en la distribución de subpoblaciones T, aunque sin cambios estadísticamente significativos a nivel fenotípico.

Conclusiones: Esta tesis propone un marco clínico-inmunológico integral para la caracterización de los pacientes con PIRD, combinando herramientas avanzadas de inmunofenotipado, análisis funcional y modelización computacional. Se identifican biomarcadores y patrones inmunes con utilidad potencial en la

estratificación diagnóstica y en la toma de decisiones terapéuticas. El trabajo sienta las bases para el desarrollo de algoritmos hospitalarios orientados al diagnóstico precoz y al diseño de terapias inmunomoduladoras personalizadas en inmunología pediátrica. La integración del perfil inmunofenotípico y la función Treg emerge como un eje central para avanzar hacia una medicina de precisión en los errores innatos de la inmunidad con fenotipos de disregulación.

Palabras clave: *EII, PIRD, Treg, inmunofenotipado extendido, citometría de flujo multiparamétrica, inmunosupresores, bioinformática, medicina personalizada, pediatría.*

Abstract

Primary immune regulatory disorders (PIRD) represent an emerging and heterogeneous group within inborn errors of immunity (IEI), characterized by autoimmunity, lymphoproliferation, and multiorgan immune dysfunction. Their clinical and molecular complexity poses a significant challenge for early diagnosis and individualized therapeutic management.

Methods: A prospective multicenter observational study was conducted, including 51 pediatric patients who met clinical criteria for PIRD. Peripheral blood samples were collected at three time points (T0, T1, and T2), along with samples from 6 healthy controls. Multiparametric flow cytometry was applied to comprehensively characterize 114 immune cell populations, with a focus on the immunophenotypic profile and functional status of regulatory T cells (Treg). In addition, machine learning models were used for immunological stratification. In parallel, an exploratory analysis was conducted using a functional phosphoprotein kit with potential applications in clinical monitoring and personalized therapy design, along with *in vitro* functional assays on human PBMCs using commonly prescribed immunosuppressants (sirolimus, ruxolitinib, mycophenolate mofetil, leniolisib, and tacrolimus).

Results The study revealed marked immunological heterogeneity in patients with PIRD, evidenced both by phenotypic profiles and by the indirect functional response of regulatory T cells (Tregs). Robust differential biomarkers (such as CD4⁺ EM, CD4⁺ CM, CD4⁺ RTE, and NK CD56⁺ CD16⁺ cells) were identified, capable of distinguishing between patients, healthy controls, and clinical subgroups. Although they did not reach statistical significance, the Treg CM and Treg EM subpopulations may play a relevant role in the altered immune regulation observed in patients, suggesting that their presence, though limited, is associated with distinctive immunological patterns that warrant further investigation. Specifically, there was an overexpression of cellular levels of various immunoregulatory populations and Treg subtypes, as well as immunoregulatory markers (CTLA-4, PD-1, IL-10, TIGIT, LAP) in Treg and CD4⁺ non-Treg cells from PIRD patients compared to healthy controls, suggesting a disorganized compensatory immune activation, corroborated by fragmented co-expression networks. The phosphoprotein analysis provided a preliminary characterization of intracellular signaling profiles under basal conditions and after stimulation, paving the way for future functional immunomonitoring strategies. Meanwhile, immunosuppressor assays revealed subtle alterations in the distribution of T cell subpopulations, although no statistically significant phenotypic changes were observed.

Conclusions: This thesis presents an integrated clinical-immunological framework for the characterization of PIRD patients, combining advanced immunophenotyping, functional assays, and computational modeling. Biomarkers and immune patterns with potential utility for diagnostic stratification and therapeutic decision-making were identified. The study lays the groundwork for the

development of hospital-based algorithms aimed at early diagnosis and the design of personalized immunomodulatory therapies in pediatric immunology. The integration of immunophenotypic profiling with Treg function emerges as a central axis for advancing precision medicine in inborn errors of immunity with dysregulatory phenotypes.

Keywords: *IEI, PIRD, Treg, extended immunophenotyping, multiparametric flow cytometry, immunosuppressants, bioinformatics, personalized medicine, pediatrics.*

1.

INTRODUCCIÓN

"En la vida no hay cosas que temer, solo cosas que comprender. Ahora es el momento de comprender más, para temer menos."

— *Marie Curie*



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

1. Introducción

1.1 El sistema inmunológico

El **sistema inmunológico** es red compleja de células, tejidos y procesos biológicos que permite a un organismo defenderse de agentes extraños, como patógenos y sustancias nocivas, al tiempo que mantiene la tolerancia hacia sus propios tejidos (1). Su función principal radica en la capacidad de distinguir entre lo "**propio**" y lo "**no propio**", así como evaluar **señales de peligro** (2) lo que le permite identificar y neutralizar amenazas, incluso si esto implica un riesgo limitado de daño a sus propios tejidos (3). Esta dualidad de discriminación es la base de la respuesta inmunológica y es esencial para mantener la salud y combatir enfermedades.

Cuando una sustancia extraña supera las barreras físicas y químicas del organismo, como la piel o las secreciones mucosas, entra en contacto con el sistema inmunológico. Este encuentro puede desencadenar una respuesta defensiva o, en ausencia de señales de peligro, inducir lo que se conoce como **tolerancia inmunológica**, un mecanismo activo que bloquea la reactividad contra antígenos inocuos o propios (4). Los mecanismos que permiten al sistema inmunológico reconocer y responder a agentes extraños se dividen en dos grandes categorías: la **inmunidad innata** y la **inmunidad adaptativa** (5). La **inmunidad innata**, o inmunidad inespecífica, es la primera línea de defensa que actúa de manera rápida y generalizada. Comprende un conjunto de respuestas predeterminadas activadas por receptores codificados en la línea germinal del huésped. Estos receptores reconocen patrones moleculares comunes en muchos patógenos, pero ausentes en el organismo, lo que permite una defensa inmediata, aunque menos específica (6). Por otro lado, la **inmunidad adaptativa**, también conocida como inmunidad específica, se caracteriza por su capacidad para responder de manera precisa a estructuras únicas, conocidas como antígenos o inmunógenos. Los receptores antigénicos en este sistema son codificados por un número limitado de elementos génicos que se recombinan somáticamente, generando moléculas con una especificidad exquisita para cada inmunógeno. Estas moléculas incluyen tanto receptores celulares localizados en linfocitos especializados (células B y T), como la producción de anticuerpos, moléculas secretadas que neutralizan patógenos de manera específica (7).

1.1.1 Ontogenia del sistema inmunológico

La **hematopoyesis**, proceso mediante el cual se generan todas las células sanguíneas e inmunitarias, ocurre principalmente en la médula ósea humana (**Figura 1**). Este proceso comienza con células madre hematopoyéticas pluripotentes que expresan el marcador CD34+. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en dos grandes linajes: el **mieloide** y el **linfoide**, dependiendo de las señales químicas y del

microambiente en el que se encuentren. Las células del linaje mieloide dan lugar a eritrocitos, megacariocitos (precursores de plaquetas) y células de la línea granulocítica/monocítica (como neutrófilos y macrófagos). Por otro lado, las células del linaje linfóide se diferencian en células linfoides innatas, linfocitos NK, células T y células B. Mientras que las ILC y los linfocitos NK son componentes clave de la inmunidad innata, las células T y B son la base de la respuesta inmunitaria adaptativa. El desarrollo de las células inmunitarias está regulado por mediadores solubles, como citocinas, y por señales de contacto con células del estroma de la médula ósea (8).

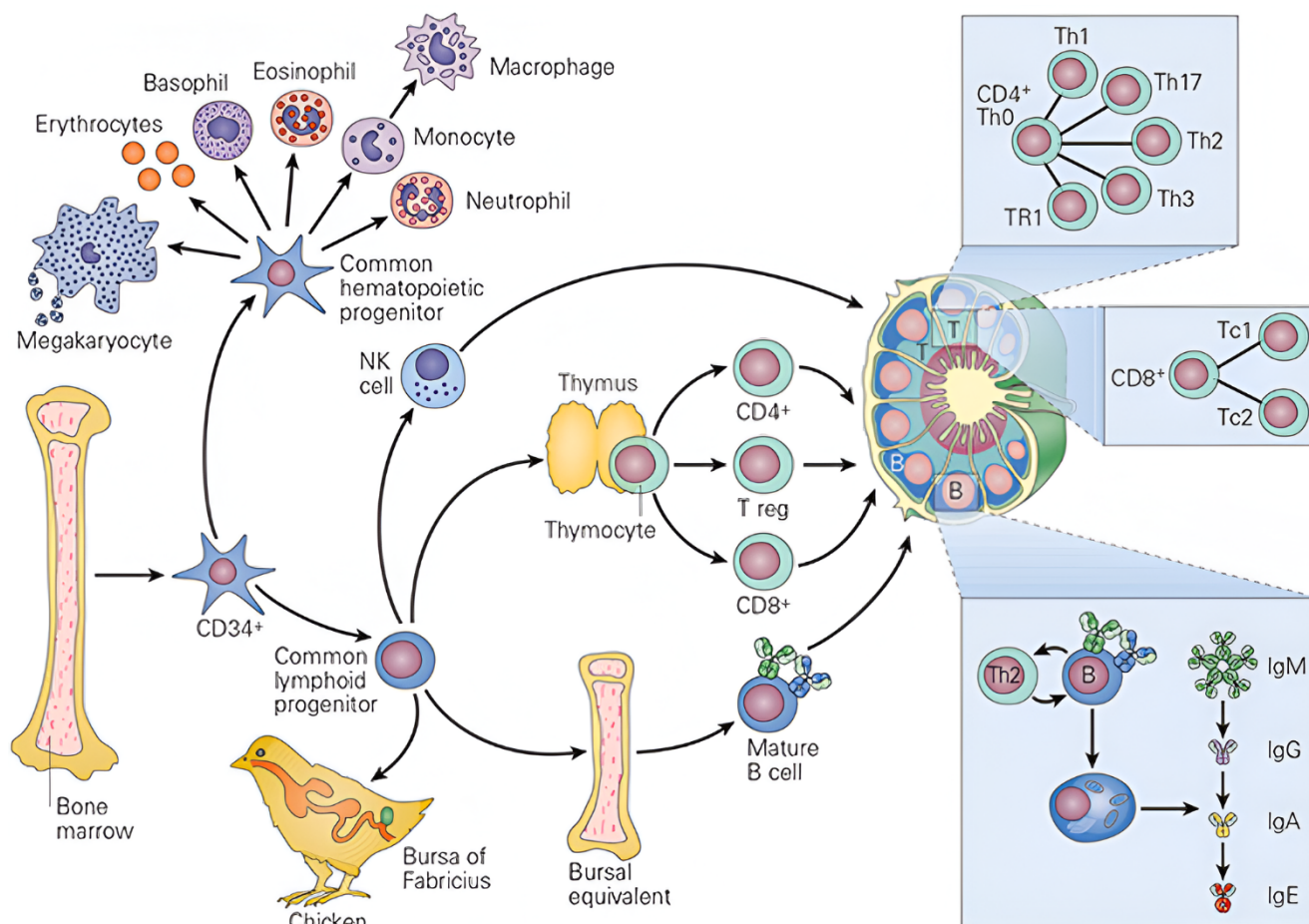


Figura 1 | Representación esquemática de la ontogenia del sistema inmunológico, que muestra la diferenciación de células progenitoras en poblaciones inmunocompetentes a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes CD34+ de la médula ósea. Los precursores mieloides dan lugar a linajes eritroides, megacariocíticos, granulocíticos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y monocíticos (monocitos/macrófagos), mientras que los precursores linfoides se diferencian en células linfoides innatas, linfocitos NK, y linajes T y B. Las células progenitoras linfoides comunes siguen vías de diferenciación dependientes del microambiente: las células T maduran en el timo, mientras que las células B completan su desarrollo en la médula ósea (equivalente humano de la bolsa de Fabricio en aves) y secundariamente en el bazo. Tras su maduración, las células T y B migran a órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos), localizándose en regiones específicas. Imagen adaptada de Bellanti, *Immunology IV* ©.

1.1.2 Inmunidad innata

La **inmunidad innata** actúa como primera barrera ante agentes infecciosos, movilizandolos mecanismos inmediatos cuando estos superan las defensas anatómicas. Inicialmente, moléculas solubles como factores

de coagulación (trombina), fibrinólisis (plasmina) y componentes del complemento (C3a, C5a) se activan para contener la amenaza (6). En las primeras horas, la **inflamación** emerge como respuesta central, mediada por citocinas, quimiocinas y metabolitos, que reclutan y activan células como **neutrófilos**, **monocitos** y **células NK**. Este proceso facilita la migración celular desde la sangre hacia tejidos afectados mediante la regulación de moléculas de adhesión (9). Si la respuesta innata falla en ~96 horas, se activa la **inmunidad adaptativa (Figura 2)** (5). Paralelamente, el sistema del complemento amplifica la defensa mediante tres vías (alternativa, lectina y clásica), que convergen en la formación del **complejo de ataque a la membrana** (MAC, por sus siglas en inglés) para lisar patógenos, mientras sus subproductos (C3a, C5a) potencian la inflamación y la quimiotaxis (10).

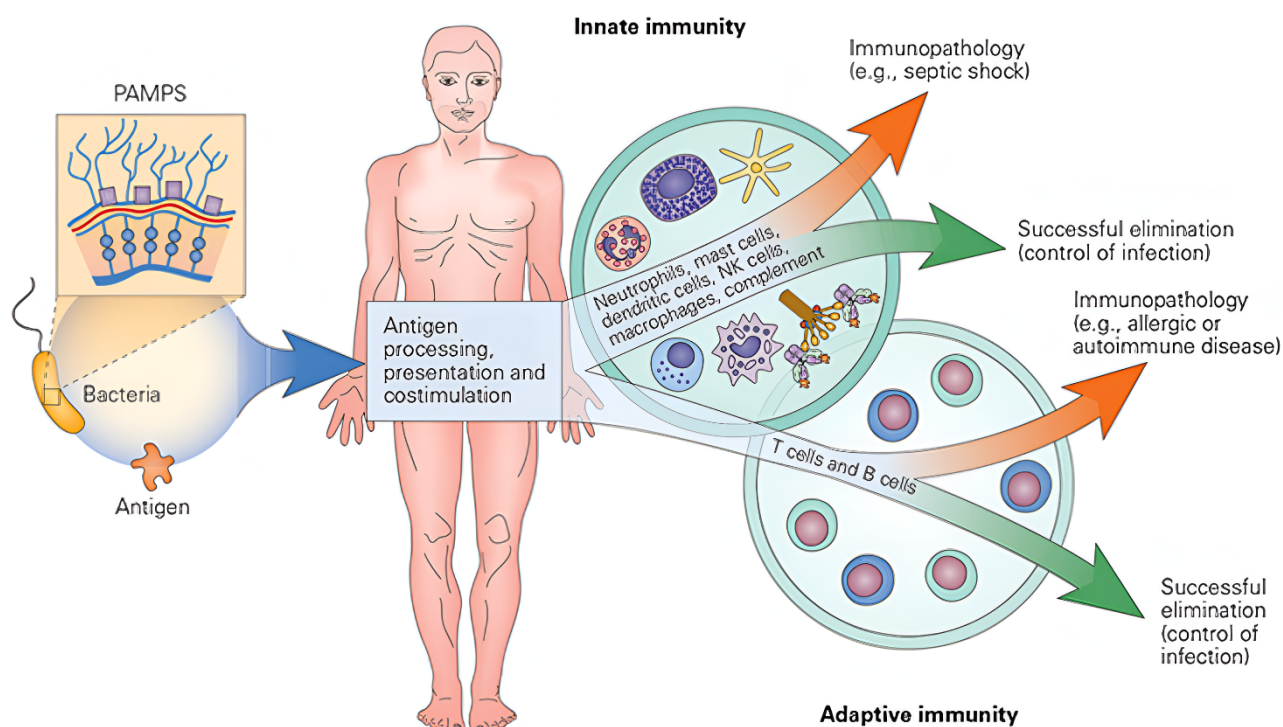


Figura 2 | Descripción gráfica de la interacción entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa frente a infecciones microbianas. Los microorganismos patógenos pueden describirse como entidades que contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y antígenos. La inmunidad innata se activa de manera inmediata al reconocer los PAMPs, y contribuye a la respuesta adaptativa, la cual es específica para cada antígeno, mediante procesos como el procesamiento y presentación de antígenos, así como la coestimulación de células inmunitarias. Aunque ambos sistemas suelen actuar de manera coordinada para eliminar infecciones, en algunos casos una activación excesiva o descontrolada puede tener consecuencias negativas. Imagen tomada de Bellanti, *Immunology IV* ©.

1.1.2.1 Células de la inmunidad innata

La inmunidad innata identifica patógenos mediante **receptores de reconocimiento de patrones** (PRRs, por sus siglas en inglés) presentes en las células que detectan **patrones moleculares asociados a patógenos** conservados (PAMPs, por sus siglas en inglés), como lipopolisacáridos bacterianos o ARN viral,

esenciales para la supervivencia microbiana (11). Los patógenos desencadenan respuestas al penetrar en los tejidos y exponer sus PAMPs a los PRRs. Además, el sistema inmunológico innato reconoce **patrones moleculares asociados a daño celular** (*DAMPs*, por sus siglas en inglés), como proteínas de choque térmico liberadas tras estrés (12). Esta dualidad permite una respuesta versátil: eliminar invasores mientras repara tejidos.

Monocitos

Los **monocitos** son elementos fundamentales en la defensa del organismo, colaborando con neutrófilos para neutralizar agentes infecciosos y eliminar residuos celulares (13). Los monocitos, originados en la médula ósea, circulan en la sangre (constituyendo ~10% de los leucocitos) antes de migrar a tejidos, donde se diferencian en **macrófagos especializados** o en **células dendríticas derivadas de monocitos** (moDCs) (14). Estas células, no solo fagocitan patógenos mediante el reconocimiento de PAMPs, sino que también eliminan desechos, presentan antígenos a linfocitos T y secretan mediadores clave (TNF- α , IL-6, quimiocinas), regulando procesos inflamatorios y sistémicos (fiebre, producción de proteínas hepáticas de fase aguda) (14). Los monocitos se dividen en tres subtipos según marcadores CD14 y CD16: **clásicos** (CD14^{hi}CD16⁻, 90% del total), que inician inflamación mediante fagocitosis y secreción de citocinas proinflamatorias; **intermedios** (CD14⁺CD16⁺), que estimulan linfocitos T mediante presentación antigénica; y **no clásicos** (CD14^{low}CD16⁺), con roles antiinflamatorios y de homeostasis vascular, induciendo IL-4 en linfocitos T CD4⁺ (15,16).

Granulocitos

Los **granulocitos**, identificados por la presencia de gránulos citoplasmáticos, son células inmunitarias maduras que circulan en la sangre y migran rápidamente a los tejidos ante estímulos inflamatorios. Este grupo incluye tres tipos principales: **neutrófilos**, **eosinófilos** y **basófilos**, cada uno con roles específicos (15).

1. Los **neutrófilos**, o leucocitos polimorfonucleares, son las células inmunitarias más abundantes en sangre (50-70% de los leucocitos) y actúan como primeros respondedores ante infecciones (17). A pesar de su corta vida (6-8 horas), pueden responder mediante fagocitosis, liberación de péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas) (18) y formación de **trampas extracelulares** (*NETs*, por sus siglas en inglés). Estas últimas son redes compuestas por ADN, histonas y proteínas granulares que atrapan y neutralizan microbios extracelulares, concentrando componentes antimicrobianos como la elastasa de neutrófilos (19). En el contexto inflamatorio, se observan subtipos en base al grado de expresión de CD62L y CD16, como los

neutrófilos en banda (inmaduros, CD62L+CD16^{low}), **segmentados** (maduros, CD62L+CD16+) y **CD62L^{dim}** (reguladores de linfocitos T) (20).

2. Los **eosinófilos**, que representan 1-5% de los leucocitos, tienen una vida circulante breve (<24 horas) y se acumulan en tejidos afectados (21,22). Sus gránulos citoplasmáticos almacenan proteínas catiónicas, como la **proteína básica mayor** (*MBP*, por sus siglas en inglés), la **proteína catiónica eosinofílica** (*ECP*, por sus siglas en inglés), la **neurotoxina derivada de eosinófilos** (*EDN*, por sus siglas en inglés) y la **peroxidasa eosinofílica** (*EPO*, por sus siglas en inglés), las cuales ejercen efectos citotóxicos sobre patógenos extracelulares, especialmente helmintos, y contribuyen al daño tisular en inflamaciones crónicas (23). La liberación de estos componentes granulares, junto con mediadores como leucotrienos, factor activador de plaquetas (*PAF*, por sus siglas en inglés) y citocinas (GM-CSF, IL-3, IL-5, TNF- α , entre otras) no solo amplifican la inflamación aguda y crónica, sino que también desempeñan un papel central en enfermedades alérgicas, modulando el reclutamiento celular y la activación de otras células inmunitarias (24).
3. Los **basófilos**, células granulocíticas minoritarias en sangre (<1%), desempeñan roles multifacéticos más allá de su asociación clásica con alergias (25). Derivados de la médula ósea, estos leucocitos expresan **receptores de alta afinidad para IgE** (Fc ϵ RI), lo que les permite liberar **histamina**, **citocinas** (IL-4, IL-13) y **leucotrienos** durante reacciones de hipersensibilidad (26). Sin embargo, su función se extiende a la defensa contra parásitos helmintos, donde activan respuestas Th2 y reclutan eosinófilos para neutralizar patógenos (27) y en procesos de autoinmunidad y cáncer (28).

Células Dendríticas

Las **células dendríticas** (DCs) destacan como las **células presentadoras de antígeno** (*APCs*, por sus siglas en inglés) más eficientes del sistema inmunológico, superando a otras células como monocitos y linfocitos B en su capacidad para activar linfocitos T (29). Estas células especializadas cumplen un doble rol crucial: no solo inician la respuesta adaptativa al conectar la inmunidad innata con la específica, sino que también participan en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (30). El proceso de presentación antigénica implica la captura, procesamiento y presentación de péptidos antigénicos en moléculas del **complejo mayor de histocompatibilidad** (*MHC*, por sus siglas en inglés), al receptor del linfocito T (*TCR*, por sus siglas en inglés) junto con señales coestimuladoras esenciales (CD80/CD86) para la activación óptima de los linfocitos en los órganos linfoides secundarios (31,32). El sistema de presentación antigénica sigue las "reglas del ocho", donde los linfocitos **T CD4+** reconocen péptidos de 15 aminoácidos presentados por **MHC-II** (HLA-DR, DP, DQ) y los **CD8+** interactúan con péptidos de 9 aminoácidos en **MHC-I** (HLA-A, B, C), con participación crucial de correceptores (CD4 para MHC-II y CD8 para MHC-I) (**Figura 3**) (32). Existe

una notable diversidad funcional entre los subtipos de DCs. Las **DCs mieloides** (mDCs) (33), divididas en **mDC1** (especializadas en presentación a linfocitos T CD8+ en respuestas antivirales/antitumorales) y **mDC2** (más eficientes en activar linfocitos T CD4+ y modular respuestas alérgicas), muestran variantes como las **mDCs CD16+** con mayor capacidad proinflamatoria (34). Por otro lado, las **DCs plasmacitoides** (pDCs) se especializan en la producción de interferón tipo I durante infecciones virales, coordinando la respuesta antiviral (35). Completan este panorama las **DCs foliculares** (foDCs), que interactúan con linfocitos B en centros germinales (36), y las **moDCs** derivadas de monocitos durante inflamación, capaces de presentar antígenos localmente sin migrar a órganos linfoides (37). Esta especialización celular permite una respuesta inmunitaria precisa y adaptada a cada amenaza, destacando el papel central de las DCs en la inmunorregulación.

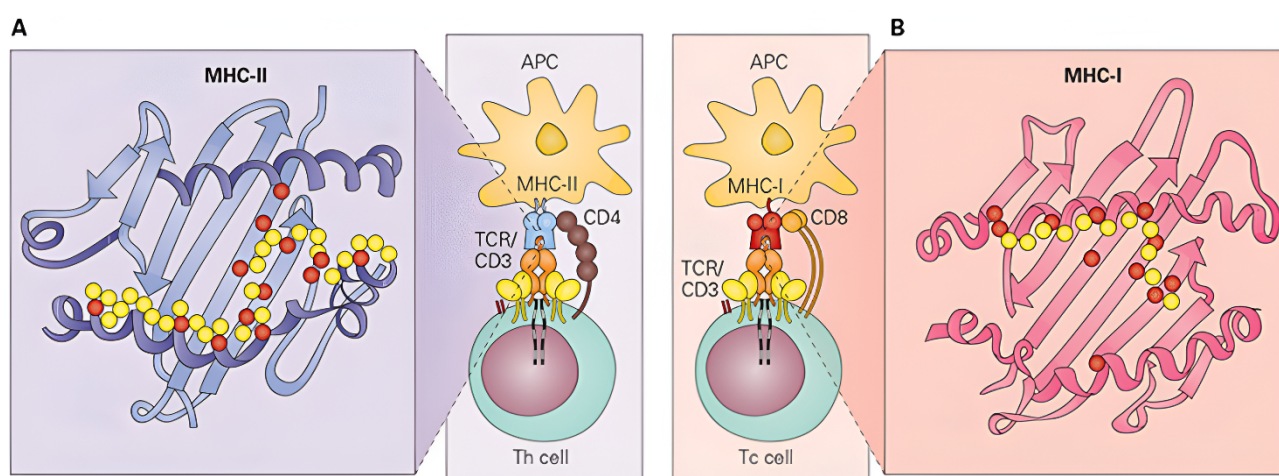


Figura 3 | Diagrama esquemático de la presentación antigénica de linfocitos Th (CD4+) y Tc (CD8+) con moléculas MHC. La longitud del péptido presentado al TCR varía según el tipo de MHC implicado: las moléculas MHC-I (Panel B) exhiben péptidos de aproximadamente 9 aminoácidos, mientras que las MHC-II (Panel A) presentan péptidos más extensos, de alrededor de 15 aminoácidos. Las regiones hipervariables (resaltadas en amarillo) de las moléculas MHC actúan como sitios de unión preferencial para los péptidos antigénicos (representados en rojo), facilitando el reconocimiento específico por parte de los linfocitos T. Esta interacción, mediada por correceptores (CD4 para MHC-II y CD8 para MHC-I), subraya la precisión del sistema inmunológico en la identificación de amenazas, adaptándose a las diferencias estructurales entre ambos tipos de MHC para garantizar una respuesta eficaz y específica. Imagen tomada de Bellanti, *Immunology IV* ©.

Células Natural Killer

Las **células Natural Killer** (NK) son linfocitos granulares derivados de la médula ósea que representan entre el 5-20% de los linfocitos circulantes y se distribuyen en órganos linfoides como bazo e hígado (15). Estas células inmunitarias innatas poseen la capacidad única de reconocer y destruir células tumorales o infectadas por virus sin necesidad de activación previa, gracias a un sofisticado sistema de receptores de superficie que incluyen **CD16** (FcγRIII) y **CD56** (38). Su mecanismo de acción se basa en el balance entre señales inhibitorias (a través de receptores de inhibición KIR que detectan MHC-I en células sanas) y activadoras (mediante receptores de activación KAR que identifican células alteradas), lo que les

permite inducir apoptosis mediante la liberación de perforina/granzimas o a través de la interacción FasL-Fas (39,40). Además, ejercen **citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC)** al unirse a blancos opsonizados mediante IgG, puenteando así la inmunidad innata y adaptativa (41). Las NK se clasifican en subpoblaciones funcionales: las **CD56^{dim} CD16⁺** (altamente citotóxicas), las **CD56^{bright} CD16⁻** (con roles inmunomoduladores como secreción de citocinas) y variantes asociadas a infecciones crónicas (15). Más allá de su función citolítica, producen IFN- γ , TNF- α y quimiocinas que regulan respuestas inflamatorias y activan macrófagos (42). Esta versatilidad las convierte en elementos clave en defensa antitumoral, antiviral, y en el desarrollo de terapias inmunológicas, destacando su papel dual como efectoras letales y reguladoras de la homeostasis inmunológica.

1.1.3 Inmunidad adaptativa

El **sistema inmunitario adaptativo** constituye una sofisticada red de defensa especializada que actúa con precisión y memoria, diferenciándose de la inmunidad innata por su capacidad para reconocer específicamente antígenos mediante receptores únicos en linfocitos B (*BCR*, por sus siglas en inglés) y T (*TCR*) (**Figura 4**) (7). Este sistema presenta tres características fundamentales: (1) **especificidad molecular**, permitiendo identificar patrones antigénicos particulares; (2) **diversidad extraordinaria**, con capacidad para responder a prácticamente cualquier estructura extraña; y (3) **memoria inmunológica**, generando células de larga vida que aceleran y potencian las respuestas ante reinfecciones (7). Se organiza en dos ramas complementarias: la **inmunidad humoral**, mediada por anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE) secretados por linfocitos B que neutralizan patógenos extracelulares; y la **inmunidad celular**, ejecutada por linfocitos T que eliminan células infectadas (CD8⁺ citotóxicos) o regulan respuestas inmunes (CD4⁺ helper) mediante citocinas (7). Aunque su activación requiere días tras la exposición antigénica (a diferencia de la respuesta innata inmediata) su capacidad para generar memoria proporciona protección duradera.

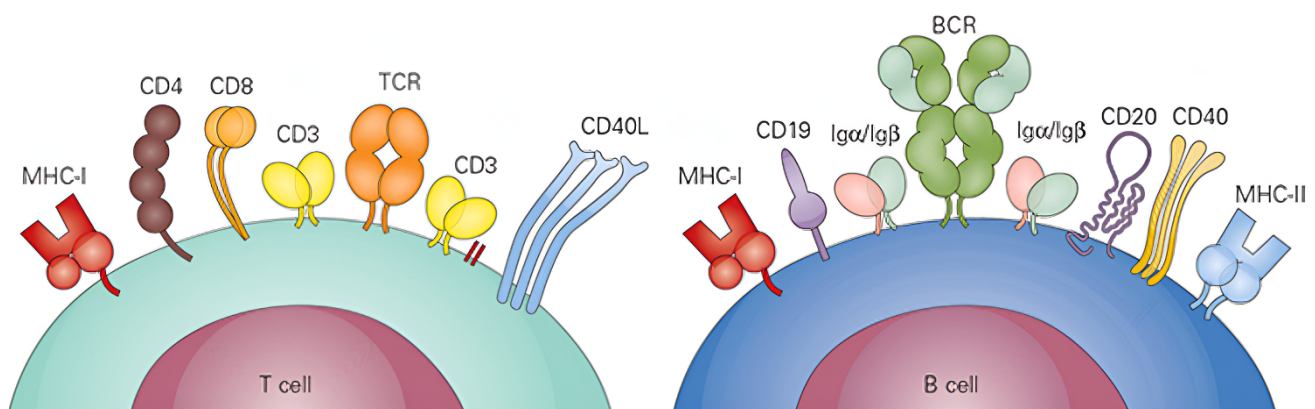


Figura 4 | Representación gráfica de las diferencias clave entre linfocitos B y T. Los linfocitos B y T poseen mecanismos diferentes para reconocer antígenos, determinados por la naturaleza de sus receptores específicos (BCR en células B y TCR en células T). Mientras que los linfocitos B identifican antígenos en su forma nativa (proteínas intactas o estructuras no procesadas), los linfocitos T solo reconocen fragmentos antigénicos procesados, presentados por APCs en MHCs. Imagen tomada de Bellanti, *Immunology IV* ©.

1.1.3.1 Inmunidad humoral: linfocitos B

El desarrollo de los linfocitos B constituye un proceso secuencial altamente regulado que puede dividirse en dos fases fundamentales: una **etapa independiente de antígeno** en la médula ósea y una **fase dependiente de antígeno** en órganos linfoides periféricos (**Figura 5**) (43).

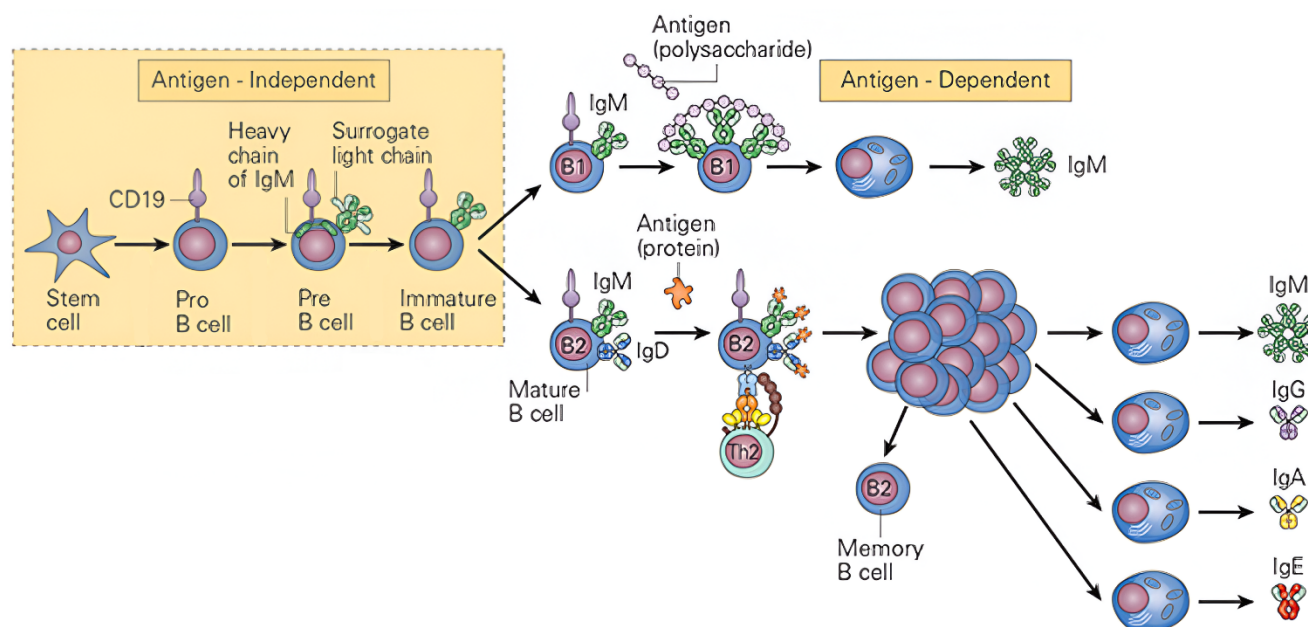


Figura 5 | El desarrollo de los linfocitos B comprende dos fases fundamentales: una fase antígeno-independiente en médula ósea y una fase antígeno-dependiente en tejidos linfoides periféricos, donde los linfocitos B maduros responden diferencialmente según el tipo de antígeno. Los antígenos como polisacáridos activan células B produciendo principalmente IgM sin ayuda de linfocitos T, mientras que los antígenos proteicos requieren cooperación de células T para inducir cambio de isotipo (de IgM a IgG, IgA o IgE) e hipermutación somática generando así anticuerpos de alta afinidad y funciones especializadas en la respuesta inmunitaria adaptativa. Imagen tomada de Bellanti, *Immunology IV* ©.

Durante la primera fase, las células progenitoras hematopoyéticas sufren transformaciones progresivas: en la fase **pro-B** (CD19+) se inicia el reordenamiento de los genes que constituirán el BCR; en la fase **pre-B** se expresa temporalmente un receptor pre-B; y en la fase de **células B inmaduras**, se expresará un BCR de superficie con especificidad única (IgM e IgD) llevándose a cabo de forma paralela una selección negativa para eliminar clones autorreactivos (43). Finalmente, los linfocitos B inmaduros abandonan la médula ósea migrando hacia el bazo donde pasarán al estadio de **célula B transicional** hasta completar su maduración como **células B maduras** (44). En la fase dependiente de antígeno, los linfocitos B maduros migran a tejidos linfoides periféricos, donde la unión del antígeno al BCR desencadena su activación y proliferación. Esta etapa implica una funcionalidad doble: como **células presentadoras de antígeno**, procesan y presentan péptidos en MHC-II para interactuar con linfocitos T colaboradores (en el caso de antígenos proteicos), y como **efectoras secretoras**, dando lugar tanto a **células plasmáticas** productoras de anticuerpos como a **células B de memoria**, preparadas para responder más rápidamente ante futuras exposiciones al mismo antígeno (45). Durante este proceso, ocurren modificaciones genéticas adicionales, como **hipermutación**

somática (para afinar la afinidad del anticuerpo) y **cambio de isotipo** (generando IgG, IgA o IgE), lo que amplía la versatilidad de la respuesta humoral (46).

1.1.3.2 Inmunidad celular: linfocitos T

Los **linfocitos T** son células de pequeño tamaño (<10 nm) que se encuentran predominantemente en sangre periférica y tejidos linfoides secundarios. Estas células se clasifican en dos poblaciones principales según la expresión de correceptores de superficie: los **linfocitos T CD4+** (células colaboradoras o Th), que secretan citocinas para coordinar respuestas inmunes celulares y humorales, y los **linfocitos T CD8+** (células citotóxicas o Tc), especializados en inducir apoptosis en células diana (47). En condiciones normales, la proporción circulante de CD4+/CD8+ es aproximadamente 2:1, relación que se invierte en infecciones como el VIH durante el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (*SIDA*) debido a la destrucción selectiva de CD4+ (48). Existe además una población minoritaria de linfocitos T **doble negativos** (DN, CD4-CD8-), abundante en mucosas (47). Todos los linfocitos T expresan el complejo CD3, esencial para la transducción de señales, y receptores de antígeno (TCR) de dos tipos: el más común (95%) está formado por **cadena α/β** , mientras que una minoría (5%) presenta **cadena γ/δ** , predominantes en tejido linfoide asociado a mucosas (*MALT*, por sus siglas en inglés) (15). El **complejo receptor de linfocitos T** incluye tanto el heterodímero TCR ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) como las moléculas CD3 (CD3- $\epsilon\gamma$, CD3- $\epsilon\delta$ y CD3- $\zeta\zeta$), que juntas garantizan su integridad estructural y funcional en el reconocimiento antigénico.

El desarrollo de los linfocitos T en el timo comienza con la migración de precursores linfoides comunes (*CLP*, por sus siglas en inglés) desde la médula ósea, los cuales inicialmente carecen de marcadores como CD3, CD4 o CD8 (49). A medida que maduran, adquieren primero el complejo CD3 (marcador de linaje T) y posteriormente desarrollan receptores TCR, pasando por etapas secuenciales: células **doble negativas (DN)** sin CD4/CD8, pero con un **pre-TCR** (50), luego células **doble positivas (DP)** que expresan simultáneamente CD4 y CD8 junto con un TCR completamente reordenado, y finalmente células **simple positivas (SP)** que se especializan en CD4+ o CD8+ (49). Durante la fase DP, los timocitos son sometidos a rigurosos procesos de selección para garantizar que su TCR reconozca adecuadamente el MHC sin reactividad contra lo propio (**Figura 6**) (51). La selección de timocitos en el timo ocurre en dos etapas críticas: **selección positiva** en la corteza del timo, donde los timocitos con TCR funcionales que reconocen moléculas propias del MHC (con afinidad intermedia) sobreviven, mientras que aquellos con TCR no funcionales o incapaces de interactuar con el MHC mueren por apoptosis (selección por restricción MHC); y **selección negativa** en la región corticomedular, donde los timocitos con TCR que se unen con alta afinidad a péptidos propios son eliminados para prevenir autoinmunidad (51). Este proceso depende críticamente de la expresión de **antígenos tisulares** en células epiteliales tímicas medulares (*mTEC*, por sus siglas en inglés) del timo, mediada por factores de transcripción como **AIRE** (*Autoimmune Regulator*) y **Fezf2** (*Fez Family Zinc Finger 2*) (52,53). AIRE induce la expresión de antígenos tisulares periféricos a través

de su interacción con complejos epigenéticos, mientras que Fezf2 regula de manera directa la expresión de los genes al unirse específicamente a sus secuencias promotoras (52,53). Su acción conjunta asegura que los timocitos sean expuestos a un repertorio diverso de antígenos propios, ampliando el espectro de autorreactividad detectada y eliminada durante la selección negativa. Este proceso, conocido también como **tolerancia central**, se basa en obtener la "afinidad justa": interacciones demasiado débiles llevan a muerte por falta de estímulos de supervivencia, las muy fuertes desencadenan apoptosis (eliminando células autoreactivas), y solo aquellas con afinidad moderada sobreviven y maduran como linfocitos T efectores (Teff) o reguladores (Treg) (51). Diversos modelos han sido propuestos para explicar esta selección afinidad-dependiente (54). El **modelo instructivo** plantea que el destino celular se define directamente por la intensidad de la señal del TCR: afinidades intermedias inducen FoxP3 y diferencian a células Treg, mientras que afinidades bajas conducen a células Teff. En cambio, el **modelo estocástico o selectivo** sugiere que la expresión de FoxP3 puede iniciarse de forma independiente al TCR, y que estas células FoxP3⁺ serían más resistentes a la eliminación negativa. Finalmente, el **modelo del nicho** propone que la generación de Treg depende no solo de la afinidad del TCR, sino también de la competencia por antígenos propios poco abundantes, lo que limita el número de Treg que pueden desarrollarse para un antígeno (54).

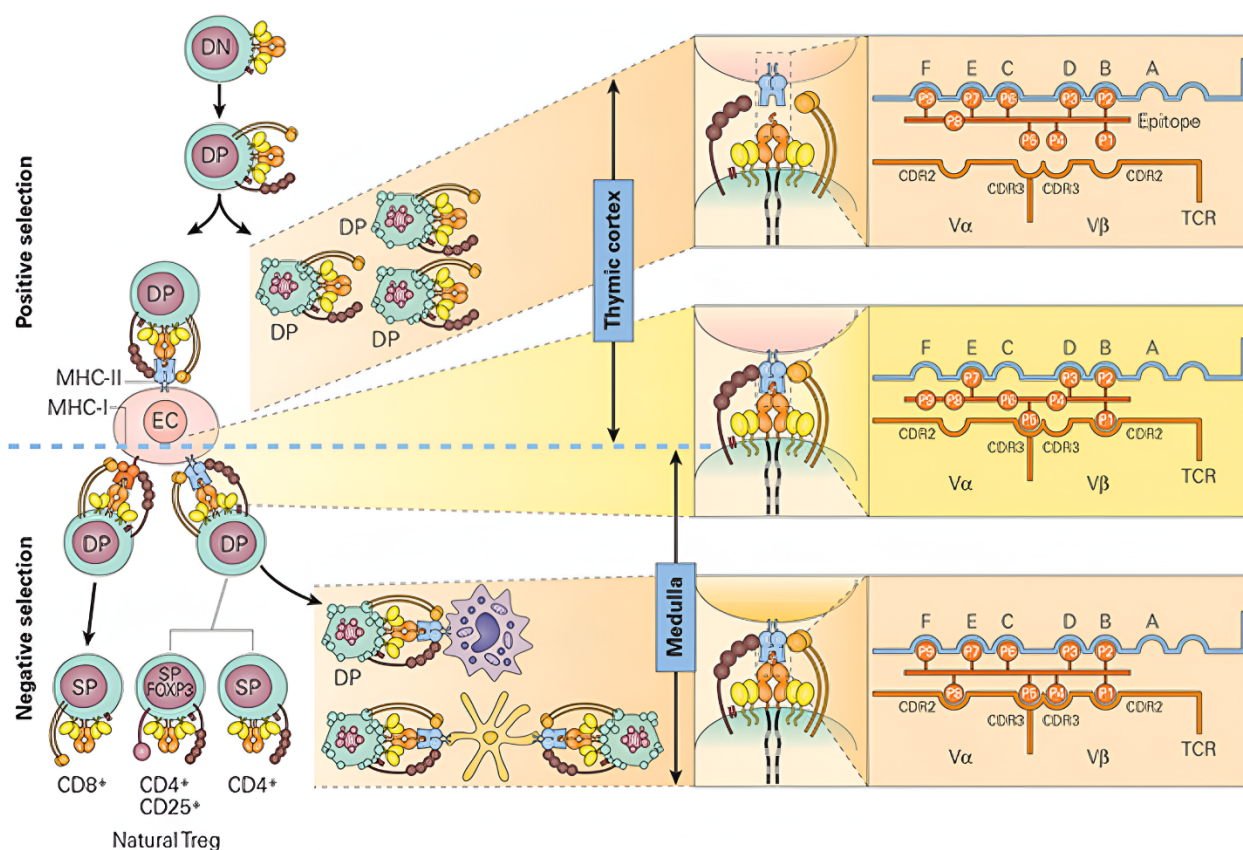


Figura 6 | Representación esquemática de los procesos de selección positiva y negativa de los linfocitos T durante su maduración en el timo. Imagen tomada de Bellanti, *Immunology IV* ©.

Aunque este filtro es eficaz, algunas células autoreactivas pueden escapar al timo, siendo controladas posteriormente por mecanismos de **tolerancia periférica**. Solo aquellos que superan esta prueba se diferencian en SP y migran a tejidos linfoides periféricos como **células T naïve** funcionales, listas para activarse ante su antígeno específico y generar posteriormente **células T de memoria**.

Linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+ se diferencian en células efectoras productoras de citocinas tras su activación, lo que les permite coordinar la respuesta inmunitaria mediante el reclutamiento y activación de otras células inmunes (55). Estas células se especializan en distintos subtipos funcionales, incluyendo las **células T colaboradoras** (Th), **cooperadoras foliculares** (Tfh) y **reguladoras** (Treg). Estas últimas detalladas más adelante.

Los **linfocitos Th** muestran una notable plasticidad, pudiendo cambiar su fenotipo en respuesta a las señales del entorno, lo que permite al sistema inmunológico adaptar finamente sus respuestas (56). Lo que actualmente se acepta es que el **microambiente de citocinas, concentración antigénica y tipo de APC** determina la diferenciación hacia un linaje u otro (57,58). En función del tipo de respuesta, podemos encontrar linfocitos **Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y Th1*** con sus respectivas funciones (**Figura 7**):

- Los linfocitos **Th1** desempeñan un papel fundamental en la coordinación de la inmunidad celular y los procesos inflamatorios, actuando como mediadoras clave de la respuesta inmunitaria (59). Estas células, conocidas como **linfocitos T inflamatorios**, expresan el factor de transcripción **T-bet** y producen citocinas como el **IFN- γ** y **TNF- α** , que potencian la actividad de los macrófagos, mejorando su capacidad fagocítica y estimulando la liberación de especies reactivas de oxígeno y otros compuestos bactericidas para eliminar patógenos de manera más eficiente (55–57,59). Además, las células Th1 incrementan la expresión de moléculas de MHC en macrófagos y otras células presentadoras de antígeno, optimizando así la presentación antigénica (60). Estas células también colaboran en la activación de los **linfocitos T CD8+** (61).
- Los linfocitos **Th2** desempeñan un papel crucial en la inmunidad humoral y los procesos inflamatorios alérgicos, principalmente mediante el cambio de isotipo hacia IgE (55,62). Estas células expresan el factor de transcripción **GATA3** y son esenciales para la activación y diferenciación de los linfocitos B ante antígenos proteicos dependientes de células T. La **IL-4** actúa sobre los linfocitos B como factor de crecimiento que promueve su proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos o células B de memoria (62). Los linfocitos Th2 también inducen inflamación al estimular mastocitos (a través de **IL-9**) y eosinófilos (mediante **IL-5**), lo que los vincula estrechamente con respuestas alérgicas (62).

Por otro lado, la **IL-13** promueve el recambio epitelial, producción de mucosidad y contracción de la musculatura lisa, imprescindible en la defensa antiparasitaria (62).

- Los linfocitos **Th9** se generan en presencia de TGF- β e IL-4, destacando por su capacidad de secretar grandes cantidades de **IL-9** (63,64). Estas células expresan el factor de transcripción **PU.1** y participan en la defensa contra infecciones parasitarias, pero también están implicadas en procesos inflamatorios, alergias, enfermedades autoinmunes o incluso modulando la actividad de las células Treg (65,66).
- Los linfocitos **Th17** se distinguen por expresar el factor de transcripción **ROR γ t** y su capacidad para producir citocinas proinflamatorias como **IL-17** e **IL-22** (55,57,58). La IL-17 desempeña un papel crucial en el reclutamiento de neutrófilos y en la estimulación de fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales para producir diversos mediadores inflamatorios (IL-1, IL-6, TNF- α , metaloproteasas y quimiocinas) que promueven infiltración celular y daño tisular (67). Esta citocina se encuentra elevada en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y asma, evidenciando su participación en estos procesos patológicos (68). Por su parte, la IL-22, también producida por células NK, posee efectos duales, promoviendo tanto péptidos antimicrobianos como inflamación (69).
- Los linfocitos **Th22** expresan el factor de transcripción AHR y están especializados en la producción de **IL-22**, distinguiéndose de los linfocitos Th17 por su incapacidad para sintetizar IL-17 (70). Estas células desempeñan un papel fundamental en la protección y homeostasis de las barreras epiteliales, particularmente a nivel de la mucosa intestinal, donde contribuyen al mantenimiento de la integridad del epitelio y los mecanismos de defensa local (69).
- Los linfocitos **Th1*** (también conocidos como **Th1/Th17**) son un subconjunto de células T efectoras que coexpresan simultáneamente los factores de transcripción **T-bet** (Th1) y **ROR γ t** (Th17), lo que les confiere un perfil híbrido con funciones proinflamatorias (71). Estas células emergen en contextos de inflamación crónica (enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide) y combinan características de ambos linajes: producen **IFN- γ** (Th1) e **IL-17** (Th17), lo que amplifica el daño tisular (71). Su desarrollo está influenciado por citocinas como **IL-23** e **IL-1 β** , que promueven la plasticidad de Th17 hacia el fenotipo Th1/Th17 (71).

Los **linfocitos T foliculares colaboradoras (Tfh)** representan una población especializada de linfocitos T que se localizan en los folículos linfoides, donde desempeñan un papel esencial en la interacción con linfocitos B durante la respuesta inmunitaria (72). Estas células expresan marcadores característicos como **CXCR5**, **PD-1** e **ICOS**, el factor de transcripción **Bcl-6** y producen **IL-21**, lo que les permite regular la activación y diferenciación de los linfocitos B (15). Su naturaleza plástica les permite adoptar diversos

perfiles funcionales (**Tfh1**, **Tfh2**, **Tfh17**) según el microambiente inmunológico (15). Además, algunas Tfh pueden convertirse en **células T reguladoras foliculares (Tfr)**, que modulan la respuesta inmunitaria dentro de los folículos mediante mecanismos supresores similares a los de las Treg convencionales (73).

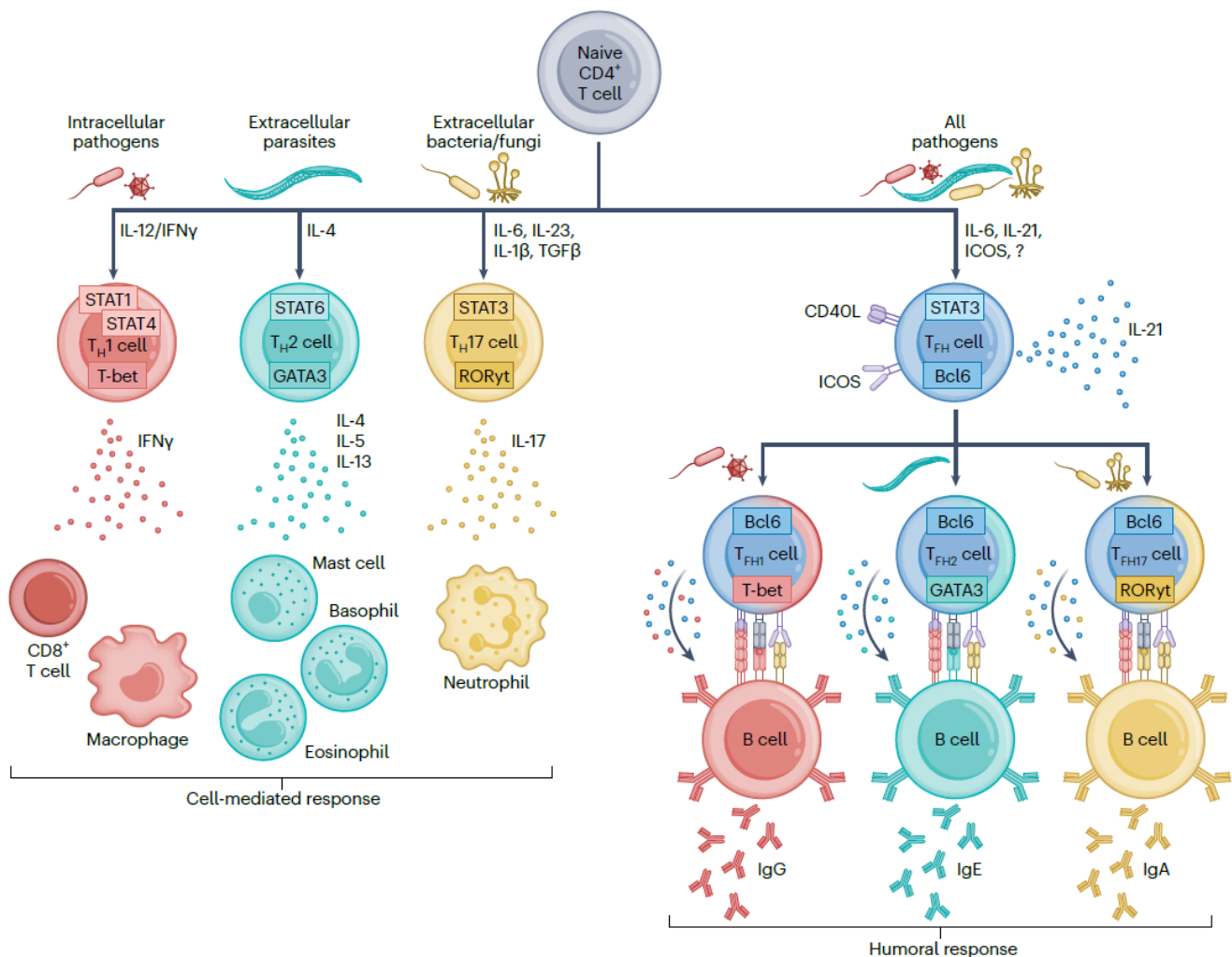


Figura 7 | Diferenciación especializada de linfocitos T CD4+ según el contexto inmunológico. Los linfocitos T CD4+ vírgenes se diferencian en subpoblaciones efectoras especializadas según la naturaleza del inmunógeno: frente a patógenos intracelulares, se diferencian en células Th1 que potencian respuestas de macrófagos y linfocitos T CD8+; ante parásitos extracelulares, se generan células Th2, activando eosinófilos, mastocitos y basófilos; mientras que bacterias u hongos extracelulares inducen células Th17 para reclutar neutrófilos. Paralelamente, los inmunógenos promueven la formación de células Tfh, que interactúan con linfocitos B facilitando el cambio de isotipo, la maduración de afinidad y la diferenciación en células plasmáticas o de memoria. Estas células Tfh pueden adquirir características de otros subtipos (Th1, Th2 o Th17) al expresar bajos niveles de sus factores de transcripción (T-bet, GATA3 o ROR γ t respectivamente), lo que determina la producción de anticuerpos hacia isotipos específicos según el contexto inmunológico. No están representadas las poblaciones Th9, Th22 y Tfr. Imagen tomada de (55).

Linfocitos T CD8+

Los **linfocitos T CD8+**, a diferencia de los CD4+, se especializan en **citotoxicidad directa** mediante la producción de **perforina** y **granzimas**, induciendo apoptosis en células diana que presenten antígenos con MHC-I (74). Estas células citotóxicas actúan eliminando selectivamente células infectadas por virus o

tumorales mediante sinapsis inmunológicas específicas. Existen 6 subtipos principales: **Tc1** (productoras de IFN- γ , cruciales en defensa antiviral), **Tc2** (secretoras de IL-4/IL-5/IL-10, asociadas a patologías crónicas), **Tc9** (productoras de IL-9), **Tc17** (productoras de IL-17 e IL-22), **Tc22** (productoras de IL-22) y **Tfc** (productoras de IL-4, IL-21 e IFN- γ) (74). Si bien son esenciales para combatir infecciones intracelulares y cáncer, también pueden causar daño tisular en trasplantes o enfermedades autoinmunes. Recientemente se ha descrito un **subgrupo regulador CD8+**, aunque su relevancia clínica en humanos requiere mayor investigación (75).

Linfocitos con comportamiento innato: células T $\gamma\delta$ y NKT

El sistema inmunológico cuenta con poblaciones linfocitarias especializadas que combinan características de inmunidad innata y adaptativa. Entre ellas destacan las **células T $\gamma\delta$** y las **células NKT**, que expresan receptores de antígeno con diversidad limitada, diseñados para reconocer patrones moleculares conservados en situaciones de infección, estrés celular o transformación maligna (76). Generadas a partir de precursores CD4-CD8- (doble negativos), las células T $\gamma\delta$ representan una minoría en sangre periférica (1-15% de linfocitos), pero aumentan significativamente durante infecciones y en enfermedades autoinmunes (77,78). Predominan en mucosas, especialmente en el epitelio intestinal y pulmonar (77,78). Funcionalmente, producen citocinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α), eliminan células infectadas o tumorales mediante mecanismos citotóxicos similares a los de células NK y T $\alpha\beta$ CD8+ (77). En cuanto a las **NKT** (constituyendo aproximadamente entre el 0,2% y el 2,5% del total de linfocitos), son un grupo heterogéneo que combina marcadores de células T (CD3) y NK (CD56) (78). Las **células NKT invariantes** (iNKT), la subpoblación mejor caracterizada, reconocen glucolípidos presentados por moléculas CD1d, estructuralmente similares al MHC-I, pero especializadas en presentar antígenos lipídicos (79). Tras su activación, las iNKT producen rápidamente citocinas polarizantes (IFN- γ , IL-4) y adquieren propiedades citotóxicas regulando respuestas inmunes tempranas (79).

1.1.4 Linfocitos T reguladores

Las **células T reguladoras (Treg)** constituyen una subpoblación de linfocitos T CD4+ especializada en mantener el equilibrio inmunológico, ejerciendo un control crucial sobre las respuestas inmunitarias para preservar la tolerancia a autoantígenos y evitar reacciones excesivas (80). Estas células desempeñan funciones vitales en procesos fisiológicos como la gestación, la interacción con microbiota comensal, la tolerancia a alérgenos y la reparación tisular, actuando como "árbitros inmunológicos" que discriminan entre amenazas reales y elementos inocuos (81). Su capacidad para modular la activación o supresión de la respuesta inmune las convierte en elementos clave para prevenir enfermedades. Alteraciones en su función puede desencadenar diversas patologías, incluyendo trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias,

alergias, infecciones, cáncer y trastornos primarios de regulación inmunológica (*PIRD*, por sus siglas en inglés), evidenciando su papel central en la homeostasis del sistema inmunológico (81,82).

1.1.4.1 Caracterización de células Treg

El descubrimiento de las Treg se remonta a 1969, cuando se identificaron por primera vez en modelos murinos como linfocitos T de origen tímico con capacidad supresora (82–84). Durante las décadas siguientes, los estudios en roedores demostraron su papel crucial en la prevención de enfermedades autoinmunes (85,86). En los años 90 se produjeron avances significativos, incluyendo la identificación de **CD25** (cadena α del receptor de IL-2) como marcador clave y el posterior reconocimiento del papel de las citocinas IL-10 y TGF- β en su función supresora (82,85,87). El hito más importante en la caracterización de estas células fue el descubrimiento en 2003 del factor de transcripción **FoxP3** (*forkhead box Protein 3*) como regulador maestro de su desarrollo y función (88,89). Posteriormente, se observó que la expresión de FoxP3 se correlacionaba con altos niveles de CD25 y, en 2006, gracias al hallazgo de una correlación inversa entre CD127 (receptor de IL-7) y FoxP3, se definió el fenotipo clásico CD4+CD25^{hi}CD127^{low}FoxP3+ para su identificación (82,87,90). Más adelante se descubrió que las Treg pueden dividirse en dos subtipos principales según su origen: **nTreg** (naturales o derivadas del timo, con expresión estable de FoxP3) y **pTreg** (generadas en tejidos periféricos, con expresión transitoria de FoxP3) (**Figura 8**) (84–86,91). Dentro de estas poblaciones, el grado de expresión de FoxP3 muestra un rango dinámico, desde células **Treg en reposo (rTreg)** con expresión baja (FoxP3^{low}) hasta **Treg activadas (aTreg)** con expresión alta (FoxP3^{hi}) (92,93). Esta heterogeneidad funcional permite distinguir subpoblaciones mediante marcadores adicionales como CD45RA: las **rTreg** se identifican como CD45RA+FoxP3^{low}, las **aTreg** (con máxima capacidad supresora) como CD45RA-FoxP3^{hi}, y los linfocitos T convencionales no supresores como CD45RA-FoxP3^{low/-} (93). Actualmente, el patrón de metilación de la región **TSDR** (región desmetilada específica de Treg) en el gen *FOXP3* se considera el marcador más fiable para discriminar verdaderas Treg de otras células T con expresión transitoria de FoxP3 (94).

Las **células Tr1** representan un subtipo único de linfocitos Treg que se distinguen por su perfil fenotípico y funcional. A diferencia de otras subpoblaciones CD4+, las Tr1 expresan marcadores como **CD49b** y **LAG-3**, carecen de expresión constitutiva de FoxP3 (o la presentan de forma transitoria) y producen grandes cantidades de **IL-10** (95,96). Estas células se generan en la periferia bajo condiciones tolerogénicas y desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, previniendo enfermedades mediadas por linfocitos T y promoviendo tolerancia a largo plazo, tanto en modelos murinos como humanos (97,98). Su actividad supresora es **dependiente de antígeno**: requieren activación a través de su TCR para inhibir respuestas inmunitarias mediante la secreción de IL-10, que suprime directamente a los linfocitos T efectoras e inducen un fenotipo tolerogénico en APCs al reducir la expresión de moléculas de MHC-II y citocinas proinflamatorias (98,99).

La caracterización de las Treg se vuelve más compleja al estudiar las **células reguladoras CD8+**, dado su papel reciente en infecciones virales y tumorigénesis (75). Los **linfocitos T CD8+CD103+** representan una subpoblación reguladora con capacidad inmunosupresora, cuya expresión del marcador **CD103** (integrina $\alpha\text{E}\beta 7$, inducida por TGF- β) les permite interactuar con la **E-cadherina** en epitelios y tejidos trasplantados (100,101). A diferencia de las Treg clásicas, estas células carecen de FoxP3, CD25 y otros marcadores convencionales, y ejercen su función supresora mediante contacto célula-célula más que a través de citocinas (102). Estudios recientes han logrado generar CD8+CD103+ humanas *in vitro* mediante TGF- β , rapamicina y estimulación con CD3/CD28+IL-2, obteniendo células con alta expresión de CD103 y PD-1 que mantienen capacidad supresora en modelos de artritis, lo que abre nuevas perspectivas terapéuticas, aunque persisten interrogantes sobre la heterogeneidad de estas poblaciones reguladoras (103–105).

Las **células T reguladoras CD8+CD122+** representan una población especializada de linfocitos supresores que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (106–108). A diferencia de otras Treg, estas células expresan la cadena β del receptor de IL-2 (CD122) pero carecen de marcadores clásicos como CD25 y FoxP3, mostrando un perfil único de memoria central (CD44^{high}CD62L^{high}) (109). Diversos estudios han demostrado su capacidad para suprimir respuestas autoinmunes y prevenir el rechazo de trasplantes, función mediada principalmente por su subpoblación **CD8+CD122+PD-1+** a través de la producción de IL-10, TGF- β e IFN- γ (107). Aunque inicialmente se identificaron como células de memoria convencionales, ahora se sabe que poseen propiedades reguladoras potentes, incluso superiores a las Treg CD4+FoxP3+ en ciertos contextos de trasplante (108). Su mecanismo de acción combina la señalización a través de PD-1 con la secreción de citocinas inmunomoduladoras. Sin embargo, persisten cuestiones sobre los detalles moleculares de su función supresora y su posible relación con estados de agotamiento inmunológico, lo que requiere investigación adicional para optimizar su uso clínico (106–109).

Las **células T CD8+CD28-** son una población inmunorreguladora que surge tras estimulación antigénica crónica, mostrando características de senescencia celular (110,111). Estas células exhiben un comportamiento dual: pueden actuar como supresoras mediante IL-10 y TGF- β en contextos como trasplantes, pero también muestran actividad citotóxica (expresando granzima A y perforina) en enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple y artritis reumatoide, donde su acumulación se asocia a mayor severidad (110,111). Aunque algunos estudios reportan expresión de FoxP3 en estas células, esto sigue siendo controvertido (112). Su pérdida de CD28 refleja un estado de envejecimiento inmunológico avanzado, afectando a su capacidad proliferativa y respuesta apoptótica. Esta población destaca por su compleja heterogeneidad funcional, pudiendo actuar tanto como reguladoras como efectoras dependiendo del contexto patológico (110–112).

Las **células T reguladoras CD8+KIR+** (KIR+CD8+ Treg) son un subconjunto de linfocitos T con funciones inmunorreguladoras identificadas en humanos, equivalentes a las células Ly49+CD8+ Treg en ratones (113). Estas células expresan **receptores inhibidores KIR** (similares a los Ly49 en ratones) y suprimen selectivamente células T CD4+ patógenas en enfermedades autoinmunes, como la celiacía, mediante citotoxicidad dependiente del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I. Además, su frecuencia aumenta en tejidos inflamados y en infecciones como COVID-19, donde se asocian con complicaciones autoinmunes, sugiriendo un rol clave en mantener la tolerancia periférica (113). Estudios en ratones muestran que su ausencia durante infecciones virales provoca autoinmunidad, destacando su función como mecanismo de retroalimentación negativa para controlar la reactividad autoinmune sin afectar la respuesta antiviral (113). Así, las KIR+CD8+ Treg representan una población reguladora distinta y complementaria a las Treg CD4+, con potencial terapéutico en enfermedades autoinmunes e infecciosas.

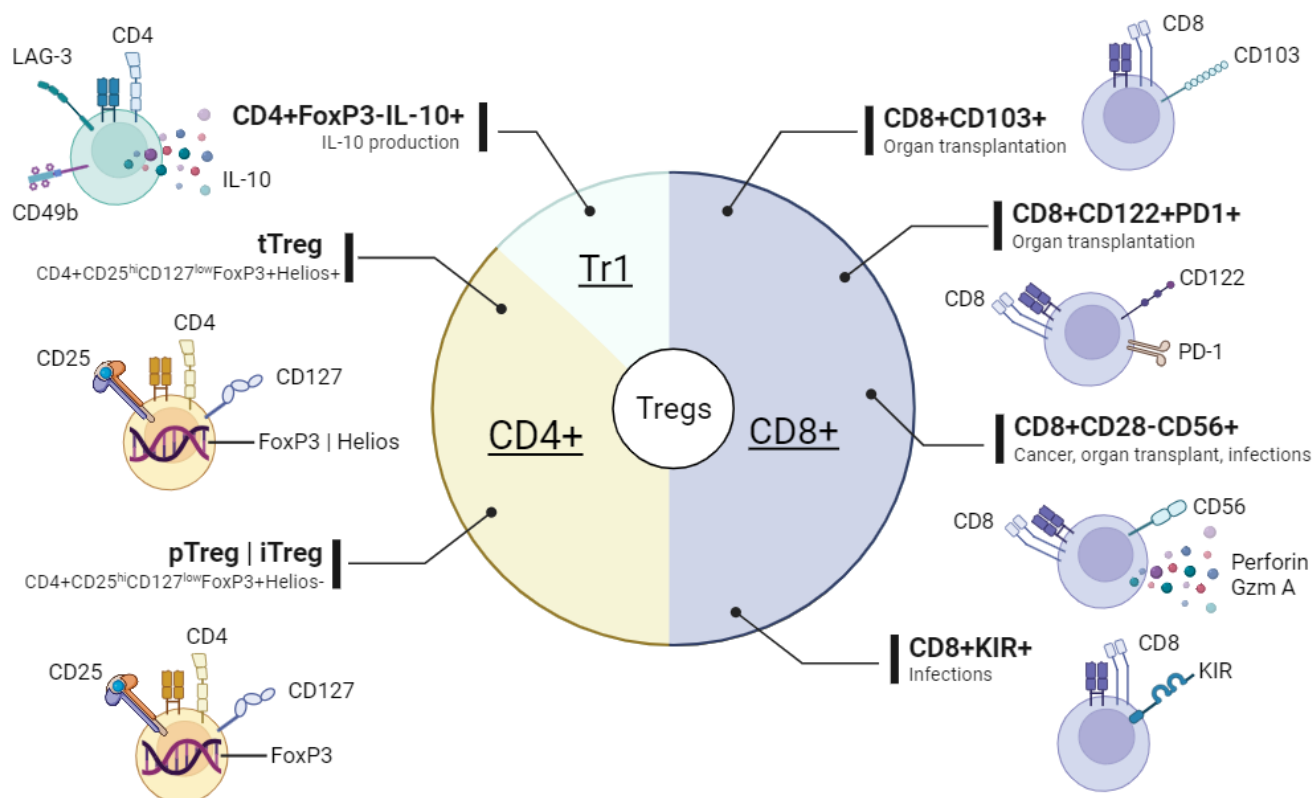


Figura 8 | Clasificación de los principales tipos de células Treg y sus marcadores característicos. En la figura quedan representadas subpoblaciones de Treg CD4+, incluyendo células productoras de IL-10 (Tr1) y Treg convencionales. Subpoblaciones de Treg CD8+, como las asociadas a trasplantes (CD8+CD103+, CD8+CD122+PD-1+), cáncer e infecciones (CD8+CD28-CD56+), y las recientemente descritas Treg CD8+KIR+ en contextos infecciosos. Los marcadores clave se indican junto a cada subtipo. Imagen creada por Daniel Acevedo con Biorender.

1.1.4.2 Mecanismos de supresión de las células Treg

Las Treg ejercen su función de forma **directa** e **indirecta** (**Figura 9**) (114,115). De manera directa, mediante la secreción de citocinas inhibitorias (**IL-10**, **TGF- β** e **IL-35**), la inducción de apoptosis a través

de **perforina** y **granzima**, y la interacción con otras células inmunes mediante moléculas de superficie (114,115). Además, su alta expresión de **CD25** les permite captar IL-2, limitando la activación de linfocitos T y NK. De manera indirecta, las Treg regulan la inflamación mediante enzimas como **CD39** y **CD73**, que metabolizan ATP en AMP, pasando de una señal proinflamatoria a antiinflamatoria (114,115). Algunas de las moléculas de contacto celular y factores de transcripción que refuerzan la actividad supresora son:

- **CTLA-4:** es una molécula co-inhibitoria expresada constitutivamente en las Treg, aunque también se encuentra en linfocitos activados. CTLA-4 compite selectivamente contra **CD28** (receptor coestimulador presente en la membrana de linfocitos T) por la unión a sus ligandos **CD80/CD86**, presente en la membrana de DCs. Al unirse a estas proteínas, induce su internalización en vesículas cuyo destino es la fusión con lisosomas para su degradación. De esta forma, se reduce su expresión, lo que limita la activación de los linfocitos T durante la presentación antigénica (116,117). Para poder seguir ejerciendo su función, CTLA-4 se recicla continuamente entre el interior celular y la membrana, proceso en el que la proteína **LRBA** (*lipopolysaccharide (LPS)-responsive and beige-like anchor protein*) juega un papel clave al evitar su degradación en los lisosomas y promover su retorno a la superficie de las células Treg (118,119).
- **PD-1/PD-L1:** cuando PD-L1 de las Treg se une a PD-1 en linfocitos T activados, desencadena una respuesta inhibitoria induciendo un estado de anergia. Esta interacción además favorece la generación de pTreg al aumentar la expresión de FoxP3 y potenciar su actividad supresora (86). Paralelamente, la unión de PD-1 con PD-L1 en DCs también promueve la diferenciación de pTreg, y una vez formadas, inducen un fenotipo tolerogénico en las DCs mediante el mismo mecanismo molecular (120).
- **TIGIT:** un receptor co-inhibitorio presente en Treg, así como en linfocitos T activados. Este receptor interactúa principalmente con su ligando **CD155**, aunque también puede unirse a **CD112**, moléculas expresadas tanto en APCs como en otros tipos celulares. En las Treg, la unión de TIGIT a células dendríticas induce un fenotipo tolerogénico caracterizado por la producción de IL-10, suprimiendo la activación de los linfocitos T (121). A nivel intracelular, TIGIT inhibe la vía de señalización **mTORC1**, favoreciendo así la estabilidad y expresión de FoxP3 en Treg (122). Particularmente en las **nTreg**, la elevada expresión de TIGIT se asocia con una mayor estabilidad del linaje y capacidad supresora (123). Mecanísticamente, este efecto se debe en parte a que TIGIT promueve la desmetilación del gen FOXP3, reforzando su expresión y función reguladora (124).
- **GITR:** es una molécula clave en la regulación de la función de las células Treg. Su señalización puede mejorar la proliferación y supervivencia de las Treg y, en condiciones inflamatorias, puede reforzar la estabilidad del fenotipo Treg al promover la expresión de FoxP3 (125).

- **LAG-3:** se expresa en células Treg y linfocitos T activados mostrando afinidad por moléculas MHC-II debido a su similitud estructural con el correceptor CD4. En las Treg, LAG-3 desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria. Esta molécula inhibe la proliferación celular y la secreción de citocinas, contribuyendo así a la regulación del sistema inmunológico (126–128). Además, aunque LAG-3 también se expresa en células Tr1, su papel específico en su función supresora aún no está completamente descrito (95).
- **TIM-3:** la señalización a través de TIM-3 en Treg potencia su función inhibitoria, particularmente en contextos inflamatorios y tumorales. Este receptor promueve la estabilidad del linaje Treg al interactuar con sus ligandos (Galectina-9), induciendo la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β (128). La expresión de TIM-3 en Treg se asocia con un fenotipo altamente supresor y parece ser esencial para controlar respuestas autoinmunes e inflamatorias (128).
- **ICOS:** potencia la eficacia de las Treg y, en determinadas condiciones, puede inhibir su apoptosis, contribuyendo significativamente a su supervivencia (129). Este efecto se produce cuando ICOS se une a su ligando **ICOS-L**, presente en células presentadoras de antígeno como células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. Esta interacción estimula la transcripción de FoxP3, lo que a su vez incrementa la producción de citocinas antiinflamatorias (129). Las células Treg pueden clasificarse en dos subtipos funcionales según su perfil de expresión y mecanismos de supresión: las **Treg ICOS+**, que ejercen su función inmunosupresora mediante la producción de IL-10 (para inhibir células dendríticas) y TGF- β (para suprimir linfocitos T efectores), y las **Treg ICOS-**, que utilizan exclusivamente TGF- β como mecanismo de supresión (129).
- **Helios:** un miembro de la familia de factores de transcripción *IKAROS*, desempeña un papel fundamental en la función de las Treg (130). Este factor es crucial para mantener la estabilidad de la expresión de FoxP3 en condiciones inflamatorias, evitando que las Treg se transformen en células efectoras (131). Aunque la ausencia de Helios no afecta el desarrollo ni la función de la mayoría de los linfocitos CD4+, sí provoca la aparición tardía de enfermedades autoinmunes al comprometer específicamente la funcionalidad de las Treg, demostrando su importancia crítica en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (132). En ratones, los marcadores Helios y Neuropilina-1 permiten diferenciar con claridad entre las células nTreg y pTreg. Sin embargo, en humanos esta distinción no es tan clara. La expresión de Helios en nTreg humanas no es constante, y al igual que FoxP3, también puede encontrarse en células T activadas, lo que complica su uso como marcador exclusivo. Aun así, tanto Helios como FoxP3 aportan información valiosa sobre la estabilidad y la capacidad supresora de las Treg, ya que se ha observado que las células Helios+ son más estables y funcionalmente más supresoras (133–139).

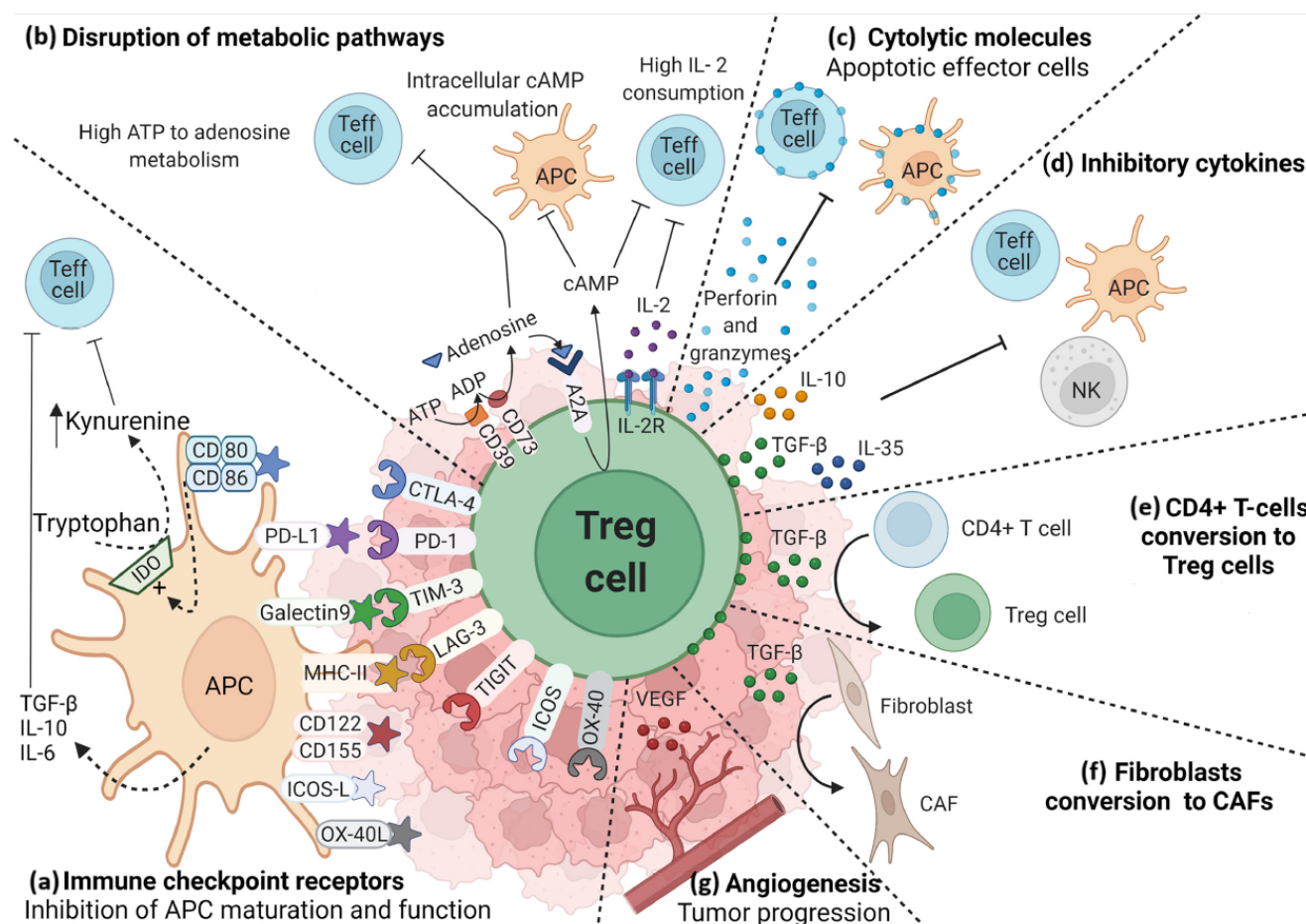


Figura 9 | Representación esquemática de los mecanismos de supresión mediados por células Treg. (a) expresión de receptores inhibidores que, al unirse a sus ligandos en APCs, refuerzan las células Treg y liberan citocinas inhibitorias. (b) interrupción del metabolismo de los linfocitos T al agotar la IL-2 disponible y mediante la producción de adenosina (a través de las enzimas CD39/CD73), aumentando los niveles de cAMP y suprimiendo su función. (c y d) supresión de la respuesta inmunitaria mediante la acción de moléculas citotóxicas como granzimas y perforina que eliminan directamente a estas células, complementada por la secreción de citocinas inhibitorias (IL-10, TGF-β e IL-35) que bloquean la función de células efectoras, células NK y células presentadoras de antígeno. (e, f y g) en contextos tumorales, las Treg pueden convertir células T CD4+ en fenotipo Treg, promover la conversión de fibroblastos a fibroblastos asociados a cáncer (CAF) a través de la secreción de TGF-β; y promover la angiogénesis a través del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Imagen modificada de (140).

1.2 Trastornos primarios de regulación inmunológica: PIRD

Hace 70 años se identificó por primera vez la **agammaglobulinemia de Bruton**, marcando un hito en el estudio de las **inmunodeficiencias primarias** (IDP) (141). El desarrollo de tecnologías innovadoras como la secuenciación masiva de exomas y genomas humanos (NGS, por sus siglas en inglés), accesible a nivel global, ha acelerado drásticamente el hallazgo de nuevas alteraciones genéticas asociadas a estos trastornos. Este progreso ha permitido que el comité de expertos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS, por sus siglas en inglés) documentara más de **508 genes** implicados en

inmunodeficiencias primarias hasta el año 2024, reflejando los extraordinarios avances en la comprensión de estas enfermedades en las últimas décadas (142,143).

Las inmunodeficiencias primarias constituyen un conjunto de enfermedades, mayoritariamente de origen genético, que alteran el correcto funcionamiento del sistema inmunológico. Aunque su manifestación principal es la **inmunosupresión** (que predispone a infecciones graves y recurrentes), presentan una sintomatología cada vez más heterogénea que incluye fenómenos de **autoinmunidad**, procesos **autoinflamatorios**, **alergias graves** e incluso **síndromes neoplásicos** (144). Esta aparente paradoja, donde coexisten respuestas inmunes deficientes y desreguladas, ha llevado a un replanteamiento conceptual. El descubrimiento continuo de nuevos defectos genéticos (tanto por pérdida como por ganancia de función) motivó que en 2019 la IUIS redefiniera estas patologías como "**Errores Innatos de la Inmunidad**" (EII), estableciendo un sistema de clasificación dinámico (145). La clasificación actualizada de la IUIS en 2024 organiza los EII en 10 categorías principales (142,143): **(1) inmunodeficiencias combinadas**, **(2) inmunodeficiencias combinadas con características sindrómicas**, **(3) deficiencias predominantes de anticuerpos**, **(4) enfermedades de desregulación inmunológica**, **(5) defectos innatos de los fagocitos**, **(6) alteraciones en la inmunidad intrínseca e innata**, **(7) enfermedades autoinflamatorias**, **(8) deficiencias del sistema de complemento**, **(9) fallo medular** y **(10) fenocopias de errores innatos de la inmunidad**.

Los EII de desregulación inmunológica (**grupo 4**) comprenden un conjunto heterogéneo de trastornos que afectan a genes cruciales para la regulación del sistema inmunitario, manifestándose con una amplia variabilidad clínica. Desde 2020, aquellos casos que presentan pérdida de los mecanismos de tolerancia, dando lugar a autoinmunidad, procesos autoinflamatorios, linfoproliferación o atopia grave, se clasifican como **Trastornos Primarios de Regulación Inmunológica** (*PIRD*, por sus siglas en inglés) (146). Estos engloban diversas patologías originadas por fallos en distintas vías regulatorias del sistema inmune, lo que permite su subclasificación en categorías específicas según los mecanismos fisiopatológicos implicados.

1.2.1 Rol central de las Treg en la fisiopatología: Tregopatías

En 2018 se acuñó el término "**tregopatías**" (147) para designar un subgrupo de EII caracterizados por afectar específicamente la función de las células Treg, que posteriormente se incluyó dentro de los PIRD. Inicialmente, esta categoría abarcaba mutaciones en genes como *FOXP3*, *CD25*, *CTLA4*, *LRBA*, *BACH2*, *IL10* y las variantes de ganancia de función (*GOF*, por sus siglas en inglés) de *STAT3* (148,149). Con el tiempo, el comité de expertos de la IUIS ha ampliado esta clasificación incorporando nuevos genes defectuosos como *FERMT1*, *CD122*, *DEF6* y las mutaciones con ganancia de función de *IKAROS*, reflejando los continuos avances en la comprensión de estos trastornos inmunorreguladores mediados por disfunción de las Treg (148,150) (**Figura 10**).

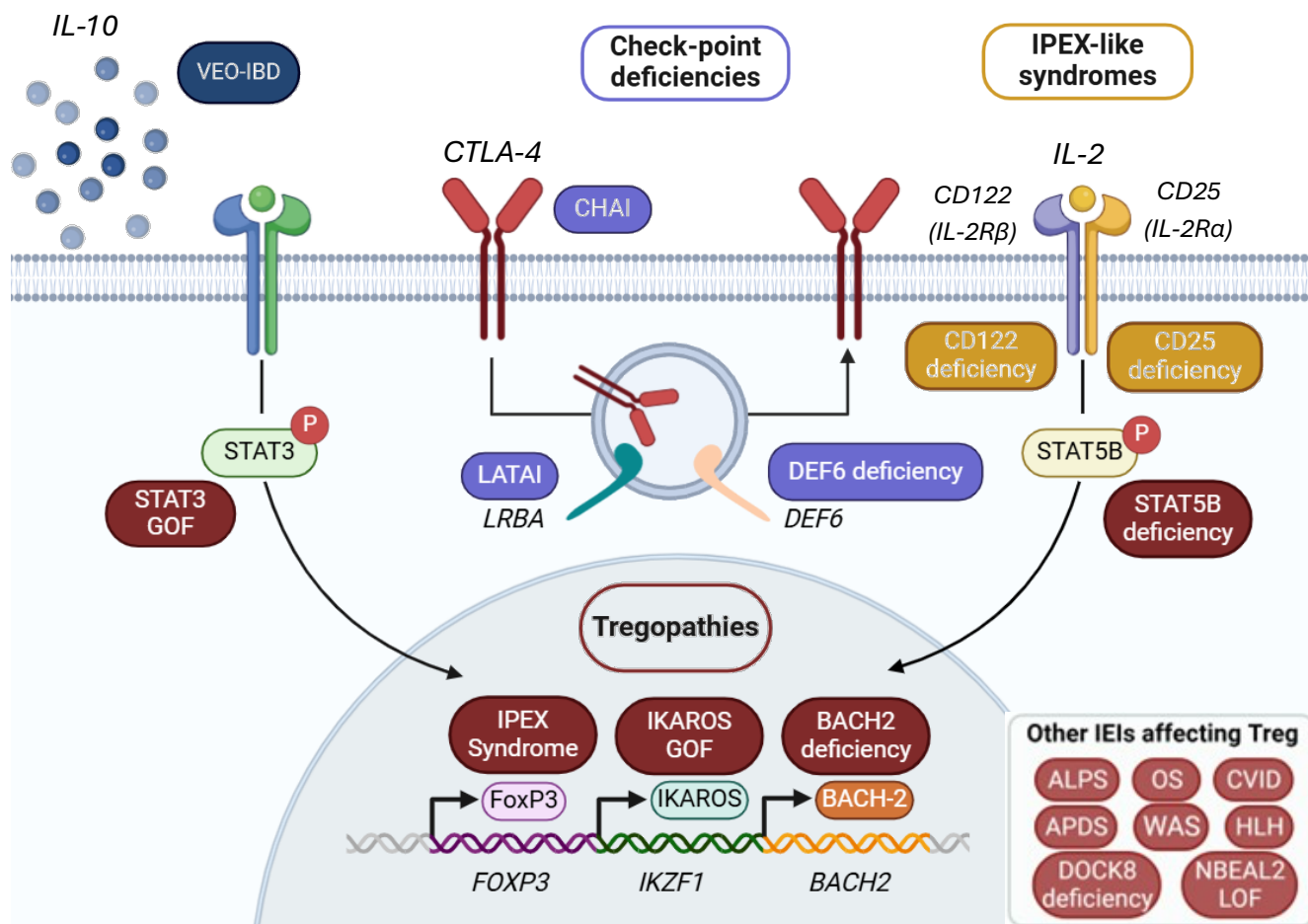


Figura 10 | Principales patologías y sus defectos genéticos implicados en la alteración de la función y/o número de células Treg. Las Tregopatías quedan representadas en rojo oscuro, los síndromes IPEX-like en amarillo, los trastornos de punto de control inmunológico en morado oscuro, los trastornos asociados a IL-10 en azul oscuro y otros EII que afectan a las Treg en un recuadro (esquina inferior derecha). Las flechas indican procesos fisiológicos normales. IEI, inborn errors of immunity; P, Phosphorilated; IPEX, immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome; LATAI, LRBA deficiency with autoantibodies, regulatory T (Treg) cell defects, autoimmune infiltration; CHAI, CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration; ALPS, Autoimmune lymphoproliferative syndrome; OS, Omenn Syndrome; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; CVID, Common variable immunodeficiency; VEO-IBD, very early onset inflammatory bowel disease; APDS, Activated PI3K Delta Syndrome; WAS, Wiskott-Aldrich Syndrome; DOCK8, Dedicator of cytokinesis 8 deficiency; NBEAL2, Neurobeachin-like 2. Imágen modificada de (151).

El **síndrome de desregulación inmune, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al X (IPEX**, por sus siglas en inglés) fue descrito inicialmente en 1982 como el primer trastorno asociado a un defecto en los linfocitos Treg. Se caracteriza por manifestaciones autoinmunes tempranas debido a mutaciones en el factor de transcripción FoxP3, que reducen su expresión o alteran su función (152,153). Aunque el gen *FOXP3* no es esencial para el desarrollo de Treg, sí regula su capacidad supresora al controlar moléculas como TIGIT y CTLA-4, además de inhibir citocinas inflamatorias y la expresión de IL-2 (114,154,155). Las mutaciones reportadas en IPEX suelen ser **variantes nulas**, **cambios de sentido** o pequeñas **delecciones/inserciones** que generan una proteína no funcional, lo que provoca que las Treg no puedan controlar la proliferación de linfocitos T efectoras (156–158). Entre las más de 70 mutaciones identificadas, el 40% afecta la región de unión al ADN (FKH), mientras que otras alteran dominios como la hélice de

leucina (LZ) o la región rica en prolina (PRR). Además, existen dos isoformas principales de FOXP3: una completa (FOXP3 FL) y otra sin parte del exón 2 (FOXP3 Δ E2), siendo esta última asociada a inestabilidad de las Treg *in vivo* y cuadros clínicos graves (159). Aunque el IPEX clásico presenta diarrea intratable, diabetes tipo 1 y eccema, hay casos atípicos con síntomas tardíos, afectación de un solo órgano o formas leves (160).

La **deficiencia de CD25** es un trastorno de desregulación inmunitaria de herencia autosómica recesiva causado por variantes bialélicas en el gen *IL2RA*, que codifica la proteína CD25. Esta molécula se expresa en altos niveles en linfocitos Treg y es crucial para su función, ya que la señalización de IL-2 a través de CD25 es necesaria para la producción de IL-10 (161). Los pacientes con esta deficiencia presentan un cuadro clínico similar al síndrome IPEX, por lo que se clasifica como una enfermedad **IPEX-like** (161). El diagnóstico se confirma mediante citometría de flujo, donde se observa la ausencia completa de CD25 en la superficie de los linfocitos T. Aunque algunos pacientes muestran una respuesta proliferativa reducida ante estímulos, esta puede recuperarse parcialmente con altas dosis de IL-2. Además, trabajos recientes han demostrado que las células Treg deficientes en CD25 presentan una capacidad supresora alterada, lo que explica su fenotipo clínico (162).

En humanos, la **haploinsuficiencia de CTLA-4** provoca un trastorno inmunológico denominado **enfermedad autoinmune infiltrativa por deficiencia de CTLA-4** (*CHAI*, por sus siglas en inglés). Los pacientes con CHAI presentan manifestaciones clínicas diversas que incluyen citopenias autoinmunes, hipogammaglobulinemia, enfermedades pulmonares, enteropatía, linfoproliferación, afecciones cutáneas, compromiso neurológico y mayor susceptibilidad a infecciones. A nivel inmunológico, se observa una disminución de linfocitos B (incluidas las células B de memoria), células NK y linfocitos T, aunque en algunos casos puede haber un aumento de linfocitos T colaboradores CD4+. Además, al igual que en el síndrome IPEX, las Treg deficientes en CTLA-4 muestran una capacidad supresora disminuida, lo que contribuye a la desregulación inmunológica característica de esta enfermedad (163–165).

La **deficiencia de LRBA**, ya sea en forma homocigota o heterocigota, provoca una expresión deficiente de CTLA-4 en la superficie celular, dando lugar a lo que se conoce como enfermedad LATAI (asociada a autoanticuerpos, defectos en células Treg, infiltración autoinmune y enteropatía). Esta condición comparte características clínicas y fenotípicas con la haploinsuficiencia de CTLA-4. Dado el papel de LRBA en el reciclaje de CTLA-4 en la membrana celular, la ausencia de esta proteína en las Treg provoca un descenso de los niveles de CTLA-4, lo que conduce a una hiperproliferación de linfocitos T, así como a un deterioro en la capacidad supresora de las Treg. Además, estos pacientes muestran un recuento disminuido de Treg, agravando la desregulación inmunológica característica de este trastorno (166,167). Un estudio reciente ha descubierto la interacción de la proteína *Neurobeachin-like 2* (NBEAL2) con células inmunes, donde su pérdida de función provoca el síndrome de plaquetas grises (*GPS*, por sus siglas en inglés) y, en algunos casos, trastornos autoinmunes (168). Mediante espectrometría de masas se identificó que NBEAL2

se asocia con LRBA, y experimentos de inmunoprecipitación confirmaron su interacción con CTLA-4 (168). Curiosamente, la deficiencia de NBEAL2 reduce la expresión de CTLA-4 en linfocitos T convencionales, aunque no afecta aparentemente a las células Treg (168).

El factor de transcripción BACH2 desempeña un papel fundamental en procesos inmunológicos como la recombinación en células B, la hipermutación somática, la diferenciación y función de linfocitos T, así como en la actividad de macrófagos alveolares. Variaciones genéticas en el locus BACH2 se han vinculado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, diabetes tipo 1, asma, esclerosis múltiple, vitíligo, enfermedad de Graves, Crohn y celiaquía. En 2017 se describió por primera vez un caso de **haploinsuficiencia de BACH2** en un paciente con colitis linfocítica, esplenomegalia y deficiencia humoral progresiva acompañada de infecciones sinopulmonares, dando origen a la denominación actual de inmunodeficiencia y autoinmunidad relacionada con BACH2 (*BRIDA*, por sus siglas en inglés) (169). Los pacientes presentan niveles reducidos de células Treg tanto en sangre como en colon, donde además se observa una disminución en la expresión de FoxP3 que compromete su función reguladora (169).

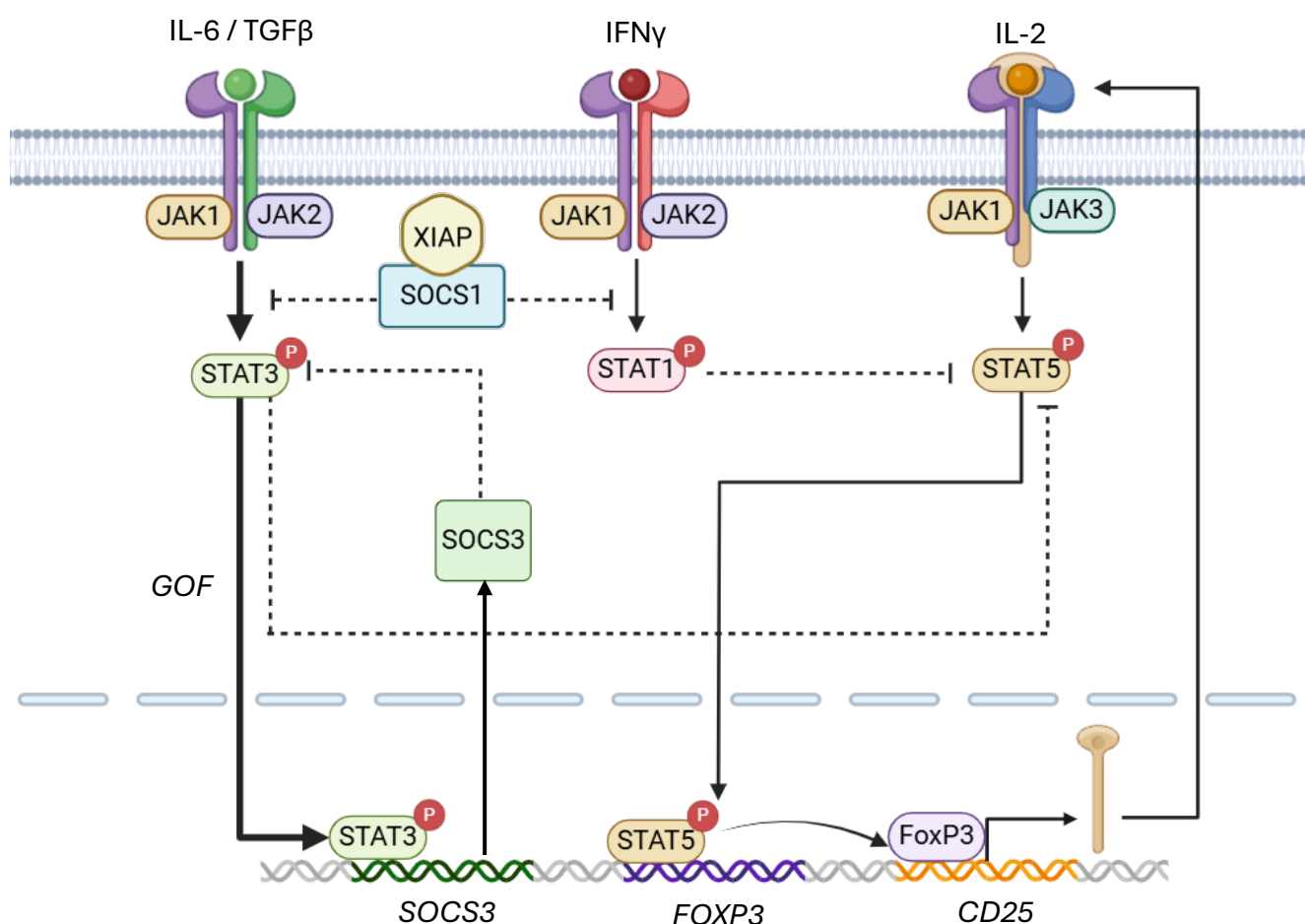


Figura 11 | Esquema de la relación entre las vías de señalización JAK-STAT con la expresión de FoxP3 y CD25 en células Treg. Las flechas continuas indican procesos fisiológicos de activación. La flecha continua de mayor grosor indica una ganancia de función de la vía. Las líneas discontinuas indican procesos fisiológicos de inhibición. Imagen creada por Daniel Acevedo con Biorender.

La cascada de señalización de STAT3 es fundamental en la regulación de las células Treg y Th17. En el **síndrome de ganancia de función de STAT3** (*STAT3 GOF*, por sus siglas en inglés), la activación constitutiva de STAT3 por IL-6 (junto con TGF- β) promueve la diferenciación de Th17 mientras suprime la expresión de FoxP3, inhibiendo así la generación de Treg (170). Aunque STAT3 induce la expresión de **SOCS3** como mecanismo de retroalimentación negativa, en STAT3 GOF esta regulación es insuficiente para controlar la señalización hiperactiva. Es importante destacar que SOCS3 actúa específicamente sobre STAT3, pero la hiperactividad de STAT3 compite con la vía IL-2/STAT5, reduciendo su capacidad para inducir la expresión de FoxP3 y CD25 (**Figura 11**) (171). Esta desregulación conduce a un déficit de Treg funcionales y un predominio del fenotipo Th17, lo que explica las manifestaciones autoinmunes características del síndrome, incluyendo linfoproliferación, citopenias y alteraciones del crecimiento (172).

1.2.2 Disfunción de las Treg en otros EII

Los PIRD que no se consideran tregopatías incluyen trastornos hiperinflamatorios como la linfohistiocitosis hemofagocítica (*HLH*, por sus siglas en inglés, con o sin susceptibilidad intrínseca al virus de Epstein-Barr), linfoproliferación no maligna con autoinmunidad (*ALPS*, por sus siglas en inglés), enfermedad inflamatoria intestinal vinculada a la señalización de IL-10 de inicio muy temprano (*VEO-IBD*, por sus siglas en inglés), y otros trastornos de autoinmunidad monogénica donde las células Treg no desempeñan un papel central (146,150). Aunque la base genética de estas PIRD no afecta directamente la biología y función de las Treg, estas células pueden verse significativamente alteradas de manera directa o indirecta en el contexto de estas enfermedades, mostrando cómo diversos mecanismos inmunopatológicos pueden converger en la desregulación del sistema inmunitario.

El **HLH** es un trastorno hiperinflamatorio caracterizado por una activación inmunitaria excesiva, causada por defectos genéticos en genes como *PRF1*, *UNC13D*, *STX11*, *STXBP2*, *SLC7A7*, *CDC42*, *FAAP24*, *RHOG*, *LYST*, *RAB27A*, *AP3B1*, *AP3D1*, *SAP*, *XIAP*, *CD27* o *CD70*, que afectan la citotoxicidad mediada por gránulos (150,173). Esta alteración impide que las células efectoras citotóxicas eliminen adecuadamente células infectadas o malignas, desencadenando una liberación masiva de citocinas que prolonga la hiperactivación inmunológica. Durante los episodios agudos de HLH, los linfocitos CD8+ sobreexpresan CD25, consumiendo la IL-2 disponible y compitiendo con las células Treg por este recurso esencial, lo que provoca un deterioro funcional indirecto y una disminución drástica en el número de Treg (174). En casos específicos como los asociados a **deficiencias de XIAP** (causante del trastorno linfoproliferativo ligado al X y VEO-IBD), las Treg se ven directamente afectadas: XIAP normalmente estabiliza a SOCS1, un regulador clave de su función inhibitoria (175). Las mutaciones en XIAP generan inestabilidad en SOCS1, hiperactivando las vías de STAT1/STAT3, reduciendo la capacidad supresora y la estabilidad de FoxP3 en Treg (**Figura 11**), e induciendo la secreción de IFN γ que polariza la respuesta hacia un perfil inflamatorio (176).

Las **immunodeficiencias linfoproliferativas autoinmunes** (*ALPID*, por sus siglas en inglés) son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas caracterizadas por linfoproliferación benigna (como adenopatías y esplenomegalia) y manifestaciones autoinmunes, especialmente citopenias, debido a alteraciones en la regulación del sistema inmunológico (177). Aproximadamente el **20%** de los casos corresponden al **síndrome linfoproliferativo autoinmune** clásico (*ALPS*, por sus siglas en inglés), caracterizado por mutaciones en la vía Fas-FasL (*FAS*, *FASLG*, *FADD* o *CASP10*) y marcado por una expansión significativa de células T doble negativas (CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-) que pueden representar más del 5-10% del total de linfocitos en sangre periférica (frente a <1% en individuos sanos), junto con elevación de biomarcadores como IL-10, FasL soluble (>200 pg/mL) y vitamina B12 (>1500 ng/L) (178). Estos pacientes presentan una reducción relativa de Tregs a aproximadamente 1-2% de los linfocitos CD4+ (vs. 5-10% en controles), con predominio de subpoblaciones naïve (FoxP3^{low}CD45RA+) (178). Sin embargo, gracias a avances en secuenciación genética, se han identificado otros trastornos con fenotipos similares, denominados **ALPS-like**, que incluyen deficiencias en CTLA-4 y LRBA (que alteran la función de los linfocitos T reguladores), el **síndrome de PI3K δ activada** (*APDS*, por sus siglas en inglés) con hiperactivación de la vía PI3K-AKT-mTOR, enfermedades por STAT3 GOF (que afectan la señalización de citocinas) y la haploinsuficiencia de NF- κ B1 (que compromete la respuesta inflamatoria) (179). Estos trastornos, que suponen otro **20%** de los ALPID, comparten características como alteraciones en las poblaciones de linfocitos Treg, expansión de células B CD21^{low} asociada a autoanticuerpos, senescencia de linfocitos T y susceptibilidad a infecciones, pero difieren en sus mecanismos moleculares y manifestaciones clínicas específicas (177). El diagnóstico requiere análisis genéticos e inmunofenotípicos, mientras que el tratamiento se basa en terapias dirigidas, como inhibidores de mTOR para ALPS o inhibidores de PI3K δ para APDS. El principal desafío en el manejo de las ALPID radica en que el **60%** de los pacientes no cuenta con un diagnóstico genético preciso, lo que limita drásticamente las opciones de tratamiento dirigido y mantiene un enfoque terapéutico basado en inmunosupresores genéricos (como corticoides o rituximab), con resultados variables y efectos adversos. La ausencia de mutaciones identificables no solo dificulta la clasificación pronóstica, sino que también excluye a estos pacientes de terapias específicas (como abatacept en CTLA-4 o leniolisib en APDS), sosteniendo complicaciones como linfoproliferación progresiva, daño orgánico por autoinmunidad o infecciones recurrentes (177).

La **Inmunodeficiencia Común Variable** (*CVID*, por sus siglas en inglés) es un trastorno heterogéneo de la inmunidad, caracterizado por hipogammaglobulinemia, defectos en la producción de anticuerpos e infecciones recurrentes, así como manifestaciones autoinmunes y linfoproliferativas (180). Su fisiopatología implica alteraciones en linfocitos B (como la reducción de células de memoria y expansión de células B CD21^{low}) y en linfocitos T, incluyendo disfunción de células Th y Treg, activación crónica y desregulación de citocinas como IL-21 y BAFF (180). Existen dos formas clínicas principales: la **clásica**, con predominio de infecciones respiratorias y autoinmunidad moderada, y la forma linfoproliferativa (**CVIDc**), más grave, con esplenomegalia, adenopatías y mayor riesgo de linfomas (181). En esta enfermedad, el papel

de las células Treg sigue siendo controvertido: mientras algunos estudios reportan disminución de Treg, particularmente en pacientes con manifestaciones autoinmunes (182), otros no encuentran diferencias significativas asociadas a gravedad o presencia de autoinmunidad (183). Curiosamente, aunque los niveles puedan variar, la función supresora de estas células parece preservarse (184). Recientemente se ha descrito también una reducción en las Treg CD8+ en CVID, aunque sin correlación con la autoinmunidad (185). Estos hallazgos contradictorios podrían explicarse por la heterogeneidad de la CVID, que agrupa probablemente múltiples enfermedades con mecanismos fisiopatológicos distintos, lo que exige un enfoque diagnóstico individualizado basado en la caracterización inmunológica detallada.

El **síndrome de Wiskott-Aldrich** (WAS, por sus siglas en inglés) es una inmunodeficiencia primaria ligada al cromosoma X causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína WAS (WASP, por sus siglas en inglés), la cual desempeña un papel clave en la función linfocitaria. Esta enfermedad se manifiesta con infecciones recurrentes, trombocitopenia, eccema, trastornos autoinmunes y mayor riesgo de cáncer (186–188). Se han identificado más de 200 mutaciones en el gen WAS, siendo las que provocan una pérdida completa de WASP las asociadas a un fenotipo más grave (186,187). La deficiencia de WASP afecta principalmente a los linfocitos T, ya que altera la reorganización del citoesqueleto de actina tras la activación del TCR, lo que conduce a una señalización defectuosa, menor proliferación y supervivencia celular (186,187). Aunque WASP no es esencial para la generación de células Treg en el timo, sí es crucial para su expansión y mantenimiento en la periferia (186,187). Los pacientes con WAS presentan una reducción en el porcentaje de Treg periféricas, especialmente en las subpoblaciones activadas, que muestran niveles disminuidos de marcadores de activación y receptores de migración (186,188). Sin embargo, la capacidad supresora de estas Treg parece conservarse en humanos, a diferencia de lo observado en modelos murinos, donde presentan una función claramente alterada (186).

La **deficiencia de DOCK8** (*dedicator of cytokinesis 8*) es una inmunodeficiencia primaria poco frecuente que se manifiesta con infecciones graves, niveles elevados de IgE, alergias y trastornos autoinmunes (189,190). Aunque su mecanismo exacto no está completamente dilucidado, se sabe que esta proteína desempeña un papel clave en la función de las células Treg, ya que favorece la fosforilación de STAT5 inducida por IL-2, esencial para su mantenimiento, además de participar en el reciclaje de CD25 (189). Los pacientes con esta deficiencia presentan una reducción en el número y la capacidad supresora de las Treg (189).

El **síndrome de Omenn** (OS, por sus siglas en inglés) es una inmunodeficiencia combinada grave de herencia autosómica recesiva, causada principalmente por mutaciones hipomórficas en los genes de recombinación *RAG1/RAG2*, aunque también puede asociarse a alteraciones en otros genes como *DCLRE1C*, *IL7R*, *RMRP*, *IL2RG*, *ZAP70*, *LIG4* y *ADA* (191). Estas mutaciones afectan parcialmente el proceso de recombinación V(D)J, generando un cuadro clínico caracterizado por eritrodermia generalizada, alopecia, linfadenopatía, hepatomegalia y diarrea, junto con una marcada disminución de linfocitos B circulantes

(191,192). Estudios recientes han demostrado que los pacientes con OS presentan un número variable de células Treg en sangre periférica, las cuales muestran expresión reducida de FoxP3 y capacidad supresora limitada o nula *in vitro*, además de una drástica disminución de Treg en el timo (192). Estos hallazgos revelan por primera vez un defecto en el desarrollo y función de las Treg en el OS, sugiriendo que tanto la tolerancia central como la periférica están comprometidas en esta enfermedad, lo que contribuye a su fenotipo autoinmune e inflamatorio severo.

La **deficiencia de STAT5b** es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente que combina retraso severo del crecimiento con inmunodeficiencia grave (193). Esta condición surge porque STAT5b regula la transcripción de genes cruciales como *IL2RA*, *FOXP3*, *BCL2* y la hormona de crecimiento (193,194). Los pacientes presentan un fenotipo inmunológico caracterizado por reducción en el número de células Treg, baja expresión de FoxP3 y CD25, junto con una capacidad disminuida para suprimir la proliferación de linfocitos T (193,194). Estas alteraciones se asocian clínicamente con manifestaciones autoinmunes como eccema severo, artritis, tiroiditis y púrpura trombocitopénica, evidenciando el papel fundamental de STAT5b en la función y mantenimiento de las Treg (193,194). Estudios recientes han destacado el papel de la citocina IL-9, que activa STAT3 y STAT5 en las Treg (65). En modelos murinos con deficiencia del receptor de IL-9 (IL-9R), se observó una capacidad supresora reducida de las Treg en encefalomiелitis autoinmune, mientras que ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que IL-9 mejora la función supresora y supervivencia de las Treg mediante la señalización de STAT3/STAT5 (65). Estos hallazgos sugieren que la vía de IL-9/IL-9R podría ser relevante en el estudio de inmunodeficiencias con disregulación inmune, abriendo nuevas perspectivas terapéuticas.

A continuación, en la **Tabla 1** se resumen las principales alteraciones que afectan al funcionamiento y/o número de las células Treg:

Continuación

Defectos de células Treg en EII				
Tregopatías				
Enfermedad	Gen	Fenotipo Treg	Función Treg <i>in vitro</i>	Referencia
Síndrome IPEX	<i>FOXP3</i>	Niveles normales o bajos de Treg FoxP3+ circulantes y de expresión de FoxP3; con alta desmetilación de TSDR	Capacidad supresiva disminuida	(195)
Deficiencia de CD25	<i>IL2RA</i>	Niveles normales o bajos de Treg FoxP3+ circulantes	Capacidad supresiva alterada	(161)
Deficiencia de CTLA-4	<i>CTLA4</i>	Niveles normales o altos de Treg FoxP3+ en sangre, con expresión disminuida de FoxP3	Capacidad supresiva disminuida	(164)

Continuación

Deficiencia de LRBA	<i>LRBA</i>	Niveles normales o bajos de Treg FoxP3+ circulantes y de expresión de FoxP3	Capacidad supresiva alterada	(167)
Deficiencia de NBEAL2	<i>NBEAL2</i>	ECR	ECR	(168)
Deficiencia de BACH-2	<i>BACH2</i>	Niveles de expresión de FoxP3 bajo	ND	(169)
Deficiencia de IL-10/IL-10R	<i>IL10</i> <i>IL10RA</i> <i>IL10RB</i>	ECR	ECR	ECR
STAT3 GOF	<i>STAT3</i>	Niveles normales o bajos de Treg FoxP3+ circulantes	Capacidad supresiva alterada	(172)
Deficiencia de FERMT1	<i>FERMT1</i>	ND	ND	ECR
Deficiencia de CD122	<i>IL2RB</i>	ND	ND	ECR
Deficiencia de DEF6	<i>DEF6</i>	ND	ND	ECR
IKAROS GOF	<i>IKZF1</i>	ND	ND	ECR
Otros EII				
HLH	<i>PRF1</i> <i>UNC13D</i> <i>STX11</i> <i>STXBP2</i> <i>SLC7A7</i> <i>CDC42</i> <i>FAAP24</i> <i>RHOG</i> <i>LYST</i> <i>RAB27A</i> <i>AP3B1</i> <i>AP3D1</i> <i>SAP</i> <i>XIAP</i> <i>CD27</i> <i>CD70</i>	Niveles disminuidos de Treg FoxP3+ circulantes	ECR	(174)
ALPS	<i>TNFRSF6</i> <i>TNFSF6</i> <i>CASP10</i>	Treg FoxP3+ bajas; Treg vírgenes elevadas (FoxP3 ^{low} CD45RA+)	Capacidad supresiva alterada	(178)
VEO-IBD	<i>XIAP</i>	Niveles normales o reducidos de células Treg FoxP3+ circulantes y de expresión de FoxP3	Capacidad supresiva alterada	(176)
APDS	<i>PIK3Cd</i> <i>PIK3R1</i>	Niveles disminuidos de Treg FoxP3+ circulantes	Capacidad supresiva alterada	(196)

CVID	Desconocido	ECR	ECR	ECR
WAS	WASP	Niveles disminuidos de Treg FoxP3+ circulantes	Capacidad supresora normal o levemente reducida	(186)
DOCK8	DOCK8	Niveles disminuidos de Treg FoxP3+ circulantes	Capacidad supresiva alterada	(189)
OS	RAG1 RAG2 DCLRE1 CIL7R RMRP IL2RG ZAP70 LIG4 ADA	Niveles bajos de células Treg FoxP3+ en sangre periférica y expresión reducida de FoxP3, acompañado de una drástica disminución de Treg FoxP3+ en el tejido tímico	Capacidad supresiva disminuida	(192)
STAT5B	STAT5B	Niveles reducidos de Treg FoxP3+ circulantes y disminución en la expresión de FoxP3	Capacidad supresiva alterada	(194)

Tabla 1 | Resumen las principales alteraciones que afectan al funcionamiento y/o número de las células Treg. ECR, estudios complementarios requeridos para una mayor comprensión del número, fenotipo y capacidad supresora en la patología; ND, no disponible, ausencia de estudios Treg en la patología. Modificado de (151).

1.2.3 Vías de señalización implicadas en la desregulación inmunológica

Las vías de señalización intracelular constituyen redes moleculares altamente conservadas que coordinan las respuestas inmunológicas mediante la transmisión de señales desde receptores de superficie hasta el núcleo celular, regulando procesos como **activación, proliferación, diferenciación, metabolismo y apoptosis** de las células inmunitarias (197). En condiciones fisiológicas, estas vías mantienen un equilibrio preciso mediante mecanismos de retroalimentación positiva y negativa, permitiendo respuestas inmunes adecuadas mientras previenen la hiperactivación patológica. Sin embargo, cuando se producen alteraciones genéticas en componentes clave de estas cascadas de señalización como mutaciones en genes que codifican proteínas kinasas (**PI3K, AKT, mTOR, JAK, JNK, ERK, MAPK1/2, p70S6K, p38**) o factores de transcripción (**STAT3, STAT5A/B, NF-κB, CREB**), se rompe este equilibrio homeostático, conduciendo a estados de desregulación inmunológica (**Figura 12**) (197). Esta situación es particularmente evidente en los ALPID, donde mutaciones en componentes de vías como PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT o NF-κB alteran los puntos de control inmunológicos, provocando expansión clonal de poblaciones linfoides autorreactivas, defectos en la función de células Treg, y producción aberrante de citoquinas proinflamatorias (198). La

estrecha interconexión entre estas vías explica por qué alteraciones en un solo componente pueden tener efectos pleiotrópicos en múltiples aspectos de la respuesta inmune, y por qué estrategias terapéuticas dirigidas contra proteínas centrales de estas redes (como mTOR en PI3K o JAK en STAT) pueden corregir simultáneamente varios aspectos de la disregulación inmunológica.

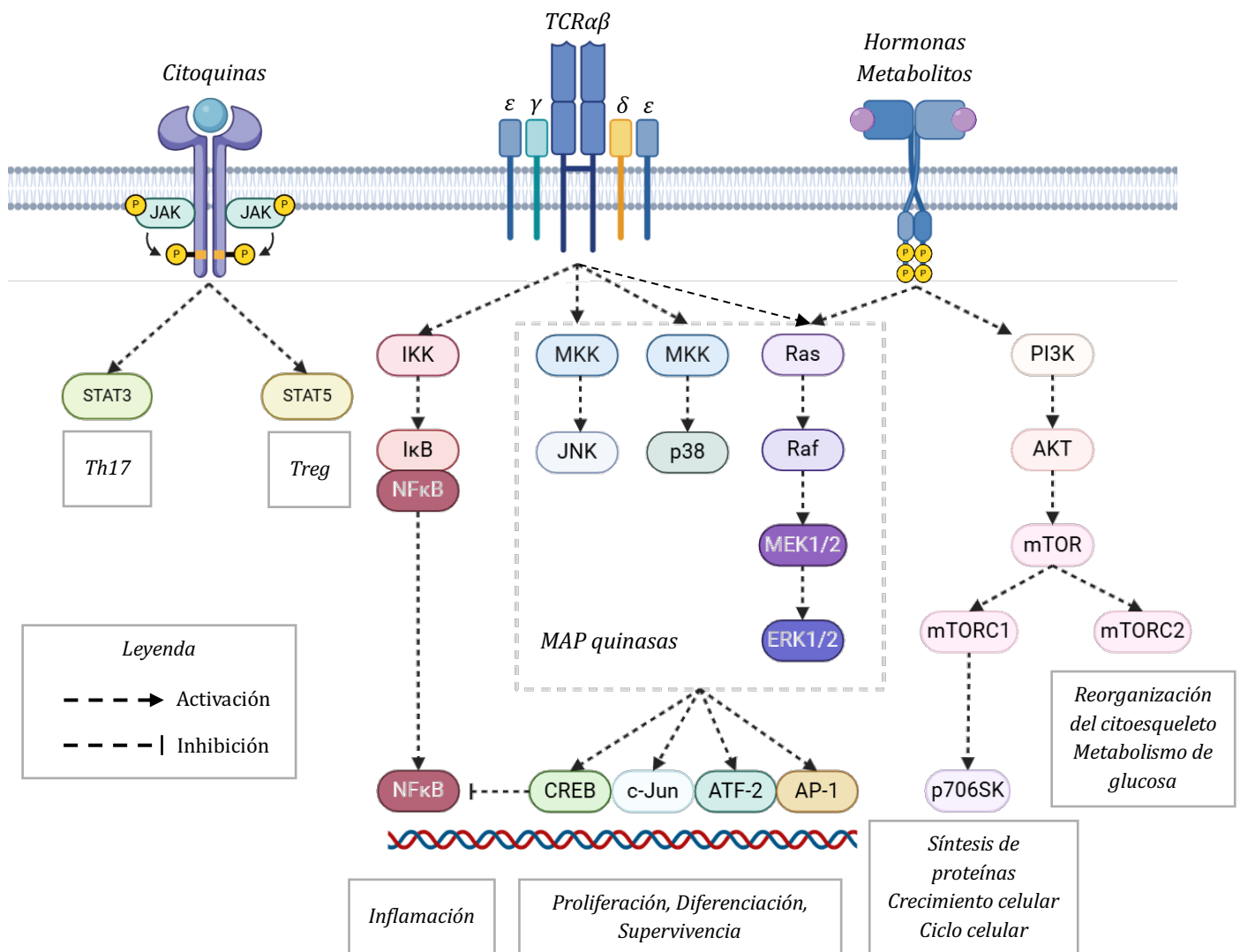


Figura 12 | Esquema ilustrativo de las principales vías de señalización involucradas en la disregulación inmunológica en células T. Imagen creada por Daniel Acevedo con Biorender.

1.2.3.1 Vía de las MAPK

Las **proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)** son enzimas altamente conservadas que actúan como intermediarias clave en la transmisión de señales intracelulares, regulando procesos celulares fundamentales como la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis (199). Estas quinasas se organizan en tres familias principales: **ERK** (asociada principalmente a crecimiento y mitosis), **JNK**

(vinculada a respuestas de estrés) y **p38** (implicada en inflamación y producción de citocinas) (199). Las MAPK funcionan mediante cascadas de fosforilación en tres niveles (**MAPKKK** → **MAPKK** → **MAPK**), donde cada paso amplifica la señal proveniente de estímulos externos como citocinas, factores de crecimiento o estrés celular (199,200). Su actividad se regula dinámicamente mediante fosfatasa que revierten las fosforilaciones, manteniendo así el equilibrio en la señalización. En el contexto de los ALPID, las MAPK desempeñan un papel crucial al modular la activación de factores de transcripción como **CREB** y **AP-1**, que a su vez regulan la expresión de genes implicados en respuestas inflamatorias y proliferación celular (198). La desregulación de estas vías puede contribuir a la patogénesis de ALPID al alterar procesos inmunológicos clave, como la activación aberrante de linfocitos, la producción descontrolada de citocinas y los defectos en la apoptosis (198). Dada su participación central en múltiples aspectos de la función inmune, las MAPK representan dianas terapéuticas prometedoras, aunque su inhibición requiere un enfoque preciso debido a su amplia implicación en procesos fisiológicos esenciales.

1.2.3.2 Vía de NF-κB

El factor de transcripción **NF-κB** está compuesto por cinco miembros (**RelA/p65**, **RelB**, **c-Rel**, **NF-κB1/p50** y **NF-κB2/p52**) que forman diversos homo y heterodímeros reguladores de la expresión génica (201). En estado basal, estos complejos permanecen inactivos en el citoplasma unidos a proteínas inhibitoras (**IκB**), cuyo bloqueo es mediado por el complejo **IKK** (formado por las quinasas **IKKα/IKKβ** y la subunidad reguladora **NEMO/IKKγ**) (201). NF-κB participa en dos vías de activación principales: la **canónica** (dependiente de IKKβ-NEMO), que responde a estímulos proinflamatorios mediante la liberación de heterodímeros p50/p65, y la **alternativa** (mediada por IKKα), involucrada en procesos de desarrollo y modulación inmune (201). En el contexto de los ALPID, mutaciones en componentes como NFKB1 (p50/p105) altera la homeostasis inmunológica al inducir expresión aberrante de citocinas inflamatorias (IL-1β, IL-6, TNF-α), moléculas de adhesión y metaloproteasas, contribuyendo a fenómenos de autoinmunidad y linfoproliferación, evidenciando el papel crucial de esta vía en el equilibrio entre activación y tolerancia inmunológica (197,198).

1.2.3.3 Vía PI3K/AKT/mTOR

La vía **PI3K/AKT/mTOR** es fundamental en la regulación del crecimiento, proliferación y supervivencia celular, especialmente en el contexto de los ALPID (198). Cuando se activan receptores como los de citoquinas o antígenos, la **PI3Kδ** (compuesta por las subunidades catalítica p110δ y reguladora p85α) fosforila el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (**PIP2**) para generar fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (**PIP3**), lo que recluta y activa la quinasa **AKT** (202). Esta, a su vez, inhibe los factores de transcripción **FOXO** y activa el complejo **mTOR**, que se subdivide en **mTORC1** y **mTORC2**. Mientras mTORC1 regula la síntesis proteica

y el crecimiento celular a través de la fosforilación de **p70S6K** (promueve la traducción de ARNm) y **4E-BP1** (regula la iniciación de la traducción), mTORC2 modula el citoesqueleto y la supervivencia celular. A nivel molecular, AKT y mTORC1 coordinan señales que impulsan la progresión del ciclo celular, especialmente durante la fase G1 y la transición a fase S (197,202). AKT, una vez activado, estimula la expresión de **ciclinas D y E** mediante la activación de factores de transcripción como **Myc**, y al mismo tiempo inhibe proteínas supresoras del ciclo como **p21** y **p27**, que normalmente bloquean la actividad de los complejos CDK-ciclina. Esto favorece la activación de **CDK4/6** y **CDK2**, permitiendo la entrada en fase S. Por otro lado, mTORC1, potencia la traducción de proteínas mediante la activación de p70S6K, lo cual promueve la síntesis de ciclinas como la **D1** y otras proteínas necesarias para la división celular (197,202). En trastornos como el APDS, mutaciones en *PIK3CD* o *PIK3R1* provocan una hiperactivación de esta vía, lo que conduce a proliferación linfocitaria descontrolada, senescencia de células T, defectos en la diferenciación de linfocitos B y mayor susceptibilidad a infecciones y autoinmunidad (198).

1.2.3.4 Vía de JAK-STAT

La vía **JAK-STAT** es una ruta esencial en la señalización celular que regula procesos inmunológicos, como la diferenciación, proliferación y respuesta inflamatoria (203). Cuando las citocinas se unen a sus receptores, activan las quinasas **JAK** (*Janus Kinase*), que fosforilan y reclutan factores de transcripción **STAT** (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Estos dimerizan y se translocan al núcleo, donde modulan la expresión génica (203). En el contexto de los ALPID, mutaciones como *STAT3 GOF* o alteraciones en *JAK* conducen a una activación constitutiva de esta vía, provocando linfoproliferación descontrolada, autoinmunidad temprana y susceptibilidad a infecciones (198).

1.2.4 Tratamiento farmacológico de los PIRD

Dada la complejidad de estas enfermedades, el tratamiento requiere un enfoque dirigido que module las vías de señalización hiperactivas, evitando la inmunosupresión excesiva (204). Aunque los glucocorticoides han sido el pilar convencional para el manejo de enfermedades inmunomediadas por su potente efecto antiinflamatorio, su uso prolongado conlleva efectos adversos significativos, que van desde reacciones agudas (como episodios psicóticos) hasta complicaciones crónicas (como hipercortisolismo iatrogénico, osteoporosis o diabetes) (205). Debido a estos riesgos, se han desarrollado terapias más selectivas, como **tacrolimus**, **micofenolato de mofetilo**, **leniolisib**, **sirolimus** o **ruxolitinib**, que actúan de forma dirigida sobre vías inmunológicas específicas (204). El éxito del tratamiento farmacológico en estos casos depende de lograr un equilibrio crucial: por un lado, debemos suprimir la actividad patológica de las células T efectoras, y por otro, preservar o incluso potenciar la función de los linfocitos Treg para crear un ambiente inmunológico tolerogénico. Este enfoque balanceado nos permite restaurar la homeostasis del sistema

inmunitario, controlando eficazmente la desregulación inmunológica mientras mantenemos un perfil de seguridad más favorable que con terapias convencionales. A continuación, se detalla el mecanismo de acción de estos agentes (resumidos en la **Figura 13**) y su relevancia en el manejo de los PIRD.

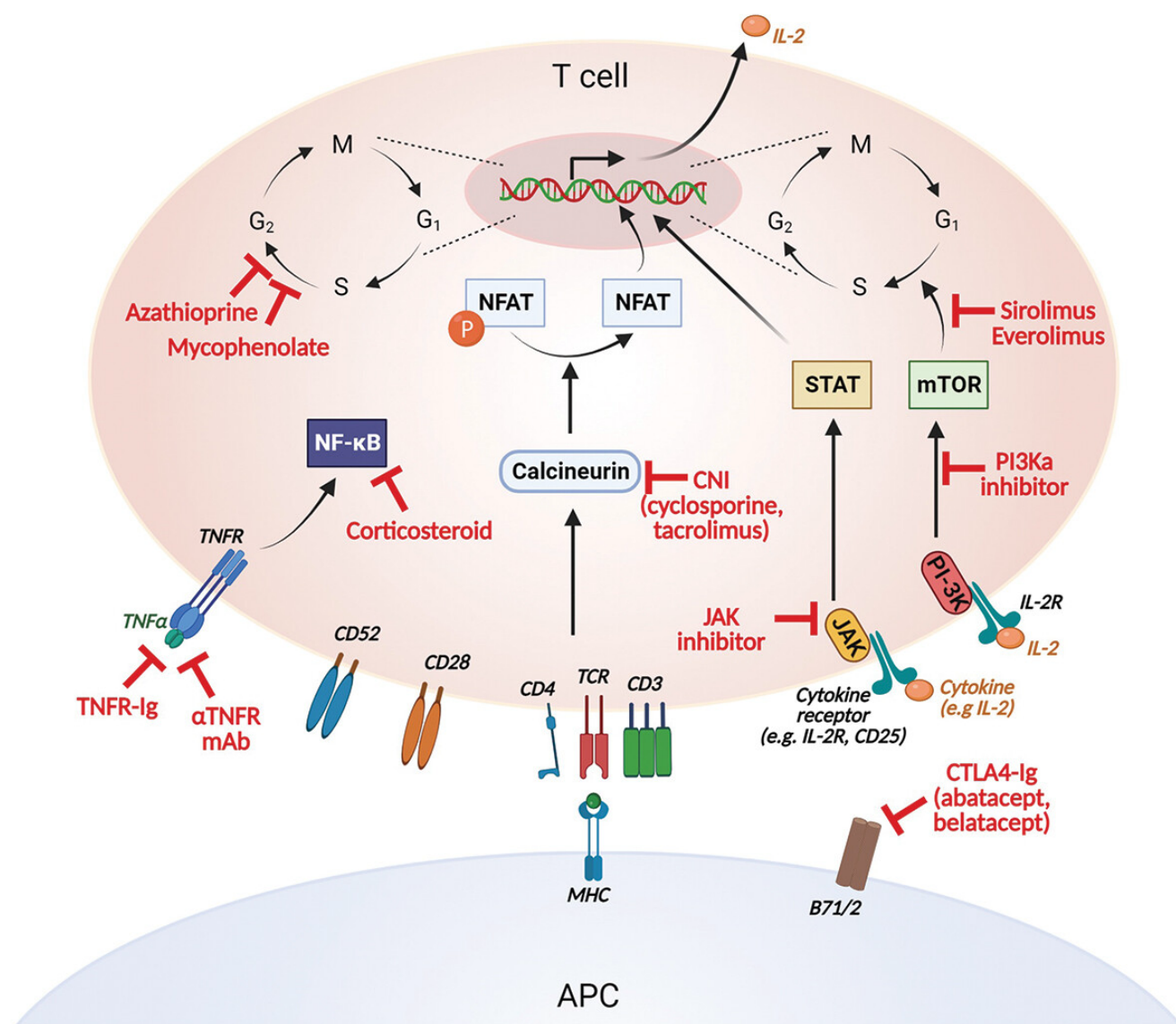


Figura 13 | Esquema ilustrativo de los principales inmunosupresores utilizados en el tratamiento de células T y su mecanismo de acción. Imagen tomada de (206).

1.2.4.1 Inhibición de la calcineurina: tacrolimus

El **tacrolimus** ejerce su efecto inmunosupresor al interferir específicamente con la vía de señalización de la **calcineurina**, un proceso fundamental para la activación de los linfocitos T (204,207). Cuando el antígeno se une al TCR, se desencadena una cascada de señalización que aumenta los niveles intracelulares de calcio. Este calcio se une a la **calmodulina**, la cual activa a la enzima **calcineurina** (una fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina) (208). Normalmente, la calcineurina activada desfosforila al factor

nuclear de células T activadas (*NFAT*, por sus siglas en inglés), permitiendo su translocación al núcleo donde induce la expresión de la IL-2 (208). El tacrolimus, al unirse a la proteína **FKBP-12** (proteína fijadora de inmunofilinas), forma un complejo que bloquea irreversiblemente la actividad fosfatasa de la calcineurina (207). Esta inhibición impide la activación de *NFAT* y, en consecuencia, interrumpe la producción de IL-2 y otras citocinas esenciales para la proliferación y activación de los linfocitos T (207). Al suprimir selectivamente esta vía de señalización, el tacrolimus logra un efecto inmunomodulador más dirigido que los glucocorticoides convencionales (204).

1.2.4.2 Inhibición de la síntesis de purinas: micofenolato de mofetilo

El **micofenolato mofetilo** (*MMF*, por sus siglas en inglés) ejerce su potente efecto inmunosupresor al inhibir selectivamente la **inosina monofosfato deshidrogenasa** (*IMPDH*, por sus siglas en inglés), enzima clave en la vía *de novo* de síntesis de guanosina (209). Tras su administración, el MMF (un profármaco) es rápidamente transformado en su forma activa, el ácido micofenólico (210). Esta conversión ocurre principalmente en el **hígado**, donde las **esterasas hepáticas** rompen el grupo éster del MMF mediante hidrólisis. Una vez liberado, el ácido micofenólico ejerce su efecto inmunosupresor al bloquear de manera reversible la enzima **IMPDH tipo II**, que es especialmente abundante en linfocitos T y B activados (209,210). Esta inhibición reduce drásticamente los niveles intracelulares de **GTP** (guanosina trifosfato), un nucleótido esencial para múltiples procesos celulares. En la síntesis de ácidos nucleicos, el GTP se incorpora como desoxiguanosín trifosfato (dGTP) durante la replicación del ADN (211) y como nucleótido directo en la transcripción de ARN (ARNm, ARNr y ARNt), necesarios para la producción de proteínas (212). Además, el GTP actúa como molécula de señalización a través de **proteínas G** (como Ras y Rac) que regulan puntos críticos del ciclo celular, incluyendo la transición G1/S y la entrada en mitosis (213). Los linfocitos activados, que dependen casi exclusivamente de la vía *de novo* para obtener GTP, ven así limitada su capacidad de proliferación y producción de citocinas (214). Al interrumpir este proceso, el MMF suprime selectivamente la expansión clonal de linfocitos autorreactivos, lo que explica su eficacia con un perfil de seguridad más favorable que otros inmunosupresores al afectar mínimamente a células que utilizan vías alternativas de síntesis de purinas (214).

1.2.4.3 Inhibición de PI3Kδ: leniolisib

Leniolisib es un inhibidor altamente selectivo de la isoforma delta de la PI3K que actúa mediante un mecanismo competitivo reversible, uniéndose específicamente al dominio catalítico de la subunidad p110δ (215). Esta unión impide la interacción entre p110δ y la subunidad reguladora p85α, bloqueando así la conversión de PIP2 a PIP3 en la membrana plasmática de células inmunitarias (216). Al interrumpir esta reacción clave, leniolisib previene la activación de la cascada de señalización **PI3K/AKT/mTOR**, lo que se

traduce en una regulación negativa de la proliferación y supervivencia de linfocitos B y T disfuncionales (216,217). Su especificidad por PI3K δ (expresada principalmente en leucocitos) permite una acción dirigida que normaliza la diferenciación de linfocitos B (reduciendo poblaciones patológicas como las células transicionales y CD21^{low} mientras aumenta los linfocitos B maduros), mejora la función citotóxica de linfocitos T/NK contra infecciones virales, y reduce significativamente los marcadores de activación inmune desregulada (218–220). En el síndrome de APDS, estas acciones farmacológicas corrigen las manifestaciones clínicas principales: disminuyen la linfadenopatía y esplenomegalia, normalizan los niveles de IgM elevada, y mejoran la citopenia autoinmune, todo ello con un perfil de seguridad favorable que muestra mínimos efectos adversos (cefalea leve, diarrea ocasional) y carece de las toxicidades graves asociadas a inhibidores menos selectivos de PI3K (198). La aprobación por la FDA en 2022 como primer tratamiento dirigido para APDS subraya su papel transformador en el manejo de estos trastornos inmunorreguladores (221).

1.2.4.3 Inhibición de mTOR: sirolimus

El **sirolimus** (rapamicina) ejerce su acción inmunosupresora mediante un mecanismo molecular dirigido: al unirse a la proteína **FKBP-12**, forma un complejo que se acopla al dominio de unión a la rapamicina de mTOR en el complejo **mTORC1**, bloqueando su actividad quinasa (222). Esta interacción inhibe específicamente dos blancos clave: la proteína **p70S6K** (reduciendo la síntesis proteica ribosómica) y **4E-BP1** (limitando la iniciación de la traducción), lo que interrumpe la progresión del ciclo celular en fase G1 de los linfocitos T y B activados (223,224). A diferencia de otros inmunosupresores, el sirolimus no afecta las señales tempranas de activación linfocitaria, sino que modula selectivamente su proliferación posterior, preservando además la función de los linfocitos Treg (225). Esta selectividad se explica por tres mecanismos clave: **(1)** las Treg poseen una dependencia metabólica única basada en **β -oxidación de lípidos** (mTORC1-independiente), a diferencia de las células T efectoras que requieren glucólisis aeróbica (mTORC1-dependiente); **(2)** el sirolimus preserva la señalización de **IL-2/STAT5** esencial para la supervivencia Treg, mientras bloquea las vías proinflamatorias (STAT3/mTORC1/p70S6K) que desestabilizan FoxP3; y **(3)** promueve activamente la estabilidad del linaje Treg al inhibir su diferenciación hacia fenotipos Th1/Th17 (vía supresión de sus factores de transcripción T-bet/ROR γ t respectivamente) (225–227). Este mecanismo explica su particular eficacia en síndromes linfoproliferativos como el ALPS, donde controla la expansión clonal patológica manteniendo un perfil de seguridad más favorable que los inhibidores de calcineurina, con menor riesgo de efectos como nefrotoxicidad (228). Estudios clínicos demuestran que el sirolimus aumenta significativamente la proporción de Treg FoxP3⁺ funcionales en pacientes, correlacionándose con menores tasas de rechazo agudo y mejor control de autoinmunidad (229).

1.2.4.4 Inhibición de JAK: ruxolitinib

El **ruxolitinib** es un inhibidor selectivo de las quinasas **JAK1** y **JAK2**, que actúa bloqueando competitivamente el sitio catalítico de estas enzimas, cruciales en la transmisión de señales de citocinas proinflamatorias (230,231). Al unirse al dominio quinasa de JAK, impide la fosforilación y activación de los factores de transcripción **STAT** (especialmente STAT3/STAT5), interrumpiendo así la cascada de señalización JAK-STAT (231). Esta inhibición reduce la expresión de genes implicados en proliferación celular, supervivencia y producción de citocinas (como IL-6, IFN- γ) (232). Su especificidad por JAK1/JAK2 frente a JAK3 le confiere efectos inmunomoduladores clave en síndromes de hiperactivación inmune, donde normaliza la respuesta inflamatoria descontrolada sin suprimir globalmente la inmunidad (233,234). Además, su acción reversible permite un ajuste fino de la dosis, minimizando efectos adversos hematológicos (anemia, trombocitopenia) asociados a la inhibición prolongada de JAK2 en médula ósea (235).

El resumen de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de los PIRD queda reflejado en la siguiente tabla:

Tabla 2 | Resumen los principales fármacos utilizados en el manejo de los PIRD.

Fármaco	Diana principal	PIRD	Uso clave	Referencia
Tacrolimus	Calcineurina	IPEX, HLH	Supresión de linfocitos T autoreactivos	(177,236)
MMF	IMPDH	ALPS, ALPID (APDS, CTLA-4/LRBA)	Reducción de linfocitos B/T autorreactivos	
Leniolisib	PI3K δ	APDS, ALPS	Inhibición de la vía específica PI3K δ	
Sirolimus	mTOR	ALPS, ALPID (APDS, CTLA-4/LRBA)	Control de la linfoproliferación y autoinmunidad	
Ruxolitinib	JAK1/2	STAT3 GOF, HLH	Bloqueo de la señalización de citoquinas	

1.2.4.5 Efecto farmacológico sobre las células Treg

El estudio del impacto de los inmunosupresores sobre las células Treg es clave para optimizar el tratamiento de los ALPID. Su preservación o expansión podría mejorar el perfil de seguridad de las terapias, reduciendo efectos adversos como infecciones o autoinmunidad secundaria. Comprender cómo fármacos como **tacrolimus**, **micofenolato**, **sirolimus**, **leniolisib** y **ruxolitinib** modulan la función y número de las Treg permitiría diseñar estrategias más selectivas: potenciando su actividad supresora cuando sea necesario (ej. en autoinmunidad) o evitando su depleción colateral (ej. en linfoproliferación). Esta aproximación molecular podría equilibrar la eficacia terapéutica y seguridad en los ALPID, donde el desafío es controlar la desregulación inmunitaria sin comprometer la tolerancia.

Medicamentos como el **tacrolimus**, **MMF**, el **sirolimus**, el **ruxolitinib** y el **leniolisib** actúan mediante mecanismos diversos con efectos variables sobre las subpoblaciones de Treg. Por ejemplo, el **tacrolimus** inhibe eficazmente los linfocitos T efectores al suprimir la activación de NFAT inducida por el TCR, lo que también disminuye la expresión de FoxP3 y la producción de IL-2, crucial para el mantenimiento y función de las Treg limitando su utilidad para inducir tolerancia a largo plazo (237–239). En cambio, el **MMF** al inhibir la IMPDH y limitar la síntesis de purinas, afecta preferentemente a linfocitos T convencionales en proliferación, pero puede preservar parcialmente las Treg debido a su menor dependencia metabólica de esta vía (240–243). El **sirolimus** promueve la estabilidad y función de las Treg mediante la inhibición específica de mTORC1, lo que reduce la diferenciación hacia linajes efectores (Th1/Th17) mientras preserva la vía FoxP3 dependiente de mTORC2, esencial para la supervivencia de las Treg (225–227). Por otro lado, el **ruxolitinib** al inhibir JAK1/2, reduce la señalización de IL-2/STAT5 (necesaria para la expansión de las Treg), pero simultáneamente suprime citoquinas como IFN- γ e IL-6 que inducen resistencia a la supresión mediada por las Treg, mejorando así su funcionalidad neta en contextos inflamatorios (244–247). Por su parte, el **leniolisib** representa un enfoque innovador al inhibir selectivamente la vía PI3K δ , crucial en la proliferación y activación de células inmunes (248–251). Si bien ha demostrado eficacia en el síndrome de APDS, su impacto sobre las Treg aún no se ha explorado *in vitro*. Estudiar este efecto es un paso clave para entender su potencial en modular el equilibrio inmunológico, controlando la proliferación excesiva de células inmunes sin comprometer la función de las Treg.

En resumen, el sistema inmunológico es una red altamente especializada que integra mecanismos innatos y adaptativos para garantizar la defensa del organismo, manteniendo al mismo tiempo la tolerancia inmunológica. Las células Treg desempeñan un papel central en este equilibrio, modulando respuestas inflamatorias y previniendo la autoinmunidad. Sin embargo, alteraciones en su desarrollo, función o número, ya sea por defectos genéticos (como en las tregopatías) o por disfunción secundaria (como en otros EII), pueden desencadenar trastornos inmunológicos complejos. El estudio de estas alteraciones no solo ha permitido comprender mejor la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, monogénicas (como el síndrome IPEX, la deficiencia de CTLA-4 o el APDS) y poligénicas, sino que también ha abierto nuevas perspectivas terapéuticas dirigidas a restaurar la homeostasis inmunológica. Avances en el conocimiento de las vías de señalización implicadas, como PI3K/AKT/mTOR, JAK-STAT y NF- κ B, han facilitado el desarrollo de tratamientos más específicos, como inhibidores de mTOR o JAK, que buscan corregir los defectos funcionales de las Treg sin comprometer la inmunidad. Estos hallazgos resaltan la importancia de continuar investigando los mecanismos moleculares que gobiernan la regulación inmunológica para mejorar el diagnóstico y manejo de los PIRD.



2.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

"La ciencia y la vida cotidiana no pueden ni deben separarse."

— *Rosalind Franklin*



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

En la actualidad, se han identificado más de 508 tipos de inmunodeficiencias primarias (**ORPHA 101997**, con una prevalencia de 1-9 por cada 100.000 personas), ahora denominadas errores innatos de la inmunidad (EII), las cuales presentan fenotipos amplios y superpuestos que van desde una mayor susceptibilidad a infecciones hasta una desregulación inmunitaria significativa. La desregulación del sistema inmunológico representa un desafío en pacientes con EII, ya que aún no existen enfoques diagnósticos ni terapéuticos efectivos. Un diagnóstico más preciso de la patología inmunológica subyacente, junto con tratamientos dirigidos, podrían ayudar a controlar la autoinmunidad y la inflamación, previniendo así daños en órganos vitales (especialmente en niños en etapa de desarrollo) y facilitando el acceso a terapias curativas. Las células T reguladoras (Treg) están implicadas en la desregulación inmunológica, por lo que su estudio detallado junto a la caracterización del perfil inmunológico en pacientes con EII con manifestaciones clínicas de desregulación inmunológica podrían servir como biomarcadores para mejorar su diagnóstico y desarrollar terapias innovadoras.

Bajo este contexto, las **hipótesis** planteadas en esta tesis doctoral son las siguientes:

1. Las manifestaciones de desregulación inmunológica en pacientes con EII están directa o indirectamente relacionadas con alteraciones en las **células Treg**, lo cual podrá demostrarse mediante el estudio de su fenotipo y función.
2. La implementación de un enfoque de **medicina personalizada de precisión** en el manejo de los trastornos primarios de regulación inmunológica (PIRD) podría mejorar significativamente la eficacia terapéutica y calidad de vida de los pacientes al seleccionar tratamientos dirigidos a las alteraciones inmunológicas y vías moleculares alteradas en cada paciente. Esta estrategia permitiría reducir los efectos adversos asociados a terapias inmunosupresoras convencionales no específicas y potenciar el uso de fármacos moduladores.

2.2 Objetivos

Teniendo en cuenta las hipótesis planteadas, el **objetivo principal** consistirá en determinar el perfil inmunológico y el papel directo o indirecto de las células Treg en las manifestaciones de desregulación inmunitaria en pacientes pediátricos con EII.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. **Evaluar la presencia de alteraciones en diferentes subpoblaciones inmunológicas** (linfocitos T y B y sus subpoblaciones, monocitos, células dendríticas, células NK, granulocitos), incluyendo marcadores fenotípicos y de diferenciación, en pacientes con EII y desregulación inmunológica, mediante citometría de flujo multiparamétrica.
2. **Caracterizar específicamente la población de células Treg** en pacientes con EII y desregulación inmunológica.
3. **Elucidar las posibles vías inmunológicas implicadas en la desregulación inmunológica en pacientes con EII y desregulación inmunológica.**
 - a) Definir patrones sanguíneos de la inmunopatología subyacente del paciente para un diagnóstico preciso.
 - b) Desarrollar una metodología de evaluación del estado de activación de las vías PI3K/AKT/mTOR, JAK-STAT y NF- κ B mediante análisis proteómico en controles sanos para su posterior aplicación en pacientes con EII.
4. **Evaluar los mecanismos por los cuales los inmunomoduladores actualmente utilizados impactan en el fenotipo de las Treg *in vitro*.**

3.

MATERIAL Y MÉTODOS

"Si sabes que estas en lo correcto, no importa lo que digan los demás."

— Bárbara McClintock



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

3. Material y métodos

Este proyecto se desarrolló en la **Unidad de Inmunología Clínica e Inmunodeficiencias Primarias del Hospital Sant Joan de Déu (HSJD)** y **Hospital Clínic de Barcelona (HCB)**; y el **Laboratorio de Inmuno-Regulación (LIR) del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM)** de Madrid, con el objetivo de caracterizar las alteraciones inmunológicas, especialmente en células Treg, en pacientes pediátricos con EII y manifestaciones de desregulación inmune. Mediante un diseño observacional prospectivo, se analizaron fenotipos celulares y funcionalidad de Treg mediante citometría de flujo multiparamétrica y bioinformática utilizando muestras de pacientes de ambos centros y controles pediátricos sanos del Biobanco del HSJD y del Hospital Universitario Gregorio Marañón (HUGM). Además, se evaluó *in vitro* el efecto de inmunomoduladores sobre Treg y se exploró el uso diagnóstico de las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR, JAK-STAT, NF-κB. La colaboración entre estos centros de referencia permitió reclutar una cohorte significativa de pacientes con EII, una población poco frecuente, pero con alta necesidad de terapias dirigidas, con el fin de mejorar el diagnóstico inmunológico y sentar las bases para futuros tratamientos personalizados, como la terapia con células Treg, que podrían aplicarse no solo en EII sino también en otras enfermedades con desregulación inmune.

3.1 Aspectos éticos

Esta investigación se desarrolló siguiendo protocolos aprobados por el Comité de Ética de Investigación con Medicamentos (CEIm) de la Fundación Sant Joan de Déu, en estricto cumplimiento de los principios éticos internacionales. El estudio se adhirió a: **(1)** la Declaración de Helsinki (revisión de Fortaleza, 2013) de la Asamblea Médica Mundial, **(2)** el Convenio de Oviedo sobre derechos humanos y biomedicina, y **(3)** el marco legal español (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y Real Decreto 1716/2011). En todo momento se garantizó la primacía de los derechos, seguridad y bienestar de los participantes sobre los objetivos científicos, manteniendo sin alteraciones el seguimiento clínico habitual de los pacientes.

Previo a la obtención de muestras biológicas, se implementó un proceso exhaustivo de **consentimiento informado (Anexo 1)** dirigido a padres, madres o tutores legales, complementado con asentimiento escrito en participantes mayores o iguales a 12 años. Durante este proceso, se explicaron detalladamente los objetivos de la investigación, los procedimientos involucrados, los posibles beneficios y riesgos, así como los derechos de los participantes, incluyendo la voluntariedad de su participación y la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento sin consecuencias. Se otorgó un periodo de reflexión adecuado para resolver dudas y tomar una decisión informada, culminando con la firma del documento de

consentimiento por parte de los representantes legales y el investigador principal, quedando una copia a disposición de las familias como constancia del proceso.

El tratamiento de los datos personales y clínicos se rigió por la normativa europea y española vigente en materia de protección de datos y ética en investigación biomédica. Específicamente, se cumplió con: **(1) el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 (RGPD)**, que establece las normas para la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de sus datos personales y a la libre circulación de estos datos; **(2) la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (LOPDGDD)**, que adapta el ordenamiento jurídico español al RGPD y **(3) la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica**, que garantiza el derecho a la intimidad y a la confidencialidad de los datos de salud. Adicionalmente, se diseñó un plan de gestión de datos que queda descrito en el **Anexo 2**.

Los principios éticos que guiaron este trabajo priorizaron en todo momento el bienestar y los derechos de los participantes sobre cualquier otro interés científico o social. Se mantuvo especial atención en proteger la identidad de los menores y en garantizar que su participación no interfiriera con la atención médica habitual que recibían. El diseño del estudio incluyó mecanismos para preservar la privacidad de los datos personales y minimizar cualquier riesgo potencial asociado con la investigación cumpliendo así con los más altos estándares éticos en investigación biomédica con población pediátrica.

3.2 Diseño del estudio de cohorte

Este estudio prospectivo de cohorte observacional incorpora un modelo experimental en el que se analizarán muestras sanguíneas para realizar inmunofenotipado, evaluar la función de las células Treg y estudiar las vías inmunológicas relevantes. El diseño combina el seguimiento longitudinal de los participantes con técnicas de laboratorio avanzadas, integrando así la observación clínica con la investigación traslacional para obtener una comprensión integral de los mecanismos inmunopatológicos. Este enfoque metodológico es particularmente adecuado para el estudio de enfermedades con componente inmunológico, ya que no solo describe las anomalías presentes, sino que también investiga sus bases moleculares subyacentes.

3.2.1 Población de estudio: criterios de inclusión y de exclusión

La investigación se centrará en una cohorte de pacientes pediátricos (≤ 18 años) diagnosticados con EII que presenten desregulación inmunológica (denominados PIRD) siguiendo los criterios establecidos por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID). Para ser incluidos, los participantes deberán mostrar al

menos una de las siguientes manifestaciones clínicas: manifestaciones autoinmunes, linfoproliferación, eccema severo, enfermedad inflamatoria intestinal, granulomas, vasculitis o cuadros similares a linfohistiocitosis hemofagocítica. Además, deberán presentar al menos una anomalía numérica o funcional en los estudios inmunológicos sin evidencia de deficiencia profunda de células T o B. Se excluirán aquellos pacientes con diagnóstico actual de infección por VIH, enfermedades hematológicas en tratamiento con quimioterapia o que no proporcionen su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

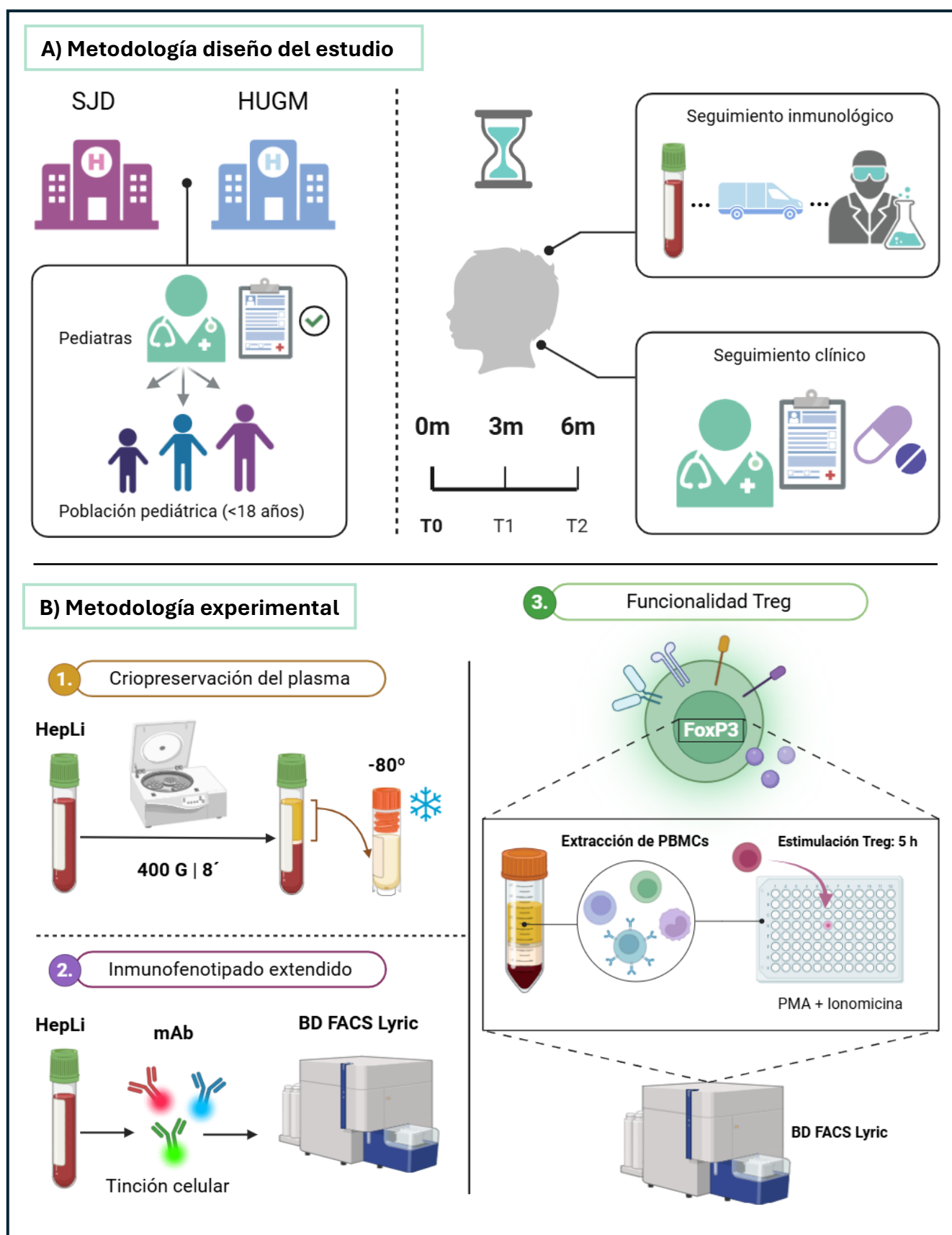
3.2.2 Reclutamiento de pacientes y recolección de muestras

Para la selección de pacientes, se contó con la colaboración de dos hospitales españoles de referencia en el diagnóstico y tratamiento de inmunodeficiencias primarias en población infantil: el Hospital Sant Joan de Déu en Barcelona y el Hospital Gregorio Marañón en Madrid, centros designados como **CSUR** (*Centro, Servicio o Unidad de Referencia*). Ambos centros mantienen una estrecha colaboración con diversas instituciones especializadas a nivel nacional e internacional. Cabe destacar que la Unidad de Inmunología Clínica e Inmunodeficiencias Primarias del Hospital Sant Joan de Déu forma parte de la Red Europea de Referencia (ERN) RITA, dedicada al estudio de las inmunodeficiencias.

El reclutamiento se llevó a cabo durante un periodo de tres años, logrando incluir en el estudio un total de **51 pacientes pediátricos** (aproximadamente 25 casos por cada centro hospitalario). A pesar de tratarse de enfermedades consideradas raras (con una prevalencia de 1-9 / 100,000, **ORPHA 101997**), la participación coordinada de estos dos centros de excelencia permitió alcanzar el número de participantes necesario para garantizar la validez de los resultados. Esta colaboración interinstitucional fue fundamental para superar los desafíos que plantea la investigación en patologías de baja prevalencia. El estudio contempló la realización de análisis de muestras y recogida de datos clínicos iniciales en el momento de inclusión de cada paciente (T0). Cuando el médico responsable indicó la necesidad de iniciar terapia inmunomoduladora, se evaluó la respuesta al tratamiento mediante controles clínicos y pruebas analíticas a los 3 meses (T1) y 6 meses (T2), registrando todos los hallazgos en la historia clínica según los protocolos habituales de seguimiento para estos pacientes. Aproximadamente la mitad de los niños participantes (50%) requirió este tipo de tratamiento inmunomodulador durante el transcurso del estudio. Las variables clínicas recogidas se muestran en el **Anexo 2**.

3.2.3 Estudios inmunológicos

Los estudios inmunológicos realizados sobre los pacientes PIRD incluyen: **1)** Inmunofenotipado extendido a través de citometría de flujo multiparamétrica y **2)** estudio de la funcionalidad Treg a través de su estimulación celular. La **Figura 14** resume la metodología utilizada en el estudio de los PIRD.



3.3 Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras siguió un protocolo estandarizado, con mínimas variaciones según el centro de procedencia. Las muestras consistieron en sangre periférica obtenida por venopunción durante controles clínicos rutinarios, recolectadas en tubos con **heparina de litio** (HepLi) (BD Vacutainer, REF: 368886) para preservar la viabilidad celular. Dada la naturaleza pediátrica del estudio, el volumen de sangre extraída se ajustó al peso del paciente (no se superaron los 10 mL). La HepLi actúa como anticoagulante al potenciar la actividad de la **antitrombina III** (ATIII), inhibiendo así la **trombina** y el **factor Xa** para prevenir la coagulación. A diferencia del EDTA, no quela el calcio, lo que preserva mejor la morfología y funcionalidad celular, (especialmente en leucocitos,) siendo ideal para estudios inmunológicos funcionales como citometría de flujo o ensayos de activación celular (15). Sin embargo, aunque conserva la viabilidad, resulta necesario su procesamiento en fresco (<24h) dado que no inhibe el metabolismo celular a corto plazo, como si lo hace el EDTA. En el proyecto descrito, su uso fue clave para garantizar la calidad de las muestras en los análisis de células Treg y vías de señalización como PI3K/AKT/mTOR, donde la integridad celular era fundamental.

Tras la extracción, las muestras fueron procesadas inmediatamente en fresco para los estudios de inmunofenotipo y función de células Treg, mientras que para los análisis de fosforilación proteica se criopreservaron células mononucleares en sangre periférica (*PBMC*, por sus siglas en inglés). El procesamiento se realizó en paralelo en ambos centros, utilizando protocolos armonizados de citometría de flujo con paneles equivalentes de anticuerpos para garantizar la comparabilidad de resultados. Cabe destacar que, aunque cada centro empleó sus propios citómetros (como el FACS Lyric en HSJD-HCB y el MACSQuant en el IISGM), se asentaron las estrategias de análisis para asegurar la concordancia en las mediciones. Las muestras destinadas a estudios coordinados entre centros fueron transportadas en condiciones controladas, manteniendo siempre la trazabilidad y anonimización de los datos según el plan de gestión aprobado por los comités de ética correspondientes.

3.3.1 Aislamiento y criopreservación del plasma

Una vez recibidas las muestras procedentes del Biobanco del Hospital Sant Joan de Déu, se procedió a su **procesamiento inmediato**. En primer lugar, se separó una alícuota para realizar tinciones de sangre completa. El volumen restante se centrifugó a 400 x *g* durante 8 minutos, siguiendo un protocolo estandarizado por el propio hospital, con el fin de separar el plasma de los componentes celulares. Tras la centrifugación, se observaron dos fases bien diferenciadas en el tubo. La capa superior, correspondiente al plasma, se recolectó cuidadosamente y se distribuyó en varios viales de **500 µL**, dependiendo del volumen obtenido. Estas alíquotas se sometieron a un proceso de criopreservación escalonada, almacenándose

inicialmente a -20°C y posteriormente a -80°C, para garantizar su estabilidad y permitir futuros análisis de citoquinas y autoanticuerpos.

3.3.2 Tinción de sangre completa

Como se mencionó anteriormente, tras la recepción de la muestra se extrajo una alícuota para la **tinción de sangre completa**, siguiendo un protocolo consensuado entre los hospitales de Barcelona y Madrid que minimizó las variaciones metodológicas. Para la tinción de sangre completa fue necesario un volumen de **100 µL** de sangre por panel de citometría para garantizar una adecuada cuantificación de poblaciones celulares poco frecuentes. Para el estudio inmunológico PIRD, se emplearon **6 paneles** en el citómetro **BD FACS Lyric™** (HSJD-HCB) y **4 paneles** en el **MACSQuant® Analyzer 16, Miltenyi Biotec** (liSGM), añadiendo a cada tubo los anticuerpos correspondientes (ver **sección 3.5**), preparados en mezclas el mismo día de la recepción para asegurar su frescura y optimizar el procesamiento, garantizando así resultados consistentes y comparables entre ambos centros. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 15 minutos.

Tras el periodo de incubación, se procedió a la **lisis de eritrocitos y fijación celular** mediante la adición de 2 mL de solución BD FACS™ *Lysing Solution* 1X (**REF:** 349202), manteniendo los tubos a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 15 minutos. Este reactivo combinó simultáneamente la lisis de glóbulos rojos y la fijación de las células de interés. A continuación, las muestras se centrifugaron a 600 x *g* durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con 2 mL de tampón fosfato salino (*PBS*, por sus siglas en inglés) 1X, repitiendo la centrifugación en las mismas condiciones para garantizar la eliminación completa de residuos.

Para el análisis específico de células Treg, se realizó un protocolo diferenciado: tras preparar los demás tubos para su adquisición inmediata en el citómetro, el tubo correspondiente al panel de Treg fue sometido a un proceso de fijación y permeabilización siguiendo las instrucciones del kit *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience™, **REF:** 00-5523-00), seguido de la adición de anticuerpos intracelulares contra FoxP3 y Helios, los cuales se incubaron a 4°C en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente, se lavó la muestra con 2 mL de PBS 1X mediante centrifugación a 600 x *g* durante 5 minutos para eliminar residuos, dejándola lista para su análisis por citometría de flujo.

3.3.3 Aislamiento de PBMCs y estudio funcional de linfocitos Treg

El procedimiento de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (*PBMCs*, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo mediante un gradiente de densidad utilizando **Ficoll-Paque** (Lymphoprep™, **REF:** 04-03-9391/04, STEMCELL™ Technologies). Todo el proceso se realizó en condiciones estériles dentro de

una **cabina de flujo laminar** (modelo Bio II Advanced Plus, Telstar Technologies S.L., con número de serie 532786) para garantizar la ausencia de contaminación microbiana.

Tras extraer el plasma, la sangre restante se diluyó en una proporción mínima de **1:3** con PBS 1X estéril. Posteriormente, la muestra se depositó con cuidado en un tubo Falcon de 30 mL, previamente cargado con 8 mL de Ficoll (una cantidad optimizada según los protocolos del HCB). La centrifugación se realizó a $800 \times g$ durante 20 minutos, utilizando un perfil de **aceleración y frenado suave** (modo *SLOW*) para evitar perturbaciones en la interfase de separación. Una vez finalizada la centrifugación, se extrajo la capa de PBMCs, visible como un halo blanquecino situado sobre el gradiente de Ficoll. Esta fracción celular se transfirió a un nuevo tubo Falcon de 15 mL, que se enrasó con PBS 1X estéril para proceder a dos lavados consecutivos a $600 \times g$ durante 5 minutos, lo que permitió eliminar residuos de Ficoll y células no deseadas, obteniendo un pellet limpio de PBMCs. Finalmente, el pellet se resuspendió en medio de cultivo completo **X-VIVO®** (Lonza, TheraPEAK™, REF: BE02-060Q), suplementado con penicilina/estreptomicina (P/S) 1X y 2% de suero humano AB proporcionado por el banco de sangre y tejidos. Este suero fue previamente inactivado en el servicio de inmunología del HCB mediante tratamiento térmico a 56°C durante 1 hora. Para determinar la concentración celular, se utilizó un contador automático (Mindray, modelo BC-3600), lo que permitió ajustar las células a la densidad requerida para los experimentos posteriores.

Las PBMCs del paciente se mantuvieron en cultivo a 37°C con 5% de CO₂ a una concentración de 1×10^6 células/mL hasta el día siguiente cuando se procedió al estudio funcional de linfocitos Treg, realizando primero un lavado por centrifugación y resuspensión en medio X-VIVO para determinar la concentración exacta mediante contador automático. Una vez ajustada la densidad celular, se sembraron 1×10^6 células por pocillo en placas de 96 pocillos con fondo curvo (COSTAR®, REF: 3799) en un volumen final de 200 µL de medio X-VIVO y se estimularon con forbol-12-miristato-13-acetato (*PMA*, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich, REF: 16561-29-8) e ionomicina (Sigma-Aldrich, REF: 56092-82-1) a una concentración de 50 ng/mL y 1 µg/mL respectivamente durante 1 hora en las mismas condiciones de incubación. Tras lo cual, se añadió monensina (BD GolgiStop™, REF: 51-2092KZ) para bloquear específicamente la secreción de IL-10 sin afectar la expresión de CD69 (un marcador clave de activación celular que sí se ve inhibido por brefeldina A), continuando la incubación durante 4 horas adicionales hasta completar 5 horas de estimulación total. Finalizado este proceso, las células se recolectaron, lavaron con PBS ($600 \times g$, 5 min) y se tiñeron con el tinte de viabilidad BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510 (1 µL/ 10^6 células) junto con el mix de anticuerpos del panel de funcionalidad Treg durante 15 minutos a temperatura ambiente, procediéndose posteriormente a un nuevo lavado y a la tinción intracelular de FoxP3, LAP (*lymphocyte activation products*) e IL-10 siguiendo el protocolo estandarizado para Treg en sangre completa (ver **sección 3.3.2**), para finalmente adquirir las muestras en el citómetro y completar el análisis.

3.4 Impacto de inmunosupresores sobre el fenotipo Treg

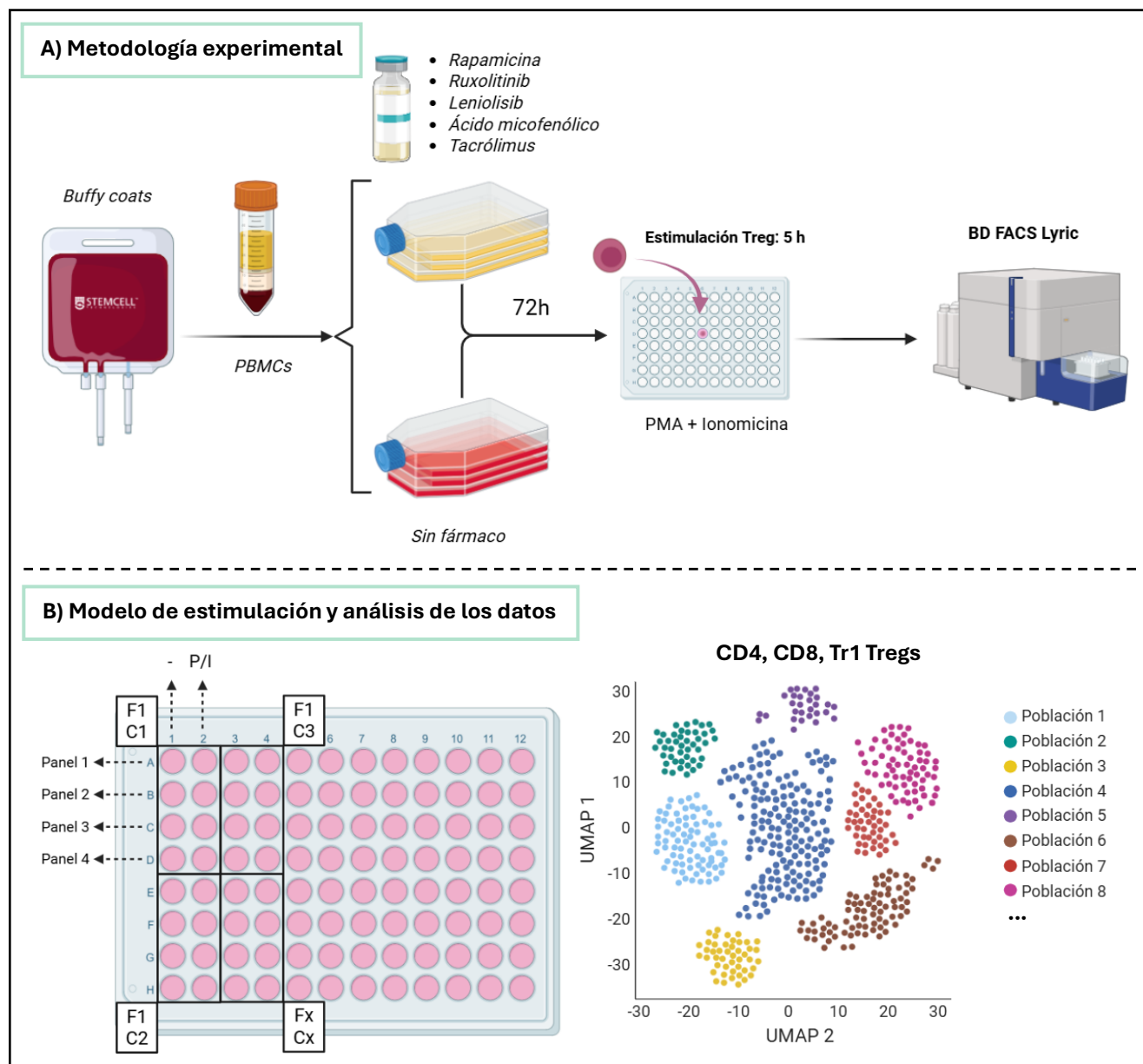


Figura 15 | Resumen gráfico de la metodología utilizada en el estudio del impacto de inmunosupresores sobre el fenotipo Treg. Las siglas F1C1 hacen referencia a fármaco 1, concentración 1 y así sucesivamente. Imagen creada con Biorender.

3.4.1 Obtención de PBMCs de donantes sanos

Las PBMCs se obtuvieron a partir de *buffy coats* de donantes sanos, suministrados por el banco de sangre y tejidos del HCB, utilizando el mismo protocolo de aislamiento descrito previamente para el estudio de la función de las células Treg (sección 3.3.3).

3.4.2 Exposición de PBMCs a fármacos inmunosupresores

Las PBMCs se cultivaron en matraces de 175 cm² con filtro (fisherscientific, **REF:** 353112) conteniendo medio X-VIVO suplementado con P/S y suero humano AB donde se incluyó un control negativo, un control positivo y diferentes concentraciones de cinco fármacos inmunomoduladores (**Tabla 3**): tacrolimus, ácido micofenólico (micofenolato de mofetilo MMF), rapamicina (sirolimus), ruxolitinib y leniolisib seleccionados por su relevancia clínica y efectos reportados sobre células T reguladoras. Los inmunosupresores convencionales (tacrolimus, sirolimus y MMF) son ampliamente utilizados en enfermedades autoinmunes y trasplantes, conocidos por modular la activación de linfocitos T. El ruxolitinib, inhibidor de JAK1/JAK2, se incluyó por su papel en la modulación de vías proinflamatorias. El leniolisib, inhibidor selectivo de PI3Kδ, fue seleccionado por sus efectos en vías relacionadas con la proliferación y función de linfocitos T, particularmente en inmunodeficiencias primarias con disfunción reguladora.

Para evaluar los efectos celulares de tacrolimus, ácido micofenólico (MMF), rapamicina (sirolimus) y ruxolitinib, se utilizaron concentraciones basadas en estudios *in vitro* previamente reportados en la literatura científica (**Tabla 3**). Estas concentraciones seleccionadas fueron corroboradas considerando los niveles terapéuticos monitorizados en pacientes *in vivo*. Sin embargo, para evaluar los efectos celulares del leniolisib dada la ausencia de estudios *in vitro*, se utilizó un rango de concentraciones equivalente a 0.5x, 1x y 5x la concentración plasmática terapéutica máxima (C_{max}) observada *in vivo*, correspondiente a 1.90 µM hasta 18.95 µM. Este enfoque permitió evaluar exposiciones subterapéuticas, terapéuticas y supratrapéuticas para caracterizar exhaustivamente su perfil farmacológico.

Fármaco	Compañía	Concentración	Estudios <i>in vitro</i>	Monitorización terapéutica
<i>Rapamicina</i>	MP Biomedicals™, REF: 159346	20, 100, 500 ng/mL	(252)	(253–257)
<i>Ruxolitinib</i>	Jakavi®, Novartis Pharma AG	0,1, 0,3, 1 µM	(258)	(259,260)
<i>Leniolisib</i>	Joenja®, Pharming Group N.V.	1,90, 3,79, 18,95 µM	(261)	(215,217,221,261)
<i>Ácido micofenólico</i>	Thermo Fisher, REF: J61905.03	5, 10, 15 µg/mL	(252)	(253–257)
<i>Tacrólimus</i>	Prograf®, Astellas Pharma Inc.	5, 10, 15 µg/mL	(254)	(253–257)

Tabla 3 | Inmunosupresores utilizados para evaluar su impacto sobre el fenotipo Treg.

Los fármacos tacrólimus y ruxolitinib se obtuvieron directamente del servicio de farmacia hospitalaria del HCB y HSJD en sus formulaciones clínicas (solución intravenosa y comprimidos, respectivamente), mientras que la rapamicina, el ácido micofenólico y el leniolisib se adquirieron en forma de polvo liofilizado que requirió reconstitución en DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich®, **REF:** D5879-1L), solvente

seleccionado por su capacidad para disolver compuestos hidrofóbicos gracias a su naturaleza polar aprótica, protegiendo además la estabilidad molecular de los fármacos durante la criopreservación a -20°C al prevenir su degradación por hidrólisis u oxidación, y permitiendo su adecuada penetración celular en bajas concentraciones sin afectar la viabilidad. Específicamente para el ácido micofenólico, se optó por la forma activa en lugar del profármaco (micofenolato de mofetilo) debido a la ausencia en los cultivos celulares de las esterasas necesarias para su activación metabólica, asegurando así la disponibilidad inmediata del principio activo para inhibir la IMPDH en los linfocitos. Finalmente, las células se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 72 horas, permitiendo una interacción óptima entre los fármacos y las células en condiciones controladas. Este periodo de incubación fue seleccionado para garantizar una exposición adecuada que permitiera observar los efectos farmacológicos sobre las poblaciones celulares.

3.4.3 Estudio fenotípico de células Treg

Tras completar las 72 horas de incubación, las PBMCs se estimularon y tiñeron utilizando el mismo protocolo y reactivos descritos en el estudio de funcionalidad de células Treg (ver **sección 3.3.3**). Para ello, se sembraron 1×10^6 células por pocillo, empleando cuatro pares de pocillos por concentración de fármaco: uno sin estimular y otro estimulado, destinándose cada par a uno de los cuatro paneles de citometría empleados para este estudio (ver **sección 3.5**). Una vez finalizada la tinción, las células se adquirieron por el citómetro para su análisis.

3.5 Inmunofenotipado (paneles de citometría)

Las muestras de la presente tesis se adquirieron en el citómetro de análisis clínico **BD FACS Lyric™**. El citómetro cuenta con **marcaje CE IVD**, lo que certifica que cumple con los requisitos de la Unión Europea para dispositivos de diagnóstico *in vitro* (IVD, por sus siglas en inglés). Combina alta tecnología con rigurosos controles de calidad para garantizar la precisión y reproducibilidad de los resultados.

Equipado con **tres láseres de estado sólido** (azul, rojo y violeta) y utilizándose en su configuración de **12 colores**, el sistema permitió una caracterización fenotípica más detallada de las poblaciones celulares a estudiar. El láser azul, con una potencia de 20 mW, opera a una longitud de onda (λ) de 488 nm, siendo ideal para fluorocromos clásicos como FITC, PE y sus conjugados (PE-Cy7). El láser rojo, con una potencia de 40 mW, opera a una longitud de onda de 640 nm, optimizado para fluorocromos como APC, APC-Cy7 y APC-R700. Por último, el láser violeta con una potencia de 40 mW, opera a una longitud de onda de 405 nm, esencial para fluorocromos modernos como la serie BD Horizon™ *Brilliant Violet* (BV) 421, 510, 605, 711 y 786. La estabilidad térmica de los láseres, junto con su sistema de autoalineación, optimiza la sensibilidad

y reduce interferencias espectrales, facilitando el análisis multiparamétrico en situaciones de alto rendimiento. La calidad de la adquisición de muestras está respaldada por múltiples controles integrados en el sistema. Entre ellos destaca el uso de BD™ CS&T Beads para realizar controles de calidad (QC) automatizados, que incluyen gráficos de Levey-Jennings para monitorear el rendimiento del instrumento a lo largo del tiempo. Antes de pasar las muestras por el citómetro, se aseguró que el sistema pasaba los controles de calidad usando las CS&T Beads (BD, REF: 656505).

3.5.1 Paneles de sangre completa

Para el estudio exhaustivo del sistema inmunológico de los pacientes PIRD, se diseñaron y optimizaron 6 paneles de citometría que engloban tanto la inmunidad innata como la adaptativa (**Tabla 4**).

Panel	Fluorocromo	mAb	Clon (RUO)	Referencia	Compañía	RRID	Volumen (μL)
(1) <i>Linfocitos T</i>	BV421	CD45RA	HI100	562885	BD	AB_2737864	1,2
	BV510	CXCR5	RF8B2	563105		AB_2738008	4
	BV605	HLA-DR	G46-6	562845			2
	BV711	CD27	M-T271	564893		AB_2739003	2
	BV786	CD31	L133.1	744757		AB_2742460	2
	FITC	CD4	RPA-T4	555346		AB_395751	10
	PE	CXCR3	1C6/CXCR3	557185		AB_396596	10
	PerCP-Cy5.5	CD8	SK1	565310		AB_2687497	4
	PE-Cy7	CCR6	11A9	560620		AB_1727440	2
	APC	CCR10	1B5	564771		AB_2738943	2
	R718	CCR4	1G1	752567		AB_2917554	10
	APC-H7	CD3	SK7	560176		AB_1645475	2
(2) <i>Linfocitos Treg</i>	BV421	CD45RA	HI100	562885	BD	AB_2737864	1,2
	BV510						
	BV605	HLA-DR	G46-6	562845			2
	BV711	CD27	M-T271	564893		AB_2739003	2
	BV786	CD31	L133.1	744757		AB_2742460	2
	FITC	CD4	RPA-T4	555346		AB_395751	10
	PE	CD127	HIL-7R-M21	557938		AB_2296056	4
	PerCP-Cy5.5	CD8	SK1	565310		AB_2687497	4
	PE-Cy7	CD25	M-A251	561405		AB_10646034	4
	Alexa Fluor-647	Helios	22F6	563951		AB_2738506	4
	R718	FoxP3	259D/C7	566935			10
	APC-H7	CD3	SK7	560176		AB_1645475	2
(3) <i>DC / Basófilos</i>	BV421	CD141	1A4	565321	BD	AB_2739180	4
	BV510	CD21	B-ly4	740165		AB_2739918	2
	BV605	HLA-DR	G46-6	562845			2
	BV711						
	BV786						
	FITC	Linaje	NCAM16.2,M	340546		AB_400053	20
	PE	CD1c	F10/21A3	564900		AB_2739006	4
	PerCP-Cy5.5	CD123	7G3	558714		AB_1645547	2
	PE-Cy7	CD11c	B-ly6	561356		AB_10611859	2
		CD34	581	555824		AB_398614	10
	APC	CD117	YB5.B8	550412		AB_398461	4
	R718						
	APC-H7	CD45	2D1	560178		AB_1645479	4

Continuación

(4) T/B / NK	BV421	CD19	HIB19	562440		AB_11153299	2
	V500-C	CD45	HI30	560777		AB_1937324	2
	BV605	CD14	M5E2	564054		AB_2687593	2
	BV711	TCRγδ	11F2	745505		AB_2743041	4
	BV786	CD10	HI10a	564960		AB_2739025	2
	FITC	CD4	RPA-T4	555346	BD	AB_395751	10
	PE	CD56	B159	555516		AB_395906	10
	PerCP-Cy5.5	CD8	SK1	565310		AB_2687497	4
	PE-Cy7	CD16	3G8	557744		AB_396850	1
	APC	CD62L	SK11	566791		AB_2869869	2
	R718						
	APC-H7	CD3	SK7	560176		AB_1645475	2
(5) Linfocitos TFH	BV421	CD45RA	HI100	562885		AB_2737864	1,2
	BV510	CXCR5	RF8B2	563105		AB_2738008	4
	BV605	CD25	BC96	567571		AB_2916650	4
	BV711	ICOS	DX29	563833		AB_2738440	10
	BV786	CD28	L293	742530		AB_2740848	2
	FITC	CD4	RPA-T4	555346	BD	AB_395751	10
	PE	CXCR3	1C6/CXCR3	557185		AB_396596	10
	PerCP-Cy5.5	CD8	SK1	565310		AB_2687497	4
	PE-Cy7	CCR6	11A9	560620		AB_1727440	2
	APC	PD-1	MIH4	558694		AB_1645458	20
	APC-R700	CD127	HIL-7R-M21	565185		AB_2739099	2
	APC-H7	CD3	SK7	560176		AB_1645475	2
(6) Linfocitos B	BV421	CD19	HIB19	562440		AB_11153299	2
	BV510	PD-1	EH12.1	565185		AB_2739099	2
	BV605	CD138	MI15	563294		AB_2738122	5
	BV711	CD27	M-T271	564893		AB_2739003	2
	BV786	CD10	HI10a	564960		AB_2739025	2
	FITC	CD21	B-ly4	561372		AB_10895576	2
	PE	IgD	IA6-2	555779	BD	AB_396114	20
	PerCP-Cy5.5	CD24	ML5	561647		AB_10896818	4
	PE-Cy7	CD38	HIT2	560677		AB_1727473	2
	APC	CD5	UCHT2	555355		AB_398594	10
		CD80	L307.4	567055			2
	R718	CD86	BU63	751920		AB_2917042	2
	APC-H7	CD45	2D1	560178		AB_1645479	4

Tabla 4 | Paneles de citometría y anticuerpos monoclonales utilizados para el inmunofenotipado extendido en sangre completa. El volumen utilizado por test se ha obtenido mediante la titulación de estos. Abreviaturas por sus siglas en inglés: mAB, anticuerpo monoclonal; RUO, uso exclusivo para investigación; BD, Becton Dickinson; RRID, identificador de recurso de investigación.

El uso simultáneo de fluorocromos *Brilliant Violet™* en un mismo panel de citometría de flujo requiere la incorporación del *Brilliant Stain Buffer* (BD, **REF:** 563794) debido a un fenómeno conocido como **interacción entre polímeros conjugados**. Los fluorocromos BV421, BV510, BV605, BV711 y BV786 están basados en polímeros conjugados fluorescentes, presentando estructuras hidrofóbicas que tienden a agregar en una solución acuosa y una alta densidad de cargas negativas debido a sus grupos sulfonados. Al utilizarse simultáneamente en un mismo panel, pueden agregarse e interactuar entre sí, compitiendo por la unión a sus moléculas diana. Estas interacciones no específicas generan **quenching fluorescente** (fenómeno físico-químico que reduce o anula la emisión de fluorescencia de un fluorocromo debido a interacciones no deseadas con su entorno molecular), aumentan el ruido de fondo y distorsionan los datos,

comprometiendo la resolución de poblaciones celulares. El *Brilliant Stain Buffer* resuelve este problema mediante agentes bloqueantes y surfactantes que neutralizan las cargas negativas de los BV y estabilizan su dispersión en solución, asegurando que cada fluorocromo se una eficientemente a su diana correspondiente. Todos los mixes de anticuerpos utilizados para los paneles de sangre completa llevan incorporado *Brilliant Stain Buffer* siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Las poblaciones celulares y sus definiciones fenotípicas para analizar quedan recogidas en la **Tabla 4**. Las estrategias de análisis se pueden consultar en el **Anexo 3**.

Panel	Población	Análisis sobre	Definición fenotípica
(1) <i>Linfocitos T</i>	Linfocitos T	FSC / SSC	CD3+
	Linfocitos T CD4	Linfocitos T	CD3+CD4+
	Linfocitos T CD4 activados	Linfocitos T CD4	CD3+CD4+CD45RA-HLA-DR+
	Linfocitos T CD4 RTE		CD3+CD4+CD45RA+CD31+
	Linfocitos T CD4 naïve		CD3+CD4+CD45RA+CD27+
	Linfocitos T CD4 CM		CD3+CD4+CD45RA-CD27+
	Linfocitos T CD4 EM		CD3+CD4+CD45RA-CD27-
	Linfocitos T CD4 TEMRA		CD3+CD4+CD45RA+CD27-
	Linfocitos T CD4 memoria		CD4 CM, CD4 EM, CD4 TEMRA
	Th0		CD3+CD4+CXCR3-CCR4-CCR6-
	Th1		CD3+CD4+CXCR3+CCR4-CCR6-
	Th2		CD3+CD4+CXCR3-CCR4+CCR6-
	Th9		CD3+CD4+CCR4-CCR6+
	Th17		CD3+CD4+CXCR3-CCR4+CCR6+
	Th22		CD3+CD4+CCR6+CCR4+CXCR3-CCR10+
	Th1-17		CD3+CD4+CXCR3+CCR4-CCR6+
	TFH		CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+
	TFH1	TFH	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+ CXCR3+
	TFH2		CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+ CXCR3-CCR6-
	TFH17		CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+ CCR6+
	TFH22		CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+ CCR6+CCR10+
	TFH1-17		CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25- CD127+CCR6+CXCR3+
	Linfocitos T CD8	Linfocitos T	CD3+CD8+
	Linfocitos T CD8 activados	Linfocitos T CD8	CD3+CD8+CD45RA-HLADR+
	Linfocitos T CD8 RTE		CD3+CD8+CD45RA+CD31+
	Linfocitos T CD8 naïve		CD3+CD8+CD45RA+CD27+
	Linfocitos T CD8 CM		CD3+CD8+CD45RA-CD27+
	Linfocitos T CD8 EM		CD3+CD8+CD45RA-CD27-
	Linfocitos T CD8 TEMRA		CD3+CD8+CD45RA+CD27-
	Linfocitos T DP	Linfocitos T	CD3+CD4+CD8+
	Linfocitos T DN		CD3+CD4-CD8-
(2) <i>Linfocitos Treg</i>	Linfocitos T	FSC / SSC	CD3+
	Linfocitos T CD4	Linfocitos T	CD3+CD4+
	Linfocitos Treg	Linfocitos T CD4	CD3+CD4+CD25 ^{hi} CD127 ^{low}

Continuación

Panel	Población	Análisis sobre	Definición fenotípica
(2) <i>Linfocitos Treg</i> <i>(Continuación)</i>	Linfocitos Treg activados	Linfocitos Treg	CD3+CD4+CD25 ^{hi} CD127 ^{low} CD45RA- HLADR+
	Linfocitos Treg RTE		CD3+CD4+CD25 ^{hi} CD127 ^{low} CD45RA+CD31+
	Linfocitos Treg naïve		CD3+CD4+CD25 ^{hi} CD127 ^{low} CD45RA+CD27+
	Linfocitos Treg CM		CD3+CD4+CD25 ^{hi} CD127 ^{low} CD45RA-CD27+
	Linfocitos Treg EM		CD3+CD4+CD25 ^{hi} CD127 ^{low} CD45RA-CD27-
	Linfocitos Treg TEMRA		CD3+CD4+CD25 ^{hi} CD127 ^{low} CD45RA+CD27-
	nTreg		CD3+CD4+CXCR3-CCR4-CCR6-
	pTreg		CD3+CD4+CXCR3+CCR4-CCR6-
(3) <i>DC / Basófilos</i>	Linfocitos T CD8	Linfocitos T	CD3+CD8+
	Leucocitos	FSC / SSC	CD45+
	Basófilos	Leucocitos	CD45+CD123+SSC ^{low}
	DC		CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+
	DC foliculares		CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+ CD21+
	moDC		CD45+SSC/FSC CD3-CD14-CD11c+
	Pre-pDC		CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+CD11c-CD123+/-
	pDC		CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+CD11c-CD123+
	mDC		CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+CD11c+CD123+/-
	mDC1	mDC	CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+CD11c+CD123+/-BDCA3+
	mDC2		CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+CD11c+CD123+/-BDCA-1+CD16-
	mDC16		CD45+CD3-CD14-CD20-CD56-HLA-DR+CD11c+CD123+/-BDCA-1-CD16+
(4) <i>T / B / NK</i>	Leucocitos	FSC / SSC	CD45+
	Granulocitos	Leucocitos	CD45+ SSC/FSC
	Eosinófilos	Granulocitos	CD45+CD16-CD10-
	Neutrófilos		CD45+CD16+CD10+
	Neutrófilos bandeados	Neutrófilos	CD45+CD16+CD10+CD62L+CD16 ^{low}
	Neutrófilos CD62Ldim		CD45+CD16+CD10+CD62L+CD16+
	Neutrófilos segmentados		CD45+CD16+CD10+CD62L ^{low} CD16+
	NK	Linfocitos	CD3-CD16+/- CD56+/-
	NK CD16+CD56++	NK	CD3-CD16+ CD56++
	NK CD16+CD56+		CD3-CD16+CD56+
	NK CD16+CD56-		CD3-CD16+ CD56-
	NKT	Linfocitos T	CD3+CD16+/- CD56+
	Monocitos	Leucocitos	CD45+ SSC/FSC CD3-CD14+
	Monocitos clásicos	Monocitos	CD45+ SSC/FSC CD3-CD14+CD16-
	Monocitos intermedios		CD45+ SSC/FSC CD3-CD14+CD16+
	Monocitos no clásicos		CD45+ SSC/FSC CD3-CD14 ^{low} CD16+
	Linfocitos B	Linfocitos	CD3-CD19+
	Linfocitos T		CD3+CD19-
	Linfocitos T CD4	Linfocitos T	CD3+CD19-CD4+
	Linfocitos T CD4 γδ	Linfocitos T CD4	CD3+CD19-CD4+TCRγδ+
	Linfocitos T CD8	Linfocitos T	CD3+CD19-CD8+
	Linfocitos T CD8 γδ	Linfocitos T CD8	CD3+CD19-CD8+TCRγδ+

Panel	Población	Análisis sobre	Definición fenotípica
(4) T/B/NK (Continuación)	Linfocitos T DP	Linfocitos T	CD3+CD19-CD4+CD8+
	Linfocitos T DP $\gamma\delta$	Linfocitos T DP	CD3+CD19-CD4+CD8+TCR $\gamma\delta$ +
	Linfocitos T DN	Linfocitos T	CD3+CD19-CD4-CD8-
	Linfocitos T DN $\gamma\delta$	Linfocitos T DN	CD3+CD19-CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +
(5) Linfocitos TFH	Linfocitos T	FSC / SSC	CD3+
	Linfocitos T CD4	Linfocitos T	CD3+CD4+
	TFH	Linfocitos T CD4	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+
	TFH activadas	TFH	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+PD1+ICOS+
	TFH1		CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CXCR3+
	TFH1 activadas	TFH1	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CXCR3+PD1+ICOS+
	TFH2	TFH	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CXCR3-CCR6-
	TFH2 activadas	TFH2	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CXCR3-CCR6-PD1+ICOS+
	TFH17	TFH	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CCR6+
	TFH17 activadas	TFH17	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CCR6+PD1+ICOS+
	TFH1-17	TFH	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CXCR3+CCR6+
	TFH1-17 activadas	TFH1-17	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25-CD127+CXCR3+CCR6+PD1+ICOS+
	TFR	Linfocitos T CD4	CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-CD25+CD127 ^{low}
	Linfocitos T CD8	Linfocitos T	CD3+CD8+
	Linfocitos T CD8 regulador	Linfocitos T CD8	CD3+CD8+CD28-
(6) Linfocitos B	Leucocitos	FSC / SSC	CD45+
	Linfocitos B	Leucocitos	CD45+CD19+
	Linfocitos B activados	Linfocitos B	CD45+CD19+CD80+CD86+
	Linfocitos B senescentes		CD45+CD19+PD-1+
	Linfocitos B IgD+CD27-		CD45+CD19+IgD+CD27-
	Linfocitos B transicionales		CD45+CD19+IgD+CD27-CD10+CD5+CD38 ^{hi} CD24 ^{hi}
	Linfocitos B transicionales activados	Linfocitos B transicionales	CD45+CD19+IgD+CD27-CD10+CD5+CD38 ^{hi} CD24 ^{hi} CD80+CD86+
	Linfocitos B transicionales senescentes		CD45+CD19+IgD+CD27-CD10+CD5+CD38 ^{hi} CD24 ^{hi} PD-1+
	Linfocitos B naïve folicular	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD+CD27-CD10-CD5-CD38 ^{low} CD24 ^{low} / +
	Linfocitos B naïve folicular activados	Linfocitos B naïve folicular	CD45+CD19+IgD+CD27-CD10-CD5-CD38 ^{low} CD24 ^{low} / +CD80+CD86+
	Linfocitos B naïve folicular senescentes		CD45+CD19+IgD+CD27-CD10-CD5-CD38 ^{low} CD24 ^{low} / +PD-1+
	Linfocitos B IgD-CD27+	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD-CD27+
	Linfocitos B de memoria con cambio de isotipo clásico		CD45+CD19+IgD-CD27+CD10-CD24+/-CD38- CD138-

Continuación

Panel	Población	Análisis sobre	Definición fenotípica
(6) <i>Linfocitos B</i> (Continuación)	Linfocitos B de memoria con cambio de isotipo clásico activados	Linfocitos B de memoria con cambio de isotipo clásico	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10-CD24+/-CD38- CD138-CD80+CD86+
	Linfocitos B de memoria con cambio de isotipo clásico senescentes	Linfocitos B de memoria con cambio de isotipo clásico	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10-CD24+/-CD38- CD138-PD-1+
	Linfocitos B de centro germinal	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10+
	Linfocitos B de centro germinal activados	Linfocitos B de centro germinal	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10+CD80+CD86+
	Linfocitos B de centro germinal senescentes		CD45+CD19+IgD-CD27+CD10+PD-1+
	Células plasmáticas	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10-CD24+/-CD38+CD138+
	Células plasmáticas activadas	Células plasmáticas	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10-CD24+/-CD38+CD138+CD80+CD86+
	Células plasmáticas senescentes		CD45+CD19+IgD-CD27+CD10-CD24+/-CD38+CD138+PD-1+
	Plasmablasto	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10- CD24+/-CD38+CD138-
	Plasmablasto activado	Plasmablasto	CD45+CD19+IgD-CD27+CD10- CD24+/-CD38+CD138-CD80+CD86+
	Plasmablasto senescente		CD45+CD19+IgD-CD27+CD10- CD24+/-CD38+CD138-PD-1+
	Linfocitos B IgD-CD27- Linfocitos B de memoria DN	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD-CD27- CD45+CD19+IgD-CD27-CD10-CD5-
	Linfocitos B de memoria DN activados	Linfocitos B de memoria DN	CD45+CD19+IgD-CD27-CD10-CD5-CD80+CD86+
	Linfocitos B de memoria DN senescentes		CD45+CD19+IgD-CD27-CD10-CD5-PD-1+
	Linfocitos B DP Linfocitos B inmaduros	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD-CD27-CD10+CD5+ CD45+CD19+IgD-CD27-CD10+CD5+CD38+CD24+
	Linfocitos B inmaduros activados	Linfocitos B inmaduros	CD45+CD19+IgD-CD27-CD10+CD5+CD38+CD24+CD80+CD86+
	Linfocitos B inmaduros senescentes		CD45+CD19+IgD-CD27-CD10+CD5+CD38+CD24+PD-1+
	Linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD+CD27+
	Linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo activado	Linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo	CD45+CD19+IgD+CD27+CD80+CD86+
	Linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo senescente		CD45+CD19+IgD+CD27+PD-1+
	Breg	Linfocitos B	CD45+CD19+IgD-CD27+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}
	Breg activado	Breg	CD45+CD19+IgD-CD27+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} CD80+CD86+
	Breg senescente		CD45+CD19+IgD-CD27+CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} PD-1+

Tabla 4 | Inmunofenotipado extendido de los pacientes PIRD. Abreviaturas por sus siglas en inglés: FSC, forward scatter; SSC, side scatter; RTE, recién emigrantes tíficas; CM, memoria central; EM, memoria efectora; TEMRA, memoria efectora de diferenciación terminal. Las definiciones fenotípicas están respaldadas por (262).

3.5.2 Panel de funcionalidad Treg

Para el estudio de funcionalidad Treg de los pacientes PIRD, se diseñó y optimizó un panel de citometría que engloba tanto marcadores de inmunosupresión clave en el funcionamiento de estas células como TIGIT, CTLA-4 y PD-1, así como citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y LAP (**Tabla 5**). La elección de detectar LAP en vez de TGF- β libre en ensayos de citometría de flujo intracelular se fundamenta en su **mayor estabilidad, accesibilidad y relevancia biológica**. A diferencia del TGF- β activo, que se secreta rápidamente y es técnicamente difícil de capturar en el compartimento intracelular, LAP forma parte del complejo latente de TGF- β y se acumula en vesículas secretoras, lo que permite su detección. Además, al marcar LAP se evita interferir con la señalización autocrina/paracrina de TGF- β libre, preservando la funcionalidad celular. Esta estrategia es especialmente útil en este estudio de funcionalidad Treg, donde identificar células productoras (LAP+) es más relevante que detectar TGF- β ya secretado.

Por otro lado, dada la ausencia de anticuerpos específicos contra IL-35 (una citoquina heterodimérica cuya detección directa es técnicamente compleja debido a la falta de herramientas que la reconozcan específicamente), el uso de **TIGIT** como marcador indirecto se justifica por su fuerte asociación con poblaciones de Treg FoxP3+ funcionalmente activas.

Panel	Fluorocromo	mAb	Clon (RUO)	Referencia	Compañía	RRID	Volumen (μ L)
(1) Funcionalidad Treg	BV421	LAP	TW7-16B4	565638	BD	AB_2739315	2
	FVS510	Viabilidad		564406		AB_2869572	1
	BV605	TIGIT	741182	747841		AB_2872304	2
	BV711	CD25	2A3	56315			2
	BV786	CD69	FN50	563834		AB_2738441	2
	FITC	CD4	RPA-T4	555346		AB_395751	5
	PE	IL-10		559330		AB_397227	10
	PerCP-Cy5.5	CD8	SK1	565310		AB_2687497	2
	PE-Cy7	CTLA-4	BNI3	567341			2
	APC	PD-1	MIH4	558694		AB_1645458	10
	R718	FoxP3	259D/C7	566935			5
	APC-H7	CD3	SK7	560176		AB_1645475	1

Tabla 5 | Panel de citometría y anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio de funcionalidad Treg en PBMCs. El volumen utilizado por test se ha obtenido mediante la titulación de estos. Abreviaturas por sus siglas en inglés: mAb, anticuerpo monoclonal; RUO, uso exclusivo para investigación; BD, Becton Dickinson; RRID, identificador de recurso de investigación.

El mix de anticuerpos utilizado para este panel lleva incluido *Brilliant Stain Buffer™* dada la presencia simultánea de fluorocromos de la serie BV. Las poblaciones celulares y sus definiciones fenotípicas para analizar quedan recogidas en la **Tabla 6**. Las estrategias de análisis se pueden consultar en el **Anexo 3**.

Panel	Población	Análisis sobre	Definición fenotípica
(1) Funcionalidad Treg	Linfocitos	Vivas	FVS- FSC ^{low} /SSC ^{low}
	Linfocitos T	Linfocitos	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+
	Linfocitos T CD4	Linfocitos T	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+ CD4+
	Linfocitos T CD4 activados	Linfocitos T CD4	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+
	Linfocitos T CD4 funcionales	Linfocitos T CD4 activados	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+TIGIT+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+LAP+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+IL-10+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+CTLA-4+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+PD-1+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+TIGIT+LAP+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+LAP+IL-10+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+LAP+CTLA-4+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD69+CTLA-4+PD-1+
	Treg	Linfocitos T CD4	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD25 ^{hi} FoxP3+
	Treg activados	Treg	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+
	Treg funcionales	Treg activados	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ TIGIT+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ LAP+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ IL- 10+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ CTLA- 4+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ PD- 1+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ TIGIT+LAP+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ LAP+IL-10+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ LAP+CTLA-4+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+CD4+ CD25 ^{hi} FoxP3+CD69+ CTLA- 4+PD-1+
	Linfocitos T CD8	Linfocitos T	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+ CD8+
	Linfocitos T CD8 activados	Linfocitos T CD8	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+ CD8+CD69+
	Linfocitos T CD8 funcionales	Linfocitos T CD8 activados	FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+ CD8+CD69+CTLA-4+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+ CD8+CD69+IL-10+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+ CD8+CD69+PD-1+ FVS-FSC ^{low} /SSC ^{low} CD3+ CD8+CD69+CTLA-4+IL-10+

Tabla 6 | Funcionalidad de pacientes PIRD. Abreviaturas por sus siglas en inglés: FVS, tinte de viabilidad; FSC, forward scatter; SSC, side scatter.

3.5.3 Paneles de inmunofarmacología

Para estudiar el impacto de inmunosupresores sobre el fenotipo regulador, se diseñaron 4 paneles de citometría para explorar diferentes poblaciones reguladoras incluyendo Treg CD4+, poblaciones CD8+ y Tr1 (Tabla 7).

Panel	Fluorocromo	mAb	Clon (RUO)	Referencia	Compañía	RRID	Volumen (μL)
(1) <i>Treg CD4 (I)</i>	BV421	TIM-3	7D3	565562	BD	AB_2744369	1
	V500	CD3	SP34-2	560770		AB_1937322	1
	BV605	GITR	V27-580	747664		AB_2744226	2
	BV711	TIGIT	741182	747839		AB_2872302	2
	BV786	CD127	HIL-7R-M21	563324		AB_2738138	2
	FITC	CD4	RPA-T4	555346		AB_395751	5
	PE	FoxP3	236A/E7	560852		AB_10563418	2
	BB700	CD25	BC96	567481			1
	PE-Cy7	CD45RA	5H9	561216		AB_10611721	1
	Alexa Fluor-647	Helios	22F6	563951		AB_2738506	2
	R718	ICOS	DX29	751854		AB_2916982	1
	FVS780	Viabilidad		565388		AB_2869673	1
(2) <i>Treg CD4 (II)</i>	BV421	PD-1	7D3	565562	BD	AB_2744369	1
	V500	CD3	SP34-2	560770		AB_1937322	1
	BV605	CD73	V27-580	747664		AB_2744226	2
	BV711	CD39	741182	747839		AB_2872302	2
	BV786	CD127	HIL-7R-M21	563324		AB_2738138	2
	FITC	CD4	RPA-T4	555346		AB_395751	5
	PE	FoxP3	236A/E7	560852		AB_10563418	2
	BB700	CD25	BC96	567481			1
	PE-Cy7	CTLA-4	5H9	561216		AB_10611721	1
	Alexa Fluor-647	Helios	22F6	563951		AB_2738506	2
	R718						
	FVS780	Viabilidad		565388		AB_2869673	1
(3) <i>CD8</i>	BV421	PD-1	MIH4	564323	BD	AB_2738745	1
	V500	CD3	SP34-2	560770		AB_1937322	1
	BV605						
	BV711						
	BV786	CD122	Mik-β3	743118		AB_2741295	2
	FITC	CD8	HIT8a	555634		AB_395996	2
	PE	FoxP3	236A/E7	560852		AB_10563418	2
	BB700						
	PE-Cy7	CD56	B159	557747		AB_396853	1
	Alexa Fluor-647						
	R718	CD28	CD28.2	567492			1
	FVS780	Viabilidad		565388		AB_2869673	1
(4) <i>Tr1</i>	BV421	LAG-3	T47-530	565720	BD	AB_2744330	1
	V500	CD3	SP34-2	560770		AB_1937322	1
	BV605						
	BV711	CD49b	AK-7	742647		AB_2740940	2
	BV786						
	FITC	CD4	RPA-T4	555346		AB_395751	5
	PE	FoxP3	236A/E7	560852		AB_10563418	2
	BB700						
	PE-Cy7						
	Alexa Fluor-647						
	R718						
	FVS780	Viabilidad		565388		AB_2869673	1

Tabla 7 | Panel de citometría y anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio de inmunofarmacología en Treg. El volumen utilizado por test se ha obtenido mediante la titulación de estos. Abreviaturas por sus siglas en inglés: mAb, anticuerpo monoclonal; RUO, uso exclusivo para investigación; BD, Becton Dickinson; RRID, identificador de recurso de investigación.

El mix de anticuerpos utilizado para este panel lleva incluido *Brilliant Stain Buffer™* dada la presencia simultánea de fluorocromos de la serie BV. La identificación de las poblaciones celulares emergentes tras el análisis se expondrá en el bloque de resultados (sección x.x.x).

3.6 Puesta a punto de la evaluación del estado de activación de las vías PI3K/AKT/ mTOR, JAK-STAT y NF-κB

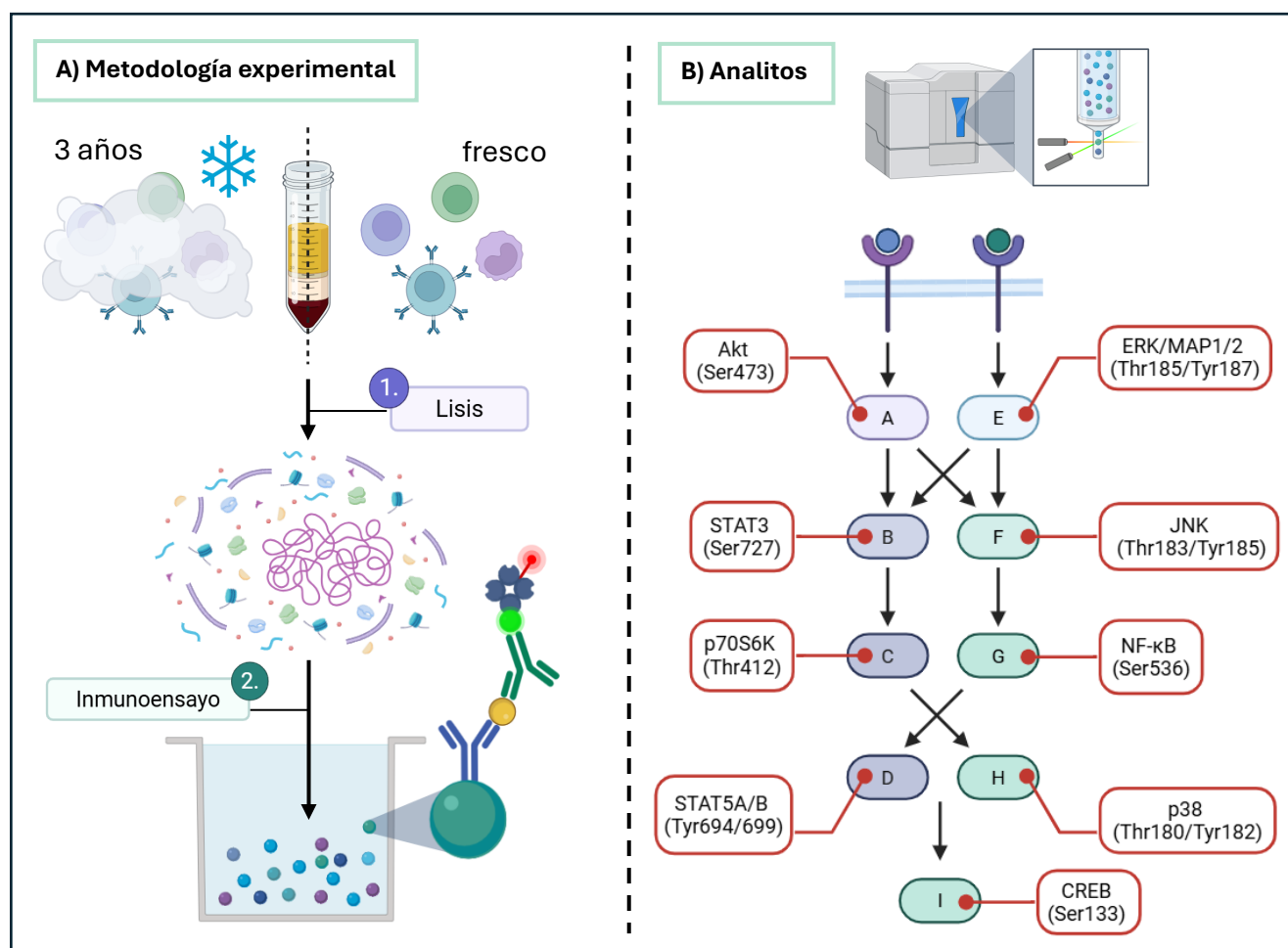


Figura 16 | Resumen gráfico de la metodología utilizada en el desarrollo de una metodología de evaluación del estado de activación de las vías PI3K/AKT/mTOR/JAK-STAT y NFκB. El panel B) representa una vía de señalización ficticia con el fin de mostrar solamente los analitos del ensayo. Imagen creada con Biorender.

Para evaluar el estado de activación de las principales vías de señalización implicadas en la regulación inmune, se utilizó el kit MILLIPLEX® *Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Signaling* (Millipore®, REF: 48-680MAG) para fosfoproteínas. Este se utiliza para detectar cambios en la fosforilación de ERK/MAP quinasa 1/2 (Thr185/Tyr187), Akt (Ser473), STAT3 (Ser727), JNK (Thr183/Tyr185), p70S6K (Thr412), NF-κB (Ser536), STAT5A/B (Tyr694/699), y p38 (Thr180/Tyr182) en lisados celulares utilizando el sistema

Luminex®. Este ensayo de detección es una alternativa rápida y conveniente a los procedimientos de inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) e inmunoprecipitación.

Para la puesta a punto, se utilizaron PBMCs de donantes sanos tanto frescas como congeladas en un tiempo de 3 años, tiempo máximo al que están las PBMCs de los pacientes PIRD criopreservadas para su procesamiento (**Figura 16**).

Las PBMCs se obtuvieron a partir de *buffy coats* de donantes sanos, suministrados por el Banco de Sangre y Tejidos del HCB, utilizando el mismo protocolo de aislamiento descrito previamente para el estudio de la función de las células T reguladoras (**sección 3.3.3**). En el caso de las PBMCs criopreservadas, estas se descongelaron en baño maría a 37°C y se lavaron tres veces con medio de cultivo X-VIVO mediante centrifugación a $600 \times g$ durante 10 minutos. Finalmente, se realizó un último lavado con PBS 1X frío para asegurar la eliminación de residuos.

Para el inmunoensayo, se procedió primero a la lisis celular utilizando el buffer *MILLIPLEX® Lysis Buffer* (**REF: 43-040**), el cual contiene inhibidores de fosfatasas, incluido ortovanadato de sodio (1 mM Na_3VO_4). Dado que este buffer no incluye inhibidores de proteasas, se añadió adicionalmente el *Protease Inhibitor Cocktail Set III, Animal-Free* (Calbiochem, **REF: 535140**) en una proporción de 1 μL por cada 100 μL de buffer. El volumen total de buffer de lisis se ajustó en función del número de células, empleando 1 mL por cada 1×10^7 células. Tras la adición de los reactivos, los lisados se incubaron durante 10-15 minutos a 4°C en agitación orbital suave y posteriormente se centrifugaron a $5.000 \times g$ durante 10 minutos para eliminar restos celulares.

Antes de iniciar el inmunoensayo, los lisados se diluyeron al menos 1:1 con el *MILLIPLEX® Assay Buffer* (1X, **REF: 43-041**). Simultáneamente, se acondicionó la placa añadiendo 50 μL de este mismo buffer por pocillo, seguido de una incubación con agitación orbital (600-800 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se prepararon los reactivos necesarios especificados en la siguiente tabla:

Reactivo	Referencia
Perlas magnéticas	
MILLIPLEX® 9-plex Multi-Pathway, Magnetic Beads (20X)	42-680MAG
GAPDH MAPmate™	46-667MAG
Lisados celulares liofilizados	
MILLIPLEX® HeLa Cell Lysate: Unstimulated	47-205
MILLIPLEX® A431 Cell Lysate: EGF	47-210
MILLIPLEX® HeLa Cell Lysate: TNF α /Calyculin A	47-230
MILLIPLEX® MCF7 Cell Lysate: IGF1	47-216

Tabla 8 | Reactivos del inmunoensayo MILLIPLEX® Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Signaling. GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; EGF, factor de crecimiento epidérmico; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; IGF1, factor de crecimiento insulínico 1.

Las perlas magnéticas, suministradas como solución concentrada **20X** y sensibles a la luz, requirieron un proceso de homogeneización previo a su uso. Para el kit *MILLIPLEX® 9-plex Multi-Pathway*, esto implicó una sonicación de 15 segundos del vial seguida de vortex durante 30 segundos. La dilución a concentración **1X** se realizó mezclando cuidadosamente 150 µL de la suspensión de perlas con 2,85 mL de *MILLIPLEX® Assay Buffer*. Cuando se optó por omitir la cuantificación proteica directa, se utilizó GAPDH como control interno de normalización. Es importante destacar que este sistema permite incorporar hasta nueve MAPmates™ adicionales especializados en fosforilación, los cuales siguen un idéntico protocolo de preparación que las perlas principales.

Como controles de calidad, se emplearon lisados celulares liofilizados en diferentes condiciones de estimulación. El **HeLa Cell Lysate: Unstimulated** representó la línea base sin tratamiento, mientras que los lisados estimulados incluyeron **células A431** expuestas a 100 ng/mL de EGF durante 5 minutos, **células MCF7** tratadas con 50 ng/mL de IGF-1 por 10 minutos, y **células HeLa** sometidas a un protocolo secuencial de 50 nM de Calyculina A (15 min) seguido de 50 ng/mL de TNFα (15 min). Todos estos lisados se prepararon por la casa comercial utilizando un tampón especial de lisis *MILLIPLEX®* con inhibidores de proteasas y se conservaron mediante liofilización. Para su reactivación, cada liofilizado se reconstituyó en 100 µL de agua MilliQ, obteniendo una concentración proteica final de 2 mg/mL, seguido de vortex suave e incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. La adición posterior de 150 µL de *MILLIPLEX® Assay Buffer* completó la preparación de estas muestras de control.

El protocolo de inmunoensayo comenzó con la eliminación del líquido residual de la placa mediante inversión sobre papel absorbente. Las suspensiones de perlas magnéticas, previamente homogeneizadas por vortex durante 10 segundos, se dispensaron en alícuotas de 25 µL por pocillo, incluyendo tanto las perlas *MILLIPLEX® 9-plex Multi-Pathway 1X* como las *GAPDH MAPmate™ 1X*. La placa sellada se incubó durante 16-20 horas a 2-8°C bajo agitación orbital constante (600-800 rpm), manteniéndose protegida de la luz en todo momento.

Para la etapa de detección, se prepararon diluciones **1X** de los anticuerpos biotinilados y reactivos asociados. El anticuerpo *MILLIPLEX® 9-plex Multi-Pathway (REF: 44-680KMG)* y el *anti-GAPDH (REF: 46-667MAG)* se diluyeron mezclando 150 µL de cada concentrado **20X** con 2,85 mL de buffer, mientras que la estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) (**REF: 45-001H**) requirió 120 µL del concentrado **25X** en 2,88 mL de buffer. Tras la incubación prolongada, las perlas se sedimentaron mediante separación magnética durante 1 minuto y se lavaron exhaustivamente con 100 µL de buffer por pocillo, repitiendo este proceso dos veces. La adición de 25 µL de la mezcla de anticuerpos de detección marcó el inicio de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

El protocolo continuó con un nuevo ciclo de lavado seguido de la adición de 25 µL de SAPE por pocillo, incubando durante 15 minutos en condiciones idénticas. Sin eliminar este reactivo, se incorporó 25 µL de

MILLIPLEX® Amplification Buffer por pocillo para una incubación adicional de 15 minutos. La etapa final consistió en un último lavado y la resuspensión de las perlas en 150 μ L de buffer, con agitación continua durante 10 minutos para garantizar homogeneidad antes de la lectura en el equipo Luminex, el cual debía haber superado los controles de calidad y calibración al menos 24 horas antes de su uso. El resumen del procedimiento queda reflejado en la **Figura 16**.

3.7 Análisis de datos

3.7.1 Análisis de datos de citometría de pacientes PIRD

Para el procesamiento y análisis de los datos de citometría de los pacientes PIRD, se empleó el software de análisis celular **FlowJo** (BD Life Sciences), que permite realizar análisis convencionales mediante *gating* manual. Se diseñaron plantillas de análisis específicas para cada panel de anticuerpos utilizado. En los casos donde fue necesario, se utilizaron controles de Fluorescencia Menos Uno (*FMO*, por sus siglas en inglés) para establecer con precisión los umbrales entre poblaciones negativas y positivas, mejorando la caracterización de subpoblaciones celulares. Los datos fueron analizados con herramientas bioinformáticas avanzadas haciendo uso del programa R (**versión 4.3.2**) (códigos disponibles en el **Anexo 4**).

3.7.1.1 Análisis bioinformático del perfil inmunológico de pacientes PIRD

El dataset consistía en **51 pacientes, 6 controles y 114 variables inmunológicas** representadas como porcentajes de células positivas para distintos marcadores, correspondientes a diversas subpoblaciones del sistema inmune. Los datos fueron importados desde un archivo Excel y organizados en una matriz donde las filas representaban individuos y las columnas, proporciones celulares. Previo al análisis, se evaluó la existencia de valores perdidos (NA) y se aplicó un proceso de imputación múltiple mediante el algoritmo **MICE** (*Multivariate Imputation by Chained Equations*), realizando una sola imputación ($m = 1$) con cinco iteraciones ($\text{maxit} = 5$). Esta técnica permite estimar de manera robusta los valores ausentes respetando la estructura multivariada de los datos. Finalizada la imputación, se generó un nuevo objeto con los datos clínicos completos y listos para ser utilizados en modelos supervisados.

Como paso inicial del análisis bioinformático, se evaluó la distribución estadística de cada variable en T0 mediante el **test de Shapiro-Wilk**, con el fin de determinar la adecuación del uso de métodos paramétricos o no paramétricos en los análisis posteriores. Esta prueba se aplicó de manera individual a cada variable tanto antes como después de una normalización mediante **z-score**. La transformación z-score se aplicó a todas las variables inmunológicas con el objetivo de estandarizar las escalas de medición, centrar los valores alrededor de una media cero y escalar la varianza a uno. Esta normalización fue especialmente

importante para la aplicación de técnicas de reducción de dimensionalidad y agrupamiento multivariante. A continuación, se procedió a explorar la estructura latente de los datos mediante el algoritmo **UMAP** (*Uniform Manifold Approximation and Projection*), una técnica no lineal de proyección que preserva la estructura local y global del espacio de alta dimensión en una representación bidimensional.

Durante la fase exploratoria inicial, se evaluó la presencia de efectos técnicos asociados a la procedencia geográfica de las muestras (efecto de lote), utilizando metadatos de origen. Para corregir dicho efecto, se empleó el algoritmo **ComBat**, un método empírico bayesiano ampliamente validado para la corrección de *batch effects* en estudios ómicos. ComBat se aplicó a los datos normalizados previamente mediante z-score, asegurando que se mantuviera la variabilidad biológica mientras se eliminaban sesgos sistemáticos debidos a diferencias técnicas entre lotes.

Una vez corregidos los datos, se aplicó nuevamente UMAP para obtener una representación bidimensional corregida, sobre la cual se implementó un análisis de **clustering no supervisado** utilizando el algoritmo **K-means**. La determinación del número óptimo de clusters (k) se realizó mediante tres enfoques complementarios: el **método del codo** (*elbow method*), el **coeficiente de silueta promedio** (*average silhouette width*) y la **estadística de la brecha** (*gap statistic*). Estos métodos permitieron establecer de forma robusta el valor de k a utilizar para segmentar a los pacientes en subgrupos inmunofenotípicos. Posteriormente, se elaboraron mapas de calor (heatmaps) de los valores promedio por grupo (clusters y controles) a partir de los datos estandarizados. Estos heatmaps se construyeron tanto para todas las variables inmunológicas como específicamente para subconjuntos inmunorreguladores seleccionados (como células Treg, Breg y Tfr), lo que facilitó una visualización comprensiva de los patrones celulares a nivel de grupo.

Para identificar las variables con mayor capacidad discriminativa entre grupos, se entrenó un modelo de clasificación **Random Forest** utilizando las variables inmunológicas como predictores y los grupos como clases. El modelo fue entrenado con 500 árboles de decisión y se utilizó la métrica de **Mean Decrease Gini** para estimar la importancia relativa de cada variable en la clasificación. Las variables fueron posteriormente ordenadas en función de su peso predictivo.

A nivel estadístico, se aplicó el **test no paramétrico de Kruskal-Wallis** para comparar la distribución de cada variable entre los grupos definidos por clustering. Dado el elevado número de variables evaluadas de forma simultánea, se aplicó una **corrección por FDR** (*False Discovery Rate*) utilizando el **método de Benjamini-Hochberg** para controlar la proporción de falsos positivos. Para las variables que resultaron significativas tras esta corrección, se realizó un **análisis post hoc mediante el test de Dunn** para comparaciones múltiples por pares entre grupos, aplicando de nuevo una corrección por FDR.

3.7.1.2 Análisis bioinformático de la funcionalidad Treg

Para el análisis centrado en la **evaluación funcional de las células Treg**, se integraron datos derivados de citometría multicolor con énfasis en la expresión de marcadores funcionales. El conjunto de variables funcionales incluyó cuantificaciones relativas de proteínas reguladoras tales como CTLA-4, PD-1, TIGIT, LAP e IL-10, evaluadas en distintas poblaciones linfoides (Treg, CD4⁺, CD8⁺). Como paso preliminar, se evaluó la existencia de valores perdidos (NA) y se aplicó un proceso de imputación múltiple mediante el algoritmo **MICE** y se analizó la distribución estadística de las variables mediante el **test de Shapiro-Wilk**, aplicado tanto sobre los datos originales como sobre los datos transformados mediante z-score. Esta evaluación permitió determinar la adecuación de métodos paramétricos o no paramétricos para los análisis posteriores.

Posteriormente, todas las variables funcionales fueron sometidas a una normalización tipo **z-score**, con el objetivo de homogeneizar la escala de las mediciones e igualar la media y varianza, condición necesaria para la posterior aplicación de técnicas de reducción de dimensionalidad. Como parte del control de calidad de los datos, se volvió a aplicar el test de Shapiro-Wilk a las variables normalizadas, para evaluar la mejora en la aproximación a la normalidad estadística. Dado que la distribución de muchas variables continuó siendo no gaussiana, se estableció que todos los análisis estadísticos posteriores emplearían enfoques no paramétricos.

Para caracterizar el perfil funcional inmunológico basal, se realizaron representaciones gráficas de distribución por grupos (pacientes T0 y controles) mediante gráficos tipo violín, que permiten visualizar tanto la dispersión individual como la densidad relativa de expresión por variable. Estas visualizaciones se realizaron sobre un subconjunto reducido de pacientes y controles con datos funcionales completos. Además, se desarrollaron **redes de coexpresión funcional** basadas en **correlaciones de Spearman**, construyendo graficos independientes para pacientes, controles y una red combinada. Estas redes fueron diseñadas para capturar la arquitectura funcional del sistema inmune y explorar las relaciones coordinadas entre poblaciones celulares inmunorreguladoras. En cada red, los nodos representaron variables inmunológicas y las aristas se definieron en función del coeficiente de correlación, visualizando tanto la dirección (positiva/negativa) como la magnitud de las asociaciones.

Para explorar posibles estructuras latentes en el espacio funcional, se aplicó la técnica de reducción de dimensionalidad **UMAP**, utilizando exclusivamente los marcadores funcionales inmunorreguladores como variables de entrada. Previo a este análisis, se realizó una corrección por efecto de lote utilizando el algoritmo **ComBat**, para eliminar posibles sesgos técnicos asociados a la procedencia geográfica de las muestras. Sobre el espacio latente generado por UMAP, se aplicó el algoritmo **K-means** para identificar

subgrupos funcionales entre los pacientes. La elección del número óptimo de clusters se realizó mediante el método del codo, el coeficiente de silueta y validaciones empíricas internas.

Una vez definidos los clústeres funcionales, se generaron mapas de calor del perfil promedio de expresión funcional estandarizada por grupo (clusters de pacientes y controles). Estos heatmaps permitieron una visualización global del patrón funcional inmunorregulador de cada grupo, y sirvieron como base para el análisis comparativo posterior.

Para identificar los marcadores funcionales con mayor capacidad discriminativa entre los grupos definidos, se entrenó un modelo de clasificación basado en **Random Forest**. Este modelo utilizó como predictores todas las variables funcionales inmunológicas, aplicando un ensemble de 500 árboles de decisión. La importancia de cada marcador se evaluó mediante la métrica de **Mean Decrease Gini**, que cuantifica la reducción en la impureza del modelo atribuible a cada variable.

Posteriormente, se aplicaron análisis estadísticos no paramétricos mediante el **test de Kruskal-Wallis** para detectar diferencias globales entre los grupos en cada variable funcional. Dado el número elevado de comparaciones simultáneas, se aplicó una **corrección por FDR** mediante el **método de Benjamini-Hochberg** para controlar la tasa de falsos descubrimientos. Para las variables significativas tras esta corrección, se realizaron comparaciones múltiples post hoc mediante el **test de Dunn**, también ajustado por FDR, con el objetivo de identificar qué pares de grupos presentaban diferencias específicas.

3.7.1.3 Análisis bioinformático de la integración clínica

El análisis integrativo se diseñó con el objetivo de combinar, en un único espacio multidimensional, los datos obtenidos a partir de tres fuentes principales: inmunofenotipado multiparamétrico por citometría convencional, evaluación funcional inmunorreguladora y variables clínicas clave. Estas últimas incluyeron **edad**, **grupo clínico** (0 = infecciones aisladas (incluidos por presentar mutaciones descritas asociadas a PIRD), 1 = ALPID-ALPS, 2 = defecto tímico/AI sistémica, 3 = susceptibilidad VEB/HLH, 4 = VEOIBD), **tipo de mutación genética** (0 = sin mutación, 1 = *NFKB1*, 2 = *FAS*, 3 = *APDS*, 4 = otras) **uso de inmunosupresor basal** (T0) (0 = no, 1 = sí), **sexo** (0 = hombre, 1 = mujer) y **uso de inmunomodulador basal** (T0) (0 = no, 1 = sí) al momento de la inclusión.

Como paso inicial, se consolidó toda la información en un único archivo estructurado en formato CSV. Este conjunto de datos integró variables cuantitativas y cualitativas provenientes de los bloques anteriores, asegurando que cada muestra de paciente incluyera valores correspondientes a todas las dimensiones analizadas. Las variables cuantitativas fueron normalizadas mediante transformación **z-score**, con el fin de homogeneizar las escalas numéricas y permitir un análisis conjunto de múltiples fuentes heterogéneas.

Para controlar posibles efectos técnicos derivados de la procedencia geográfica, se aplicó el algoritmo **ComBat** para la corrección por efecto de lote, usando como variable de ajuste el centro de origen.

Una vez completado el proceso de normalización y corrección, se aplicó la técnica de reducción de dimensionalidad **UMAP** sobre el conjunto integrado. Este enfoque permitió proyectar las muestras en un espacio bidimensional, conservando tanto la proximidad local como la estructura global del sistema. En este espacio, se representaron conjuntamente las muestras correspondientes a todos los puntos temporales disponibles (T0, T1, T2) y los controles, para explorar la estructura global de los datos en el tiempo. Sobre el mismo espacio UMAP, se aplicó el algoritmo de clustering **K-means**, cuya (k) fue determinada empíricamente mediante los tres criterios anteriormente mencionados.

Para evaluar la consistencia temporal de la pertenencia de cada paciente a un determinado clúster, se analizó su trayectoria longitudinal entre los tres puntos de recogida (T0, T1, T2). Se comparó su asignación de clúster en cada uno de estos momentos, permitiendo explorar la estabilidad o inestabilidad fenotípica inmunológica a lo largo del tiempo.

Además, se generaron **mapas de calor complejos (heatmaps)** para visualizar patrones globales de coexpresión y asociación entre las variables inmunológicas y clínicas. Se utilizaron escalas cromáticas estándar para representar la abundancia relativa o la presencia/ausencia de características clínicas. En algunos casos, se representaron exclusivamente las variables clínicas cualitativas para explorar la estructura emergente sin el sesgo de las variables cuantitativas.

Finalmente, se evaluó la **distribución diferencial de variables clínicas** entre los clústeres identificados mediante K-means. Para ello, se aplicaron análisis descriptivos univariados (proporciones, medianas) y representaciones gráficas específicas para comparar la edad, sexo, tipo de mutación genética, uso de inmunosupresores o inmunomoduladores, y el grupo clínico entre clústeres. Este análisis permitió explorar la posible asociación entre los patrones inmunofenotípicos y funcionales con características clínicas relevantes.

3.7.2 Análisis de datos de citometría de inmunofarmacología

Los archivos FCS derivados de los distintos tratamientos farmacológicos fueron procesados mediante el programa de análisis **OMIQ** (Dotmatics). La exploración de la estructura fenotípica global se realizó mediante el algoritmo de reducción de dimensionalidad **UMAP** previo control de calidad y limpieza de los datos haciendo uso del algoritmo **PeacoQC**, y escalado de los marcadores. Los mapas UMAP fueron generados individualmente para cada fármaco y visualizados con codificación por densidad celular.

Para la identificación no supervisada de subpoblaciones celulares, se aplicó el algoritmo **FlowSOM** tras extracción de las intensidades transformadas para los marcadores incluidos en el panel. El número óptimo

de clústeres (k) fue determinado mediante el método del codo (elbow method) y por clusterización supervisada. Posteriormente, se calcularon las medianas de fluorescencia (MFI) por clúster y marcador, generándose un heatmap de expresión. La clasificación semicuantitativa de las MFI como baja, intermedia o alta se aplicó para asignar perfiles funcionales a cada clúster, que luego fueron agrupados en subpoblaciones inmunológicas mayores basadas en similitud de expresión.

Para cuantificar el impacto de cada tratamiento, se calculó el porcentaje relativo de cada subpoblación inmunológica respecto al total de eventos CD4⁺ por muestra y condición experimental. Estas proporciones fueron sometidas a análisis estadístico mediante pruebas no paramétricas, debido a la distribución no normal de los datos. Se utilizó la **prueba de Kruskal-Wallis** para comparaciones globales entre múltiples grupos, seguida de un análisis post hoc mediante la **prueba de Dunn** para comparaciones múltiples entre condiciones específicas. En ambos casos, se aplicó corrección de tasa de falsos descubrimientos (FDR) mediante el método de Benjamini-Hochberg para controlar el error tipo I asociado a múltiples contrastes.

3.7.3 Análisis de datos de fosfoproteínas

Para la evaluación de un kit proteómico comercial aplicado sobre PBMCs, los datos obtenidos fueron primero sometidos a un proceso de **normalización interna**. Esta se realizó dividiendo la señal de cada proteína diana entre los niveles de GAPDH, utilizada como control endógeno de carga proteica. Este paso tuvo como objetivo corregir variaciones técnicas asociadas a diferencias en la cantidad total de proteína o eficiencia de detección entre condiciones o muestras. Posteriormente, se calcularon los estadísticos descriptivos fundamentales para cada proteína normalizada: **media aritmética**, **desviación estándar** y **coeficiente de variación (CV)**. Este último parámetro se utilizó como métrica de robustez y estabilidad del ensayo, dada su utilidad en la comparación de dispersiones relativas entre proteínas con diferentes escalas de expresión. Los valores derivados fueron representados mediante gráficos tipo barras y diagramas de dispersión.

No se aplicaron contrastes estadísticos en esta fase, dado que el objetivo principal fue la caracterización técnica preliminar del rendimiento del ensayo como posible herramienta para muestras clínicas de alto valor, tales como aquellas procedentes de pacientes con enfermedades por desregulación inmune tipo PIRD.

3.7.4 Softwares adicionales

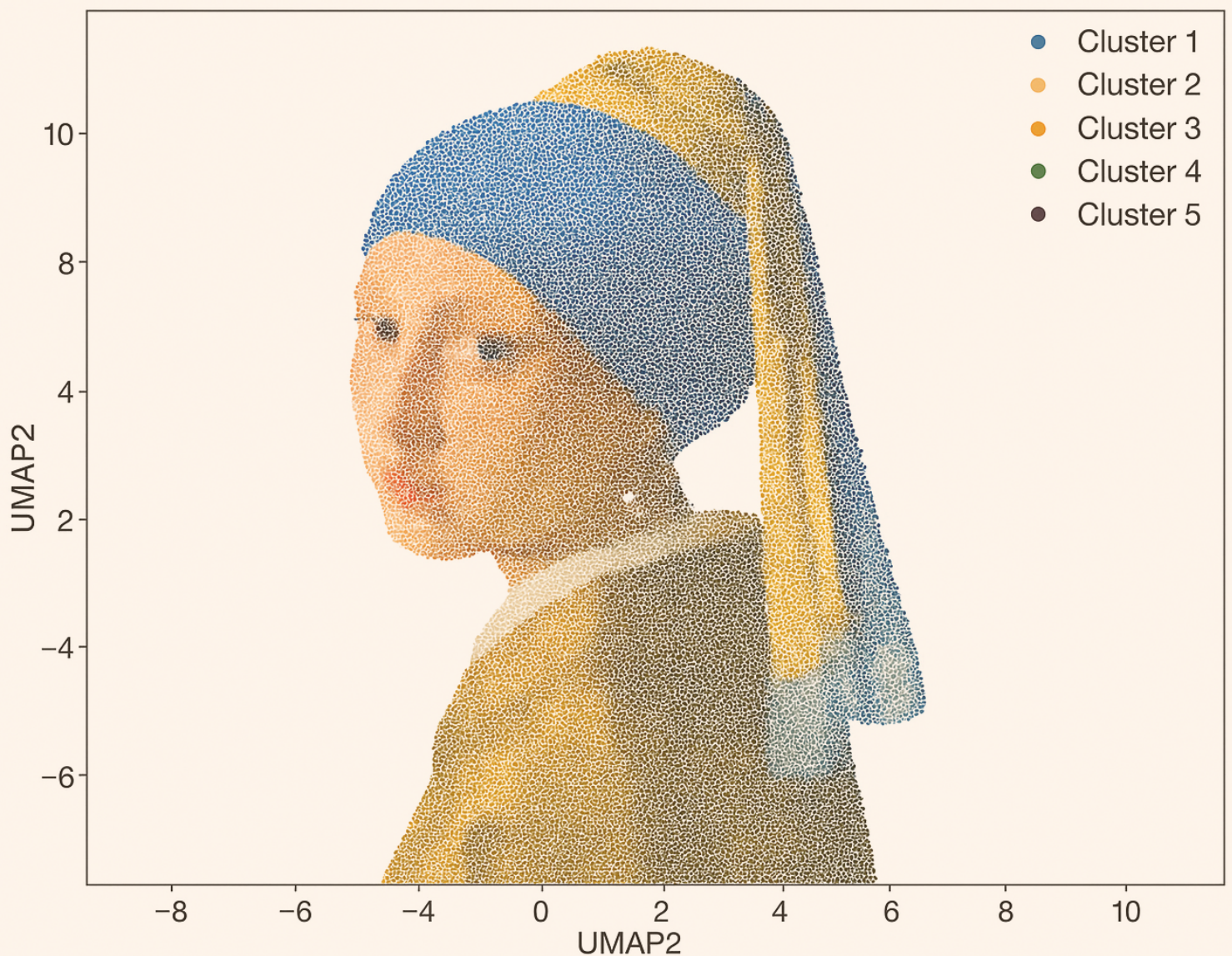
Algunas de las figuras presentadas en introducción, material y métodos y resultados han sido creadas con *Biorender.com*.

4.

RESULTADOS

“La investigación no se trata solo de encontrar respuestas, sino de formular mejores preguntas.”

— Jennifer Doudna



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

4. Resultados

En el presente proyecto de Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo un análisis integral del sistema inmunológico en pacientes pediátricos con EII y desregulación inmunológica, con el objetivo de comprender el papel que desempeñan las células Treg en la desregulación inmunológica observada en estos trastornos. A través de un enfoque multidimensional que han combinado técnicas de citometría de flujo multiparamétrica y caracterización funcional de subpoblaciones inmunológicas, se ha investigado de manera específica la implicación directa o indirecta de las Treg en los mecanismos inmunopatológicos. Esta investigación ha permitido establecer una base molecular más precisa para el diagnóstico. En paralelo, se ha evaluado el impacto de inmunomoduladores sobre el fenotipo de las Treg, abriendo nuevas posibilidades terapéuticas adaptadas a las alteraciones inmunológicas específicas de cada paciente.

4.1 Población de estudio

Se estudiaron un total de **51 pacientes**, reclutados a partir de los dos centros participantes (27 del Hospital Sant Joan de Déu y 24 del Hospital Gregorio Marañón). La media de edad de la cohorte fue de **11,1 años** con un rango entre 0,6 a 20,1 años, y con una distribución entre sexos prácticamente similar, con un 56,9% (29/51) de sexo masculino. La mayoría eran **caucásicos** (68,6%, 35/51), seguido de **hispanos** (15,7%, 8/51), **árabes** (11,8%, 6/51) y, finalmente, **asiáticos y africanos** (2%, 1/51 cada uno). Dos de los pacientes presentaban **ascendencia mixta caucásica e hispana**. Únicamente 3 pacientes presentaban antecedentes de **consanguinidad** (5,9%), pero hasta 8/51 (15,7%) tenían antecedentes familiares de EII. El 52,9% (27/51) de los pacientes de la cohorte a estudio tenían confirmación genética, con mutaciones o variantes en genes asociados a EII. Sin embargo, el porcentaje aumenta hasta el 100% (8/8) en aquellos pacientes con antecedentes familiares.

Dentro de los grupos clínicos establecidos, el predominante fue el grupo de **autoinmunidad con linfoproliferación** (Grupo 1) (26/51, 51%), seguido del grupo de **autoinmunidad sin linfoproliferación** (Grupo 2) (15/51, 29,4%). El grupo de pacientes **sin clínica, pero con genética asociada a PIRD** (Grupo 0) (4/51, 7,8%) y los grupos de **susceptibilidad a VEB/HLH** y de **VEOIBD** (Grupos 3 y 4 respectivamente) fueron los menos representados, con estos últimos representando un 5,9% cada uno (3/51). El Grupo 0 se reclutó con el objetivo de estudiar el perfil de pacientes con afectación de vías inmunes concretas, conocidas por la alteración genética de base pese a no presentar clínica PIRD, y valorar posibles alteraciones intrínsecas al defecto inmune más que al fenotipo. Las características de cada grupo clínico quedan recogidas en la **Tabla 9**.

Grupo	n	Edad (años) Media y rango	Sexo (M:F)	Confirmación genética (%)
Grupo 0	4	10,8 (5,2 – 15)	1:3	100
Grupo 1	26	12,1 (1,1, - 19,6)	15:11	50
Grupo 2	15	9,9 (0,6 – 20,1)	8:7	46,7
Grupo 3	3	8,8 (4,7 – 12,3)	2:1	33,3
Grupo 4	3	10,6 (5,9 – 14)	3:0	66,6

Tabla 9 | Características clínicas de cada grupo poblacional. Grupo 0: pacientes asintomáticos con mutaciones asociadas a PIRD; Grupo 1: autoinmunidad con linfoproliferación; Grupo 2: autoinmunidad sin linfoproliferación; Grupo 3: susceptibilidad a VEB/HLH; Grupo 4: VEOIBD.

Asimismo, se estudió una cohorte de **6 controles sanos** reclutados en el Hospital Gregorio Marañón, con una edad media de 1,77 años (rango de 0,24 a 8,55 años) y con un predominio masculino (4/6, 66,7%).

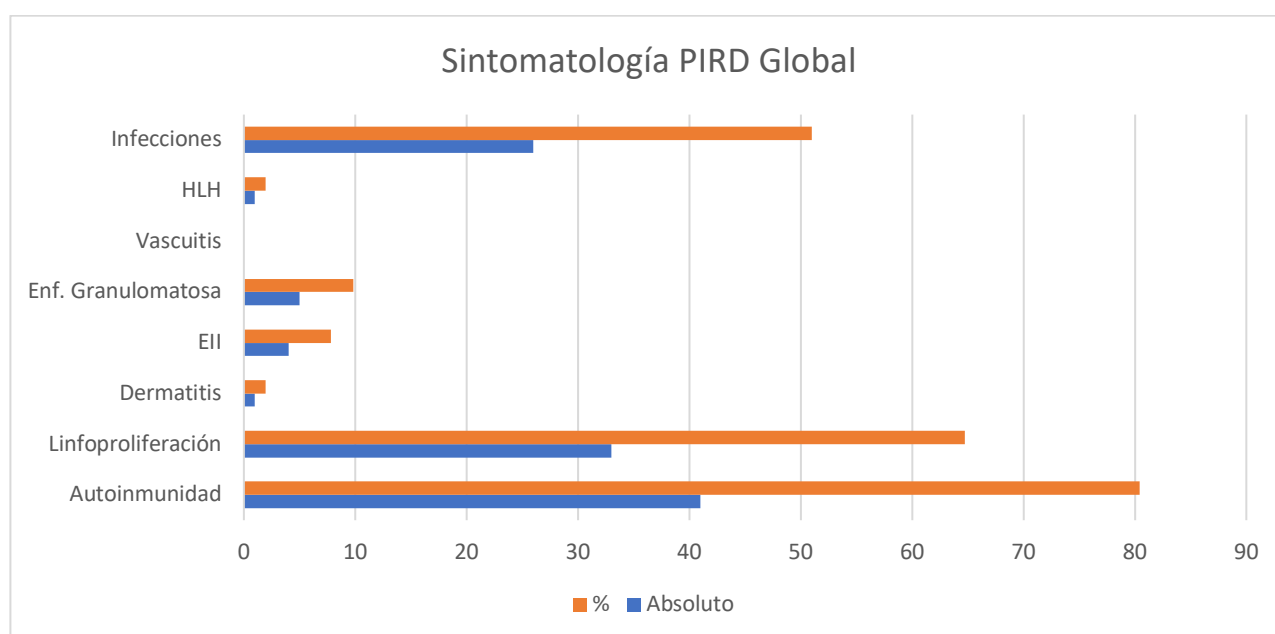


Figura 17 | Distribución global de la sintomatología en pacientes con trastornos primarios de regulación inmunológica (PIRD). El gráfico muestra la frecuencia absoluta (barra azul) y relativa (barra naranja, en porcentaje) de las principales manifestaciones clínicas observadas en la cohorte de pacientes analizada. Las categorías incluyen infecciones recurrentes, linfoproliferación, autoinmunidad, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad granulomatosa, vasculitis, síndrome hemofagocítico (HLH) y dermatitis.

Dentro de los pacientes con **base genética conocida (n=27)**, las mutaciones en genes de la **vía NFκB o FAS/FAS-L** fueron las más frecuentes, representando un 14,8% cada una (4/27), seguidas de la **vía PI3KR1/PI3KCD** con 3 pacientes que representaban un 11,1%. El resto (16/27) de los pacientes con confirmación genética, presentaba alteraciones en otros genes entre los que se incluyeron **STAT3, AIRE, TNFRSF13B o LRBA**, entre otros. Un 92,2% (47/51) de los pacientes presentaron clínica en algún momento de su evolución compatible con los criterios clínicos de ESID de PIRD. Los cuatro pacientes restantes habían

presentado clínica infecciosa, pero presentaban mutaciones en **NFKB1** o **PI3KR1/PI3KCD**, genes asociados a PIRD. Las frecuencias absoluta y relativa en que se presentaron los síntomas definitorios de PIRD, junto con la presencia de infecciones, quedan representadas en la **Figura 17**. Cada paciente puede tener más de una de las manifestaciones.

En relación con la **clínica** presentada en el histórico de la evolución de la cohorte, un 51% (26/51) de los pacientes presentaron **infecciones**, siendo la combinación de **infecciones virales y bacterianas** la forma más habitual (10/26, 38,5%). Un 80,4% de la cohorte (41/51) presentó **clínica autoinmune** de algún tipo, representando las **citopenias** el mayor porcentaje de esta (80,5%, 33/41). En concreto, la **trombocitopenia inmune** la presentaron prácticamente el total de los pacientes con citopenias (97%, 32/33), ya fuera de forma aislada u asociada a la afectación de otra línea. La **neutropenia** se presentó en un 45,5% (15/33), siempre en contexto de **bicitopenia** (Síndrome de Evans) o de **pancitopenia**. La **anemia hemolítica**, fue la manifestación menos frecuente con solo 9 casos (27,3%). Un 22% de los pacientes con autoinmunidad (AI) presentaban **clínica organoespecífica**, con dos tercios (6/9) presentando afectación de un solo órgano. Únicamente un 7,3% (3/41) presentó AI sistémica.

La segunda manifestación más frecuente fue la **linfoproliferación**, la cual se presentó en un 64,7% (33/51) de la cohorte. Tanto la **esplenomegalia** como la presencia de **adenopatías** se dio con una frecuencia de 65,7% (23/35), con un 37,1% (13/35) de los pacientes presentando ambas manifestaciones. Solamente un paciente presentó **malignidad**. Cabe destacar que un 51% (26/51) de la cohorte asoció la presencia de **linfoproliferación** y **citopenia inmune**, fenotipo conocido como **ALPID**.

Entre las manifestaciones menos frecuentes encontramos la **afectación granulomatosa**, presente en un 9,8% (5/51) de los pacientes, siendo en forma de **enfermedad pulmonar intersticial** (denominada *granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease*, GLILD) en un 80% de los casos, y la **enfermedad inflamatoria intestinal** en un 7,8% (4/51). La **dermatitis grave** y la **HLH** se dieron en un paciente en ambos casos, y ningún paciente presentó **vasculitis**.

En el momento de entrada al estudio (T0), el porcentaje de la cohorte con clínica asociada a PIRD era de un 82,4% (42/51), con solo 7 pacientes (13,7%) presentando infecciones aisladas. De nuevo, la clínica más habitual fue la **autoinmunidad** (49%, 25/51) siendo las **citopenias** la principal manifestación (68%, 17/25), y representando la **autoinmunidad organoespecífica y sistémica** un 24% (6/25) y 12% (3/25) respectivamente. La **linfoproliferación** estaba presente en un 39,2% (20/51) de la cohorte, siendo en este punto de corte ligeramente más habitual la **esplenomegalia** (76,2%, 16/21) que las **adenopatías** (52,4%, 11/21). Un tercio de los pacientes con **linfoproliferación** asociaba ambas manifestaciones en T0. Un 23,5% de la cohorte (12/51) presentó fenotipo ALPID con **citopenias** y **linfoproliferación**.

El resto de manifestaciones clínicas fueron menos frecuentes en T0, con la **enfermedad inflamatoria intestinal** dándose en un 5,9% (3/51) y la **enfermedad granulomatosa** representando un 3,9% (2/51). Como en el análisis histórico, la **dermatitis grave** y la **HLH** solo se dieron cada una en un paciente. La distribución de las manifestaciones entre los grupos clínicos queda reflejada en la **Figura 18**.

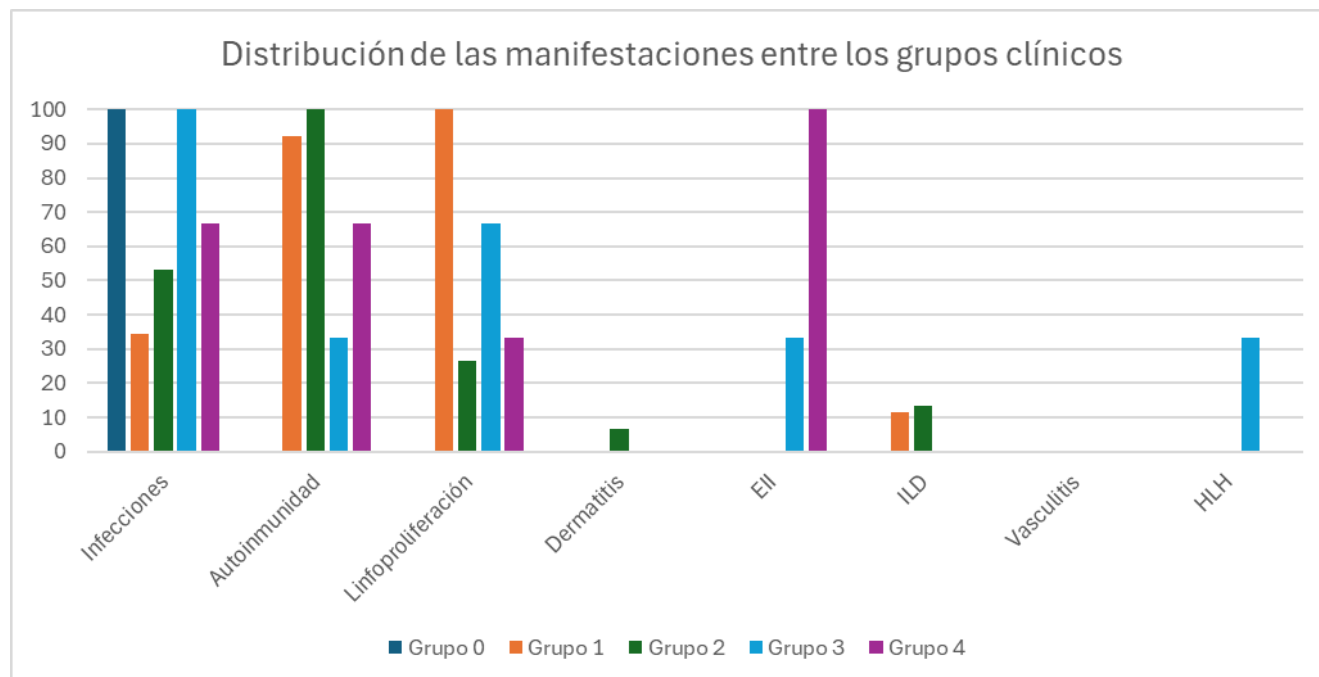


Figura 18 | Distribución porcentual de ocho manifestaciones clínicas (Infecciones, Autoinmunidad, Linfoproliferación, Dermatitis, EII, ILD, Vasculitis y HLH) comparadas entre cinco grupos clínicos (Grupos 0-4). Las barras representan la proporción de pacientes dentro de cada grupo que presenta la manifestación indicada; los colores corresponden a cada grupo según la leyenda. Grupo 0: pacientes asintomáticos con mutaciones asociadas a PIRD; Grupo 1: autoinmunidad con linfoproliferación; Grupo 2: autoinmunidad sin linfoproliferación; Grupo 3: susceptibilidad a VEB/HLH; Grupo 4: VEOIBD.

Por lo que refiere al **tratamiento**, el 92,2% (47/51), prácticamente la totalidad de la cohorte había recibido algún tipo de tratamiento previo a su inclusión en el estudio. Los tratamientos pautados con mayor frecuencia fueron los **inmunomoduladores** y los **inmunosupresores**. Sin embargo, cabe destacar que hasta un 60,8% (31/51) de pacientes habían recibido múltiples tipos de tratamiento, incluyendo también la **profilaxis antimicrobiana**, **inmunoglobulinas policlonales** y los **análogos**. La diferencia en la clasificación entre inmunosupresor e inmunomodulador es poco clara y variable según el autor, ya que varios de los fármacos considerados inmunomodulares ejercen su efecto al suprimir el número o función de células inmunes. Para el estudio, se consideró fármaco inmunosupresor aquel que tiene un efecto amplio sobre distintas células del sistema inmune como por ejemplo los **corticoides**, el **metotrexato**, o los **quimioterápicos**, como el **etopósido**. Por otro lado, se consideró inmunomoduladores aquellos fármacos dirigidos a regular la respuesta inmune con efecto sobre una población inmune más definida, como sería el **micofenolato**, la **rapamicina** o el **tacrolimus**.

En T0, el porcentaje de pacientes en tratamiento fue del 82,4% (42/51), con un claro predominio del uso de inmunomoduladores, recibiendo los dos tercios (28/42) de los pacientes bajo tratamiento. La frecuencia de pacientes recibiendo varias líneas de tratamiento en T0 fue del 45,2% (19/42). Las frecuencias de los distintos tratamientos en ambos puntos de corte quedan representadas en la **Figura 19**.

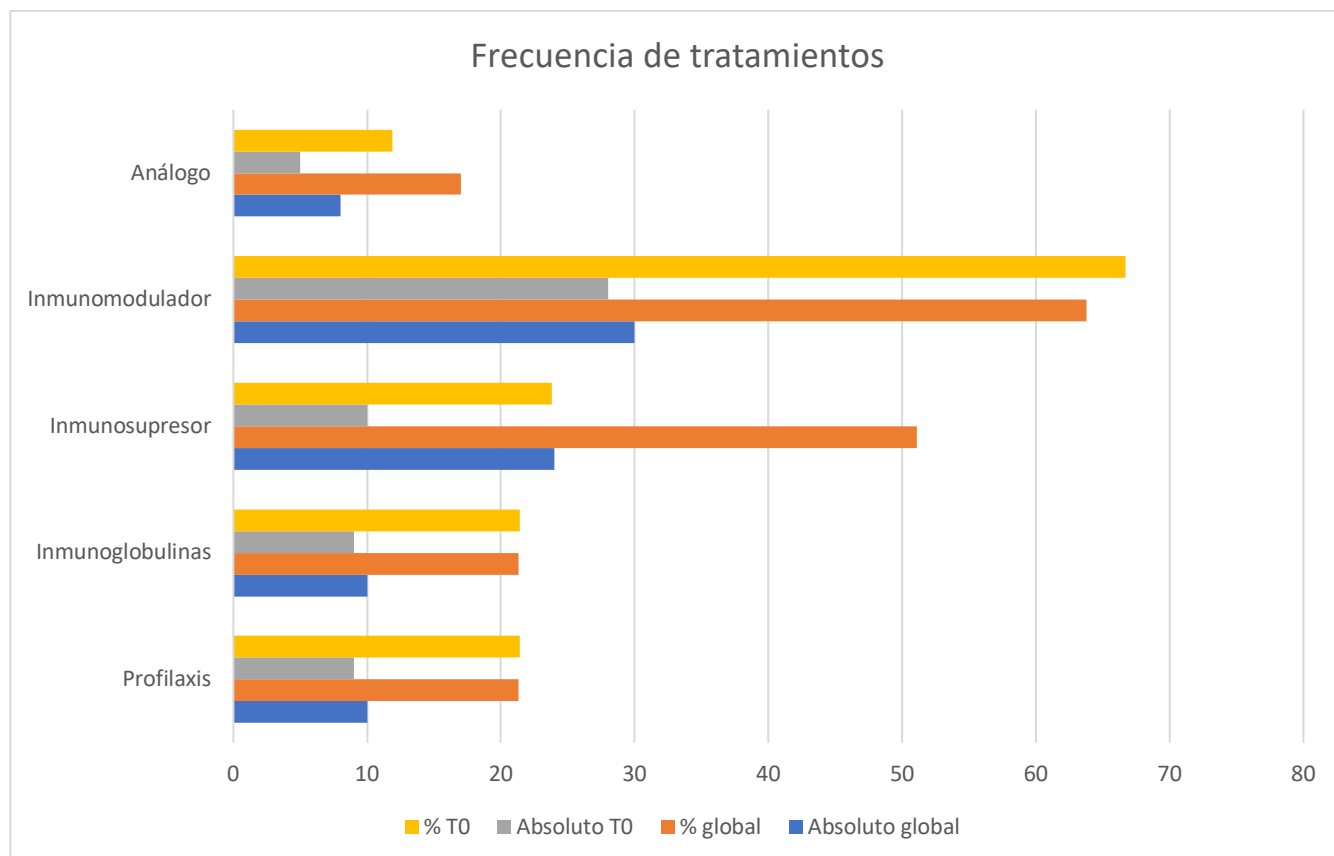


Figura 19 | Frecuencia de tratamientos utilizados en pacientes con trastornos primarios de regulación inmunológica (PIRD). El gráfico representa la distribución de diferentes tipos de tratamientos empleados tanto al inicio del seguimiento clínico (T0) como de forma global. Se muestran los valores absolutos (barras grises y azules) y relativos en porcentaje (barras amarillas y naranjas) para cada categoría terapéutica: análogos, inmunomoduladores, inmunosupresores, inmunoglobulinas y profilaxis antimicrobiana.

4.2 Caracterización inmunológica de pacientes PIRD

4.2.1 Perfil inmunofenotípico

4.2.1.1 Evaluación de la naturaleza de los datos

Como paso preliminar al análisis estadístico, se evaluó la distribución de normalidad de las 114 variables inmunológicas antes de aplicar cualquier tipo de transformación. Para ello, se utilizó el test de Shapiro-Wilk, una prueba ampliamente aceptada para detectar desviaciones de la normalidad en conjuntos de datos de tamaño moderado. Los resultados se visualizaron mediante un heatmap que codifica los valores p

obtenidos por variable, donde el espectro de color varía desde verde (alta probabilidad de normalidad, $p > 0.75$) hasta amarillo (baja probabilidad de normalidad, $p < 0.25$). Como se puede apreciar en la **Figura 20**, la inmensa mayoría de las variables presentan valores p por debajo de 0.25, lo que se refleja en la dominante coloración amarilla del mapa. Esto indica que las distribuciones de estas variables se desvían significativamente de la normalidad. La ausencia de tonalidades verdes en la mayoría del espectro reafirma que muy pocas variables, si acaso alguna, cumplen con el supuesto de normalidad. Además, la confirmación de una distribución no normal en el conjunto de datos original sustentó la decisión de aplicar una normalización tipo z-score antes de procedimientos multivariantes sensibles a escala y distribución, como UMAP y K-means.

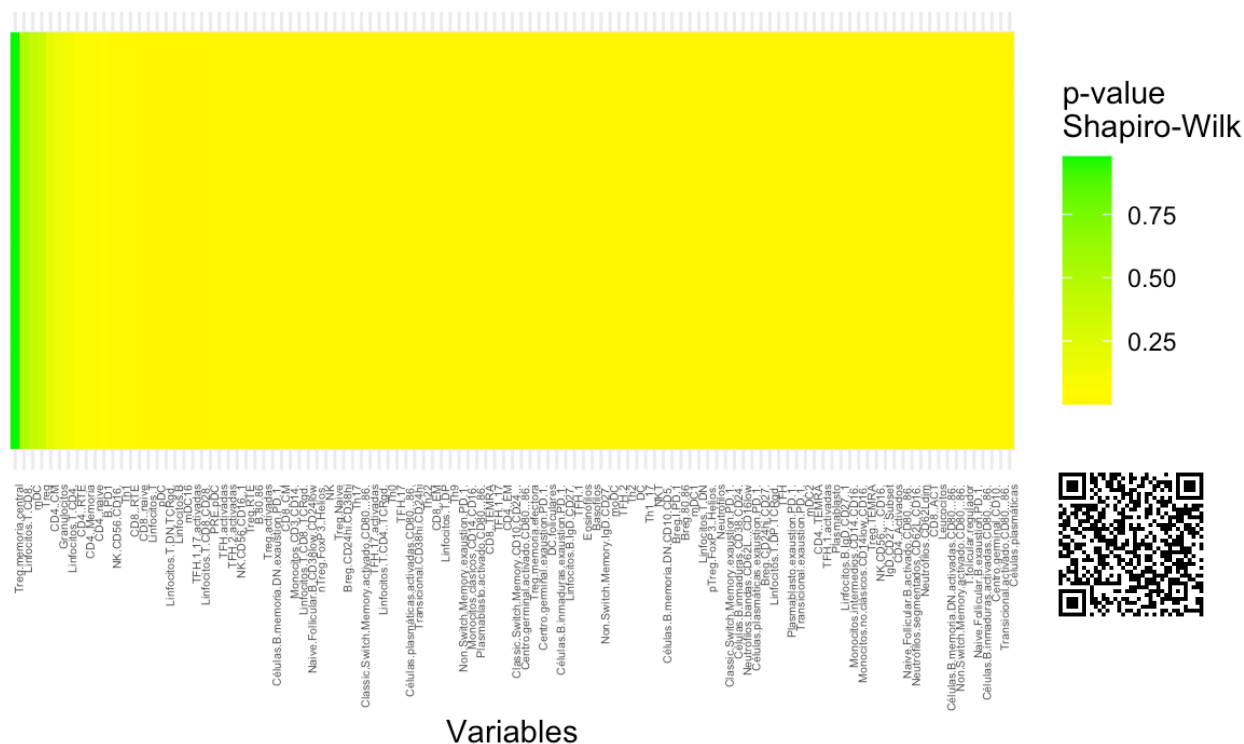


Figura 20 | Mapa de normalidad por variable antes de la normalización (test de Shapiro-Wilk). Cada columna representa una de las 114 variables inmunológicas cuantificadas como proporciones celulares, y el color indica el valor p obtenido en el test de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad. La escala de colores va desde verde ($p > 0.75$, compatible con distribución normal) hasta amarillo ($p < 0.25$, indicativo de distribución no normal). Se observa una amplia dominancia de valores p bajos (colores amarillos), lo cual sugiere que la gran mayoría de las variables presentan distribuciones significativamente alejadas de la normalidad. Este resultado justifica el uso de métodos estadísticos no paramétricos para los análisis subsiguientes. Para ver la imagen con más detalle escanear el QR.

Tras aplicar la transformación z-score a las 114 variables inmunológicas, se repitió la evaluación de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk con el objetivo de verificar si la estandarización de los datos contribuía a que sus distribuciones se aproximaran a una distribución normal. Los resultados se representaron en un nuevo heatmap (**Figura 21**), donde al igual que en el análisis previo, el gradiente de color abarca desde verde ($p > 0.75$, compatible con normalidad) hasta amarillo intenso ($p < 0.25$, indicativo de no normalidad). Los resultados mostraron que, a pesar de la normalización, la mayoría de las variables

[illegible]

Sin embargo, como se muestra en la **Figura 22a**, el resultado del UMAP reveló una **agrupación inesperada**: los pacientes y los controles no se distribuían de manera diferenciada en función de su estatus clínico, sino que más bien formaban dos conglomerados claramente separados en el eje vertical. Para investigar esta observación, se repitió la visualización del UMAP, pero coloreando ahora según la **procedencia geográfica de la muestra** (Figura 22b). Esta segunda representación confirmó que la separación observada en el espacio UMAP no respondía a diferencias biológicas reales entre pacientes y controles, sino a un **efecto de lote asociado a la ciudad de origen** (Madrid o Barcelona). Este artefacto técnico (frecuente en estudios multicéntricos) es consecuencia de variaciones sistemáticas no biológicas en la recogida, procesamiento o análisis de las muestras, que introducen ruido estructurado en los datos.

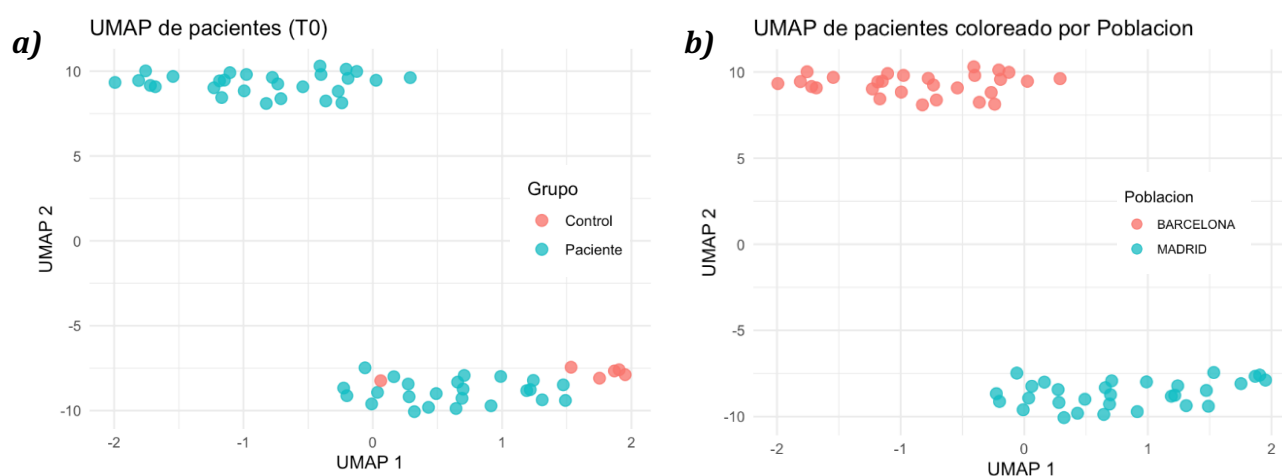


Figura 22 | UMAP inicial de pacientes y controles coloreado por grupo clínico (T0). **a)** Representación bidimensional mediante UMAP a partir de los datos inmunológicos basales (T0), tras normalización por z-score pero antes de aplicar correcciones por efecto de lote. Los puntos representan individuos, coloreados según su pertenencia al grupo Paciente (celeste) o Control (rojo). Se observa una separación vertical marcada entre los dos grupos, que no corresponde a diferencias biológicas esperadas, sugiriendo la presencia de un artefacto técnico subyacente. **b)** UMAP inicial de pacientes coloreado por procedencia geográfica. Representación equivalente al panel anterior, pero con los pacientes coloreados según su población de origen: Barcelona (rojo) o Madrid (celeste). La clara segregación de los individuos en función de la ciudad evidencia un efecto de lote asociado a la procedencia, responsable de la separación observada previamente.

Reconocer y corregir este efecto fue un paso metodológico esencial para garantizar la validez del análisis posterior. Para ello, se aplicó el algoritmo **ComBat**, una herramienta estadística diseñada específicamente para eliminar efectos de lote no deseados manteniendo al mismo tiempo la variabilidad biológica real. Tras la corrección, se generó un nuevo UMAP (**Figura 23**) donde ya no se observó una separación por localización geográfica. La figura muestra el resultado de esta corrección aplicada a los datos previamente normalizados por z-score, donde cada punto representa a un individuo y está coloreado según su grupo de pertenencia (Control en rojo y Paciente en celeste). La visualización sugiere una separación parcial pero relevante entre ambos grupos, especialmente visible en el cúmulo superior derecho, compuesto mayoritariamente por individuos del grupo **Control**. Esta agregación indica que, a pesar del ruido biológico y técnico presente, la corrección por población permitió revelar diferencias estructurales en el espacio

latente que podrían asociarse con el estado clínico. Por otro lado, los individuos del grupo **Paciente** aparecen distribuidos de manera más dispersa a lo largo del espacio UMAP, lo cual podría reflejar una mayor heterogeneidad inmunológica dentro de este grupo.

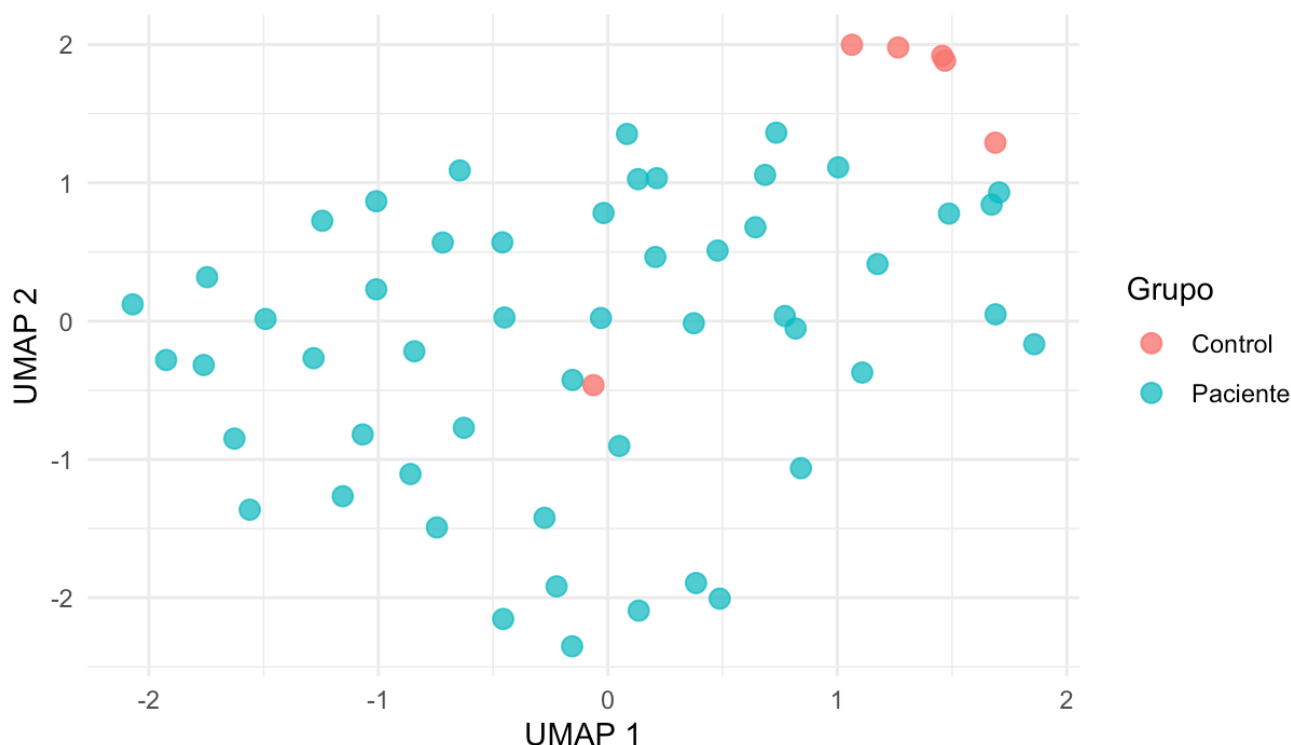


Figura 23 | Proyección bidimensional mediante UMAP corregido por población (ComBat). Cada punto representa a un individuo del estudio, coloreado según su grupo clínico (rojo: Controles; celeste: Pacientes). La reducción de dimensionalidad se realizó tras la normalización z-score de las variables inmunológicas y la corrección del efecto de lote entre las poblaciones de Madrid y Barcelona mediante el algoritmo ComBat. Se observa una agrupación parcial de los controles en el cuadrante superior derecho, mientras que los pacientes presentan una distribución más dispersa, lo que sugiere una mayor heterogeneidad inmunológica. Esta visualización evidencia diferencias latentes entre los grupos que podrían estar relacionadas con el estado clínico, y proporciona una base adecuada para la aplicación de técnicas de agrupamiento como K-means.

Tras esta observación, quisimos explorar la posible existencia de subgrupos inmunológicos distintos dentro del grupo de pacientes. Para determinar el número óptimo de agrupamientos (k) en el análisis de clustering sobre el espacio reducido por UMAP, se aplicaron tres metodologías complementarias: el **método del codo** (*elbow method*), el **coeficiente de silueta promedio** (*average silhouette width*) y la **estadística de la brecha** (*gap statistic*) (Figura 24).

En primer lugar, se empleó el método del codo para evaluar la inercia intra-cluster, a través de la suma total de los errores cuadráticos dentro de cada grupo (*Total Within Sum of Squares*). El gráfico correspondiente (Figura 24a) evidenció una reducción marcada de la inercia hasta $k = 3$, tras lo cual la disminución se vuelve más paulatina. Este punto de inflexión sugiere que la partición en tres grupos logra capturar la mayor parte de la estructura subyacente. Paralelamente, el análisis del coeficiente de silueta (Figura 24b) alcanzó su valor máximo con $k = 2$, lo que indica una separación clara entre dos agrupaciones.

Sin embargo, a partir de $k = 3$, aunque dicho valor disminuye levemente (≈ 0.17), se mantiene dentro de un rango aceptable. Dado que el coeficiente de silueta tiende a favorecer agrupaciones más simples y compactas, estos resultados fueron interpretados con cautela y contextualizados junto con los obtenidos por los otros métodos de validación de clustering. Finalmente, la estadística de la brecha (*gap statistic*), que compara la variabilidad intracluster con un modelo de referencia aleatorio, mostró una mejora significativa al pasar de $k = 2$ a $k = 3$, tras lo cual los incrementos fueron más moderados y estabilizados (**Figura 24c**). Aunque el valor más alto de la estadística de brecha se observa en $k = 9$, los errores estándar se solapan ampliamente a partir de $k = 3$, lo que sugiere que aumentos posteriores no ofrecen ganancias significativas de estructura real y podrían reflejar sobreajuste.

Considerando los resultados en conjunto, se optó por seleccionar $k = 3$ como número óptimo de clusters. Esta decisión representa un equilibrio razonable entre complejidad del modelo y capacidad explicativa, capturando la heterogeneidad biológica esperada sin perder interpretabilidad. Además, tres grupos ofrecen una partición suficientemente rica como para explorar subfenotipos inmunológicos dentro del conjunto de pacientes y controles, permitiendo análisis posteriores más refinados.

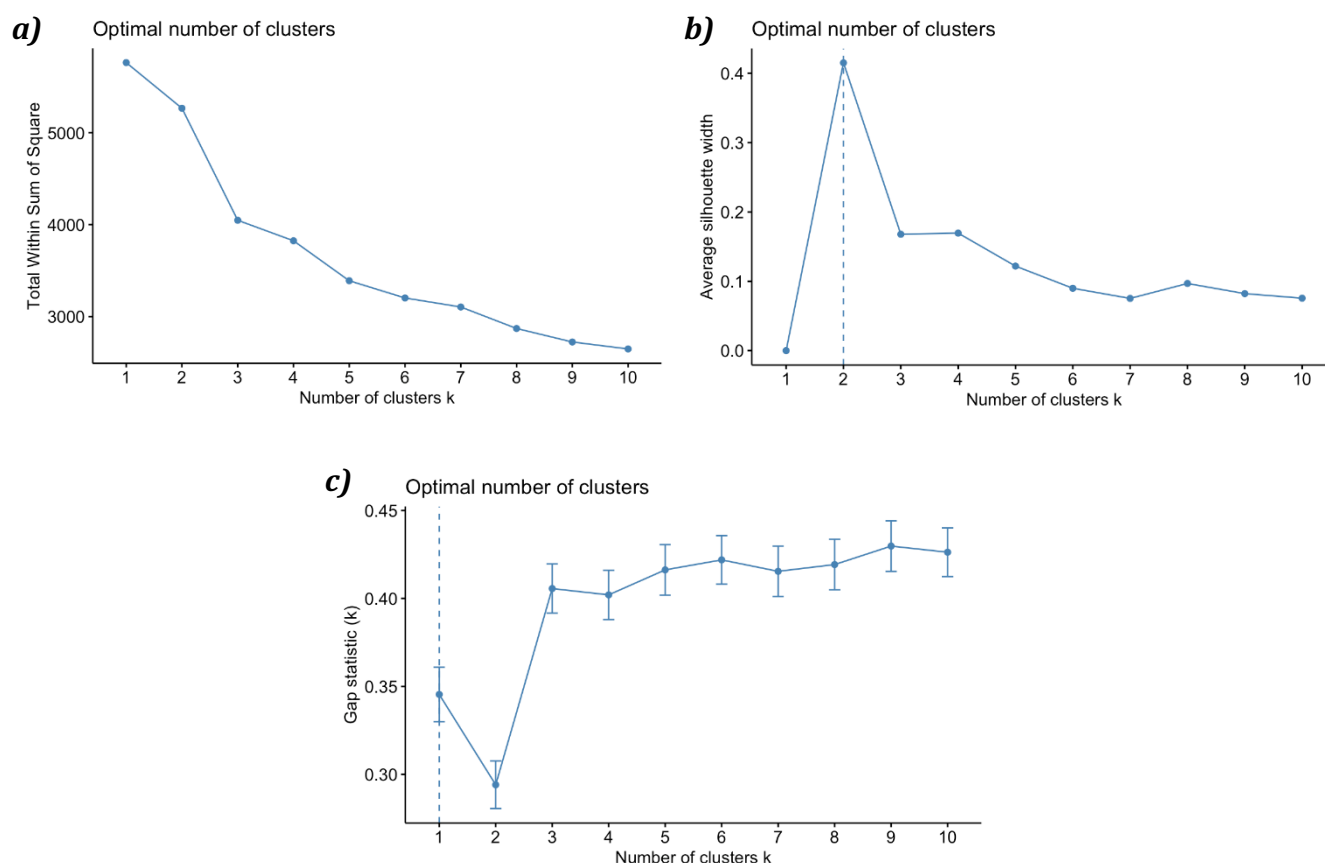


Figura 24 | Elección del número de agrupamientos (k) óptimo. **a)** Determinación del número óptimo de clusters mediante el método del codo. El punto de inflexión observado en $k = 3$ indica que este número de agrupamientos captura de forma eficiente la estructura interna de los datos, minimizando la varianza dentro de los clusters sin incurrir en sobreajuste. **b)** Determinación del número óptimo de clusters mediante el coeficiente de silueta promedio. Se muestra el valor promedio del índice de silueta para distintos valores de k . **c)** Determinación del número óptimo de clusters mediante la estadística de la brecha (Gap statistic). Se representa el valor del gap (con barras de error) para cada valor de k .

Una vez identificado que el número óptimo de agrupamientos era $k = 3$, se aplicó el algoritmo **K-means** exclusivamente sobre los individuos del grupo de pacientes, utilizando como espacio de entrada las coordenadas generadas por UMAP tras la normalización y corrección por efecto de lote (ComBat). El objetivo era identificar posibles subgrupos inmunológicos internamente consistentes dentro del conjunto de pacientes, que pudieran reflejar patrones biológicamente relevantes. En la **Figura 25** se muestra el resultado de esta clusterización, donde cada paciente aparece representado por un triángulo coloreado según su pertenencia a uno de los tres clusters (**rojo**, **verde** y **azul**), mientras que los sujetos del grupo control (no incluidos en la clusterización) se proyectan en el mismo espacio como puntos **grises** para referencia comparativa.

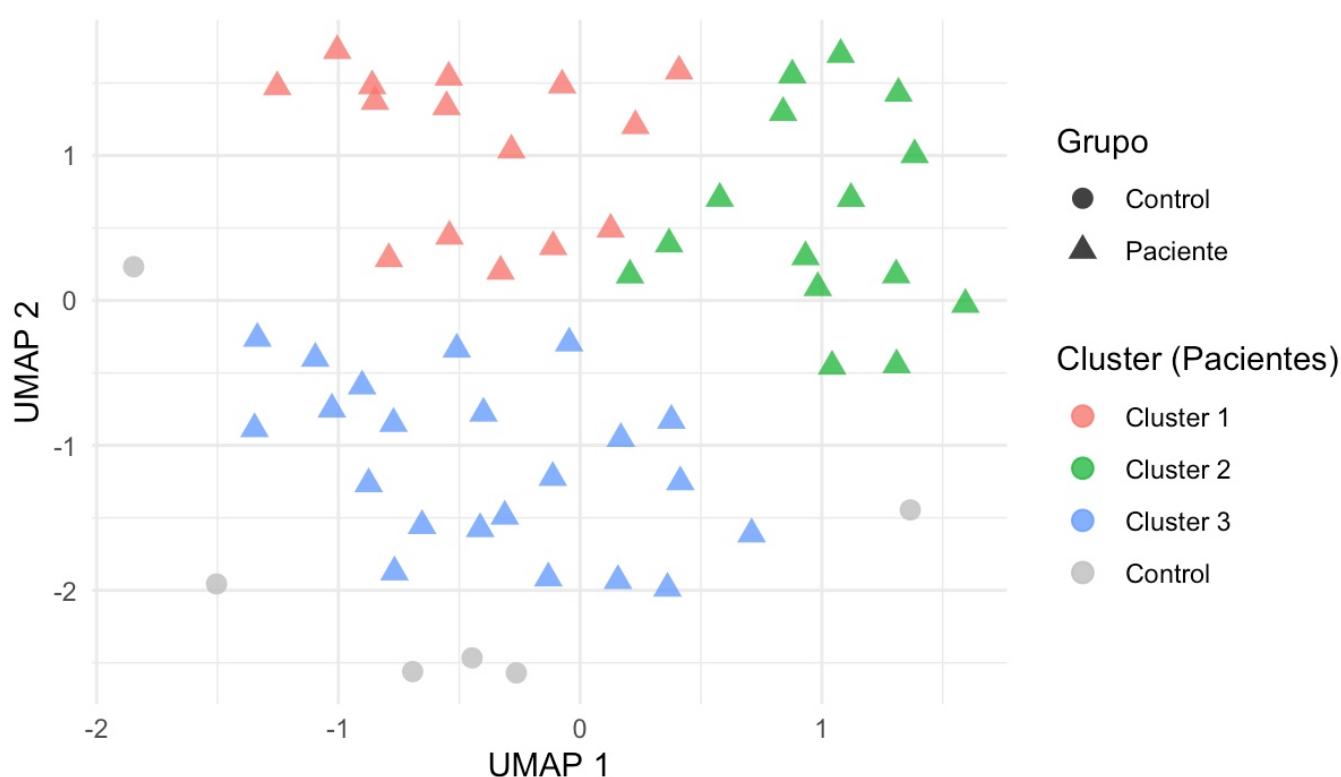


Figura 25 | UMAP de pacientes clusterizados ($k = 3$) y controles proyectados. Visualización bidimensional obtenida mediante UMAP tras normalización z-score y corrección por efecto de lote (ComBat), aplicada a las variables inmunológicas. Los pacientes (triángulos) fueron agrupados mediante K-means en tres clusters diferenciados (Cluster 1: rojo, Cluster 2: verde, Cluster 3: azul), mientras que los controles (círculos grises) se proyectaron en el mismo espacio sin participar en el proceso de agrupamiento. Se observa una clara separación espacial entre los tres subgrupos de pacientes, cada uno ocupando regiones específicas del espacio UMAP, lo que sugiere la existencia de perfiles inmunológicos diferenciados.

La distribución espacial resultante evidencia una partición clara y no arbitraria entre los tres clusters de pacientes, cada uno de ellos ocupando regiones bien definidas del plano UMAP. El **Cluster 1** (**rojo**) se sitúa predominantemente en el cuadrante superior izquierdo, el **Cluster 2** (**verde**) en la región central derecha,

y el **Cluster 3** (azul) en la parte inferior central. Esta estructura sugiere la existencia de subfenotipos inmunológicos distintivos dentro del grupo de pacientes. Por otro lado, la proyección de los individuos control permite visualizar su posición relativa respecto a los pacientes y a sus subgrupos. Este patrón de distribución también sugiere que los pacientes de cada cluster podrían estar respondiendo a mecanismos inmunopatológicos distintos, lo cual justifica análisis posteriores orientados a caracterizar diferencialmente sus perfiles inmunológicos.

4.2.1.3 Determinación de perfiles inmunológicos y búsqueda de biomarcadores

Por ello, con el objetivo de explorar diferencias inmunofenotípicas a gran escala entre los grupos de pacientes identificados por clustering, se representó un heatmap del perfil inmunológico promedio por clúster, incluyendo también al grupo de controles. En la **Figura 26a** se visualizan patrones de expresión media de múltiples subpoblaciones inmunes tras la normalización de los datos. A nivel visual, el heatmap revela una estructura diferenciada entre los tres clústeres de pacientes (**Cluster_1**, **Cluster_2** y **Cluster_3**) y los controles sanos (**Cluster_Control**). Cada uno de estos clústeres presenta un patrón característico de expresión en distintas poblaciones inmunes, lo que sugiere que el modelo de agrupación basado en el análisis no supervisado captura de forma efectiva perfiles inmunológicos distintos entre los pacientes, así como con los controles.

Dado el especial interés en el brazo regulador y con el fin de enriquecer el perfil inmunológico global, se llevó a cabo un análisis enfocado específicamente en las poblaciones reguladoras del sistema inmunitario, dado su papel central en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, la inducción de tolerancia y la resolución de la inflamación (**Figura 26b**). A nivel visual, se aprecian patrones de distribución claramente divergentes entre los grupos de pacientes y los controles. El **grupo Control** (fila inferior) presenta de forma general valores bajos (tonos azulados) en muchas de las poblaciones representadas, lo que es coherente con un estado de equilibrio inmunológico en ausencia de inflamación sistémica activa. En contraste, los tres **grupos de pacientes** (filas 1, 2 y 3) presentan múltiples poblaciones con valores aumentados (tonos naranjas y rojizos), lo cual refleja una activación o expansión diferencial de subpoblaciones inmunorreguladoras en el contexto de la enfermedad.

El análisis focalizado en las poblaciones inmunorreguladoras revela que los mecanismos supresores del sistema inmune no se distribuyen de manera uniforme entre los pacientes, sino que siguen patrones particulares dentro de cada uno de los subgrupos identificados. En conjunto, estos hallazgos indican que los clusters de pacientes no solo se distinguen por la intensidad de la respuesta inmunitaria, sino también por las características cualitativas de sus circuitos de control inmunológico, que se mostrarán más adelante.

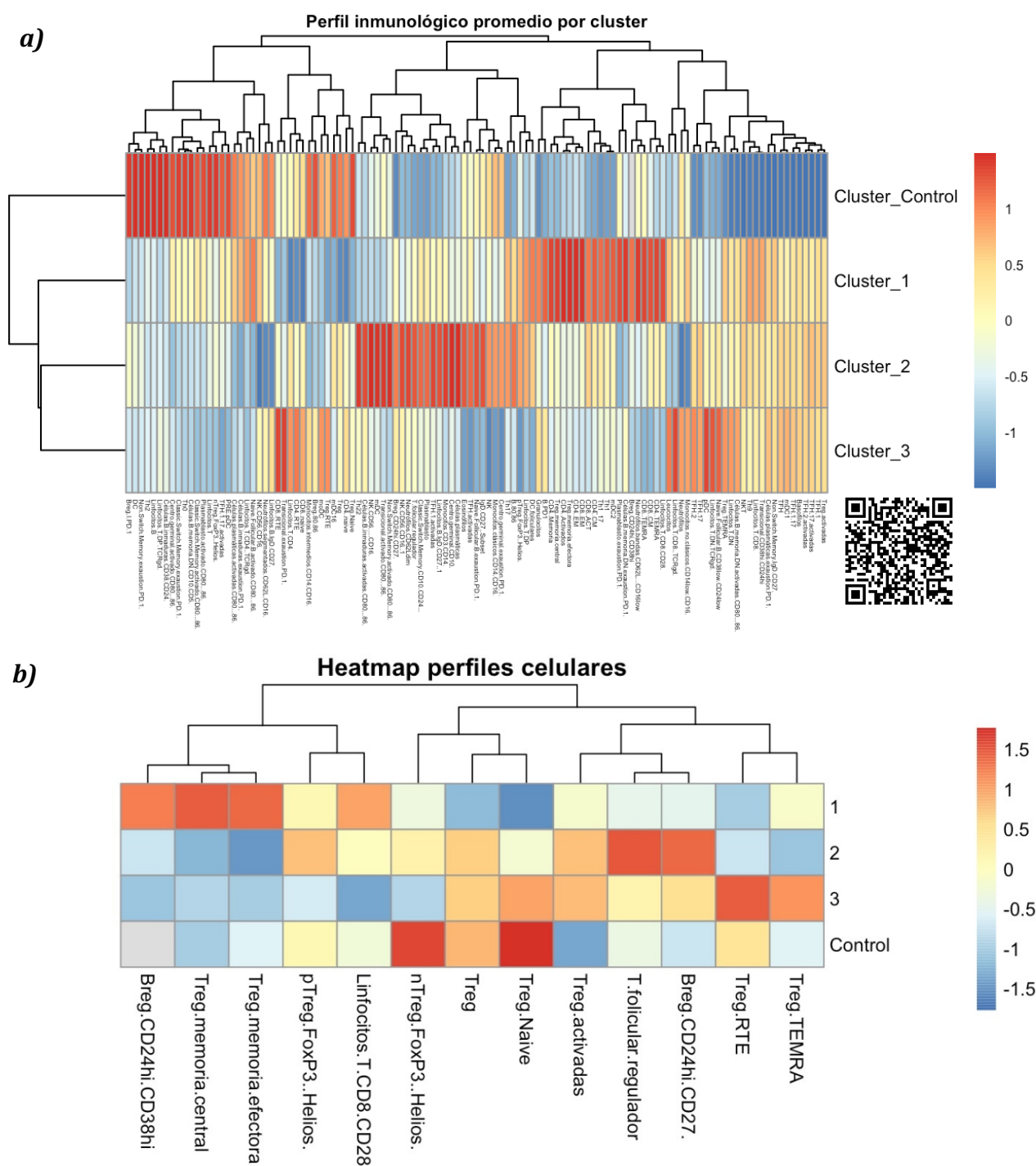


Figura 26 | Perfil inmunológico promedio por grupo (clusters de pacientes y controles). **a)** Heatmap que representa los valores promedio estandarizados (z-score) de las 114 variables inmunológicas para cada uno de los grupos: controles sanos (Cluster_Control) y los tres subgrupos de pacientes identificados mediante K-means (Cluster_1, Cluster_2 y Cluster_3). **b)** Heatmap que representa los valores promedio estandarizados (z-score) de múltiples subpoblaciones inmunorreguladoras (incluyendo células T reguladoras (Treg), B reguladoras (Breg) y T foliculares reguladores) en los tres clusters de pacientes y el grupo control. Cada columna corresponde a una variable inmunológica, y cada fila representa el promedio del grupo correspondiente. Los colores indican desviaciones respecto a la media global: rojo para valores por encima del promedio, azul para valores por debajo y amarillo para valores cercanos a cero. La organización jerárquica de las variables en el eje horizontal permite identificar bloques funcionales inmunológicos con comportamientos similares entre grupos. Para ver la imagen con mayor detalle, escanear QR.

A continuación, para identificar los marcadores inmunológicos más relevantes que discriminan los distintos grupos inmunológicos del estudio (tanto los subgrupos de pacientes previamente definidos por

K-means como el grupo control), se entrenó un modelo de clasificación basado en **Random Forest**. Este modelo incluyó a todos los individuos del estudio, integrando tanto pacientes como controles, y utilizó como variables predictoras las 114 proporciones celulares previamente normalizadas por z-score y corregidas por efecto de lote. Se entrenó con 500 árboles para garantizar estabilidad, y se evaluó la importancia relativa de cada variable mediante la métrica de **Mean Decrease Gini**, que cuantifica cuánto contribuye cada marcador a reducir la impureza de los nodos en el conjunto de árboles.

El análisis de importancia reveló que los subconjuntos **CD4+ naive**, **CD4+ memoria**, y **CD4+ EM** fueron los marcadores más influyentes del modelo, seguidos por **CD8+ naive** y **CD4+ RTE**. Esta prominencia de subconjuntos T CD4+ y CD8+ sugiere que la **estructura del compartimento adaptativo**, particularmente en términos de diferenciación y renovación celular, representa un eje clave de separación tanto entre pacientes y controles como entre los subgrupos de pacientes. Asimismo, se identificaron otras poblaciones relevantes como las **células NK CD56+ CD16+**, **Tregs de memoria efectora y central**, **eosinófilos** y **monocitos clásicos**, lo que refleja que también existen alteraciones en componentes de la **inmunidad innata y regulación inmunológica (Figura 27)**. Esta variedad de tipos celulares implicados indica que la distinción entre los grupos no está mediada únicamente por un desequilibrio en una rama específica del sistema inmune, sino por un patrón complejo de cambios funcionales y fenotípicos múltiples.

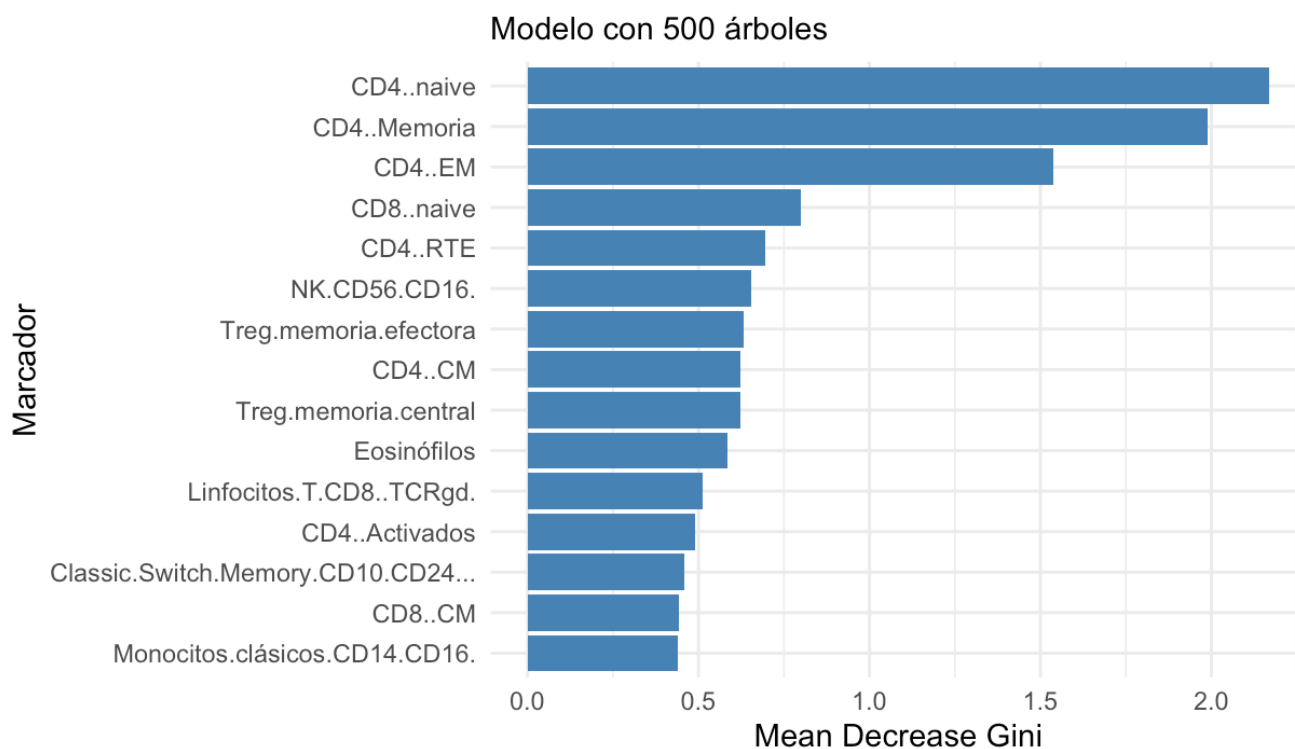


Figura 27 | Importancia de variables inmunológicas en la clasificación de pacientes y controles mediante Random Forest. Se muestra la métrica de Mean Decrease Gini para las 15 variables inmunológicas más relevantes del modelo, entrenado con 500 árboles de decisión e incluyendo tanto pacientes como controles. Los subconjuntos de células T CD4+ (naive, memoria, efectoras de memoria) fueron los más informativos, seguidos por CD8+ naive, CD4+ RTE y poblaciones innatas como NK CD56+CD16+ y eosinófilos. Estos resultados destacan que tanto el compartimento adaptativo como el innato participan en la separación inmunológica entre los grupos, proporcionando una jerarquía objetiva de marcadores clave para la caracterización de estados inmunológicos alterados.

Tras identificar los marcadores inmunológicos con alta capacidad discriminativa entre grupos, se procedió a validar estadísticamente las diferencias en dichos marcadores entre los tres clusters de pacientes y el grupo control. Para ello, se aplicó el **test no paramétrico de Kruskal-Wallis**, adecuado dada la naturaleza no normal de los datos, ya previamente evidenciada mediante el test de Shapiro-Wilk. Este test permite evaluar si al menos uno de los grupos presenta una distribución significativamente diferente respecto a los demás para cada marcador inmunológico considerado. Dado que se evaluaron múltiples variables de forma simultánea, se aplicó una corrección de tipo **FDR (False Discovery Rate)** mediante el **método de Benjamini-Hochberg**. Esta corrección controla la proporción de falsos positivos esperados entre los resultados considerados significativos, lo cual es especialmente importante en contextos con gran número de comparaciones (como es el caso con más de 100 poblaciones), donde la probabilidad de obtener resultados estadísticamente significativos por azar aumenta considerablemente.

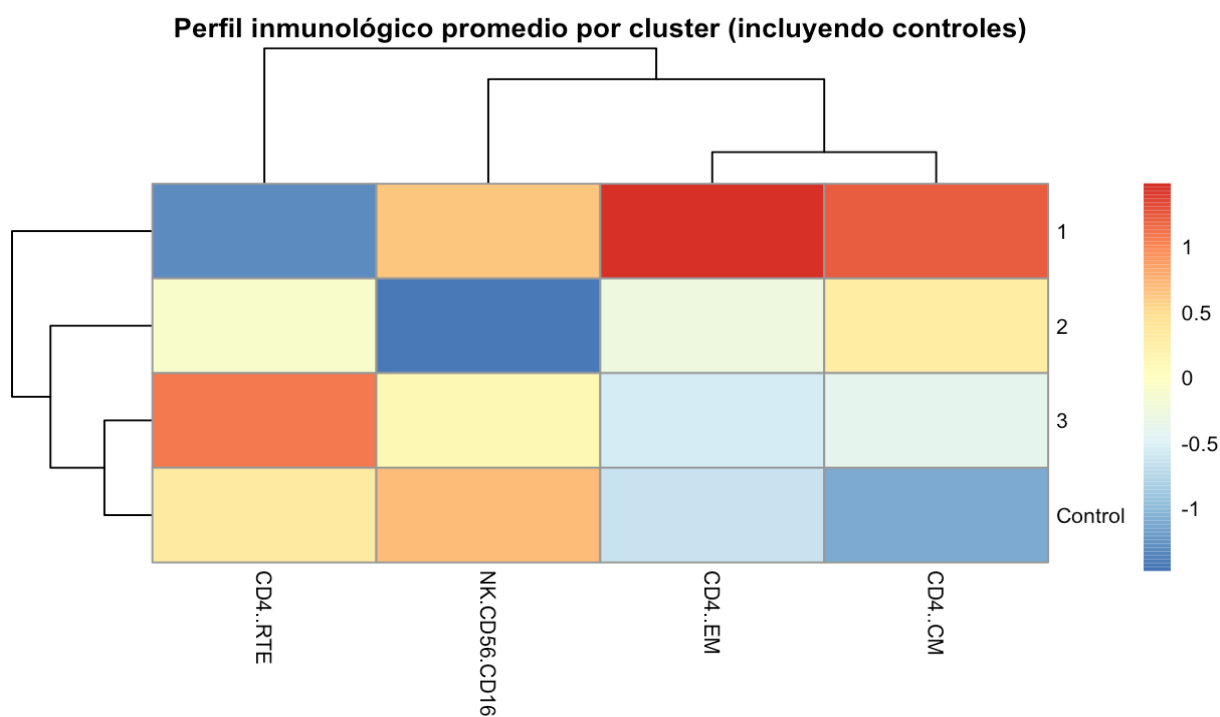


Figura 28 | Marcadores con alta capacidad discriminativa entre grupos. Perfil inmunológico promedio por grupo para los marcadores significativamente diferenciadores tras corrección FDR. El heatmap reducido muestra los valores z-score promedio de cuatro marcadores inmunológicos (CD4+ RTE, NK CD56+CD16+, CD4+ EM y CD4+ CM) que resultaron estadísticamente significativos entre los grupos tras aplicar el test de Kruskal-Wallis seguido de corrección por FDR. Los datos están organizados por grupo (Clusters 1, 2, 3 y Controles), permitiendo visualizar patrones diferenciadores claros.

La **Figura 28** de heatmap simplificado presenta los valores promedio estandarizados (z-score) de los **cuatro marcadores** que resultaron estadísticamente significativos tras la aplicación del test de Kruskal-Wallis y la corrección FDR: **CD4+ EM**, **CD4+ CM**, **CD4+ RTE** y **NK CD56+ CD16+**. Se puede observar que estos marcadores discriminan de forma visualmente clara entre los distintos clusters y los controles. Por ejemplo, el **Cluster 1** exhibe niveles elevados de **CD4+ EM** y **CD4+ CM**, junto con una reducción significativa en **CD4+ RTE**, lo que sugiere una expansión de células T diferenciadas a expensas de poblaciones más

recientes del timo. Este patrón contrasta fuertemente con el de los **controles**, quienes presentan niveles más altos de **CD4+ RTE** y menores de CD4 activados o de memoria, reflejando un estado inmunológico más equilibrado o homeostático.

Luego de identificar diferencias globales estadísticamente significativas entre grupos mediante el test de **Kruskal-Wallis**, se procedió a realizar comparaciones pareadas utilizando el **test de Dunn post hoc**, con el objetivo de determinar **entre qué grupos específicos** (clusters de pacientes y controles) se encuentran las diferencias que explican las variaciones observadas. Este análisis es esencial para descomponer los resultados globales del test no paramétrico en comparaciones individuales, revelando qué grupos se distinguen entre sí en cuanto a los niveles de cada marcador inmunológico. Dado que este procedimiento genera múltiples comparaciones por cada marcador (en este caso, seis pares posibles por marcador entre los cuatro grupos), se aplicó nuevamente una **corrección por FDR**.

Los resultados se resumen visualmente en los diagramas de caja anotados con las comparaciones post hoc significativas (**Figura 29**). Los marcadores que presentaron diferencias ajustadas fueron: **CD4+ CM**, **CD4+ EM**, **CD4+ RTE**, y **NK CD56+ CD16+**, tal como se había establecido previamente por Kruskal-Wallis.

- Para **CD4+ CM**, el **Cluster 1** muestra niveles significativamente más altos que los clusters 2, 3 y los controles ($p < 0.001$), lo que refuerza la idea de una expansión específica de la memoria T en ese subgrupo.
- En **CD4+ EM**, se observaron diferencias altamente significativas entre el **Cluster 1** y todos los demás grupos ($p < 1e-7$), indicando que este marcador es uno de los más diferenciadores del perfil inmunológico del Cluster 1.
- Por el contrario, **CD4+ RTE** mostró un patrón opuesto: los controles presentaron niveles significativamente mayores en comparación con todos los clusters, mientras que el **Cluster 1** tuvo los niveles más bajos. Este hallazgo es coherente con una reducción en la renovación tímica funcional en los pacientes, particularmente en aquellos con perfil inflamatorio más avanzado.
- En cuanto a **NK CD56+ CD16+**, el **Cluster 2** presentó valores significativamente más bajos que el **Cluster 1** y los controles, con p-valores corregidos < 0.01 , lo cual podría reflejar una supresión o redistribución de las células NK citotóxicas en ese subgrupo.

Aunque las subpoblaciones **Treg CM** y **Treg EM** no alcanzaron significación estadística, su contribución al modelo de clasificación mediante Random Forest fue destacada, situándose entre las variables con mayor importancia según el criterio de *mean decrease Gini* en un modelo de 500 árboles. Esta aparente discrepancia puede explicarse por la baja frecuencia de estas subpoblaciones (poblaciones raras), lo cual limita la potencia estadística, pero no impide que aporten un valor predictivo.

En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia cuantitativa y visual de que los **subgrupos de pacientes difieren entre sí de manera significativa en marcadores clave**, y que estas diferencias

también los separan claramente del grupo control. La aplicación del test de Dunn permitió establecer **comparaciones robustas y estadísticamente controladas** entre todos los grupos, reforzando las observaciones previas del modelo Random Forest y del clustering multivariado. Estos marcadores podrían considerarse **firmas inmunológicas distintivas** de cada subfenotipo, con potencial valor clínico o terapéutico si se validan en futuras cohortes.

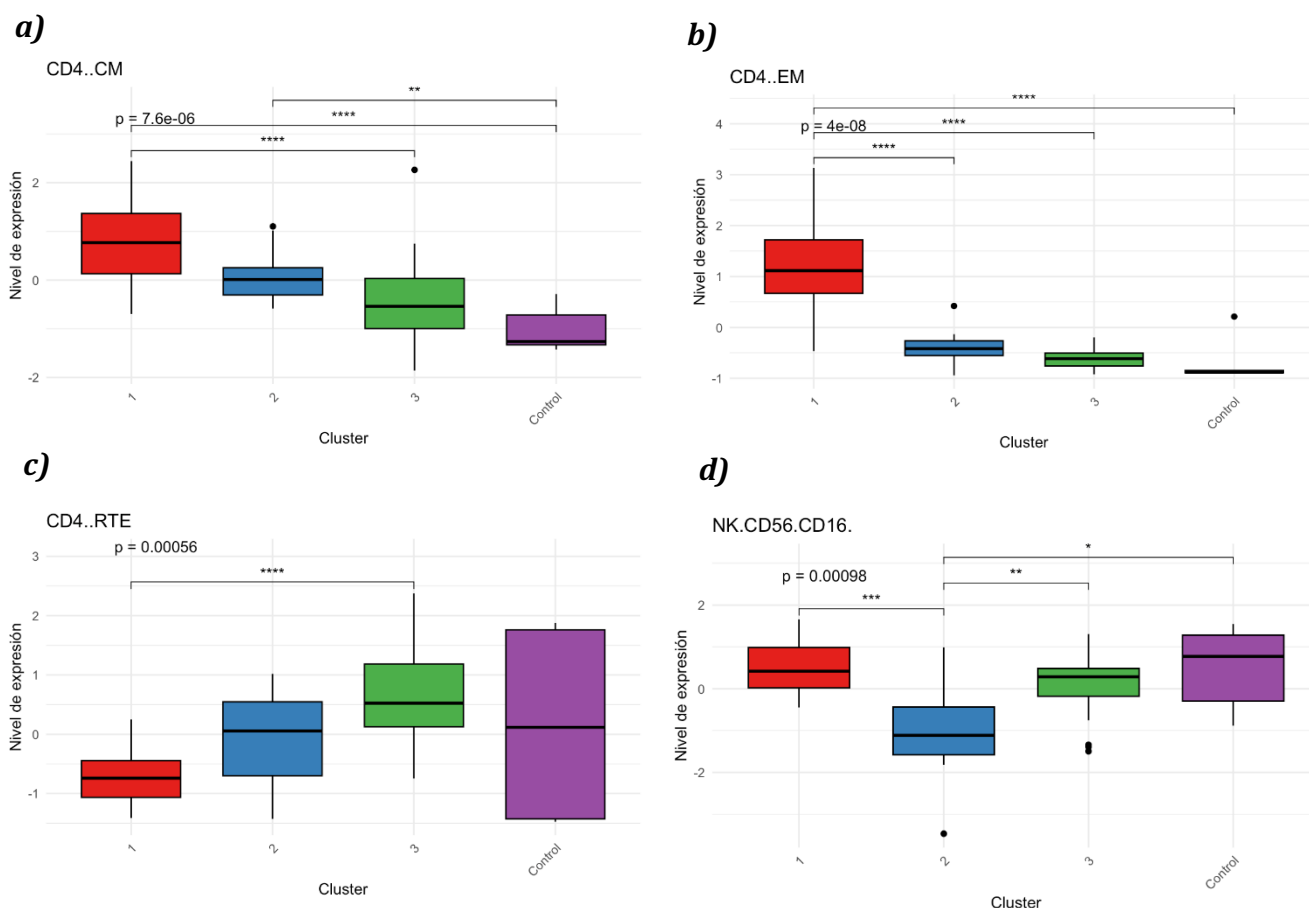


Figura 29 | Comparación post hoc de marcadores inmunológicos significativos entre clusters de pacientes y controles mediante el test de Dunn con corrección FDR. Se muestran diagramas de caja (boxplots) para los cuatro marcadores inmunológicos que resultaron estadísticamente significativos en el test de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples corregidas por FDR entre los grupos (Clusters 1, 2, 3 y Controles). Las líneas horizontales indican comparaciones entre pares con diferencias significativas, junto con sus respectivos valores de p ajustados ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$, $p^{****} < 0.0001$).

Para facilitar la interpretación clínica de los resultados obtenidos, se elaboró una tabla resumen que sintetiza el comportamiento relativo de los principales marcadores inmunológicos diferenciadores entre los grupos estudiados: los tres clusters de pacientes identificados mediante K-means y el grupo control (**Tabla 10**). Los marcadores incluidos en esta tabla fueron seleccionados con base en su significancia estadística tras la aplicación secuencial del test de Kruskal-Wallis, corrección por FDR, y comparaciones post hoc mediante el test de Dunn. Esta selección permite concentrarse en aquellos parámetros con mayor robustez analítica y relevancia biológica.

La tabla emplea un sistema de flechas para representar visualmente si cada marcador está aumentado (\uparrow), muy aumentado ($\uparrow\uparrow$), disminuido (\downarrow), muy disminuido ($\downarrow\downarrow$) o sin cambios relevantes (\approx) respecto al promedio global, tomando al grupo control como referencia. Este enfoque gráfico y sintético facilita una lectura rápida y una comparación directa entre los subgrupos, lo que resulta especialmente útil para audiencias clínicas o multidisciplinares.

Población	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Controles
CD4+ CM	$\uparrow\uparrow$	\uparrow	\uparrow	(referencia)
CD4+ EM	$\uparrow\uparrow$	\uparrow	\uparrow	(referencia)
CD4+ RTE	\downarrow	\approx	\approx	(referencia)
NK CD56+ CD16+	\approx	$\downarrow\downarrow$	\downarrow	(referencia)

Leyenda: $\uparrow\uparrow$ = Muy elevado | \uparrow = Elevado | \approx = Sin cambio relevante | \downarrow = Disminuido | $\downarrow\downarrow$ = Muy disminuido
Grupo control usado como referencia para las comparaciones entre clusters.

Tabla 10 | Tabla resumen del perfil inmunofenotípico de los clusters de pacientes tomando los controles como referencia.

4.2.2 Inmunofenotipado de función Treg

4.2.2.1 Evaluación de la naturaleza de los datos

Como paso inicial en el análisis del siguiente bloque, orientado a caracterizar el perfil funcional de las células Treg, se procedió a evaluar la distribución estadística de las variables consideradas. Esta fase exploratoria, al igual que en el bloque anterior, es esencial para establecer si los datos cumplen con los supuestos requeridos por técnicas estadísticas paramétricas, o si, por el contrario, es necesario emplear enfoques no paramétricos más robustos frente a desviaciones de normalidad. Para esta evaluación se aplicó nuevamente el **test de Shapiro-Wilk**. Los resultados del test se representaron visualmente mediante un **heatmap**, donde el color de cada celda refleja el valor p obtenido por variable: tonalidades verdes indican una distribución compatible con la normalidad ($p > 0.75$), mientras que colores rojos intensos reflejan un rechazo claro del supuesto de normalidad ($p < 0.05$).

La **Figura 30a**, correspondiente al análisis de los datos sin transformar, revela un patrón generalizado de **no normalidad en las variables Treg**, representado por la dominante coloración roja. Prácticamente todas las variables evaluadas presentan valores de p significativamente bajos, lo que indica la presencia de asimetrías marcadas. Ante este hallazgo, y siguiendo el mismo pipeline aplicado en el bloque anterior, se procedió a **normalizar los datos mediante transformación z-score**. Una vez transformados los datos, se repitió el test de Shapiro-Wilk, cuyos resultados se resumen en la **Figura 30b**. En este nuevo heatmap, se observa una mejora general en la distribución de los valores p . Aunque la mayoría de las variables aún no alcanzan niveles plenamente compatibles con la normalidad (es decir, siguen por debajo del umbral de $p > 0.75$), muchas han migrado del extremo rojo al rango **amarillo-verde**, lo que sugiere una **disminución**

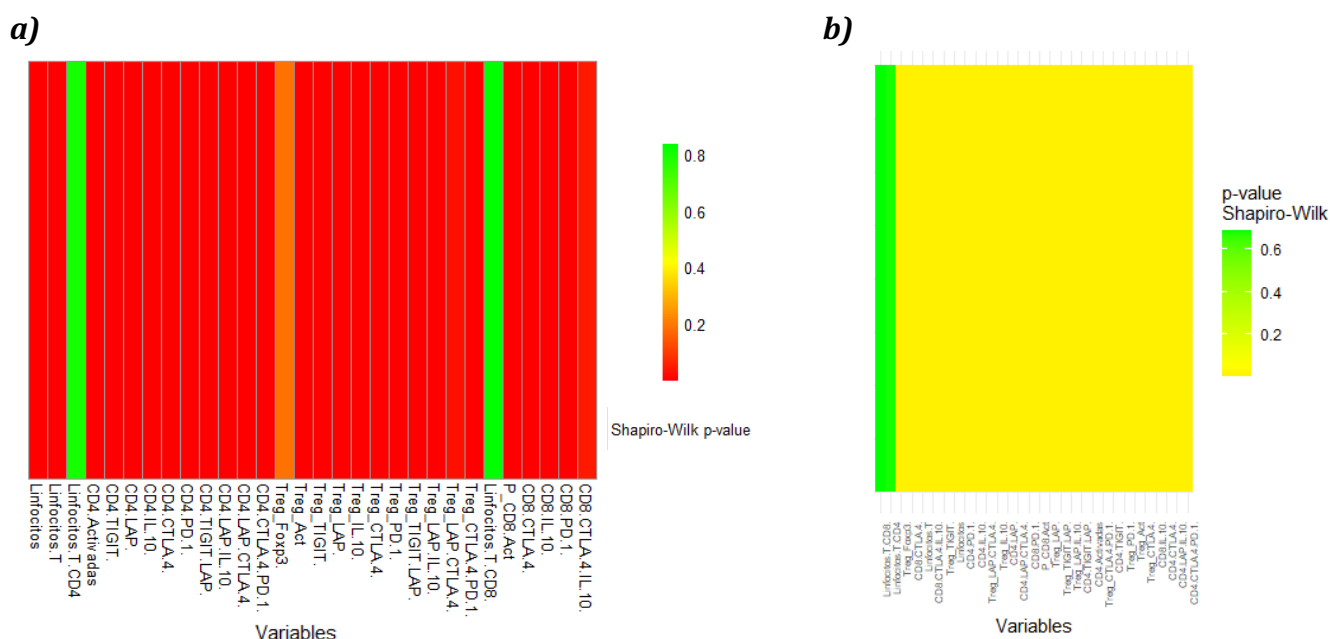
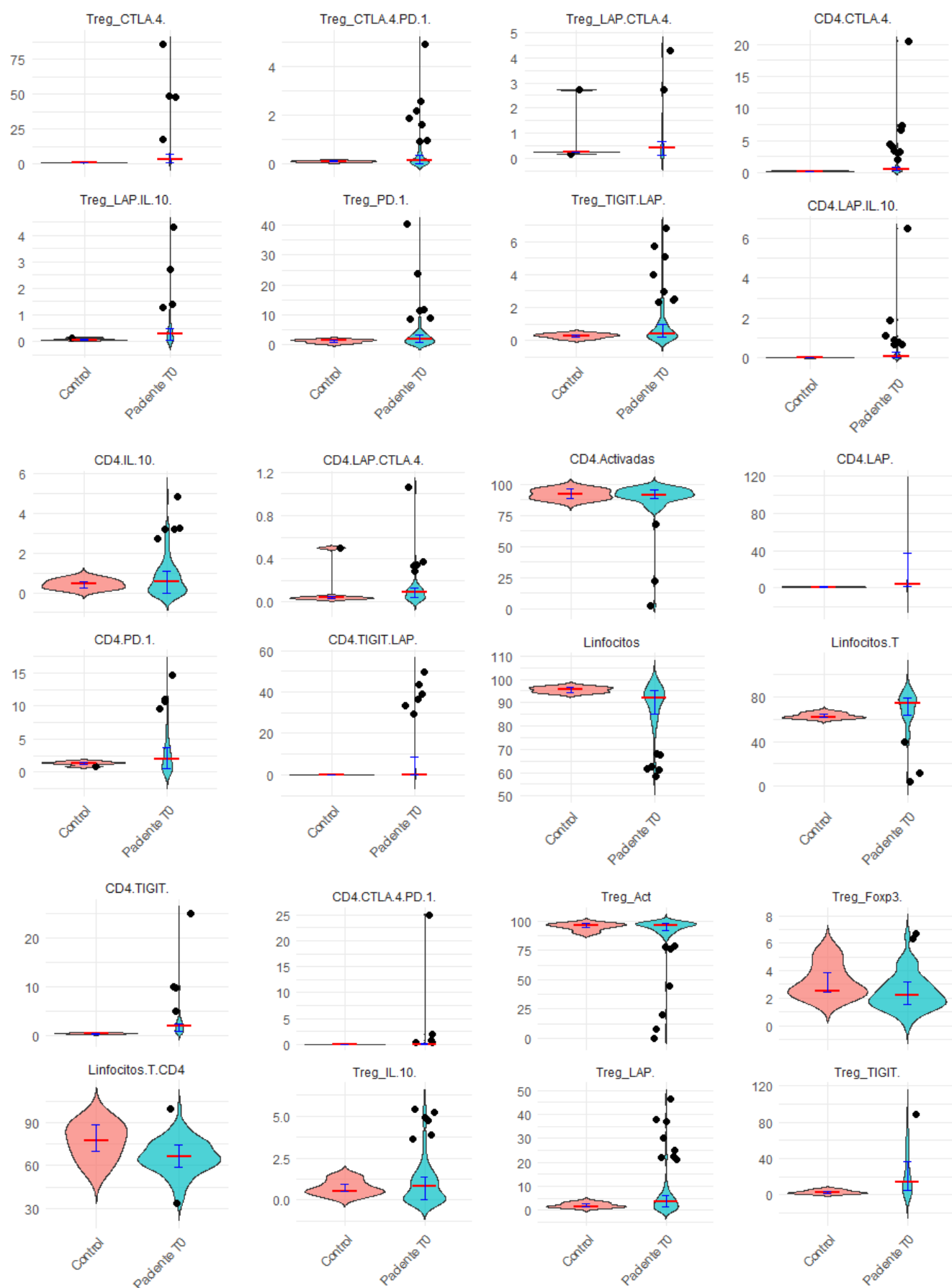


Figura 30 | Evaluación de normalidad de las variables funcionales. a) Heatmap que representa los valores p obtenidos del test de Shapiro-Wilk para cada una de las variables funcionales relacionadas con células T reguladoras, usando los datos crudos (sin transformar) antes de la transformación. La escala de colores varía desde verde ($p > 0.75$, compatible con normalidad) hasta rojo ($p < 0.05$, indicativo de distribución no normal). La marcada presencia de tonos rojos indica que la mayoría de las variables presentan distribuciones significativamente desviadas de la normalidad. **b)** Evaluación de normalidad tras normalización por z-score de variables Treg. Heatmap que resume los valores p del test de Shapiro-Wilk aplicados a las variables funcionales Treg luego de aplicar una transformación z-score. Se observa una mejora generalizada en la distribución, reflejada por el cambio de rojo a tonos amarillos y verdes en varias variables. Sin embargo, muchas de ellas aún no alcanzan el umbral necesario para asumir normalidad estadística plena, lo que motivó la adopción de métodos no paramétricos en los análisis posteriores.

En consecuencia, se concluyó que, pese a la mejora derivada de la normalización, la distribución de las variables funcionales Treg sigue sin ajustarse plenamente al modelo normal. Este resultado justificó nuevamente la elección de **métodos no paramétricos** para todos los análisis estadísticos posteriores de este bloque, tal como se hizo en la **sección 4.2.1**.

4.2.2.2 Aproximación funcional

Para obtener una primera aproximación al comportamiento funcional de las distintas poblaciones celulares implicadas en la inmunorregulación, se representaron gráficamente las distribuciones de múltiples variables inmunológicas en **pacientes en el momento basal (T0)** y en **controles sanos**.



Continuación

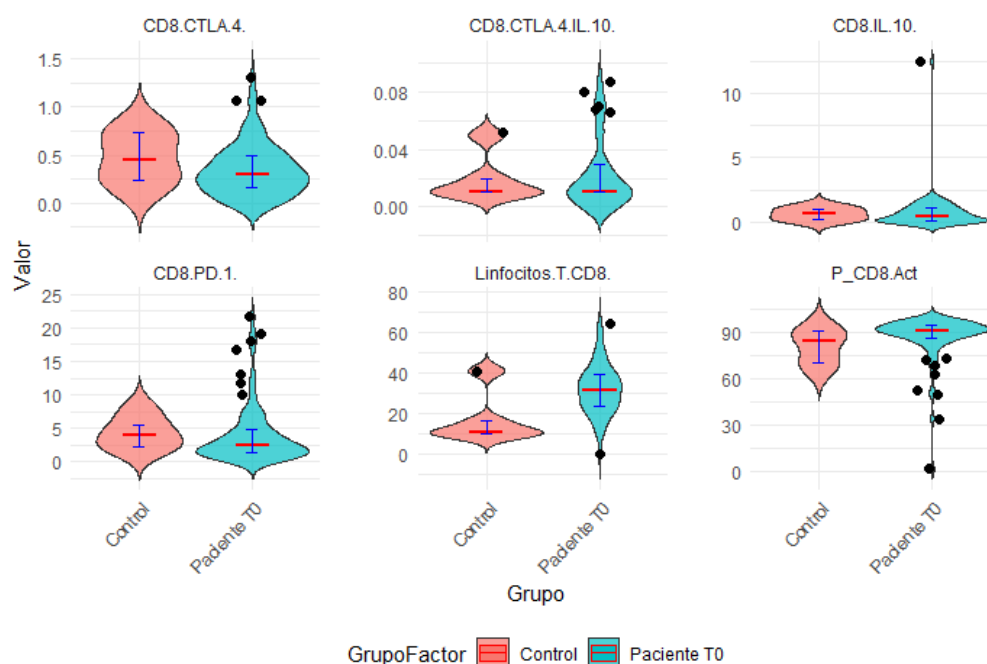


Figura 31 | Comparación de la distribución de marcadores inmunológicos entre controles y pacientes en T0 mediante gráficos de violín. Representación conjunta de múltiples variables inmunológicas funcionales y fenotípicas evaluadas en controles sanos ($n = 6$) y pacientes en el momento basal (T0). Se incluyen marcadores reguladores clave como CTLA-4, PD-1, TIGIT, LAP e IL-10 en células Treg, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Las poblaciones de pacientes muestran, en términos generales, niveles más elevados y mayor dispersión en la expresión de estos marcadores, reflejando un perfil inmunológico caracterizado por hiperactivación y heterogeneidad funcional. Por el contrario, los controles presentan distribuciones más compactas y homogéneas.

En este análisis se incluyeron tanto **marcadores funcionales en células Treg** como en **linfocitos CD4⁺ y CD8⁺**. A pesar del tamaño limitado del grupo control ($n=6$), se observa un patrón claro y consistente: los pacientes T0 presentan, en términos generales, **niveles más elevados de expresión de múltiples marcadores inmunorreguladores**, tanto en células Treg como en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (**Figura 31**). Destaca particularmente la sobreexpresión de **CTLA-4, PD-1, LAP, TIGIT e IL-10** en el grupo de pacientes, lo que sugiere un entorno inmunológico caracterizado por una **hiperactivación del eje regulador**, posiblemente en respuesta a un proceso inflamatorio subyacente. Además de las diferencias funcionales, también se observaron **variaciones en proporciones celulares generales**, como una ligera disminución en linfocitos CD4⁺ y linfocitos T en algunos pacientes, acompañadas de incrementos en subpoblaciones activadas. En conjunto, estos resultados describen un **paisaje inmunológico alterado en pacientes desde el inicio del estudio**, marcado por la activación simultánea de mecanismos efectores y reguladores.

Para enriquecer la información sobre las relaciones funcionales entre poblaciones inmunológicas más allá de sus niveles, se llevó a cabo un **análisis de coexpresión basado en correlaciones de Spearman**, construyendo redes independientes para los pacientes en el momento basal (T0), los controles sanos y una red combinada. Esta aproximación permite identificar agrupamientos funcionales de poblaciones inmunes que se comportan de forma coordinada, revelando posibles disrupciones bajo condiciones patológicas.

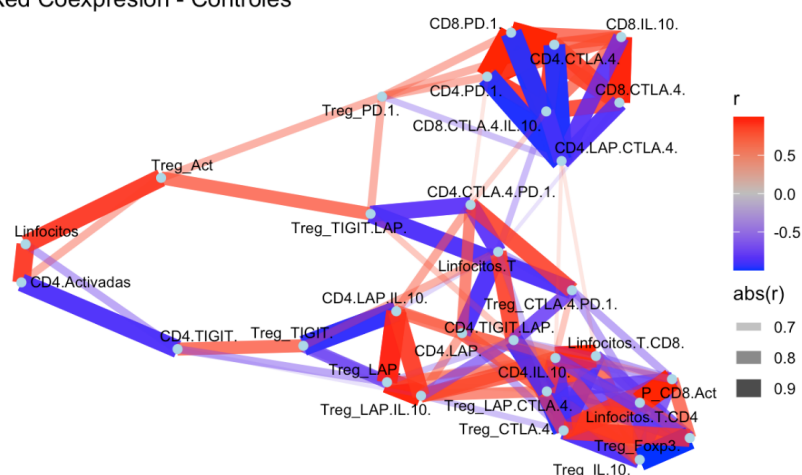
Cada nodo representa una población celular o un marcador funcional, mientras que las aristas codifican la fuerza y dirección de la correlación (positiva o negativa), facilitando una visualización integrada del sistema inmune (**Figura 32**).

La **red de los controles sanos** presenta una arquitectura **densa, bien estructurada y altamente funcional**. Se destacan múltiples módulos robustos de coexpresión que reflejan la homeostasis inmunológica en condiciones fisiológicas. Se identifican clústeres de nodos que agrupan **marcadores reguladores clásicos**, como **CTLA-4**, **LAP**, **TIGIT** e **IL-10**, tanto en células Treg como en subpoblaciones CD4⁺, con correlaciones positivas sólidas. Además, el eje IL-10, representado por **Treg_IL.10**, **CD4_IL.10**, **Treg.LAP_IL.10** y **CD4.LAP_IL.10**, forma otro subgrupo fuertemente correlacionado, lo que indica una activación funcional conjunta de los mecanismos inmunosupresores mediados por IL-10. Estas asociaciones reflejan un sistema inmunológico robustamente integrado, donde las vías de control están funcionalmente entrelazadas. Se detectan incluso correlaciones negativas fisiológicas entre células efectoras como **CD4.Activadas** y marcadores reguladores como **CD4.TIGIT**, señalando la existencia de un equilibrio dinámico entre activación y regulación inmunitaria en condiciones normales.

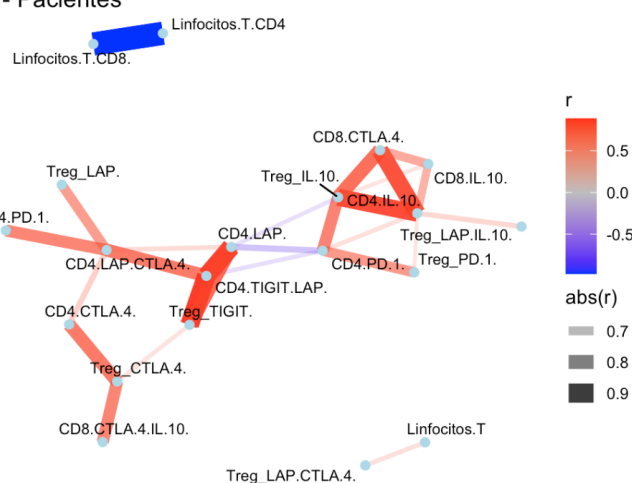
En cambio, la red generada para los **pacientes en el momento basal (T0)** reveló un panorama muy distinto. Aquí se observa una arquitectura notablemente más fragmentada en comparación con los controles. Si bien persisten algunos módulos funcionales coherentes, la red global aparece dispersa, con menor densidad de conexiones y una organización más laxa. Se identifican asociaciones entre subpoblaciones reguladoras, como la correlación positiva entre **Treg_TIGIT**, **CD4_TIGIT.LAP** y **CD4.LAP**. Asimismo, se conserva la correlación entre **CD4.CTLA.4** y **Treg_CTLA.4**, reflejando una continuidad parcial de los mecanismos reguladores mediados por estas moléculas. Sin embargo, otras correlaciones relevantes aparecen debilitadas o ausentes. Por ejemplo, el brazo regulador de linfocitos CD8⁺, aparecen con baja conectividad con otros grupos. Esta red menos estructurada refleja una **alteración del control inmunológico**, en la que algunos mecanismos continúan activos, pero de forma probablemente ineficaz o descoordinada.

La red **fusionada**, que combina a pacientes y controles, sirve para identificar correlaciones **conservadas frente a específicas** de cada grupo. En ella, se conservan algunas de las correlaciones funcionales clave, como las que conectan **CD4.CTLA.4** con **Treg_CTLA.4**, o **CD4.LAP.CTLA.4** con **Treg_LAP.CTLA.4**. También persisten asociaciones entre **CD4_IL.10** y **Treg_IL.10**, y entre **CD4.TIGIT.LAP** y **Treg_TIGIT.LAP**, lo que sugiere que ciertos ejes inmunorreguladores se mantienen relativamente estables a pesar del contexto patológico. Sin embargo, la pérdida de densidad en muchas conexiones, así como la disolución de algunos módulos completos observados en los controles, evidencian una alteración significativa de la **coordinación funcional** del sistema inmunológico en pacientes.

a) Red Coexpresión - Controles



b) Red Coexpresión - Pacientes



c) Red Coexpresión - Fusiónada

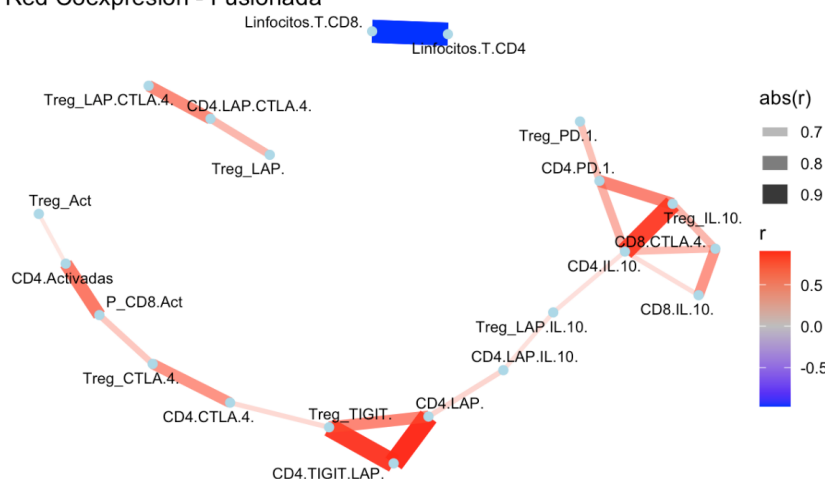


Figura 32 | Redes de coexpresión inmunológica. a) Representación de las correlaciones de Spearman entre marcadores funcionales y subpoblaciones inmunológicas en el grupo control. La red muestra una arquitectura altamente estructurada, con agrupaciones funcionales consistentes entre poblaciones Treg, CD4⁺ y CD8⁺, lo que sugiere un sistema inmunológico coordinado y equilibrado en condiciones fisiológicas. **b)** Red de coexpresión inmunológica en pacientes (T0). A diferencia de los controles, la red presenta una estructura más fragmentada y menor densidad de conexiones, reflejando una pérdida de coordinación funcional entre marcadores. Se mantienen algunos módulos relacionados con regulación inmunológica, pero se pierden relaciones clave observadas en sujetos sanos. **c)** Red de coexpresión inmunológica fusionada (controles + pacientes). La fusión revela una arquitectura mixta que refleja tanto estabilidad de ciertas relaciones como disrupciones funcionales propias del entorno inmunológico alterado de los pacientes. El grosor indica la magnitud ($|r|$) y el color la dirección: rojo para asociaciones positivas, azul para negativas.

4.2.2.3 Exploración de agrupamientos funcionales

Tras realizar el análisis de correlación mediante redes de coexpresión, se procedió a una reducción de dimensionalidad utilizando la técnica UMAP, esta vez aplicada exclusivamente a los marcadores funcionales relacionados con poblaciones inmunorreguladoras. Este enfoque tuvo como objetivo explorar si existía una estructura latente capaz de discriminar subgrupos funcionales entre los pacientes al igual que los hallazgos encontrados sobre la heterogeneidad inmunofenotípica en la **sección 4.2.1.2**. Previamente, y con el fin de mitigar posibles sesgos derivados de la procedencia geográfica (Barcelona vs Madrid), se aplicó una corrección por batch effect utilizando el método ComBat, asegurando que las diferencias observadas en el espacio UMAP fuesen atribuibles a la biología de los pacientes y no a efectos técnicos o de lugar de reclutamiento.

En la **Figura 33**, que representa el resultado del UMAP aplicado a los pacientes y controles en base a los marcadores funcionales (ya corregidos por población), se observa una separación clara entre ambos grupos. Los controles aparecen proyectados en regiones periféricas del mapa, sin integrarse con las principales agrupaciones de pacientes, lo que sugiere una diferencia entre ambos. Además, dentro del grupo de pacientes, no se aprecia una distribución homogénea sino más bien la presencia de una variabilidad que sugiere la existencia de subgrupos funcionalmente distintos.

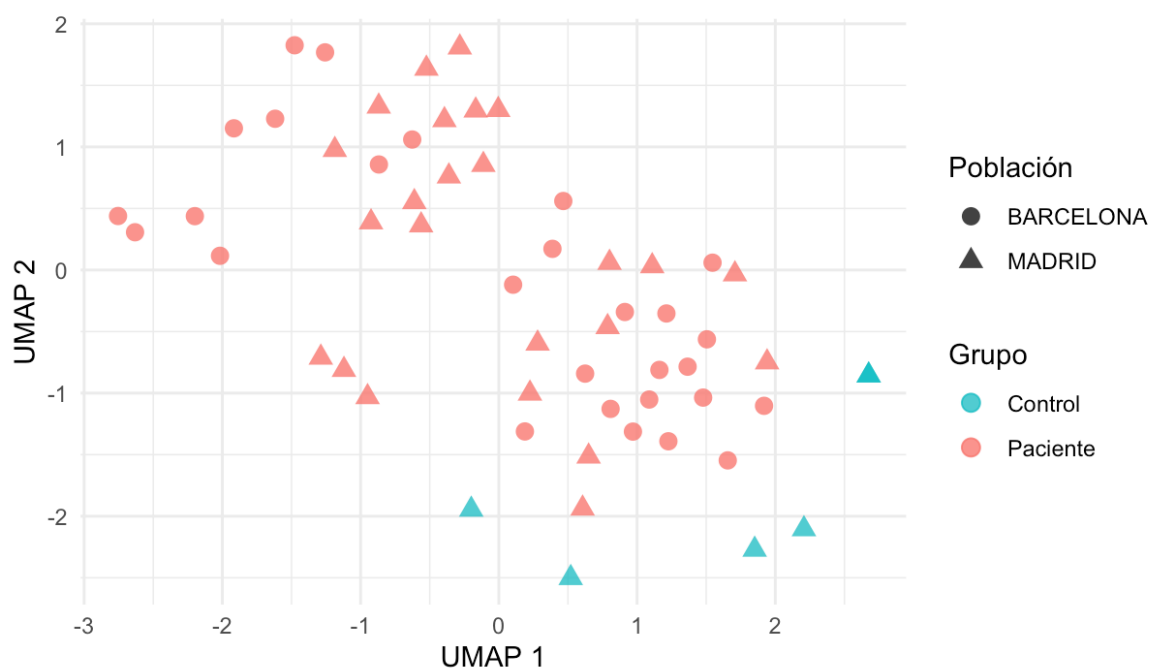


Figura 33 | UMAP de funcionalidad inmunorreguladora en pacientes y controles (corregido por población). Representación bidimensional mediante UMAP basada exclusivamente en marcadores funcionales inmunorreguladores, tras aplicar normalización tipo z-score y corrección por efecto lote (batch effect) utilizando el método ComBat. Los pacientes (círculos y triángulos rojos) se distribuyen de forma agrupada, mientras que los controles (círculos y triángulos en azul turquesa) se proyectan en regiones periféricas del espacio, indicando una clara separación funcional. La forma de los puntos representa la procedencia geográfica (círculo: Barcelona; triángulo: Madrid), mostrando una distribución equilibrada tras la corrección. Esta representación sugiere una organización latente entre los pacientes que motiva la posterior aplicación de técnicas de clustering.

Para confirmar esta sospecha, se procedió a la aplicación del algoritmo de clustering K-means sobre el espacio UMAP de los pacientes, seleccionando $k = 2$ como número óptimo de clusters tras evaluar distintos criterios de robustez (curva del codo, índice de silueta y validación empírica). El resultado, mostrado en la segunda figura, revela dos clústeres de pacientes bien definidos, representados en rojo (Cluster 1) y púrpura (Cluster 2) (Figura 34). Cabe destacar que la proyección de los controles en el mismo espacio confirma que ambos clústeres de pacientes se alejan significativamente de la fisiología inmunológica representada por los controles, lo que refuerza la noción de que esta clasificación no responde a un patrón normal de variabilidad sino a diferencias inmunológicas relevantes. Además, la distribución balanceada de los pacientes en ambos clústeres, sin una clara agrupación por centro de procedencia ni por sesgo técnico, sugiere que estas diferencias son intrínsecas al estado inmunológico funcional de cada paciente.

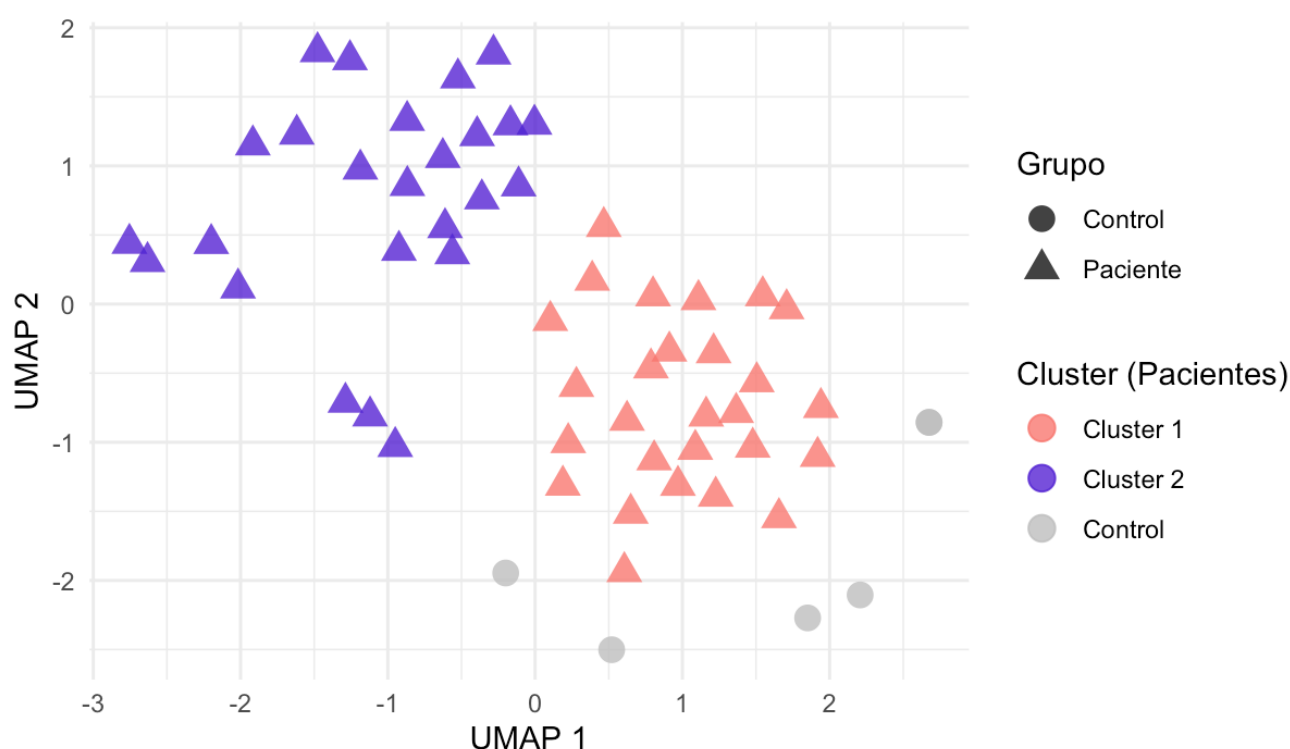


Figura 34 | UMAP de funcionalidad Treg en pacientes clusterizados ($k=2$) y controles proyectados. Agrupación de pacientes en dos clústeres funcionales (Cluster 1 en rojo y Cluster 2 en púrpura) mediante la técnica de K-means aplicada sobre las componentes UMAP de marcadores funcionales. La clasificación se realizó exclusivamente con pacientes, y posteriormente se proyectaron los controles (círculos grises) en el mismo espacio para su comparación. La separación entre clústeres sugiere diferencias funcionales inmunorreguladoras relevantes dentro de la cohorte de pacientes, independientes de factores técnicos o geográficos. La posición periférica de los controles refuerza la hipótesis de que ambos subgrupos de pacientes se alejan del perfil inmunológico fisiológico.

4.2.2.4 Determinación de perfiles funcionales y búsqueda de biomarcadores

Tras haber definido dos clústeres funcionales de pacientes mediante UMAP y K-means ($k = 2$), se procedió a caracterizar el perfil inmunológico funcional promedio de cada grupo, integrando además el

perfil correspondiente al grupo control. Para ello, se generó un heatmap que representa la media estandarizada (*z-score*) de los marcadores funcionales inmunorreguladores por grupo, con el fin de explorar visualmente las diferencias globales entre los patrones de expresión (**Figura 35**).

A nivel visual, se observa una **clara separación entre los dos clústeres de pacientes (Cluster_1 y Cluster_2)**, con patrones de expresión notablemente diferenciados en la mayoría de las variables funcionales representadas. Esta divergencia sugiere que los grupos identificados mediante *K-means* reflejan **perfiles inmunológicos funcionales distintos**, consistentes y reproducibles tras la reducción dimensional. Asimismo, el grupo de **controles** (Cluster_Control) muestra predominantemente valores negativos (azules) en la mayoría de las funciones evaluadas, lo que sugiere una menor activación o expresión funcional en comparación con los otros clusters. Esto es consistente con un perfil inmunológico basal, donde la activación de marcadores como CTLA4, PD1, LAP y TIGIT suele ser baja en ausencia de estimulación o en condiciones fisiológicas normales. Esto refuerza la hipótesis de que tanto Clúster 1 como Clúster 2 representan estados inmunológicos alterados o desviados de la homeostasis fisiológica, cada uno con un patrón funcional distintivo.

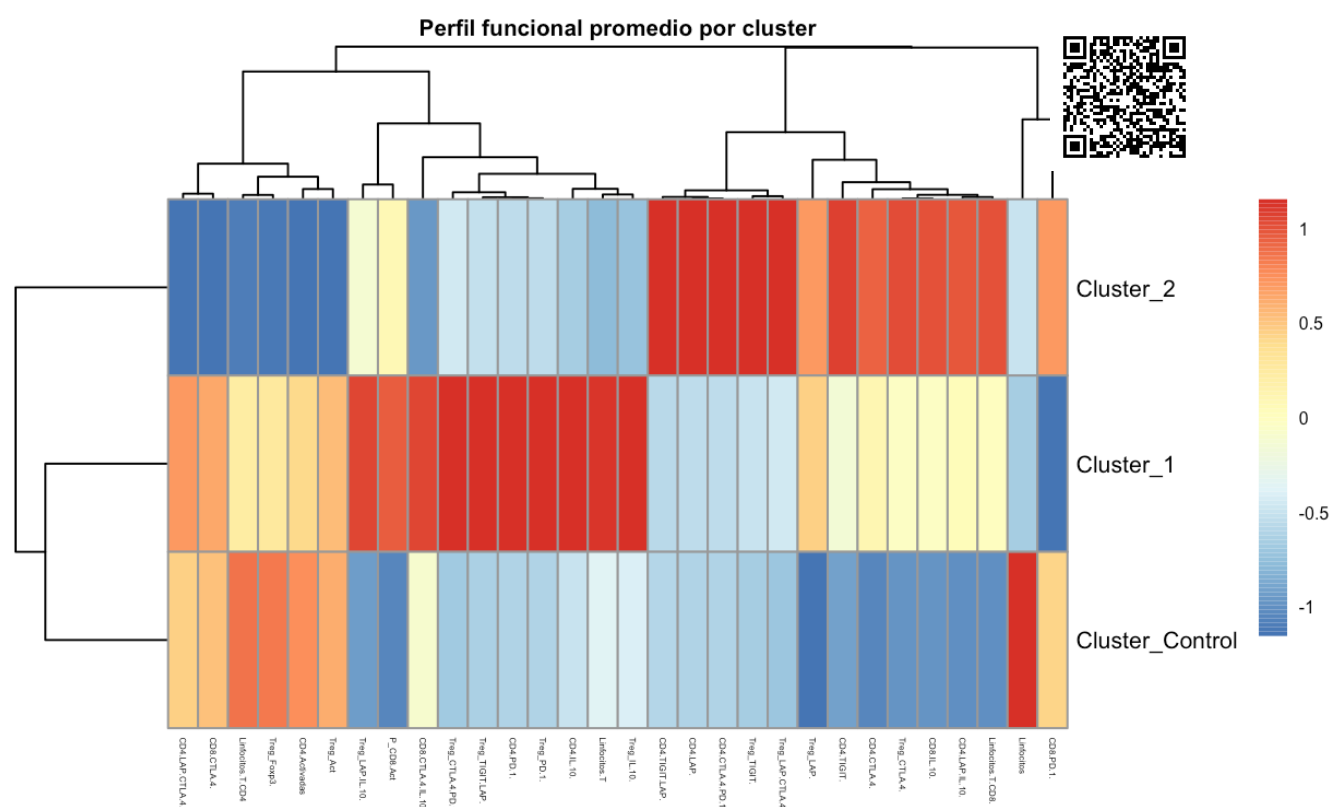


Figura 35 | Heatmap del perfil funcional promedio por clúster de pacientes y controles. Se representa la expresión media estandarizada (Z-score) de diversos marcadores de funcionalidad inmunológica, particularmente asociados a células Treg, en los dos grupos de pacientes identificados mediante clustering no supervisado (Cluster_1 y Cluster_2) y el grupo de controles sanos (Cluster_Control). Los colores reflejan la abundancia relativa respecto a la media global: rojo indica mayor expresión (valores por encima del promedio), azul menor expresión (valores por debajo del promedio) y amarillo valores intermedios. El dendrograma superior muestra la agrupación jerárquica de individuos basada en la similitud de sus perfiles funcionales. Escanear QR.

Para comprender en mayor profundidad los determinantes inmunológicos que subyacen a la separación entre los dos clústeres funcionales identificados previamente, se aplicó un modelo de Random Forest utilizando como input los marcadores funcionales evaluados. Los resultados del modelo, entrenado con 500 árboles, revelan un ranking claro de los marcadores más discriminativos (**Figura 36**). Encabezando la lista se encuentra **CD8.CTLA.4**. Le siguen **CD4.IL.10** y **Treg_TIGIT**. La elevada importancia de estos tres marcadores sugiere que la capacidad reguladora mediada tanto por Treg como por células T convencionales CD4⁺ y CD8⁺ constituye un eje diferencial fundamental entre los subgrupos funcionales. También destacan marcadores adicionales de linfocitos T cooperadores (como **CD4.LAP** y **CD4.TIGIT.LAP**), citotóxicos (**CD8.IL.10**) y reguladores (**Treg_IL.10**, **Treg_CTLA.4.PD.1**), apuntando a un fenómeno de regulación inmunitaria distribuida transversalmente entre distintas poblaciones T. Cabe resaltar la presencia en el top-15 de variables como **Linfocitos.T.CD4** y **Linfocitos.T.CD8**, lo que indica que no solo la funcionalidad molecular sino también la abundancia de estas subpoblaciones tiene valor discriminante.

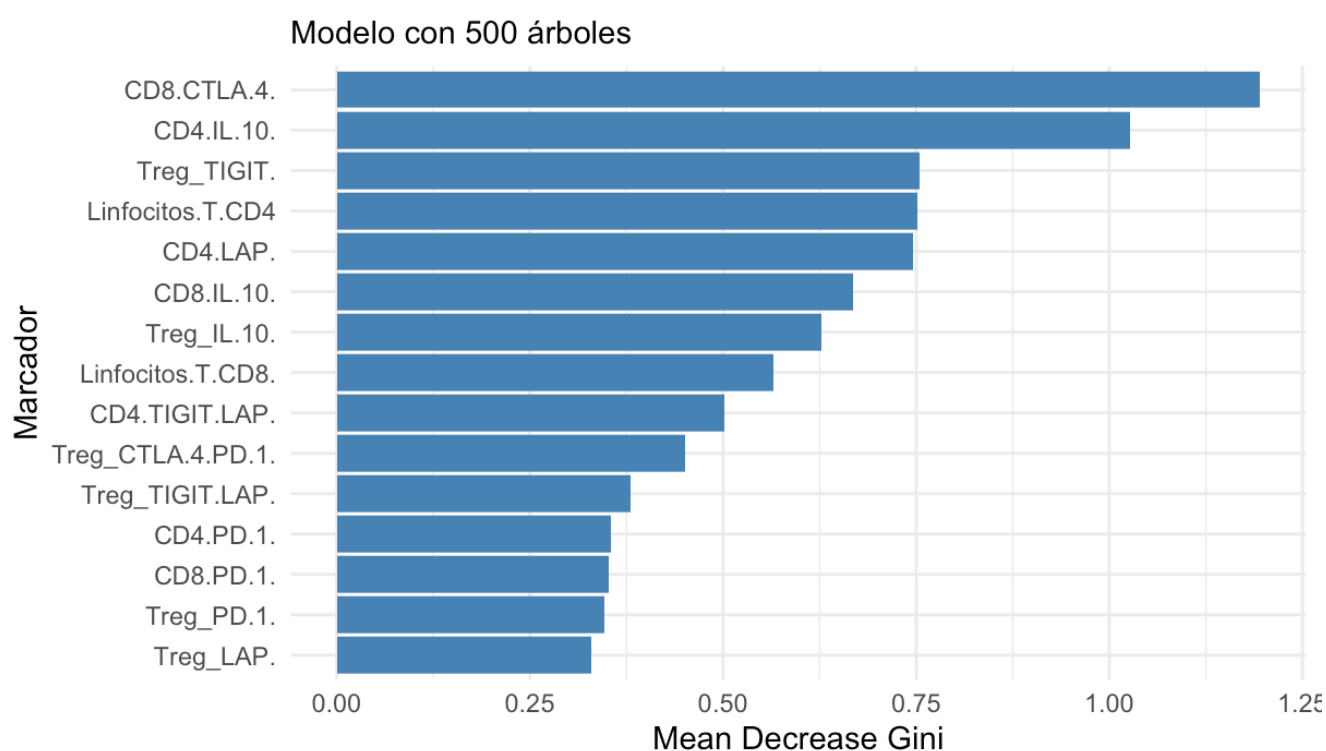


Figura 36 / Importancia de las variables funcionales en la clasificación de pacientes según el modelo Random Forest. El gráfico muestra el ranking de los 15 marcadores con mayor capacidad discriminativa entre los dos clústeres funcionales identificados previamente, según el índice Mean Decrease Gini. Este valor refleja la contribución de cada variable a la reducción de la impureza del modelo en cada árbol de decisión. Los marcadores más relevantes incluyen **CD8.CTLA.4**, **CD4.IL.10** y **Treg_TIGIT**, todos ellos relacionados con mecanismos de inmunorregulación, lo que sugiere que las diferencias entre clústeres están fuertemente influenciadas por la funcionalidad supresora de las células T.

Tras la identificación de las variables con mayor capacidad discriminativa mediante Random Forest, se aplicó un análisis estadístico no paramétrico usando el test de Kruskal-Wallis, seguido de una corrección por FDR para controlar el riesgo de falsos positivos en el contexto de comparaciones múltiples. Esta

estrategia permitió determinar qué marcadores funcionales mostraban diferencias estadísticamente significativas entre los dos clústeres funcionales de pacientes previamente definidos, así como en relación con el grupo control.

La **Figura 37** presenta un conjunto de diagramas de caja para los principales marcadores inmunosupresores cuya expresión fue significativamente diferente entre los grupos. En general, se observan patrones diferenciados entre los clústeres: por ejemplo, el **Cluster 1 (verde)** se caracteriza por una marcada sobreexpresión de múltiples moléculas reguladoras como **CD4.IL.10**, **CD4.PD.1**, **Treg_IL.10** o **Treg_TIGIT.LAP**, lo que sugiere un perfil inmunológico altamente regulador o compensatorio. Por el contrario, el **Cluster 2 (azul)** muestra en general valores más bajos para la mayoría de estos marcadores, con una excepción notable en **CD4.TIGIT.LAP** y **Treg_TIGIT**, donde presenta una elevación relativa frente a los otros grupos. El **grupo control (rojo)** por su parte, presenta un perfil intermedio o bajo en la mayoría de los marcadores, lo que sugiere un estado homeostático más equilibrado en comparación con los pacientes.

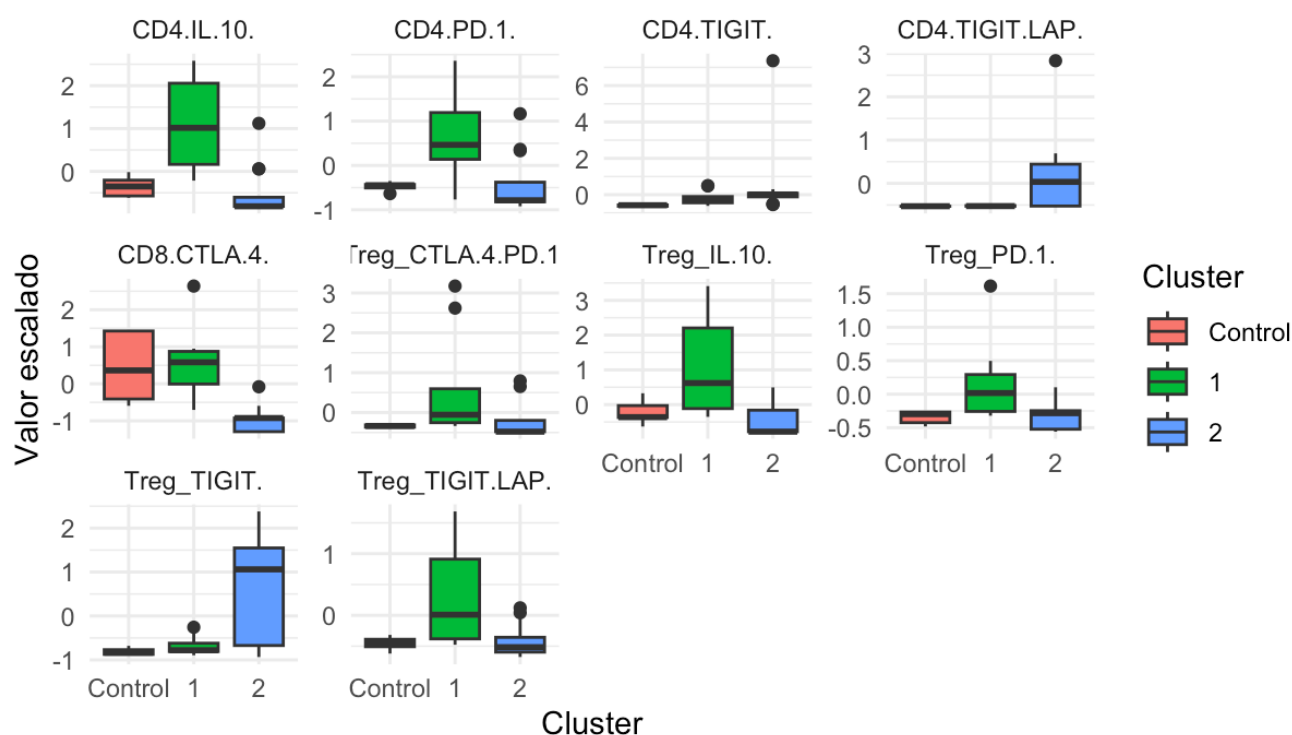


Figura 37 | Comparación de la expresión de las principales moléculas inmunorreguladoras identificadas como significativamente diferentes entre grupos mediante el test de Kruskal-Wallis con corrección FDR. Se muestran los valores escalados (z-score) de los marcadores funcionales que mejor discriminan entre los dos clústeres de pacientes (Cluster 1 y Cluster 2) y el grupo control. Cada diagrama de caja representa la distribución de la expresión de una variable específica dentro de cada grupo. El Cluster 1 (verde) destaca por una mayor expresión relativa en la mayoría de marcadores supresores, mientras que el Cluster 2 (azul) muestra niveles más bajos, y los controles (rojo) presentan perfiles generalmente intermedios o basales. Estos hallazgos refuerzan la existencia de fenotipos funcionales inmunorreguladores distintos dentro de la cohorte de pacientes.

Después de identificar un conjunto de marcadores supresores relevantes para la estratificación de pacientes, se aplicó un test de Dunn con corrección por FDR para comparaciones múltiples entre los tres grupos definidos: **Control**, **Cluster 1** y **Cluster 2**. Este análisis permitió detectar con precisión qué comparaciones entre grupos mostraban diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estos marcadores inmunológicos funcionales (**Figura 38**).

En el caso de **CD4.TIGIT.LAP**, se observó una expresión significativamente más alta en el **Cluster 2** en comparación tanto con el **Cluster 1** como con los **Controles**, lo que sugiere una mayor activación del eje TIGIT-LAP en células T CD4+ de este subgrupo. Este marcador se asocia con mecanismos de regulación periférica, especialmente en contextos de tolerancia mantenida o supresión inmune activa.

Para **CD8.CTLA.4**, en cambio, la expresión fue significativamente **más alta en el grupo Control** que en los dos clusters de pacientes, y especialmente más baja en el **Cluster 2**.

En cuanto a **CD4.PD.1**, se detectó una **expresión significativamente mayor en el Cluster 1** frente al **Cluster 2** y los **Controles**, lo cual podría reflejar una activación sostenida o una tendencia al agotamiento funcional de células T CD4+ en este grupo específico. El hecho de que el grupo control presentara niveles bajos sugiere que este marcador es más representativo de una alteración funcional en pacientes.

En el análisis de **CD4.LAP.IL.10**, el **Cluster 2** mostró niveles más altos que los **Controles**, y también significativamente superiores a los de **Cluster 1**, reforzando el perfil altamente regulador de este subgrupo. Esta combinación de LAP e IL-10 es típica de células con funciones inmunosupresoras robustas.

Para **CD4.TIGIT**, los resultados mostraron diferencias significativas entre **Cluster 2** y **Controles**, con niveles más altos en el grupo de pacientes, aunque no se observaron diferencias destacables entre los dos clusters de pacientes. Por su parte, **CD4.CTLA.4.PD.1** también evidenció diferencias significativas entre **Cluster 1** y los **Controles**, con mayor expresión en pacientes, mientras que las diferencias con el **Cluster 2** no fueron significativas.

En cuanto a **CD4.IL.10**, el marcador mostró diferencias altamente significativas entre **Cluster 2** y los otros dos grupos, con una expresión marcadamente más alta en el **Cluster 2**. Este hallazgo es consistente con una mayor capacidad de producción de citoquinas inmunorreguladoras en este subgrupo de pacientes, y refuerza su perfil funcional supresor.

Finalmente, **CD4.LAP** presentó un patrón similar al de IL-10, con expresión significativamente mayor en **Cluster 2** respecto a **Cluster 1** y **Controles**, lo que reafirma la activación de mecanismos reguladores en este subgrupo.

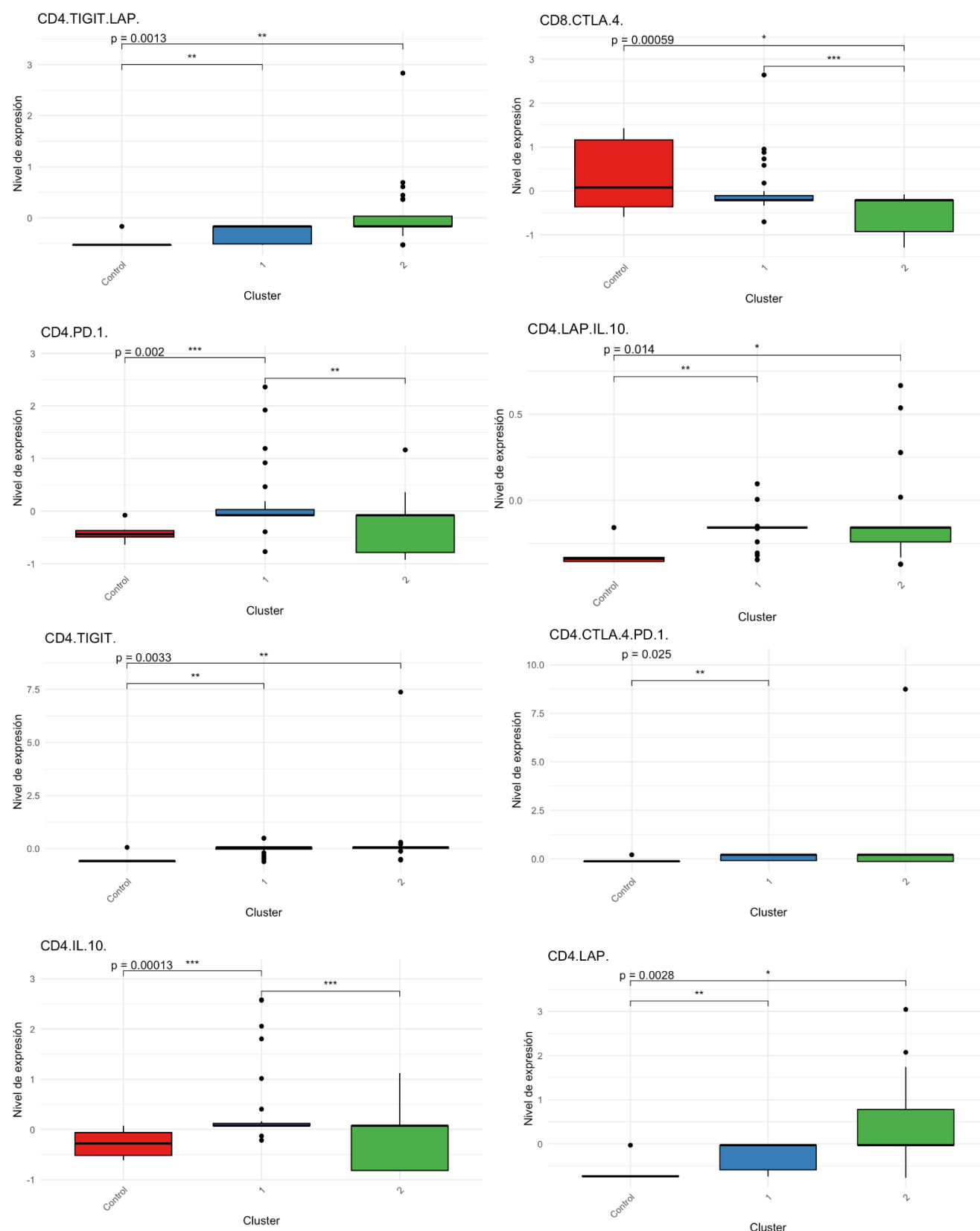


Figura 38 | Comparación post hoc mediante test de Dunn con corrección FDR entre grupos (Control, Cluster 1 y Cluster 2) para los principales marcadores supresores. Cada panel muestra los niveles de expresión escalada de una variable funcional inmunitaria asociada con mecanismos reguladores, en función del grupo asignado. Los valores se presentan como diagramas de caja (boxplots), e incluyen significancia estadística para las comparaciones múltiples entre grupos ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$, $p^{****} < 0.0001$).

Con el fin de facilitar la interpretación clínica de los resultados derivados del análisis de expresión de marcadores inmunológicos, se construyó una tabla resumen que sintetiza el comportamiento relativo de los principales parámetros diferenciales entre los grupos evaluados.

La **Tabla 11** utiliza un sistema de flechas para representar visualmente los cambios relativos en la expresión de cada marcador: flechas hacia arriba (\uparrow o $\uparrow\uparrow$) indican un aumento o aumento marcado en comparación con los controles, mientras que flechas hacia abajo (\downarrow o $\downarrow\downarrow$) reflejan una disminución relativa. El símbolo \approx se emplea para denotar ausencia de cambios relevantes. Esta representación gráfica permite una rápida visualización del patrón inmunológico característico de cada subgrupo, facilitando así su interpretación por parte de equipos clínicos, investigadores traslacionales y otros profesionales multidisciplinares.

Marcador	Cluster 1	Cluster 2	Controles
$CD4^+ TIGIT^+ LAP^+$	\uparrow	$\uparrow\uparrow$	(referencia)
$CD8^+ CTLA-4^+$	\approx	\downarrow	(referencia)
$CD4^+ PD-1^+$	\uparrow	\approx	(referencia)
$CD4^+ LAP^+ IL-10^+$	\uparrow	\uparrow	(referencia)
$CD4^+ TIGIT^+$	\uparrow	\uparrow	(referencia)
$CD4^+ CTLA-4^+ PD-1^+$	\approx	\approx	(referencia)
$CD4^+ IL-10^+$	\uparrow	\approx	(referencia)
$CD4^+ LAP^+$	\uparrow	$\uparrow\uparrow$	(referencia)

Leyenda: $\uparrow\uparrow$ = Muy elevado | \uparrow = Elevado | \approx = Sin cambio relevante | \downarrow = Disminuido | $\downarrow\downarrow$ = Muy disminuido
Grupo control usado como referencia para las comparaciones entre clusters.

Tabla 11 | Tabla resumen del perfil inmunoregulatorio de los clusters de pacientes tomando los controles como referencia.

4.2.3 Integración clínica

Para abordar de manera integral la complejidad inmunológica subyacente en la enfermedad de EI por desregulación inmune, el **Bloque III** del estudio se centró en la **integración exhaustiva de tres dimensiones de datos complementarios**: inmunofenotipado avanzado, funcionalidad reguladora y parámetros clínicos clave (edad, sexo, perfil genético, tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor, y clasificación fenotípica según criterios ESID). Esta integración se diseñó con el objetivo de generar una **visión holística y transversal** del estado inmunológico de los pacientes, superando las limitaciones de los análisis parciales realizados por separado en los bloques anteriores.

4.2.3.1 Determinación de la distribución de los datos

Como primer paso para abordar el análisis integrativo, y siguiendo la misma estrategia utilizada en los bloques previos, se procedió a la normalización de los datos mediante el algoritmo de estandarización z-

score. Esta transformación estadística fue aplicada a un archivo consolidado en formato CSV que integraba las tres dimensiones clave de información previamente descritas. Con el fin de explorar la posible persistencia de un efecto de lote derivado de la procedencia geográfica de las muestras, se utilizó nuevamente la variable clínica “clasificación fenotípica” como marcador de referencia. Tal como se muestra en la **Figura 39** (panel izquierdo), la representación UMAP de los datos antes de la corrección revela una agrupación de los pacientes según el lote de origen. Sin embargo, también se observa que la distribución de los individuos no sigue un patrón definido según el grupo clínico, dispersándose de forma heterogénea a lo largo del espacio UMAP. Dada esta evidencia, y en coherencia con los análisis anteriores, se aplicó el algoritmo de corrección por efecto lote ComBat sobre la variable de procedencia. Tras esta corrección (**Figura 38**, panel derecho), se constató una desaparición de las agrupaciones espurias por lote, permitiendo una integración más adecuada y libre de sesgos técnicos para los análisis posteriores.

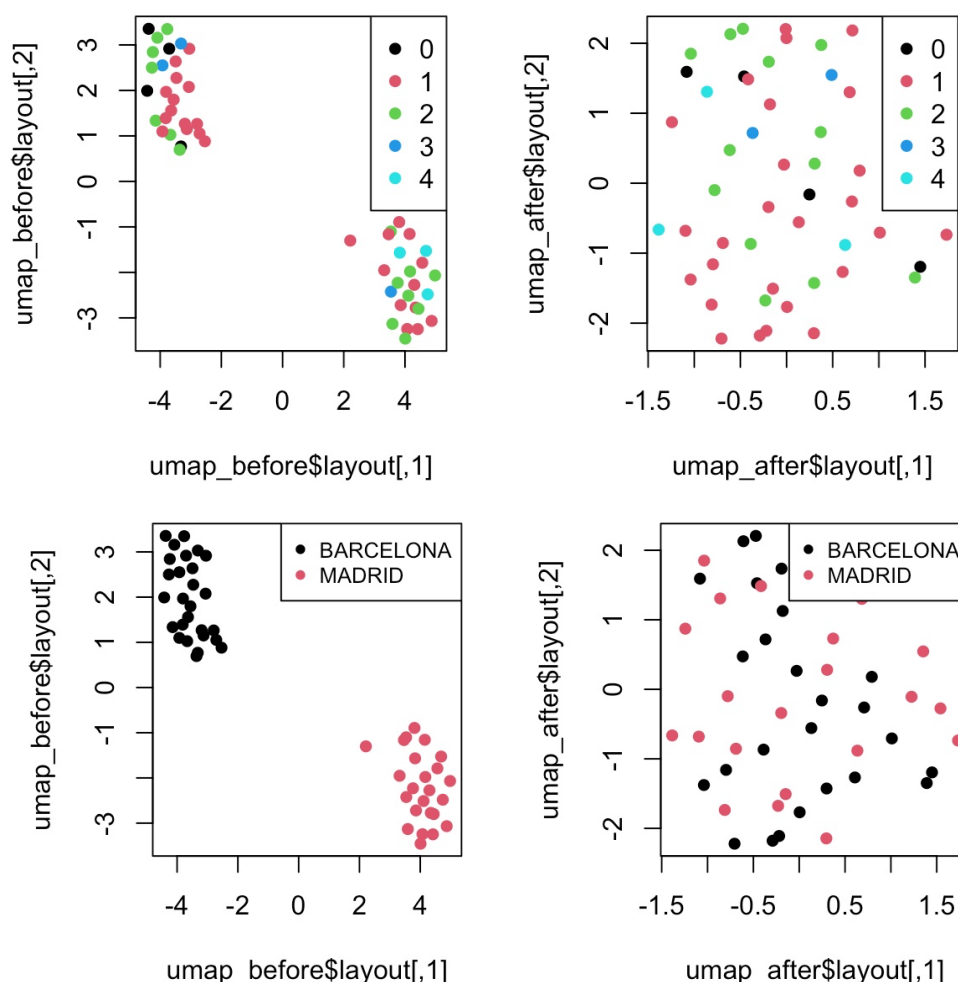


Figura 39 | Visualización UMAP de los datos integrados antes y después de la corrección por efecto lote. Proyección UMAP de las muestras consolidadas en el análisis integrativo, coloreadas según el grupo fenotípico asignado, donde 0 = no clínica PIRD, 1 = ALPID/ALPS, 2 = defecto tímico, autoinmunidad organoespecífica o sistémica, Tregopatías, 3 = susceptibilidad VEB/HLH, 4 = VEO-IBD. En el panel izquierdo se observa la distribución de las muestras tras la normalización z-score pero antes de la corrección por lote, evidenciando una agrupación asociada a la procedencia geográfica. En el panel derecho, tras aplicar la corrección por efecto lote mediante el algoritmo ComBat, se elimina dicha agrupación artificial, permitiendo una distribución más homogénea e independiente del centro de origen.

4.2.3.2 Perfil tridimensional (inmunológico, funcional y clínico)

Una vez corregido el efecto lote, se procedió a visualizar la estructura global de los datos mediante un **heatmap complejo**, incorporando simultáneamente variables clínicas y parámetros inmunológicos relevantes. Esta estrategia permite evaluar relaciones multidimensionales entre pacientes y características, y explorar patrones emergentes de agrupación no evidentes en análisis univariantes.

A nivel visual, el heatmap revela una notable heterogeneidad entre los pacientes, con perfiles diferenciados que no se alinean estrictamente con los grupos fenotípicos definidos (**Figura 40a**). Si bien se observan ciertas agrupaciones locales de pacientes con patrones similares (lo cual sugiere la existencia de subperfiles inmunológicos consistentes), también se constata una importante variabilidad interindividual incluso dentro de un mismo grupo diagnóstico. En cuanto a la distribución de las variables, algunas características inmunológicas muestran una clara segmentación vertical con bloques de alta o baja expresión que coinciden con subconjuntos de pacientes, lo que podría apuntar a firmas inmunofenotípicas específicas. Otras variables, en cambio, presentan patrones difusos o sin correlación aparente con la clasificación clínica, lo que subraya la complejidad del fenotipo inmunológico y la posibilidad de fenotipos clínicos solapados o mal definidos bajo los criterios actuales.

Con el fin de examinar de manera más focalizada el comportamiento de las variables clínicas fundamentales, se generó un segundo heatmap complejo en el que se incluyeron exclusivamente las variables cualitativas: **mutación genética identificada, grupo clínico, y tratamiento inmunomodulador e inmunosupresor**. Esta visualización tuvo como objetivo explorar posibles patrones clínicos emergentes sin la interferencia de la variabilidad introducida por las variables inmunológicas cuantitativas.

Sin embargo, el análisis visual reveló que **la distribución de los pacientes se mantuvo prácticamente inalterada con respecto al heatmap original** que incluía todas las dimensiones clínicas e inmunológicas. No se evidenciaron cambios significativos en la estructura de agrupación ni en la organización general de los pacientes, lo que sugiere que estas variables clínicas, si bien relevantes, **no son las principales responsables de la heterogeneidad observada** en el conjunto de datos. Tampoco se identificaron agrupaciones robustas asociadas a combinaciones específicas de grupo clínico, genética o tratamiento.

Este resultado refuerza la interpretación previa de que la variabilidad en el perfil inmunológico individual es más determinante para la organización global de los pacientes que las variables clínicas per se. En conjunto, ambos heatmaps indican que los pacientes PIRD presentan una **dispersión clínica e inmunológica elevada**, sin una estratificación clara basada exclusivamente en los parámetros clínicos tradicionales.

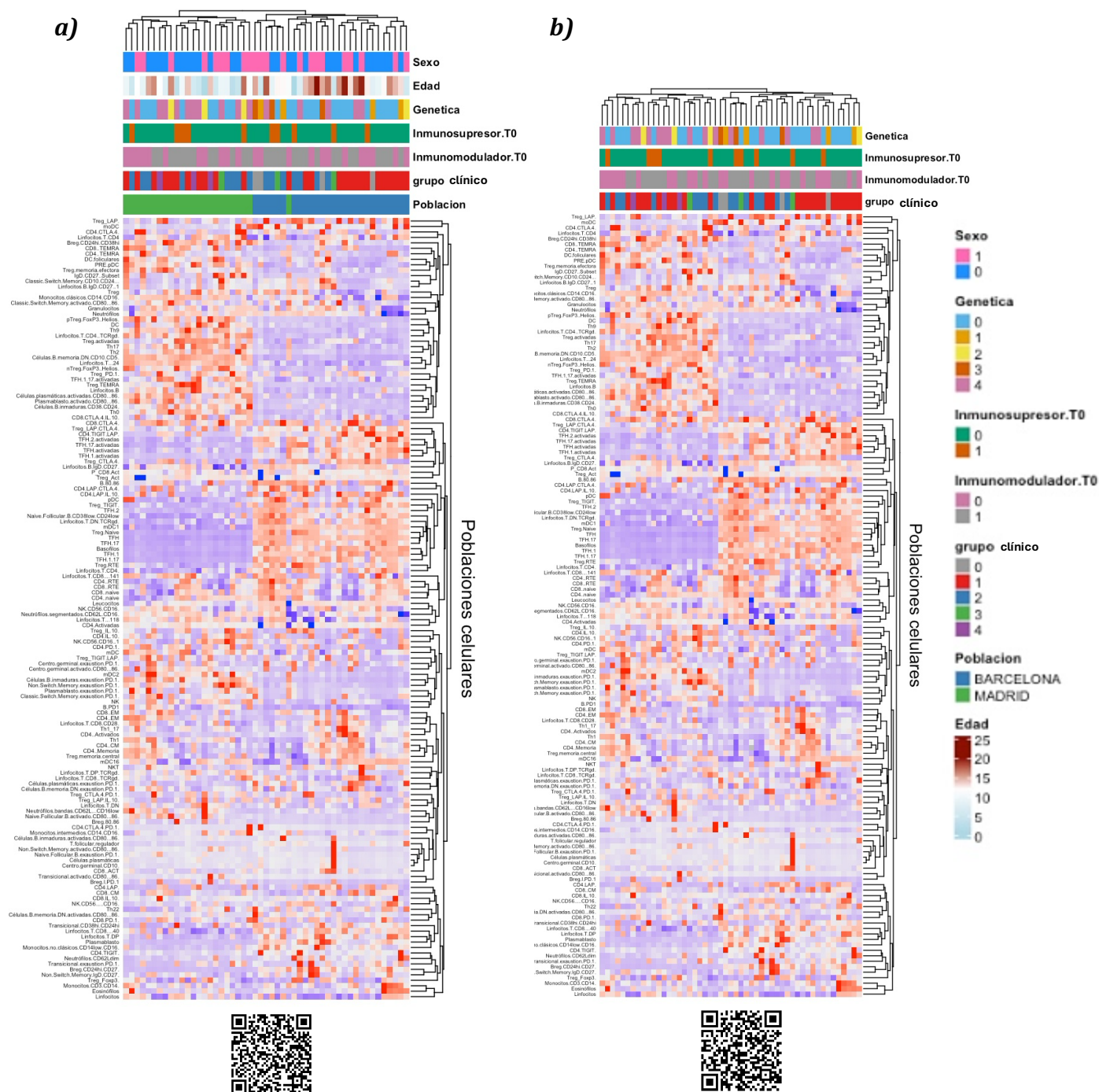


Figura 40 | Heatmaps complejos para la exploración de patrones clínico-inmunológicos en pacientes con inmunodeficiencias primarias. a) Heatmap integrador que combina variables inmunológicas cuantitativas y clínicas cualitativas tras corrección por efecto lote con ComBat. Se observa una alta heterogeneidad entre los pacientes, sin una agrupación clara según el grupo fenotípico definido, lo que sugiere una distribución inmunológica dispersa e individualizada. **b)** Heatmap centrado exclusivamente en las variables clínicas cualitativas: grupo clínico, presencia de mutación genética conocida, y uso de tratamiento inmunomodulador e inmunosupresor. La estructura de agrupación observada es muy similar a la del heatmap anterior, sin evidencias de estratificación clara o patrones consistentes entre grupos, lo que indica que estas variables clínicas, consideradas de forma aislada, no explican la heterogeneidad observada. Ambos análisis refuerzan la necesidad de enfoques integrativos para comprender la complejidad fenotípica de esta cohorte. Grupo clínico (0 = infecciones aisladas, 1 = ALPID-ALPS, 2 = defecto tímico/AI sistémica, 3 = susceptibilidad VEB/HLH, 4 = VEOIBD); tipo de mutación genética (0 = sin mutación, 1 = NFKB1, 2 = FAS, 3 = APDS, 4 = otras); uso de inmunosupresor basal (T0) (0 = no, 1 = sí); proporción de sexo (0 = hombre, 1 = mujer); uso de inmunomodulador basal (T0) (0 = no, 1 = sí). Para visualizar las imágenes con mayor detalle, escanear QR.

4.2.3.3 Exploración y estabilidad temporal de subgrupos inmunológicos

Para armonizar globalmente la información de los pacientes, se construyó un modelo de reducción de dimensionalidad mediante UMAP a partir de la concatenación de los tres ejes de información clave: **inmunofenotipo por citometría convencional, pruebas funcionales y datos clínicos relevantes**. Este análisis incluyó todas las muestras correspondientes a los distintos puntos temporales (T0, T1 y T2), tanto de pacientes como de controles. El objetivo era observar si existía una estructura subyacente en el conjunto de datos integrados que pudiera revelar **patrones fenotípicos consistentes a lo largo del tiempo**.

Como se observa en la **Figura 41a**, la proyección UMAP muestra una distribución continua pero estructurada de las muestras, sin una agrupación clara por condición (control, T0, T1, T2), lo cual sugiere que el estado clínico o temporal per se no determina completamente la posición en el espacio multivariado. Para profundizar en la organización latente de estos datos, se aplicó el algoritmo K-means, con una solución de **k = 3 clusters**, valor seleccionado en base a la convergencia de tres criterios complementarios: la gráfica del codo, el coeficiente de silueta y la estadística de gap. Como se representa en la **Figura 40b**, los tres clusters resultantes (C1, C2 y C3) se distribuyen de forma bien definida en el espacio UMAP, indicando que existen **patrones fenotípicos integradores y reproducibles** que agrupan a las muestras más allá de la condición clínica aislada o el momento temporal.

Una vez identificados estos tres clusters robustos, se abordó una cuestión crítica desde el punto de vista clínico e inmunológico: **¿permanecen los pacientes estables en el mismo clúster a lo largo del tiempo, o existen transiciones entre clusters?** Para responder a esta pregunta, se analizó la trayectoria de cada paciente a través de los tres puntos temporales disponibles (T0, T1 y T2), clasificando su pertenencia a los clusters y evaluando su **consistencia temporal (Figura 40c)**. Los resultados revelan que una proporción significativa de pacientes muestra **consistencia fenotípica a lo largo del tiempo**, manteniéndose dentro del mismo clúster en todos los puntos temporales. Esto podría reflejar una **estabilidad inmunológica subyacente**, independiente de la evolución clínica o cambios en el tratamiento sugestivo de un defecto o característica intrínseca del paciente.

Sin embargo, también se identificó un subconjunto relevante de pacientes con **inestabilidad temporal**, es decir, que cambiaron de clúster entre puntos de seguimiento. Este comportamiento es especialmente evidente en pacientes como PIRD_G1, PIRD_G2, o PIRD_06, cuya clasificación fluctúa entre C1, C2 y C3. Este hallazgo sugiere que **algunos pacientes atraviesan transiciones dinámicas**, posiblemente relacionadas con brotes clínicos, respuesta a inmunomodulación, progresión subclínica o mecanismos compensatorios del sistema inmune. Interesantemente, se observó que **los controles sanos tienden a agruparse**

mayoritariamente en el clúster C3, lo que permite inferir que este podría representar un perfil inmunológico de referencia o equilibrado.

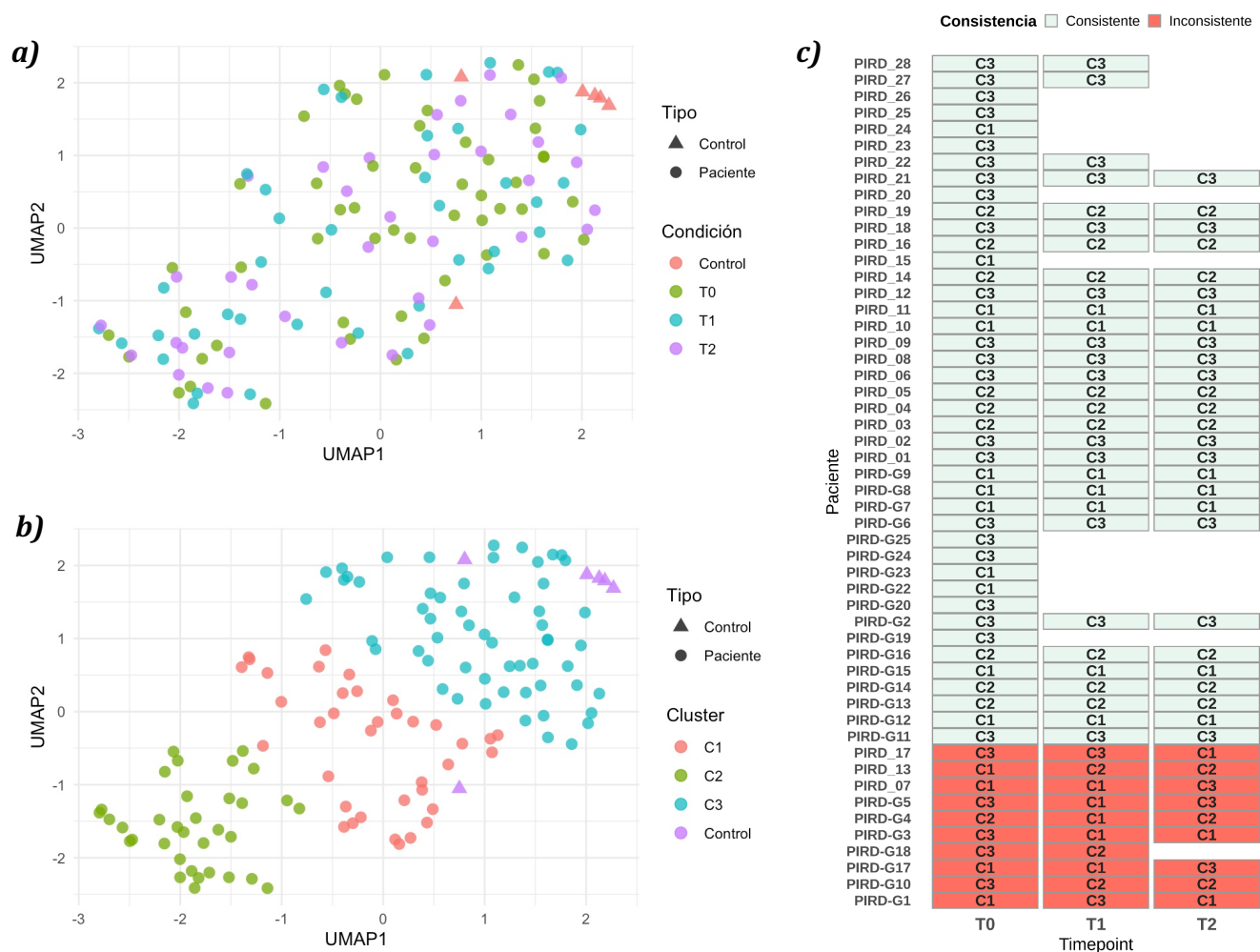


Figura 41 | UMAP tras corrección por ComBat con todos los puntos temporales de los pacientes. **a)** Representación bidimensional mediante UMAP de todas las muestras de pacientes (T0, T1 y T2) junto con los controles. Los puntos representan individuos y están coloreados según el tiempo de recolección: T0 (verde), T1 (azul), T2 (violeta) y controles (rojo). **b)** Mapa UMAP obtenido en el apartado a) sobre el cual se aplicó la clusterización (C1, C2, C3), coloreados en rosa, verde y azul respectivamente. Los controles (triángulos violetas) se proyectaron sobre el mismo espacio sin participar en el clustering, y se posicionaron en zonas adyacentes pero diferenciadas, reforzando la validez biológica de la segmentación multivariada. **c)** Consistencia temporal en la asignación de clusters inmunológicos en pacientes. Matriz de seguimiento longitudinal que representa la pertenencia de cada paciente a los clusters C1, C2 o C3 en tres momentos del estudio: T0 (inicio), T1 (3 meses) y T2 (6 meses). Cada celda corresponde a una muestra individual, y su color indica si la asignación del paciente se mantuvo consistente con la clasificación original de T0 (verde claro) o si cambió a un cluster distinto (rojo). La mayoría de los pacientes presentan una asignación estable a lo largo del tiempo, lo que sugiere que los subgrupos inmunológicos identificados mediante clustering reflejan perfiles fenotípicos intrínsecos y persistentes, más que estados inmunológicos transitorios.

Los resultados obtenidos respecto a la estabilidad temporal de los pacientes dentro de los clústeres fenotípicos son coherentes y encuentran respaldo en los análisis previos realizados mediante heatmaps complejos centrados en variables clínicas. Tal como se observó en dichos heatmaps, tanto en el integrador como en el enfocado exclusivamente en las variables clínicas de genética, grupo fenotípico y tratamientos inmunomoduladores/inmunosupresores, **la estructura de agrupación clínica se mantenía estable**, sin

evidencia de cambios marcados entre los distintos timepoints. Esta estabilidad visual reflejaba que la mayoría de los pacientes no experimentaban modificaciones sustanciales en su perfil clínico a lo largo del seguimiento. En consecuencia, no resulta sorprendente que, al proyectar las muestras en un espacio multidimensional que integra inmunofenotipo, funcionalidad y datos clínicos, una proporción considerable de pacientes mantuviera su pertenencia al mismo clúster (C1, C2 o C3) en los tres puntos temporales. Esta **consistencia longitudinal** sugiere que los clústeres obtenidos mediante K-means reflejan **estados inmunológicos robustos intrínsecos al paciente y sostenidos en el tiempo**, probablemente modulados por características clínicas estables, como el tipo de tratamiento, la presencia de variantes genéticas o el fenotipo clínico de base. Los pocos casos de pacientes con transiciones entre clústeres representan, por el contrario, **situaciones dinámicas o inestables**, posiblemente influenciadas por eventos no capturados en las variables clínicas analizadas, como variabilidad funcional, respuesta terapéutica diferencial o cambios inmunológicos subclínicos.

4.2.3.4 Distribución de variables clínicas por cluster: repercusiones clínicas

Tras la identificación de tres clústeres inmunofenotípicos bien definidos mediante el algoritmo K-means aplicados al espacio UMAP multidimensional (integrando datos inmunológicos, funcionales y clínicos), se llevó a cabo una fase crítica de interpretación biológica: examinar cómo se **reparten las variables clínicas relevantes** dentro de cada uno de estos clústeres. Esta evaluación permitió determinar si alguno de los clústeres presentaba una **sobrerrepresentación de características clínicas específicas**, lo cual aportaría **contenido clínico funcional** a la segmentación algorítmica. Los resultados revelaron una estratificación robusta en tres clusters diferenciados, cada uno con implicaciones clínicas y terapéuticas específicas (**Figura 42**).

- El **cluster C1** agrupa predominantemente a pacientes jóvenes (de entre 5 y 12 años) sin mutaciones genéticas identificadas (código 0) y mutaciones clasificadas como “otras” (código 4), así como algunos casos con *NFKB1*. Clínicamente, estos pacientes presentan fenotipos menos graves y menor complejidad inmunológica, lo que se refleja en el bajo uso de inmunosupresores al inicio del seguimiento (T0), con solo una minoría recibiendo este tipo de tratamiento. Este grupo representa un perfil de bajo riesgo, donde la vigilancia clínica y el cribado genético ampliado ante progresión clínica son prioritarios.
- El **cluster C2** se caracteriza por una mayor edad (entre los 13 y 18 años) al diagnóstico y una clara predominancia del subtipo ALPID-ALPS (grupo interno 1), acompañado de una proporción significativa de mutaciones *FAS* (código 2) y *NFKB1* (código 1). Este perfil genético se traduce en una fisiopatología dominada por la disfunción apoptótica y la desregulación de NF-κB, lo que explica la linfoproliferación crónica y las citopenias autoinmunes observadas. Notablemente, el uso de inmunosupresores en este grupo es nulo al inicio (T0), lo que sugiere que, a pesar de la carga clínica,

la estrategia terapéutica inicial se orienta más hacia inmunomodulación específica (como rapamicina) que hacia inmunosupresión convencional. Este hallazgo subraya la importancia de adaptar el tratamiento a la biología subyacente y no solo a la gravedad clínica aparente.

- El **cluster C3** representa el grupo de mayor complejidad clínica y genética. Aquí se observa una distribución diversa de mutaciones, incluyendo *NFKB1*, *FAS*, *APDS* (código 3), con solo una minoría sin mutación identificada. Este grupo presenta una alta carga de autoinmunidad multiorgánica y una necesidad significativa de inmunomodulación intensiva. El dato más relevante es que aproximadamente una cuarta parte de los pacientes de C3 ya reciben inmunosupresores al inicio del seguimiento (T0), la proporción más alta entre los tres clusters. Esto refleja el reconocimiento clínico de la gravedad de este subgrupo, así como la necesidad de estrategias terapéuticas combinadas y personalizadas, incluyendo terapias dirigidas según el defecto molecular (leniolisib en APDS, rapamicina en FAS, anti-IL-6 en *NFKB1*).

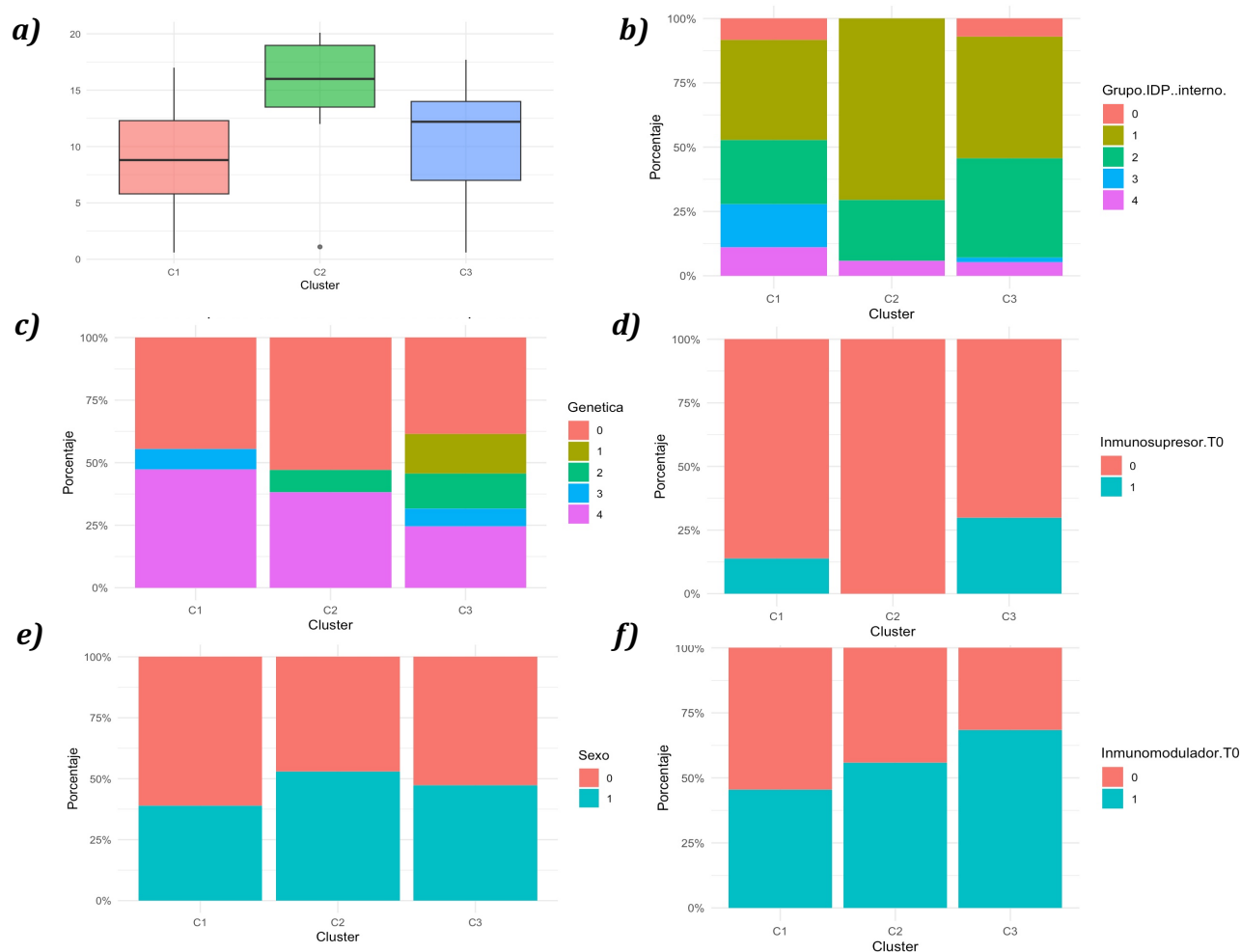


Figura 42 | Distribución comparativa de las principales variables clínicas-biológicas en los tres clusters obtenidos mediante análisis no supervisado de los pacientes PIRD. a) edad al diagnóstico (años); **b)** Grupo IDP (interno)" (0 = infecciones aisladas, 1 = ALPID-ALPS, 2 = defecto tímico/AI sistémica, 3 = susceptibilidad VEB/HLH, 4 = VEOIBD); **c)** tipo de mutación genética (0 = sin mutación, 1 = *NFKB1*, 2 = *FAS*, 3 = *APDS*, 4 = otras); **d)** uso de inmunosupresor basal (T0) (0 = no, 1 = sí); **e)** proporción de sexo (0 = hombre, 1 = mujer); **f)** uso de inmunomodulador basal (T0) (0 = no, 1 = sí).

En conjunto, la integración de los datos clínicos, genéticos y de tratamiento inmunosupresor permite una estratificación precisa de los pacientes con PIRD, facilitando la toma de decisiones terapéuticas individualizadas y la identificación de subgrupos candidatos a intervenciones avanzadas o ensayos clínicos específicos.

En conjunto, la estrategia analítica multidimensional llevada a cabo en esta tesis ha permitido descomponer y reinterpretar la complejidad inmunológica de los pacientes con enfermedades relacionadas con disregulación inmune primaria a través de una integración progresiva en tres bloques analíticos sucesivos. En el **Bloque I**, se caracterizó de forma exhaustiva el **inmunofenotipo de base**, identificando alteraciones en subpoblaciones celulares clave y detectando patrones inmunológicos aberrantes ya presentes en el momento basal (T0). La aplicación de técnicas de reducción de dimensionalidad y análisis de conglomerados permitió una estratificación preliminar de los pacientes basada exclusivamente en su perfil inmunológico. En el **Bloque II**, se incorporó la dimensión de **funcionalidad inmunorreguladora**, centrada particularmente en la actividad supresora de las células T reguladoras y otras poblaciones con expresión de marcadores como CTLA-4, PD-1, IL-10, TIGIT y LAP. Esta segunda capa analítica no solo confirmó la heterogeneidad previamente observada, sino que permitió identificar subgrupos funcionalmente distintos con perfiles de expresión molecular divergentes, revelando la coexistencia de fenotipos inmunorreguladores activos, disfuncionales o silentes dentro de una misma categoría clínica. En el **Bloque III**, se llevó a cabo una **integración total** de datos inmunofenotípicos, funcionales y clínicos, incorporando además variables genéticas, demográficas y de tratamiento. Esta aproximación integradora, reforzada por metodologías de corrección por lote (ComBat), clustering no supervisado (K-means) y análisis de estabilidad temporal, permitió identificar clústeres inmunofenotípicos robustos, clínicamente interpretables y estables en el tiempo. Los tres clústeres emergentes mostraron perfiles moleculares, clínicos y terapéuticos diferenciados, evidenciando la utilidad de los enfoques multidimensionales para la **estratificación de precisión** en PIRD. De este modo se proporciona no solo un marco metodológico reproducible para la integración de datos de inmunología avanzada, sino también evidencia de que los criterios clínicos actuales resultan insuficientes para capturar la verdadera complejidad del sistema inmunológico en estos pacientes, abriendo la puerta a una medicina de precisión inmunológica basada en datos.

4.3 Inmunofarmacología

En este segundo capítulo se presenta un análisis exhaustivo del impacto inmunomodulador de cinco fármacos seleccionados por su uso en la práctica clínica sobre PBMCs humanas, tratadas con tres concentraciones distintas. El objetivo central de esta fase experimental fue caracterizar con alta resolución los efectos específicos de cada fármaco sobre distintas poblaciones de **células reguladoras del sistema inmunitario**, haciendo especial énfasis en los cambios fenotípicos y funcionales inducidos. Para ello, se emplearon **cuatro paneles de citometría multicolor de alta complejidad**, diseñados para cubrir de manera complementaria la diversidad de subtipos reguladores (CD4 Tregs, CD8 y Tr1). Todas las condiciones experimentales se realizaron tanto en ausencia como en presencia de un potente estímulo policlonal con **PMA e ionomicina**, lo que permitió explorar tanto el estado basal como el potencial funcional inducible de las células frente a diferentes contextos de activación. Las muestras no tratadas con fármaco fueron utilizadas como controles internos, permitiendo comparar de forma sistemática los efectos farmacológicos con el estado inmunológico fisiológico. Este diseño multifactorial y de alta dimensionalidad ofrece un marco robusto para el estudio comparado de perfiles inmunorreguladores y para la identificación de firmas inmunofenotípicas específicas moduladas por cada intervención terapéutica.

4.3.1 Impacto sobre células CD4 (I)

4.3.1.1 Topografía inmunofarmacológica

Para explorar las alteraciones inducidas por los distintos tratamientos farmacológicos en las subpoblaciones de células T CD4⁺, se generaron proyecciones UMAP específicas para cada fármaco, incluyendo una condición control sin tratamiento. Esta visualización integrativa permite evaluar la distribución global de los eventos en el espacio fenotípico, facilitando una comparación cualitativa de los perfiles celulares modulados por cada compuesto (**Figura 43**).

En la condición **control**, las células CD4⁺ presentan una organización bien definida en varias regiones de alta densidad distribuidas a lo largo del eje central del UMAP. El mapa actúa como referencia para detectar desviaciones inducidas por los tratamientos. El tratamiento con **Leniolisib**, provoca una reducción visible en la densidad de eventos en varias regiones del UMAP, especialmente en zonas centrales y superiores. Esta redistribución sugiere un efecto supresor sobre determinadas subpoblaciones CD4⁺. El perfil inducido por **ácido micofenólico** muestra una topografía fenotípica globalmente similar a la del control, aunque con un aumento de la densidad celular en regiones específicas. Por su parte, **rapamicina**, mantiene una estructura comparable al control, pero con una redistribución notable de eventos hacia áreas periféricas del UMAP. El tratamiento con **ruxolitinib**, induce una organización fenotípica bastante estable,

aunque con un aumento en la densidad de regiones laterales del UMAP similar a la rapamicina. Finalmente, y de igual modo, la exposición a **tacrólimus**, muestra una estructura conservada, pero con un desplazamiento de la densidad hacia las regiones periféricas del UMAP en similitud a los otros fármacos.

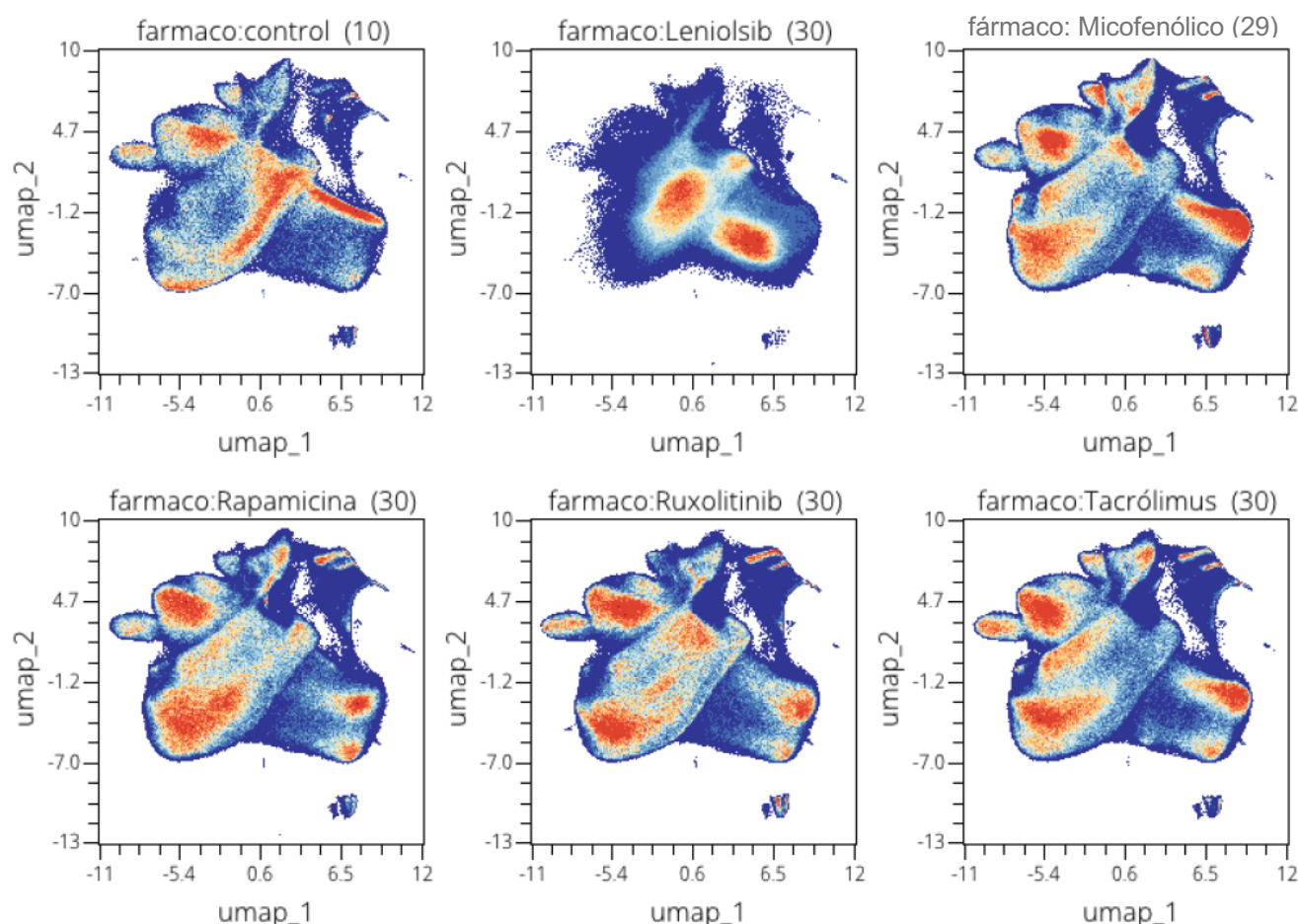


Figura 43 | Distribución de células T CD4+ tras tratamiento con diferentes fármacos inmunomoduladores. Proyecciones UMAP generadas a partir de muestras de PBMCs tratadas con cinco fármacos distintos a concentración intermedia (30) durante 24 horas, comparadas con una condición control sin tratamiento. Cada mapa representa la agregación de eventos correspondientes a las células CD4⁺ identificadas mediante citometría espectral con el panel CD4 (I). Se muestra la densidad de eventos en pseudocolor (azul: baja densidad; rojo: alta densidad). Las condiciones incluyen: control (n = 10), leniolsib (n = 30), ácido micofenólico (n = 29), rapamicina (n = 30), ruxolitinib (n = 30) y tacrólimus (n = 30). La organización espacial revela la estructura global de subpoblaciones CD4⁺ y permite visualizar diferencias inducidas por cada fármaco sobre el paisaje inmunológico.

En conjunto, esta exploración visual revela que cada fármaco ejerce un efecto distintivo sobre el paisaje fenotípico de las células CD4⁺, alterando de forma específica la abundancia y disposición espacial de sus subpoblaciones.

4.3.1.2 Clusterización y definición fenotípica

Tras la exploración inicial de la topografía inmunológica global inducida por los distintos fármacos, se procedió a realizar una **clusterización no supervisada** con el objetivo de identificar las **poblaciones inmunológicas latentes** embebidas en el espacio reducido generado por UMAP. Para determinar el

número óptimo de clústeres (k), se aplicó el **método del codo** (elbow method), evaluando la inercia dentro de clústeres en función del número de particiones. Este análisis reveló un punto de inflexión claro en $k = 15$, valor que fue adoptado como parámetro para la partición final utilizando el algoritmo K-means. Una vez definido el número óptimo de clústeres mediante métodos no supervisados ($K = 15$), se procedió a caracterizar fenotípicamente cada uno de los subconjuntos celulares derivados del modelo de clustering (**Figura 44a**). Para ello, se construyó un **heatmap de intensidades fluorescentes medias (MFI)** correspondientes a los principales marcadores incluidos en el panel CD4. Cada fila representaba un clúster identificado, y cada columna, un marcador, permitiendo una visualización cuantitativa y comparativa de los perfiles de expresión (**Figura 44b**). Este enfoque facilitó la **asignación manual de identidades celulares a cada clúster**, tomando como base el conocimiento inmunológico actual sobre la expresión diferencial de marcadores en subtipos de células T reguladoras y efectoras. Para garantizar una nomenclatura precisa y biológicamente fundamentada, se establecieron **umbrales de MFI relativos** basados en tres niveles: bajo (<1), intermedio ($1-2$), y alto (>2), lo cual permitió diferenciar poblaciones incluso en contextos de gradientes continuos de expresión.

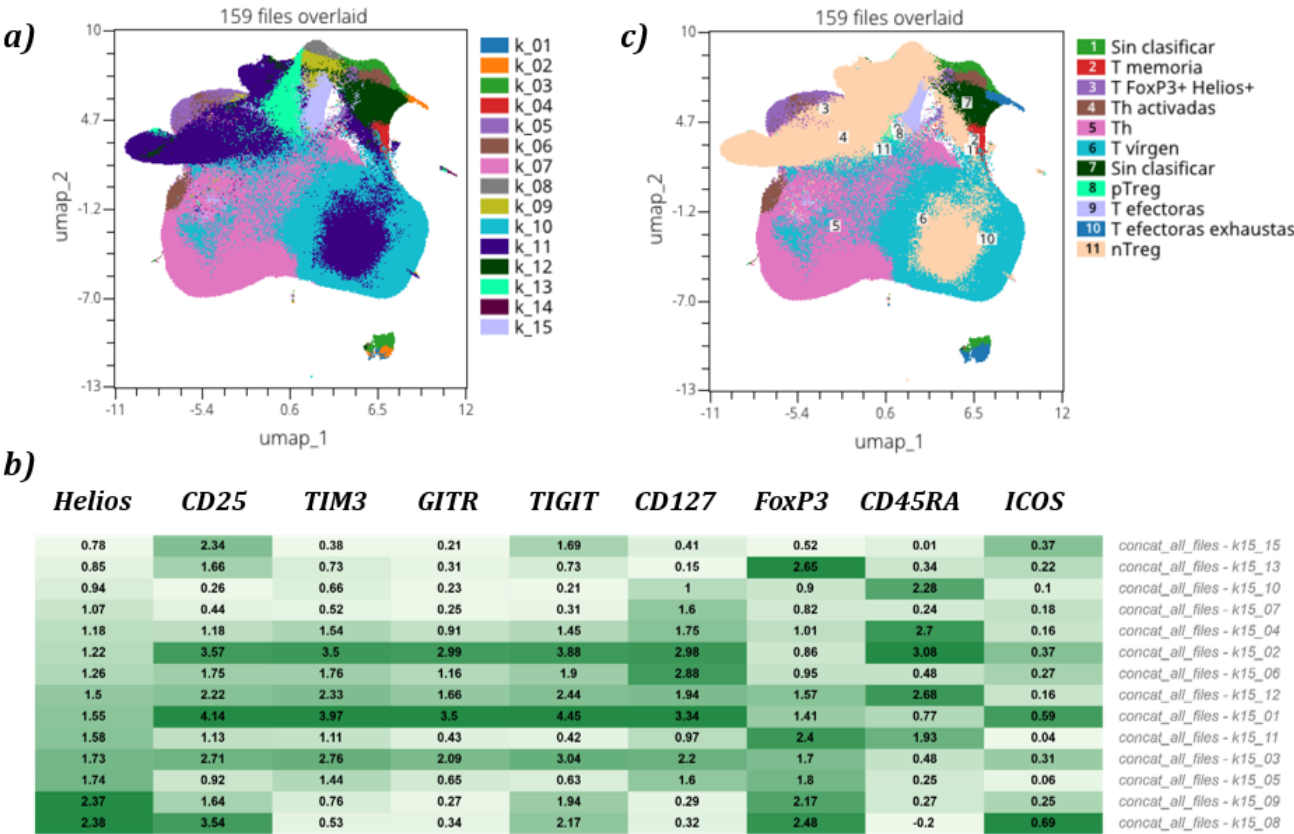


Figura 44 | Identificación fenotípica y consolidación de poblaciones inmunológicas tras la clusterización del panel CD4 (I). **a)** Representación UMAP de las 159 condiciones experimentales, coloreadas según los 15 clústeres obtenidos mediante K-means ($k = 15$), tras estimación óptima con el método del codo. Cada color representa una partición independiente en el espacio multivariado generado a partir de marcadores de superficie y nucleares. **b)** Heatmap de intensidades fluorescentes medias (MFI) para cada marcador incluido en el panel, calculadas por clúster. Este análisis permitió una caracterización fenotípica precisa basada en umbrales de expresión relativa: bajo (<1), intermedio ($1-2$), y alto (>2). Las firmas de expresión específicas permitieron asignar identidades celulares conocidas como T vírgenes, T memoria, T reguladoras naturales (nTreg), T reguladoras periféricas (pTreg), T activadas, T efectoras o células T exhaustas. **c)** Mapa UMAP con los clústeres renombrados según su identidad inmunológica y fusionados en grupos funcionales equivalentes, reduciendo el total a 11 poblaciones.

Con base en esta caracterización fenotípica, se procedió a **fusionar clústeres con perfiles inmunofenotípicos equivalentes o superponibles**, reduciendo el número total de grupos funcionales de 13 a 11 (**Figura 44c**). El resultado final fue un mapa inmunológico compuesto por subconjuntos celulares sobre el cual se realizaron los análisis de redistribución y modulación farmacológica en las siguientes secciones.

4.3.1.3 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco

Con el objetivo de evaluar el impacto fenotípico de cada intervención farmacológica sobre las poblaciones inmunológicas definidas previamente, se procedió a cuantificar de manera sistemática la distribución relativa de los subconjuntos celulares en el espacio UMAP curado. Este análisis se centró en determinar cómo varía la composición inmunológica global en función del **tipo de fármaco administrado, su concentración y la presencia o ausencia de estímulo** con PMA e ionomicina. Este enfoque proporciona una medida funcional integrada del **efecto inmunomodulador de cada compuesto**, y permite identificar perfiles de expansión, contracción o estabilidad en subpoblaciones celulares clave bajo condiciones de estímulo o reposo.

4.3.1.3.1 Leniolisib

A nivel visual, la comparación de los mapas UMAP entre las distintas condiciones tratadas con Leniolisib sugiere **diferencias topológicas apreciables** en la distribución de las subpoblaciones inmunológicas CD4+, tanto en ausencia como en presencia de estímulo (**Figura 45**). Estos cambios afectan a la densidad y extensión relativa de varios clústeres, lo que indica una posible modulación fenotípica dependiente de la dosis y del contexto de activación.

Para confirmar las diferencias observadas a nivel fenotípico entre condiciones, se procedió a una **evaluación estadística rigurosa**. En primer lugar, se analizó la distribución de los datos mediante pruebas de normalidad, las cuales indicaron una desviación significativa del supuesto de normalidad en múltiples poblaciones celulares. En consecuencia, se optó por emplear un enfoque no paramétrico más robusto. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis para detectar diferencias globales entre condiciones experimentales en la proporción relativa de cada clúster identificado. Posteriormente, los valores de p obtenidos fueron ajustados mediante corrección FDR para controlar el error de tipo I asociado a comparaciones múltiples. Finalmente, sobre los clústeres que alcanzaron significación estadística, se realizó un análisis post hoc utilizando el test de Dunn, también seguido de corrección FDR, con el fin de identificar las comparaciones específicas entre grupos que explicaban la diferencia global observada.

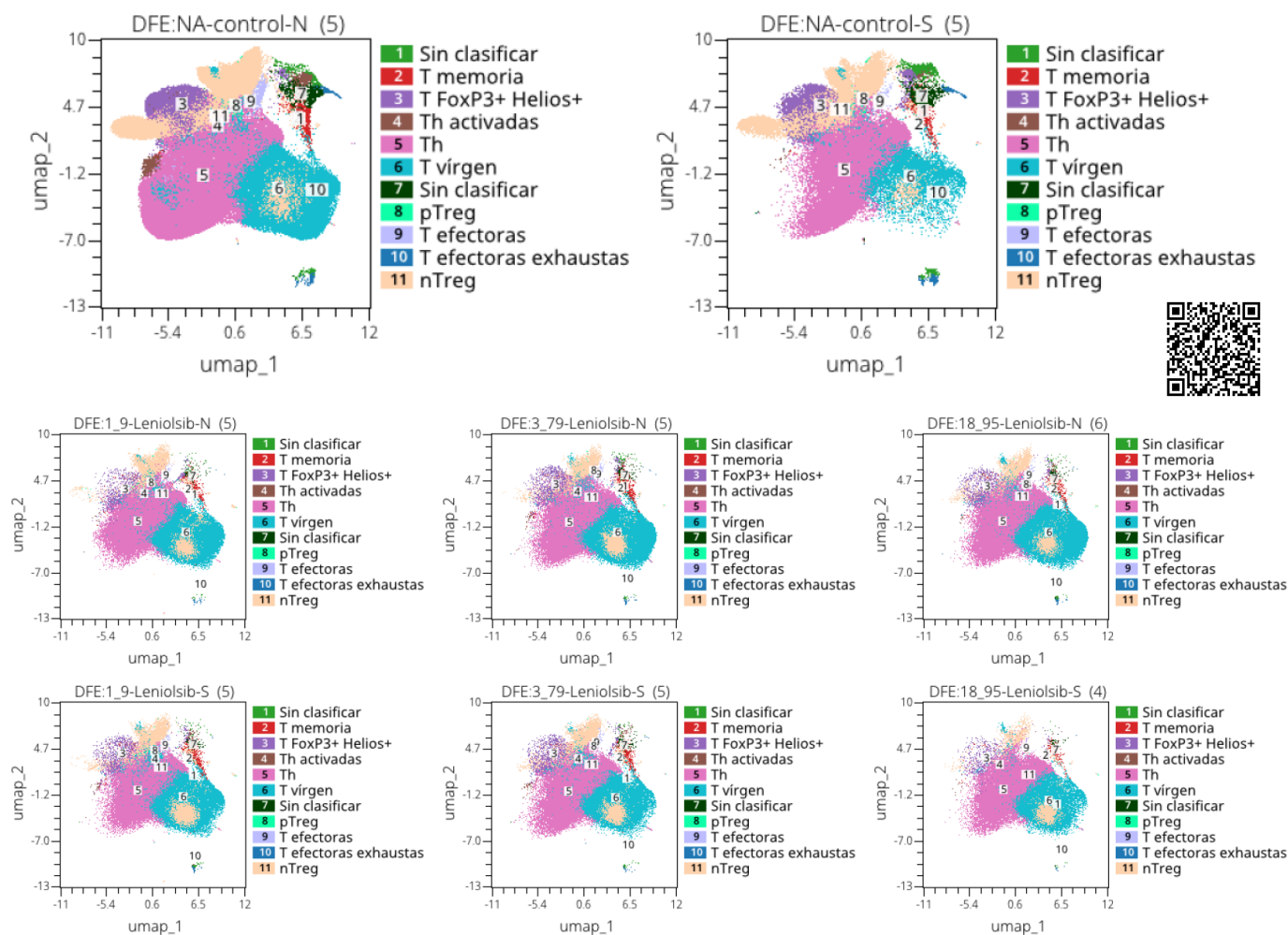


Figura 45 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4+ bajo tratamiento con leniolisib a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 11 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con leniolisib a tres concentraciones (1.9, 3.79 y 18.95 μM), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Los resultados mostrados revelan que, para la mayoría de las poblaciones, **no se detectaron diferencias estadísticamente significativas** tras el

tratamiento con Leniolisib (**Figura 46**). Aunque se aprecian **ligeras variaciones visuales en la mediana o dispersión** en algunas subpoblaciones (como en nTreg, pTreg, T vírgenes o Th), estas no alcanzaron umbrales de significación tras el análisis con Kruskal-Wallis seguido de corrección FDR y Dunn post hoc. La ausencia de significación sugiere que **Leniolisib no induce una remodelación fenotípica robusta en estas poblaciones CD4+ en condiciones de reposo ni con estímulo**, al menos en términos de su frecuencia relativa dentro del conjunto celular. Es importante destacar que la única condición que muestra cambios amplios y claramente diferenciables corresponde al **control estimulado (NA-control-S)**, lo cual valida la sensibilidad del modelo para detectar activaciones inmunológicas reales. En contraste, el hecho de que las condiciones con Leniolisib no reproduzcan estos patrones sugiere un **efecto modulador**

moderado o focalizado, que no altera significativamente la arquitectura inmunológica general de la población CD4+ en los subconjuntos aquí analizados.

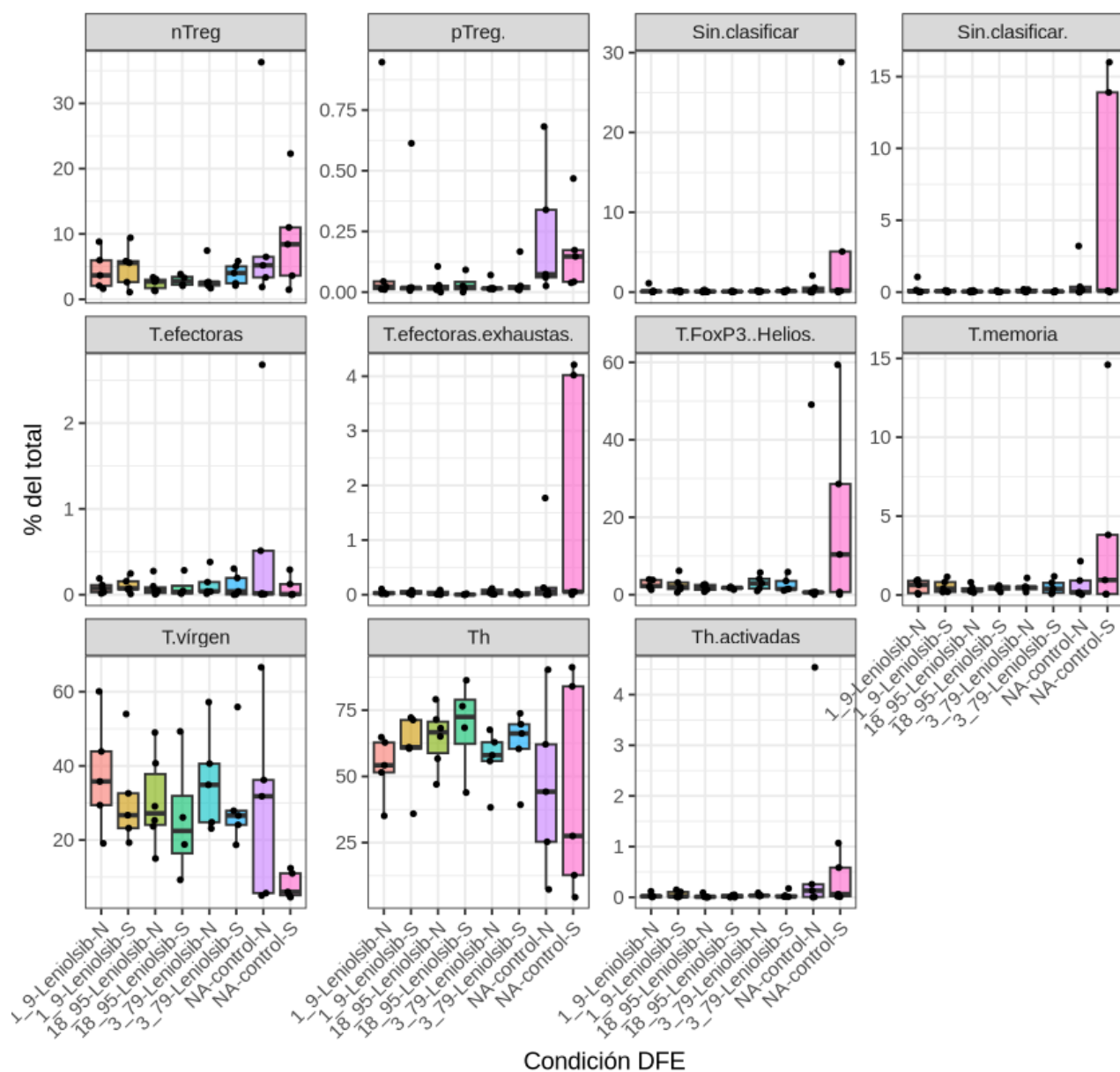


Figura 46 | Distribución porcentual de once subpoblaciones T bajo ocho condiciones DFE (combinaciones de dosis de leniolisib ± estimulación PMA-ionomicina). Cada recuadro muestra la mediana (línea central), el rango intercuartílico (caja) y los valores individuales (puntos). Las medianas se superponen ampliamente, reflejando la ausencia de diferencias estadísticas significativas tras Kruskal-Wallis y corrección FDR. No obstante, se aprecian tendencias: (i) ligera expansión de Th activadas tras la estimulación P/I, (ii) descenso modesto de T vírgen y ascenso paralelo de T memoria con la dosis alta de leniolisib, y (iii) estabilidad marcada de los compartimentos nTreg y pTreg. Estos indicios sugieren que los cambios inducidos por leniolisib en 72 h son sutiles y se manifiestan más en activación funcional que en redistribución fenotípica bruta. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

En conjunto, los datos confirman que, dentro de las 72 horas de experimento, leniolisib no reconfigura drásticamente el paisaje porcentual de las subpoblaciones T; las variaciones detectadas son tenues y mayoritariamente asociadas al estímulo P/I más que al fármaco en sí.

4.3.1.3.2 Tacrólimus

A nivel visual, la administración de **tacrólimus** no mostró un impacto claro en la **topografía global del espacio UMAP** respecto a los controles (**Figura 47**). No obstante, bajo condiciones de estimulación, Tacrólimus si que parece alterar ligeramente el panorama inmunofenotípico global.

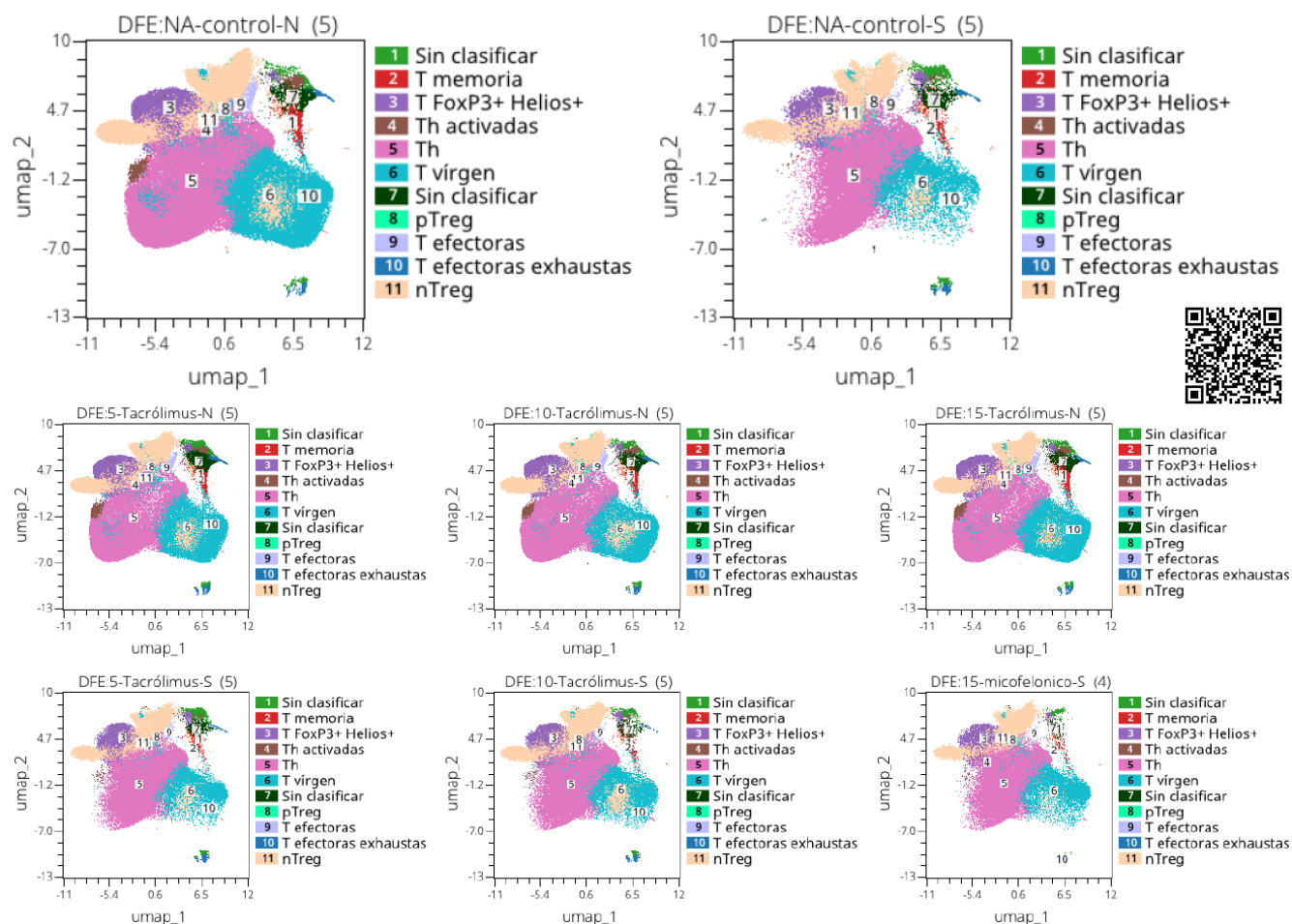


Figura 47 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4+ bajo tratamiento con tacrólimus a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 11 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con tacrólimus a tres concentraciones (5, 10 y 15 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Tras aplicar el test de Kruskal-Wallis seguido de corrección por FDR, y posteriormente el test post hoc de Dunn también ajustado por FDR, **no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subpoblaciones analizadas (Figura 48)**. A pesar de algunas variaciones visuales modestas entre condiciones, la alta dispersión interindividual y la solapación entre los grupos impidieron alcanzar significancia tras el ajuste por comparaciones múltiples.

Estos resultados indican que, en las condiciones ensayadas, tacrólimus **no altera de forma significativa la frecuencia relativa de las principales poblaciones CD4+ fenotípicamente definidas**, lo cual sugiere un efecto limitado sobre la arquitectura inmunológica global evaluada en este modelo *in vitro*. Al igual que en el caso de Leniolisib, se observa una marcada diferencia entre las condiciones con estímulo y sin estímulo.

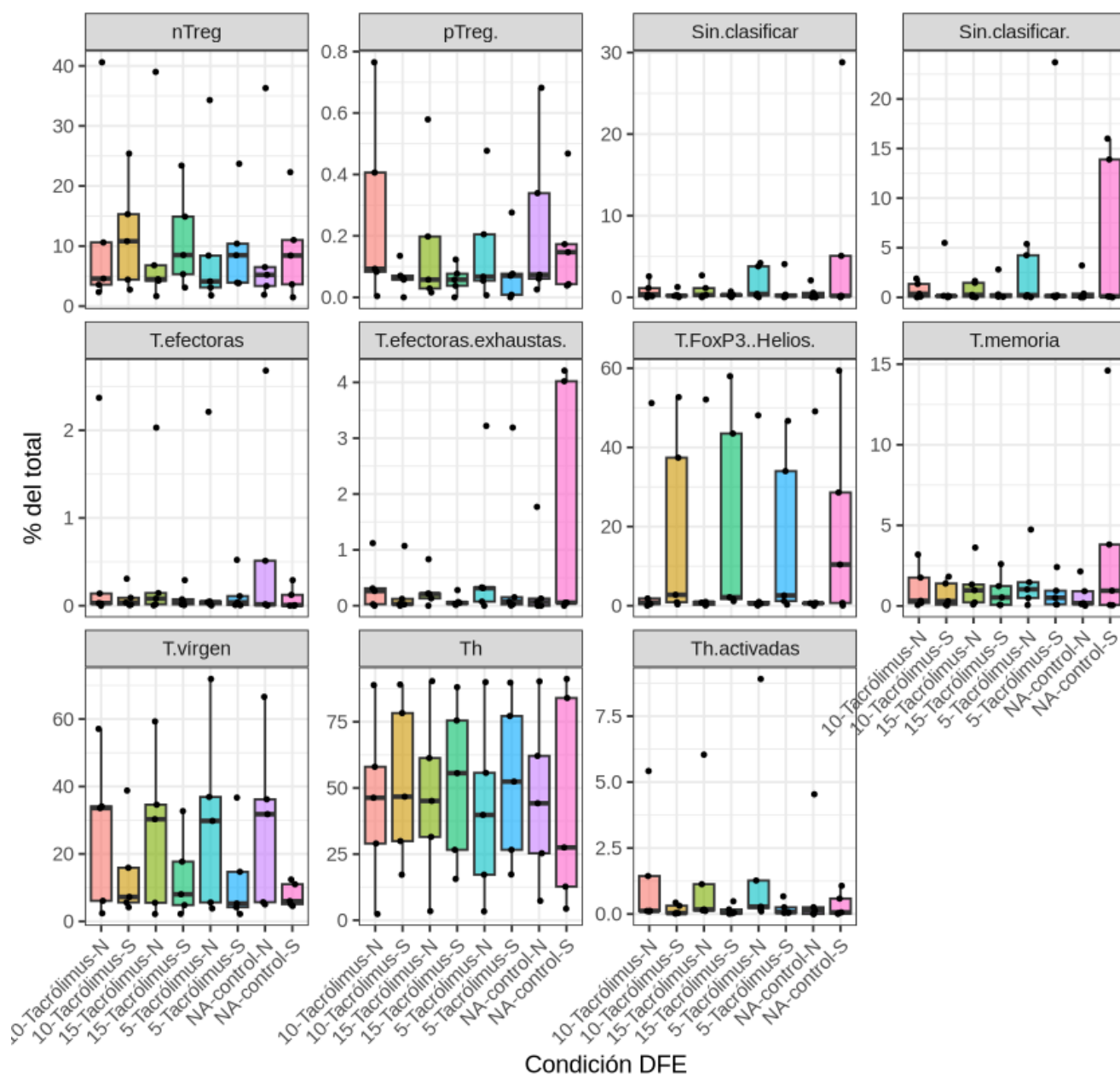


Figura 48 | Distribución porcentual de once subpoblaciones T tras incubación con tacrólimus (5, 10 y 15 ng/ml) ± estimulación PMA-ionomicina. Cada caja representa mediana y rango intercuartílico; los puntos individuales muestran la dispersión muestral. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección FDR no evidenciaron diferencias significativas entre condiciones. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.1.3.3 Ácido micofenólico

A nivel visual, el tratamiento con **ácido micofenólico** tampoco provocó **alteraciones notables en la arquitectura del espacio UMAP** en la proporción relativa de las subpoblaciones inmunológicas CD4+ en comparación con los controles (**Figura 49**).

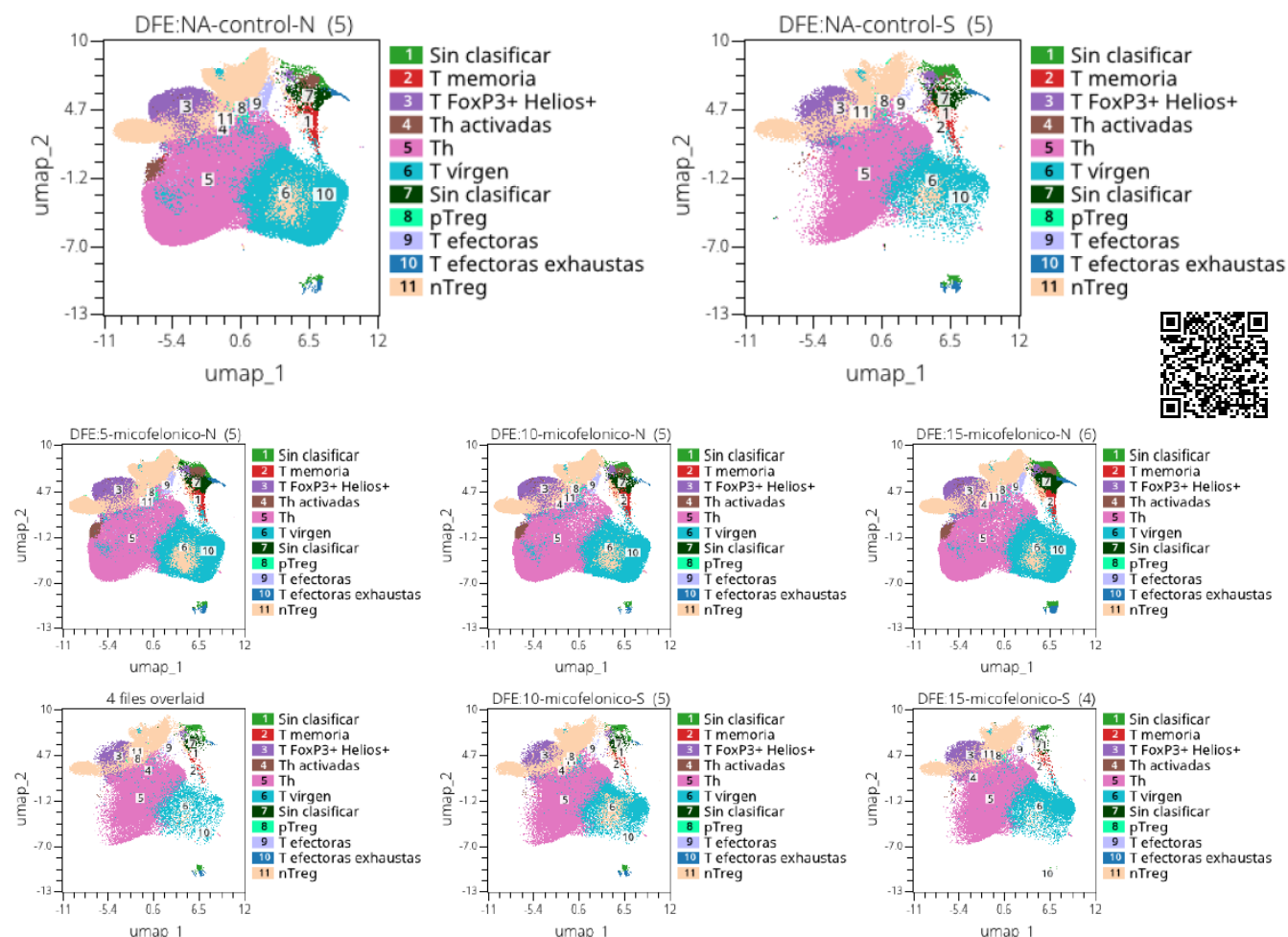


Figura 49 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4+ bajo tratamiento con ácido micofenólico a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 11 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con ácido micofenólico a tres concentraciones (5, 10 y 15 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Tras aplicar el test de **Kruskal-Wallis** seguido de **corrección FDR**, y posteriormente el análisis post hoc de **Dunn** también corregido por FDR, **no se identificaron diferencias estadísticamente significativas** en ninguna de las subpoblaciones evaluadas (**Figura 50**).

A nivel visual, pueden observarse **ligeras variaciones entre condiciones**, con una mayor dispersión en algunos clústeres como nTreg, T vírgenes o Th. Sin embargo, estas diferencias **no muestran un patrón**

claro ni consistente a lo largo de las dosis ni con respecto al estímulo, y los intervalos intercuartílicos entre grupos tienden a solaparse. Por tanto, no se puede concluir que el ácido micofenólico tenga un efecto marcado sobre la composición fenotípica de las subpoblaciones CD4+ en este modelo experimental.

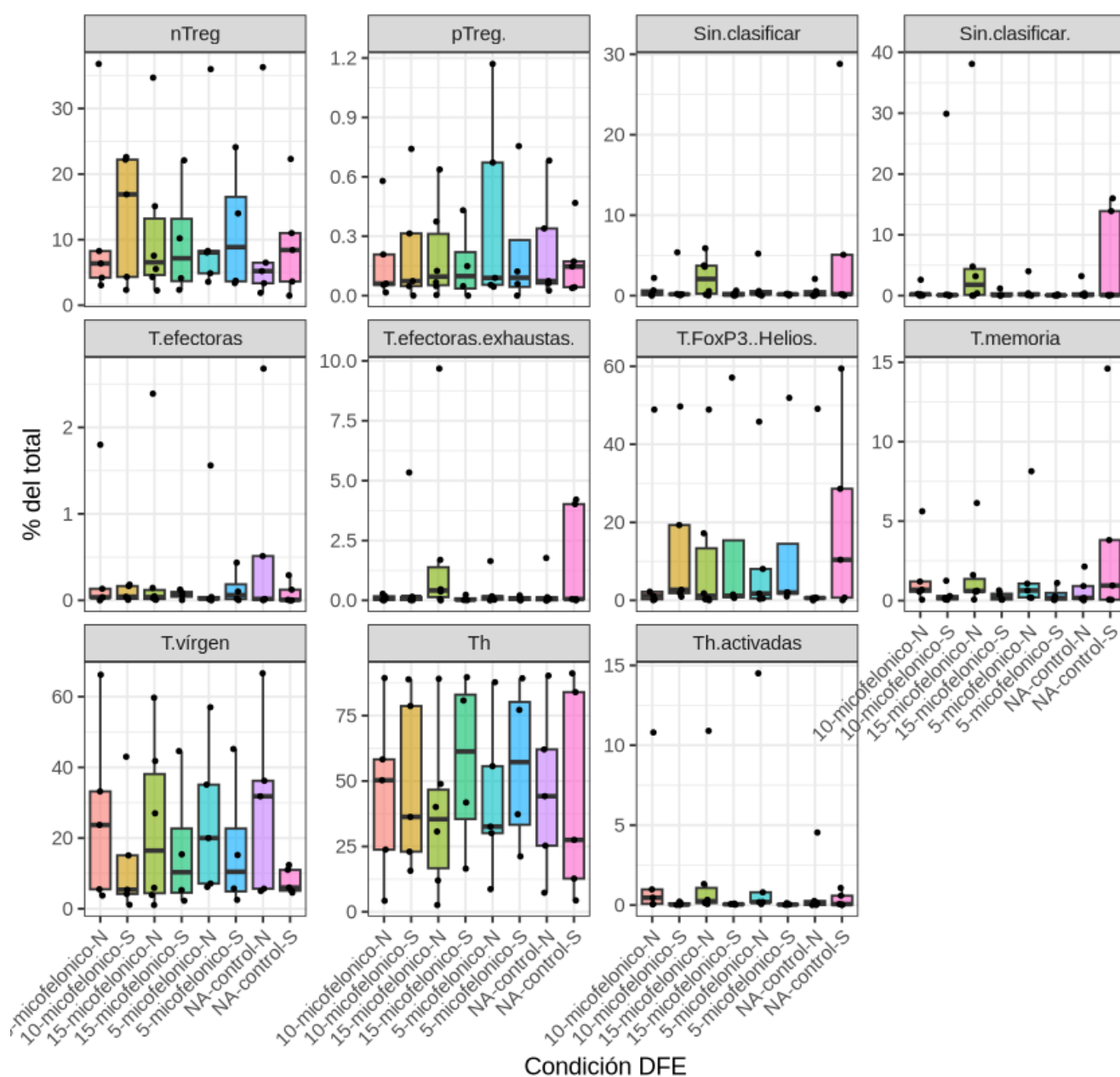


Figura 50 | Distribución porcentual de once subpoblaciones T tras incubación con ácido micofenólico (5, 10 y 15 ng ml⁻¹) ± estimulación PMA-ionomicina durante 72h. Las cajas muestran mediana y rango intercuartílico; los puntos representan valores individuales. Los tests de Kruskal-Wallis y Dunn (FDR) no revelaron diferencias significativas entre condiciones. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

En conjunto, estos resultados sugieren que, **al menos en términos de proporción relativa y sin estimulación prolongada**, el ácido micofenólico **no modifica de forma significativa el equilibrio fenotípico del compartimento CD4+**, lo cual podría deberse a una acción más funcional que fenotípica, o

a la necesidad de un contexto biológico más prolongado o específico para evidenciar su efecto inmunomodulador.

4.3.1.3.4 Rapamicina

La exposición de las PBMCs a **rapamicina** no provocó cambios claramente apreciables en la configuración general del espacio UMAP, frente a las condiciones de control (**Figura 51**). Bajo estimulación con PMA/ionomicina, Rapamicina pareció levemente preservar el cluster Th en comparación con la condición control estimulada.

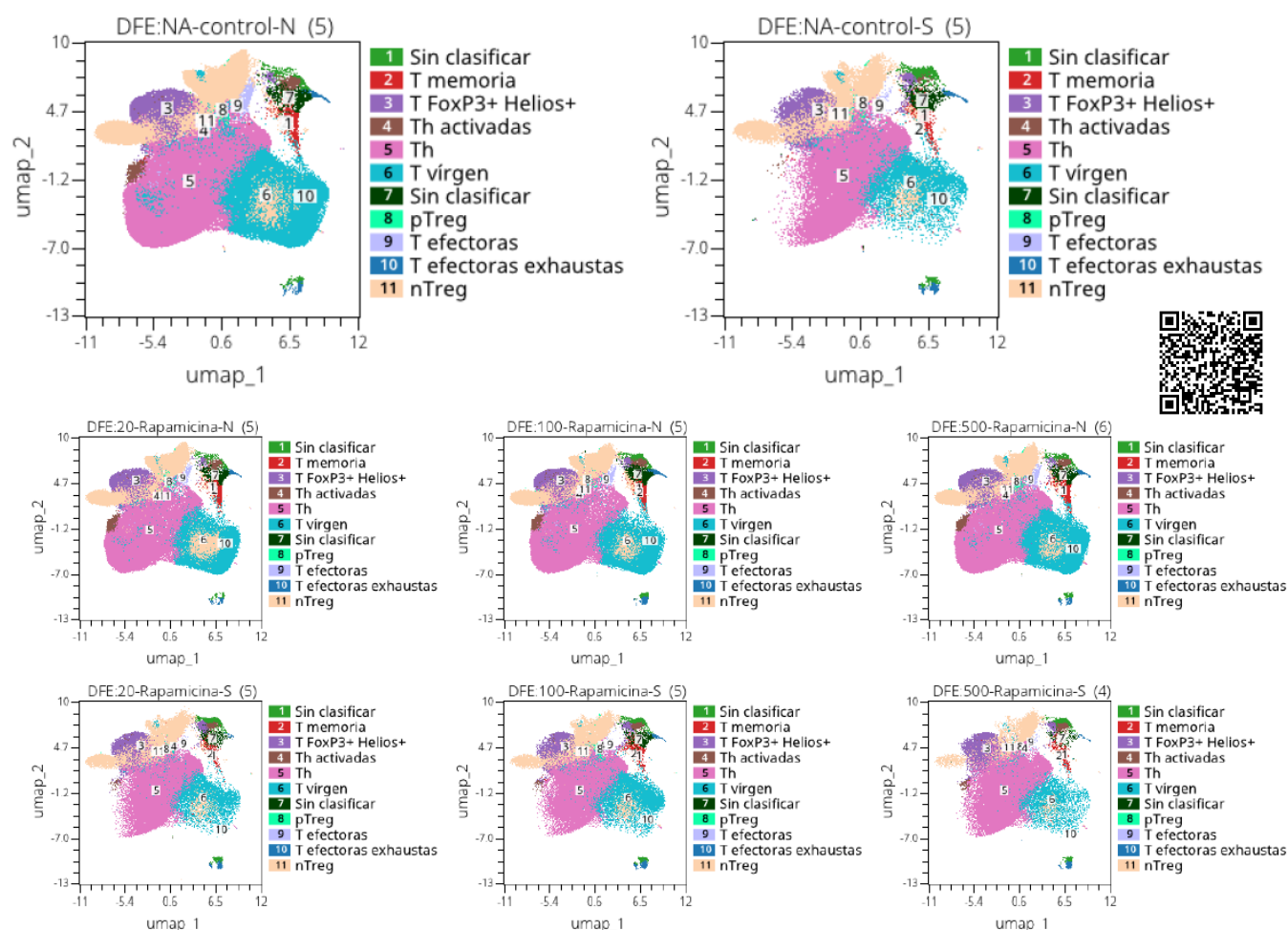


Figura 51 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4+ bajo tratamiento con rapamicina a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 11 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con rapamicina a tres concentraciones (20, 100 y 500 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Tras los análisis estadísticos posteriores, **no se detectaron diferencias estadísticamente significativas** entre condiciones para ninguna de las subpoblaciones evaluadas (**Figura 52**).

Desde un punto de vista visual, se observan **fluctuaciones leves en la mediana y dispersión de algunas poblaciones**, como nTreg, Th y T vírgenes, particularmente a dosis elevadas o bajo estímulo. Sin embargo, no se identifica un **patrón claro, consistente ni dependiente de la dosis** que permita atribuir un efecto específico a la rapamicina dentro de las condiciones experimentales probadas. La variabilidad interindividual sigue siendo notable en la mayoría de los clústeres.

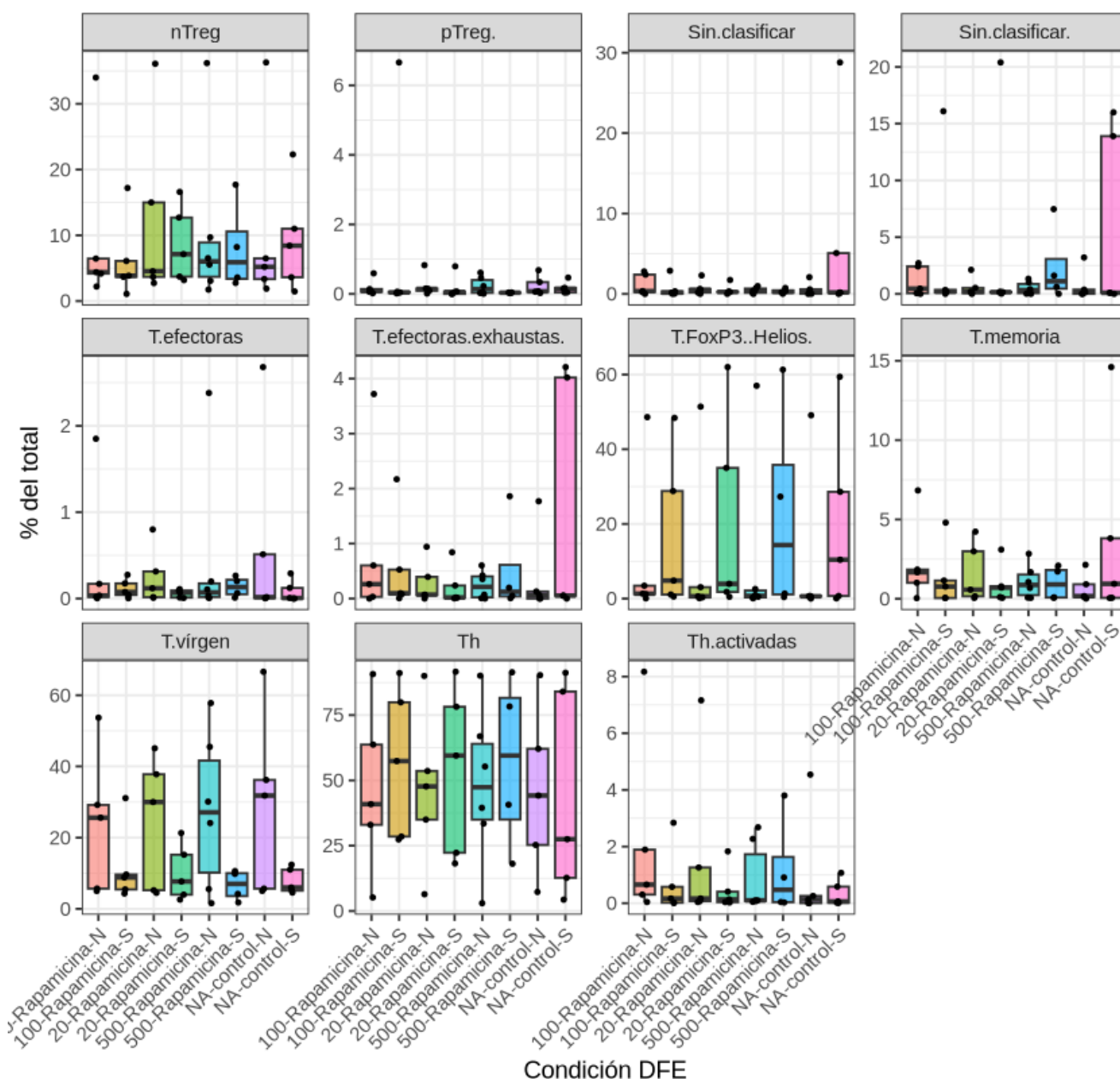


Figura 52 | Efecto de rapamicina (20 – 500 ng/mL) ± PMA-ionomicina sobre subpoblaciones T. Los tests de Kruskal-Wallis y Dunn, ajustados por FDR, no revelan diferencias significativas entre condiciones. La estabilidad de las medianas sugiere que la inhibición mTOR no altera la distribución porcentual de los linfocitos T en las primeras 72 h, apuntando a que los efectos de rapamicina son esencialmente funcionales y se manifiestan a tiempos más prolongados o en endpoints metabólicos. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.1.3.5 Ruxolitinib

La visualización UMAP de las muestras tratadas con **ruxolitinib** muestra un **perfil topográfico inmunológico que se mantiene relativamente conservado** en comparación con los controles, tanto en condiciones basales como estimuladas. A través de las diferentes concentraciones evaluadas (0.1, 0.3 y 1 μM), no se observan **cambios evidentes ni redistribuciones marcadas** en las principales subpoblaciones CD4+ previamente definidas por clústeres fenotípicos (**Figura 53**).

En ausencia de estímulo (condiciones “N”), las estructuras de clúster se superponen estrechamente con las de los controles no tratados, reflejando **una topografía altamente estable**. De forma similar, bajo estimulación (condiciones “S”), la organización espacial **no parece alterarse visiblemente** por la presencia de ruxolitinib. Estos hallazgos visuales indican que, al menos a nivel de distribución fenotípica en el espacio UMAP, **ruxolitinib no induce un remodelado sustancial del paisaje inmunológico CD4+**

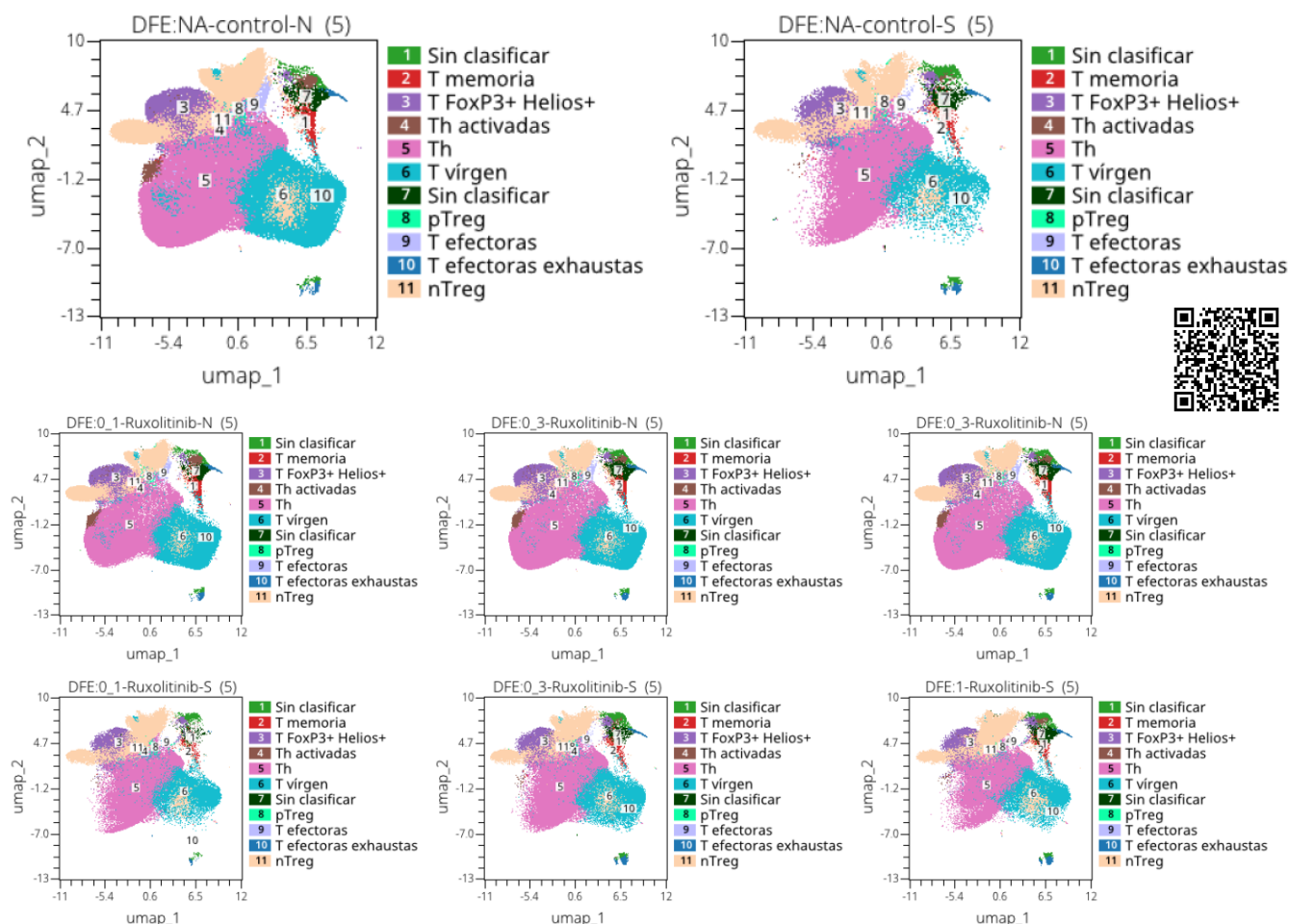


Figura 53 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4+ bajo tratamiento con ruxolitinib a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 11 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con ruxolitinib a tres concentraciones (0.1, 0.3 y 1 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Tras analizar los datos con el test **no paramétrico de Kruskal-Wallis**, seguido de una **corrección por FDR**, y realizar un análisis post hoc con **Dunn + FDR**, no se identificaron **diferencias significativas** en la proporción de ninguna de las poblaciones evaluadas (**Figura 54**). Desde el punto de vista visual, se aprecian algunas **fluctuaciones en la mediana y dispersión** de ciertas subpoblaciones (como Th, T vírgenes o nTreg), pero sin un patrón claro asociado a la dosis ni al estímulo. El comportamiento de las diferentes condiciones tiende a mantenerse dentro de márgenes comparables, reflejando una **estructura fenotípica global conservada** a lo largo del experimento.

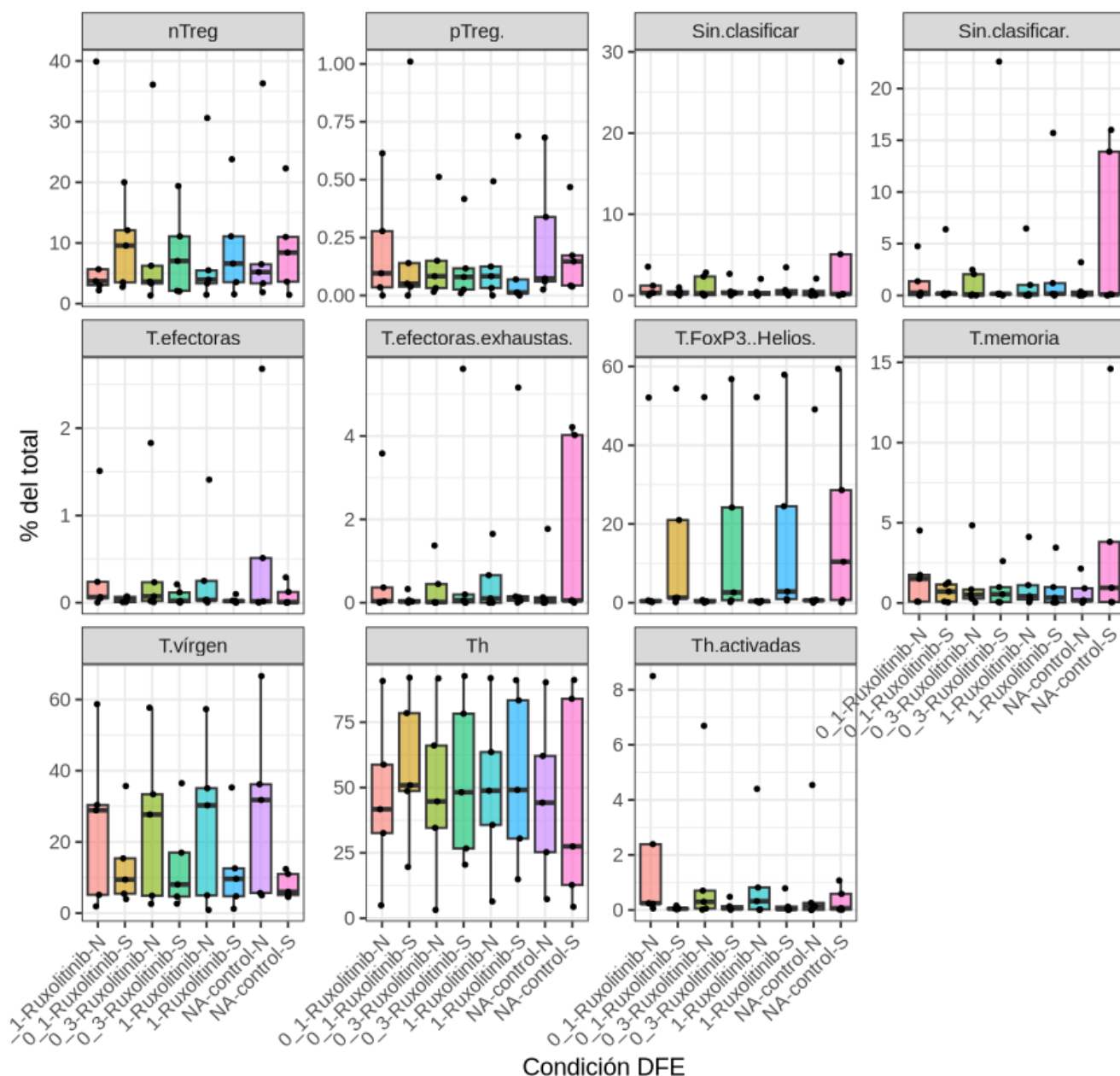


Figura 54 | Efecto de ruxolitinib (0.1 – 1 µM) ± PMA-ionomicina sobre subpoblaciones T. Los tests de Kruskal-Wallis y Dunn, ajustados por FDR, no revelan diferencias significativas entre condiciones. Cada caja representa mediana y rango intercuartílico; los puntos individuales muestran la dispersión muestral. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección FDR no evidenciaron diferencias significativas entre condiciones. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

En conjunto, estos hallazgos apuntan a que **Ruxolitinib no genera modificaciones fenotípicas detectables en la composición del compartimento CD4⁺**, al menos en términos proporcionales. Su mecanismo de acción probablemente se manifieste más a nivel funcional o transcripcional que mediante cambios evidentes en marcadores de superficie en el contexto *in vitro* y a corto plazo empleado en este modelo.

En resumen, el estudio del impacto inmunofenotípico de cinco fármacos inmunomoduladores (Leniolisib, Tacrólimus, Micofenolato mofetilo, Rapamicina y Ruxolitinib) sobre PBMCs humanas *in vitro*, evaluado mediante citometría de flujo multiparamétrica en un panel CD4⁺ y representado en el espacio UMAP, no reveló diferencias estadísticamente significativas en la proporción relativa de las subpoblaciones CD4⁺ entre condiciones (n = 5 por grupo). Aunque se observaron ligeras variaciones topográficas y visuales en ciertas poblaciones según la dosis y el estímulo, estas no fueron consistentes ni dependientes de un patrón farmacológico común. En conjunto, estos resultados indican que, bajo las condiciones experimentales ensayadas, **ninguno de los fármacos evaluados produjo una remodelación fenotípica significativa o reproducible del compartimento CD4⁺**, sugiriendo que sus efectos principales podrían depender de mecanismos funcionales no reflejados exclusivamente en la arquitectura superficial de estas células a corto plazo o la necesidad de ampliar el tamaño muestral por grupo.

4.3.2 Impacto sobre células CD4 (II)

4.3.2.1 Topografía inmunofarmacológica

Con el objetivo de validar y ampliar los hallazgos obtenidos en el primer análisis, se procedió a estudiar una segunda cohorte independiente de células T CD4⁺ sometidas a las mismas condiciones farmacológicas. Se generaron nuevas proyecciones UMAP específicas para cada fármaco, incluyendo nuevamente una condición control sin tratamiento, con el fin de visualizar de forma integradora la organización fenotípica de las distintas subpoblaciones celulares.

Desde un análisis visual preliminar basado en las proyecciones UMAP, se identifican diferencias topográficas sutiles pero apreciables entre las distintas condiciones farmacológicas en esta segunda cohorte de células T CD4⁺ (**Figura 55**). Tomando como referencia el perfil del **control**, que muestra una organización homogénea con alta densidad celular en múltiples regiones centrales y periféricas, se aprecia cómo el tratamiento con **Leniolisib** induce una **redistribución notoria de la densidad celular hacia la zona central derecha** del mapa, acompañada de una **disminución considerable en las áreas periféricas**, lo que sugiere una posible contracción o represión de ciertos subconjuntos celulares marginales. En el caso de **Tacrólimus**, la **silueta topográfica general del control se conserva en gran medida**, sin pérdidas aparentes de estructura espacial, aunque se observa una **reorientación de la densidad hacia el eje central**, posiblemente indicando una consolidación fenotípica de ciertas subpoblaciones.

Por otro lado, **Micofenolato**, **Rapamicina** y **Ruxolitinib** presentan entre sí un patrón visual relativamente similar. En estas tres condiciones, se observa una **distribución predominante de eventos en la región central e inferior del mapa**, con una menor densidad en las zonas laterales, lo que sugiere una **convergencia fenotípica hacia compartimentos más uniformes** o conservados del repertorio $CD4^+$. Aunque los cambios no son abruptos, la morfología general del espacio UMAP en estas condiciones refleja un posible sesgo hacia poblaciones más centradas o menos heterogéneas en términos de localización fenotípica.

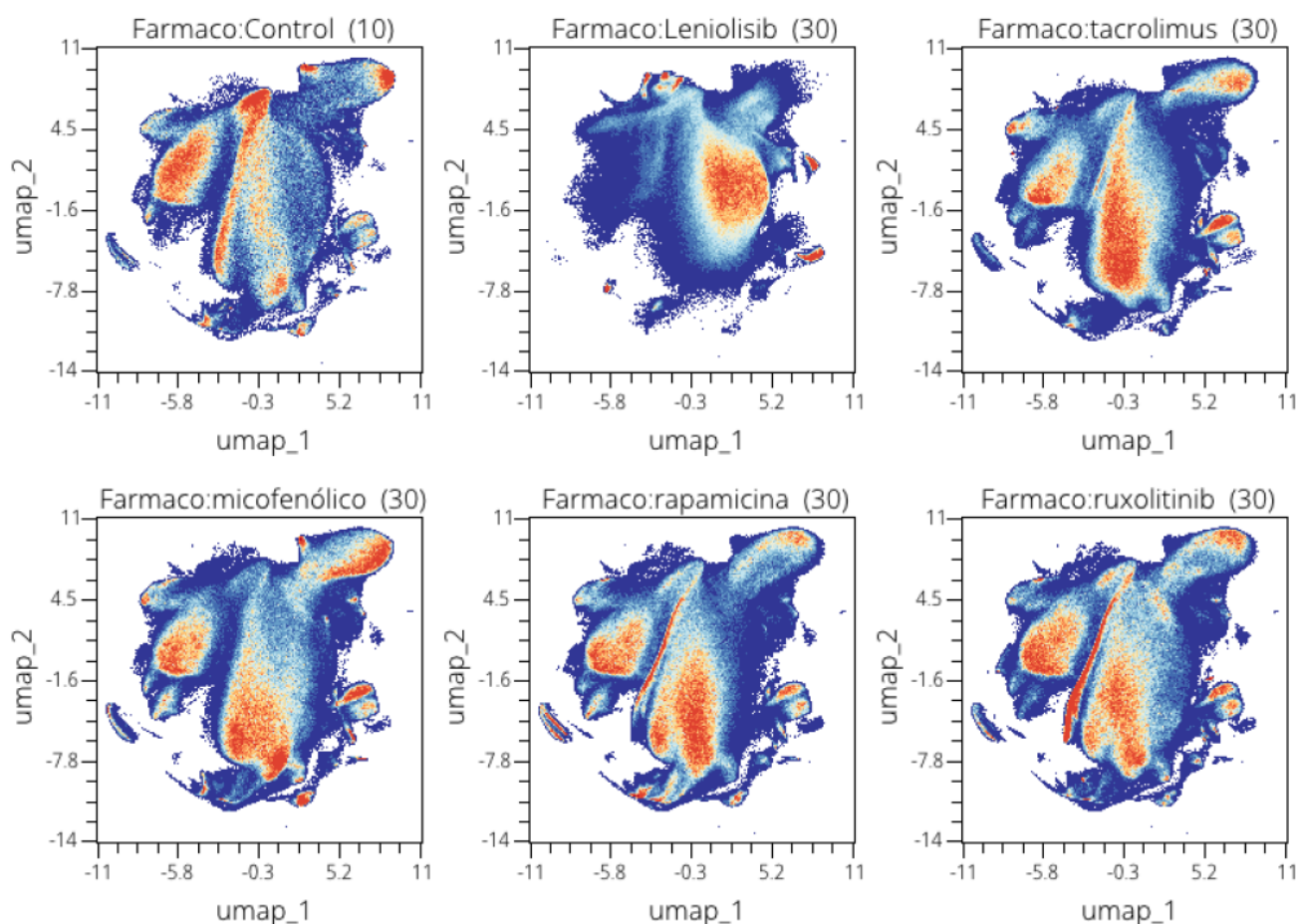


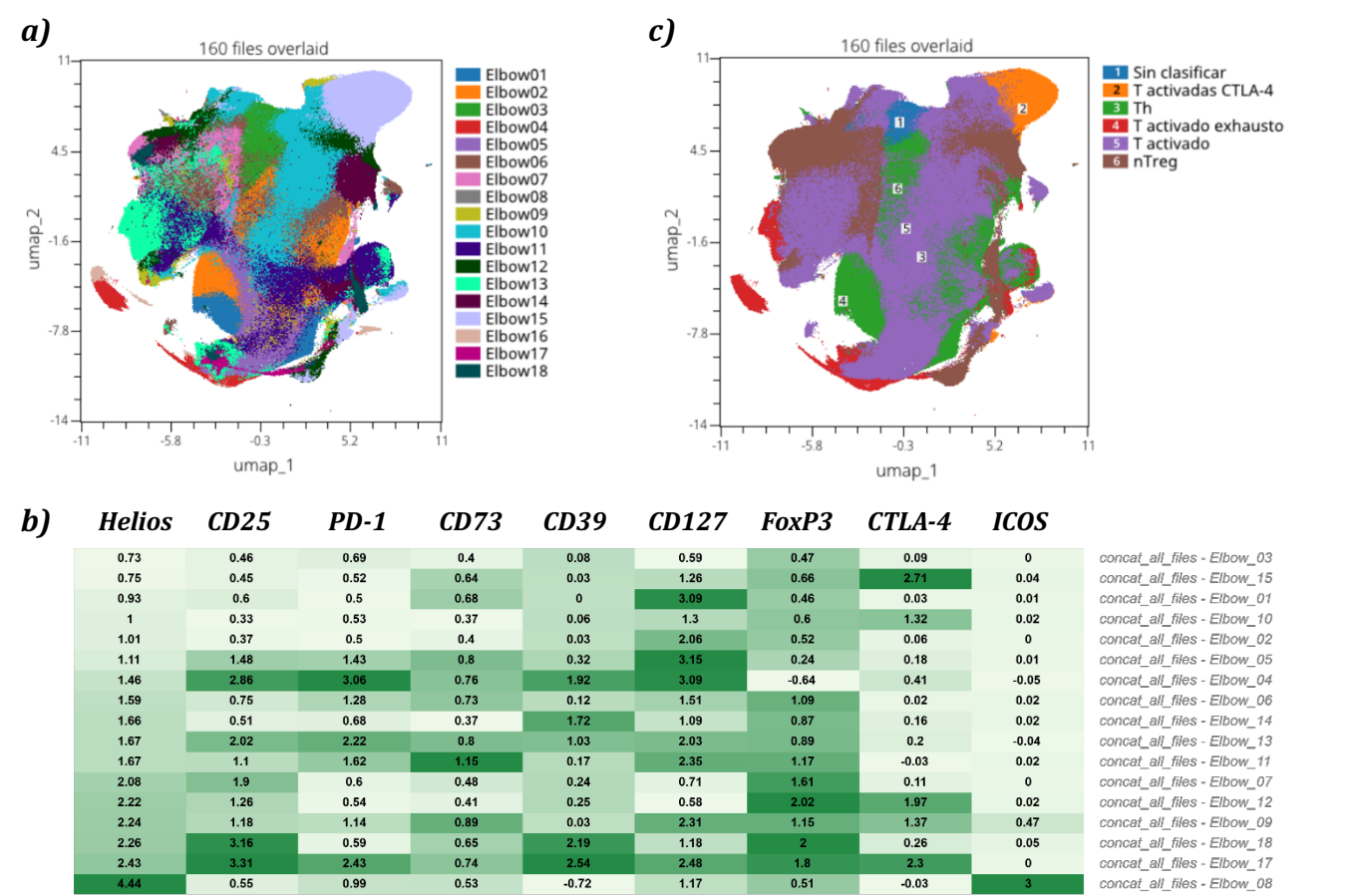
Figura 55 | Proyección UMAP de células T $CD4^+$ (II) tras tratamiento con diferentes fármacos inmunomoduladores. Se representa la densidad de eventos celulares en el espacio UMAP para la condición control (sin tratamiento) y para las condiciones tratadas con leniolisib, tacrólimus, micofenolato mofetilo, rapamicina y ruxolitinib. Cada mapa muestra la distribución fenotípica de las células, coloreada según densidad (azul: baja, rojo: alta).

4.3.2.2 Clusterización y definición fenotípica

Para caracterizar fenotípicamente el compartimento $CD4^+$ en esta segunda tanda experimental, se llevó a cabo una clusterización no supervisada de los eventos celulares mediante el método **elbow**, el cual determinó un número óptimo de agrupamientos de **k = 18**. Cada clúster fue visualizado en el espacio UMAP

(Figura 56a), evidenciando una distribución diversa y estructurada de los subconjuntos celulares. Posteriormente, se calculó la **mediana de la intensidad fluorescente (MFI)** de cada marcador para cada uno de los 18 clústeres, lo que permitió construir un **heatmap comparativo (Figura 56b)**. En base a este perfil de expresión, y siguiendo los mismos criterios semicuantitativos previamente establecidos para clasificar la MFI como **baja, intermedia o alta**, se procedió a la **asignación fenotípica de cada clúster**.

Esta caracterización funcional reveló patrones de expresión coherentes que permitieron identificar y reagrupar los clústeres en **cuatro grandes poblaciones biológicamente relevantes**: (1) **T activadas con expresión elevada de CTLA-4**, (2) **T helper clásicas (Th)**, (3) **T activadas con fenotipo parcialmente exhausto**, y (4) **nTreg**, con alta expresión de CD25 y FOXP3. Esta fusión redujo el número de clústeres de 18 a 4, optimizando la interpretación biológica del mapa inmunológico (Figura 55c).



4.3.2.3 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco

A continuación, y al igual que en el bloque anterior, se evaluó de forma cuantitativa el efecto de cada tratamiento farmacológico sobre las principales subpoblaciones inmunológicas previamente definidas, considerando la variación en concentración y la presencia o ausencia de estímulo. Este análisis permite inferir de manera integrada los patrones de respuesta fenotípica inducidos por cada fármaco.

4.3.2.3.1 Leniolisib

A nivel visual, los UMAP correspondientes al tratamiento con leniolisib muestran alteraciones fenotípicas detectables en la distribución espacial de las subpoblaciones T CD4⁺ en comparación con las condiciones control. En las muestras controles sin estímulo (NA-Control-N) y con estímulo (NA-Control-S), se observa una organización bastante equilibrada de las principales poblaciones inmunológicas, con un dominio de las células Th (verde) distribuidas en el centro del mapa y una presencia estructurada de nTreg (marrón), células activadas (lila) y células activadas exhaustas (rojo) en zonas periféricas bien delimitadas.

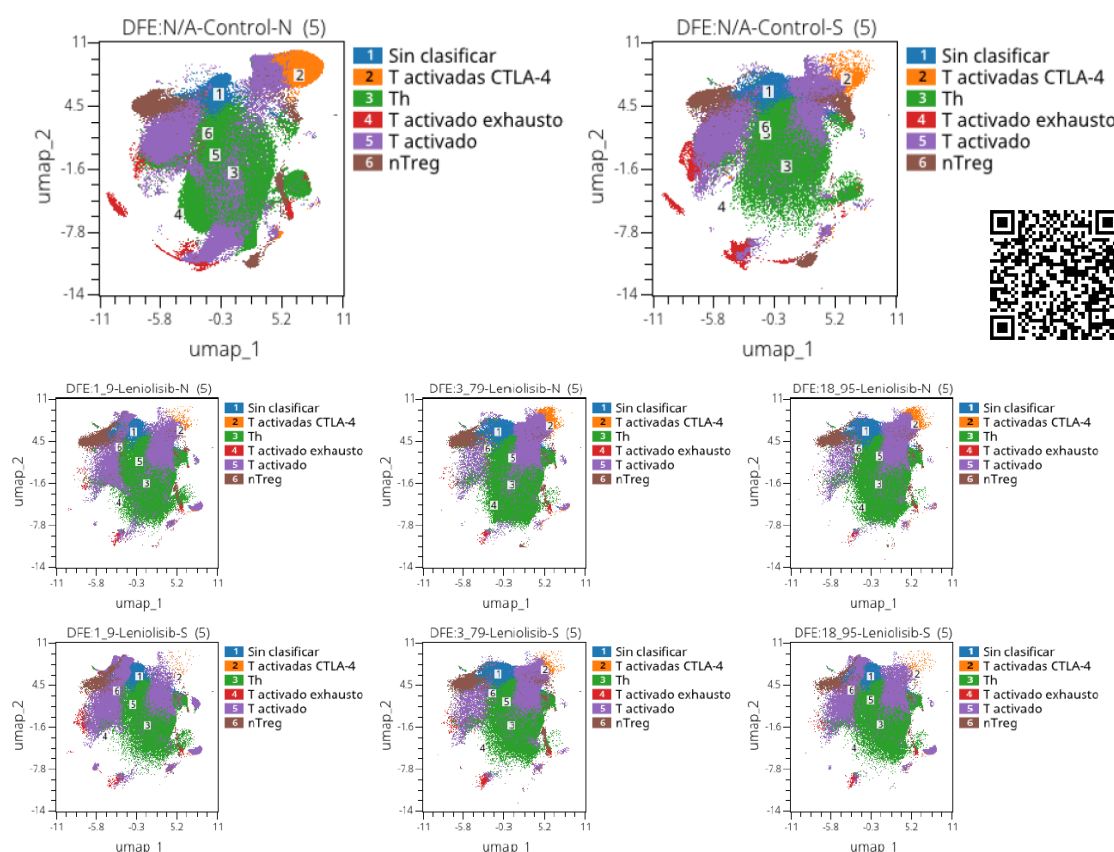


Figura 57 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4⁺ (II) bajo tratamiento con leniolisib a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 6 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con leniolisib a tres concentraciones (1.9, 3.79 y 18.95 μ M), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Sin embargo, tras la exposición a Leniolisib, independientemente de la dosis y la condición de estímulo, se aprecia una contracción del área ocupada por las células Th, que pasan a estar menos densamente agrupadas, y una pérdida relativa de otras poblaciones, especialmente las células T activadas y nTreg, que tienden a ocupar regiones del mapa previamente más pobladas. Además, se percibe una mayor difusión de las poblaciones activadas CTLA-4⁺ (naranja) y activadas exhaustas. Esta reorganización sugiere un efecto redistributivo del fármaco sobre los fenotipos inmunes (**Figura 57**).

Tras la aplicación de los tes estadísticos con sus respectivas correcciones, ninguna de las diferencias observadas alcanzó significación estadística, lo cual sugiere que los cambios fenotípicos detectados no pueden atribuirse de forma concluyente al efecto del tratamiento bajo el tamaño muestral evaluado ($n = 5$ por condición) (**Figura 58**).

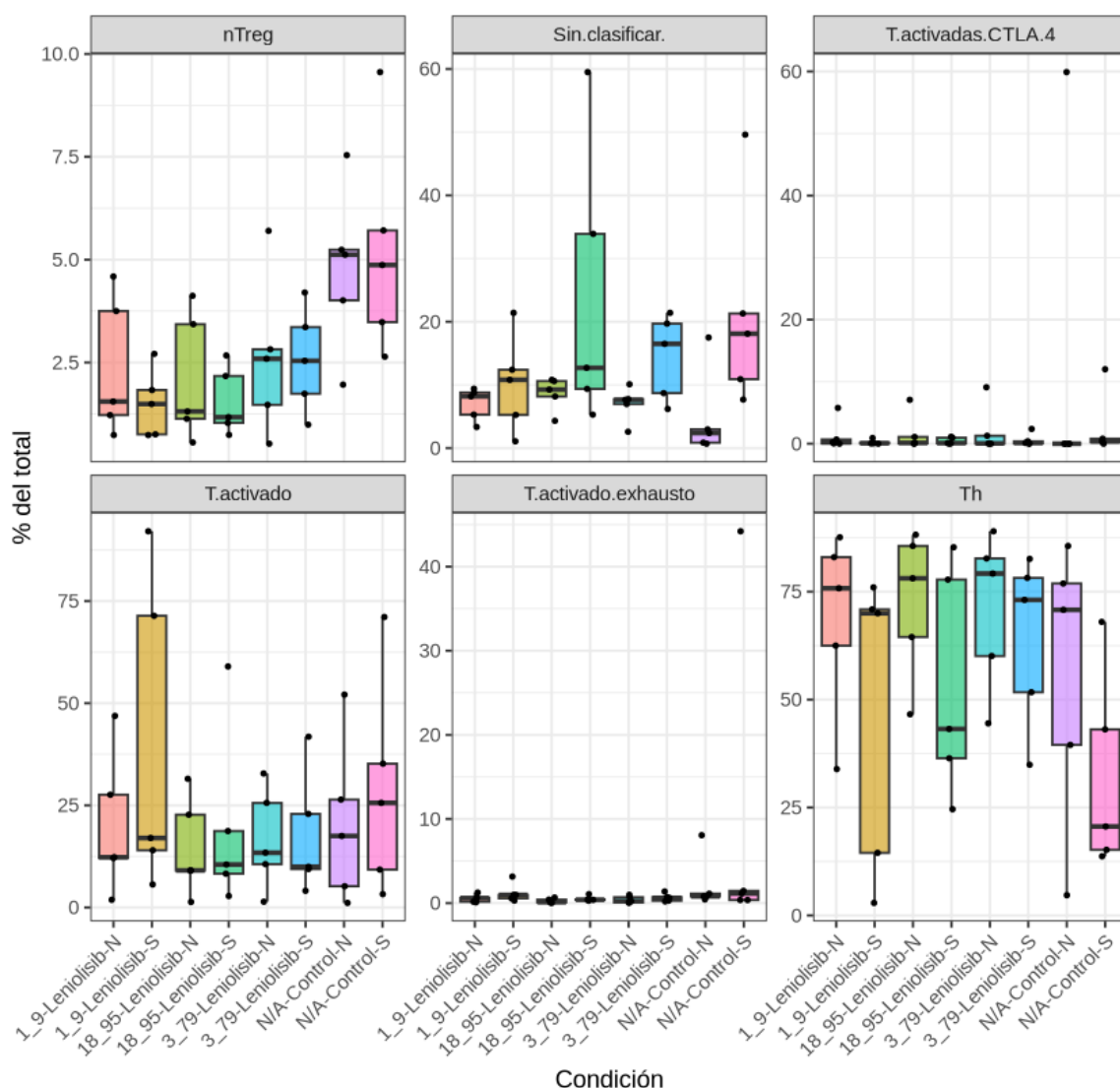


Figura 58 | Distribución porcentual de seis subpoblaciones T tras incubación con leniolisib (1.9, 3.79 y 18.95 μ M) \pm estimulación PMA-ionomicina. Cada caja representa mediana y rango intercuartílico; los puntos individuales muestran la dispersión muestral. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección FDR no evidenciaron diferencias significativas entre condiciones.

A pesar de ello, a nivel descriptivo, se observa una tendencia consistente de **mayor frecuencia relativa de células nTreg en los controles**, especialmente en la condición estimulada (NA-Control-S), en comparación con las condiciones expuestas a Leniolisib. Este patrón refleja una posible inhibición del mantenimiento o expansión de células T reguladoras naturales por el fármaco, en línea con lo observado previamente en el primer panel CD4 (I).

En contraste, las células **Th** tienden a mostrar proporciones más elevadas en las condiciones tratadas con Leniolisib, lo que podría sugerir una expansión compensatoria de subpoblaciones efectoras en detrimento del compartimento regulador. Las poblaciones de **T activadas**, **T activadas CTLA-4⁺** y **T activadas exhaustas** se mantienen bajas y sin variaciones destacables entre condiciones.

4.3.2.3.2 Tacrólimus

En las proyecciones UMAP correspondientes a las distintas condiciones del tratamiento con **tacrolimus**, no se aprecian alteraciones topográficas marcadas en la distribución global de las subpoblaciones T CD4⁺ con respecto a los controles. La organización espacial de las principales poblaciones se mantiene relativamente constante, preservando la arquitectura fenotípica general.

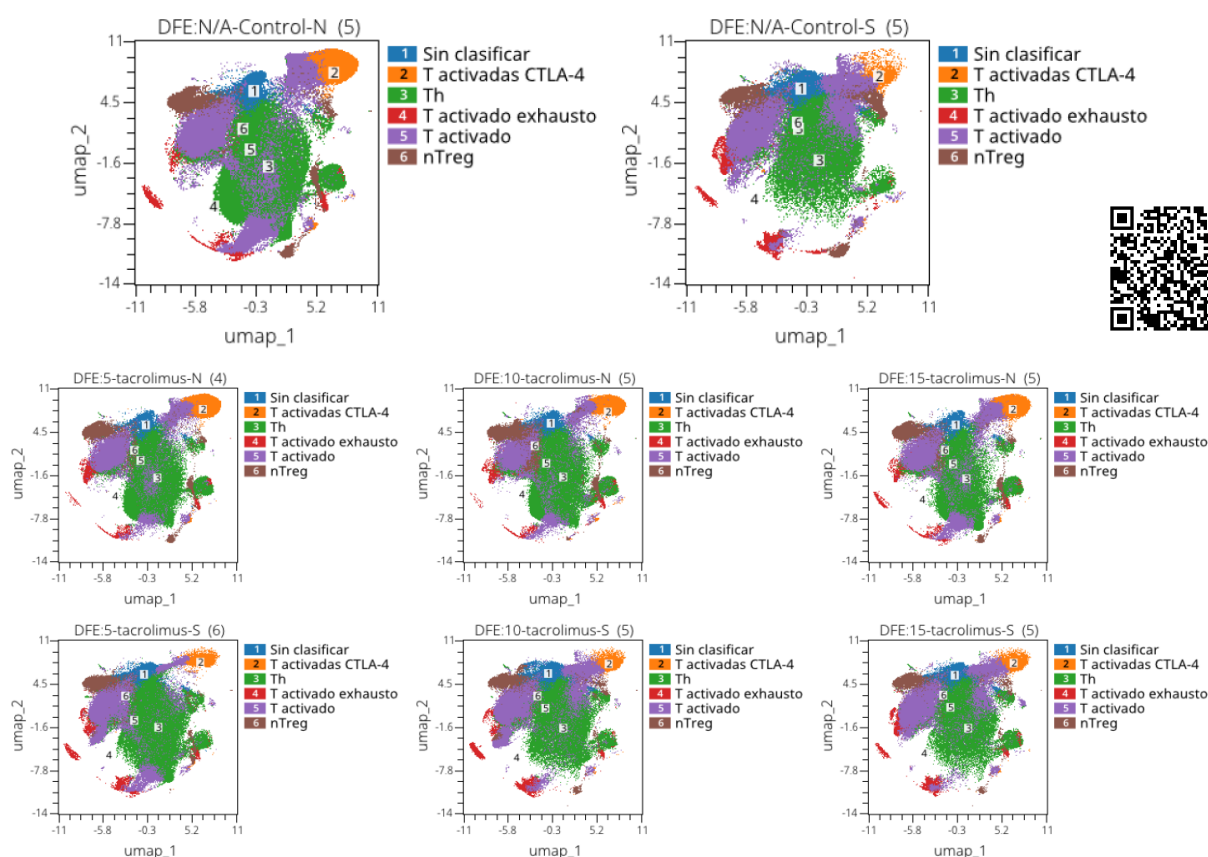


Figura 59 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4⁺ (II) bajo tratamiento con tacrólimus a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 6 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con tacrólimus a tres concentraciones (5, 10 y 15 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

No obstante, se observa de forma recurrente un leve incremento en la densidad y expansión de la población de células T activadas exhaustas (rojo) en múltiples condiciones con tacrolimus, tanto en presencia como en ausencia de estímulo (**Figura 59**). Esta expansión, aunque no dramática en términos de distribución, podría reflejar una tendencia sutil hacia un estado de activación sostenida y disfuncionalidad en ciertas subpoblaciones, posiblemente relacionada con el mecanismo inmunosupresor del fármaco. A pesar de ello, los cambios observados no alteran de manera significativa la topografía global, lo que sugiere un impacto más moderado del tacrolimus sobre la reprogramación fenotípica global de las células T CD4⁺ bajo estas condiciones.

Al igual que en los resultados anteriores, **ninguna de las comparaciones alcanzó significación estadística**. Como único a destacar es la presencia de algunos valores atípicos (outliers) en la población **T activadas CTLA-4⁺**, que alcanzan niveles muy elevados en una de las condiciones, pero que no representan una tendencia general (**Figura 60**).

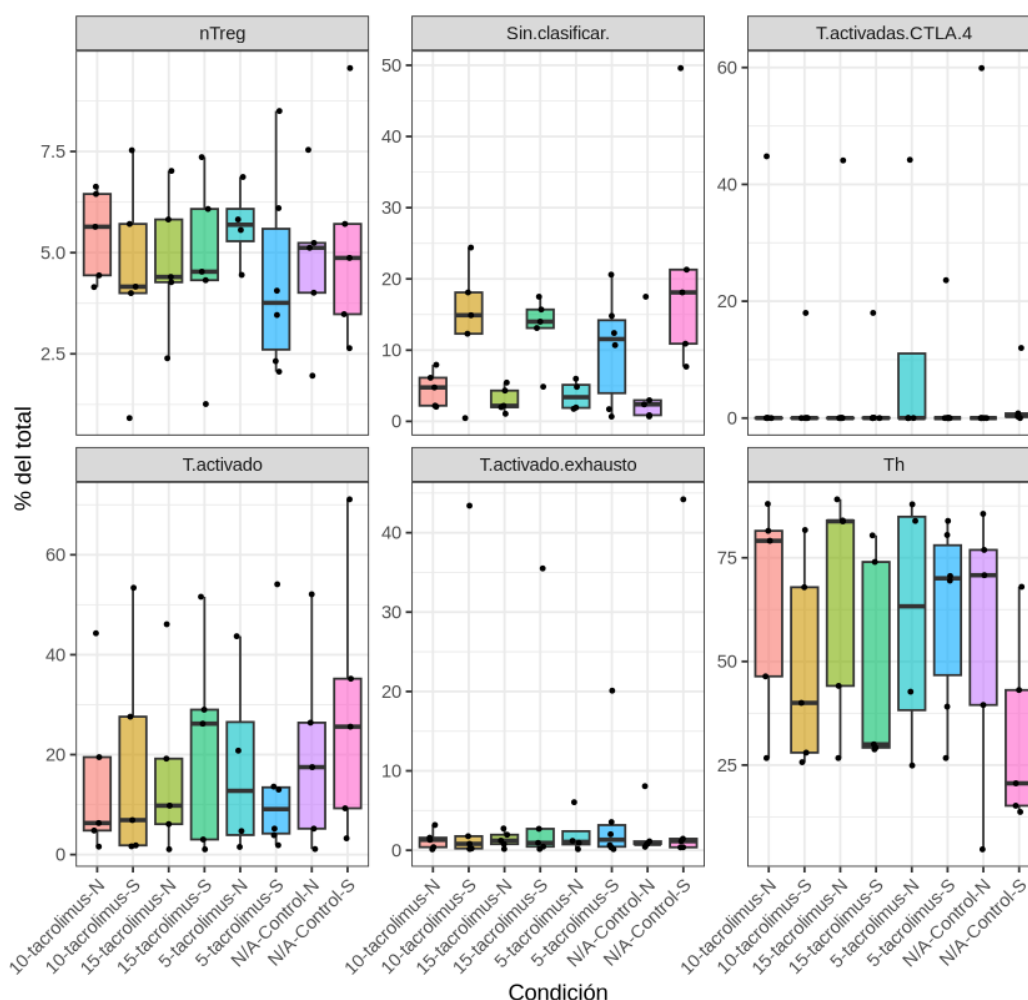


Figura 60 | Distribución porcentual de seis subpoblaciones T tras incubación con tacrolimus (5, 10 y 15 ng/ml) ± estimulación PMA-ionomicina. Cada caja representa mediana y rango intercuartílico; los puntos individuales muestran la dispersión muestral. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección FDR no evidenciaron diferencias significativas entre condiciones. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.2.3.3 Ácido micofenólico

En las representaciones UMAP correspondientes al tratamiento con **ácido micofenólico**, tanto en condiciones estimuladas como en reposo, se observa una conservación sustancial de la topografía fenotípica general respecto a los controles (**Figura 61**). Las principales subpoblaciones mantienen una distribución espacial estable, sin evidencias visuales de expansión, desplazamiento o desaparición significativas. Este patrón sugiere que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, el ácido micofenólico no induce modificaciones fenotípicas notorias en las células T CD4⁺, al menos no lo suficientemente marcadas como para alterar la estructura del espacio UMAP.

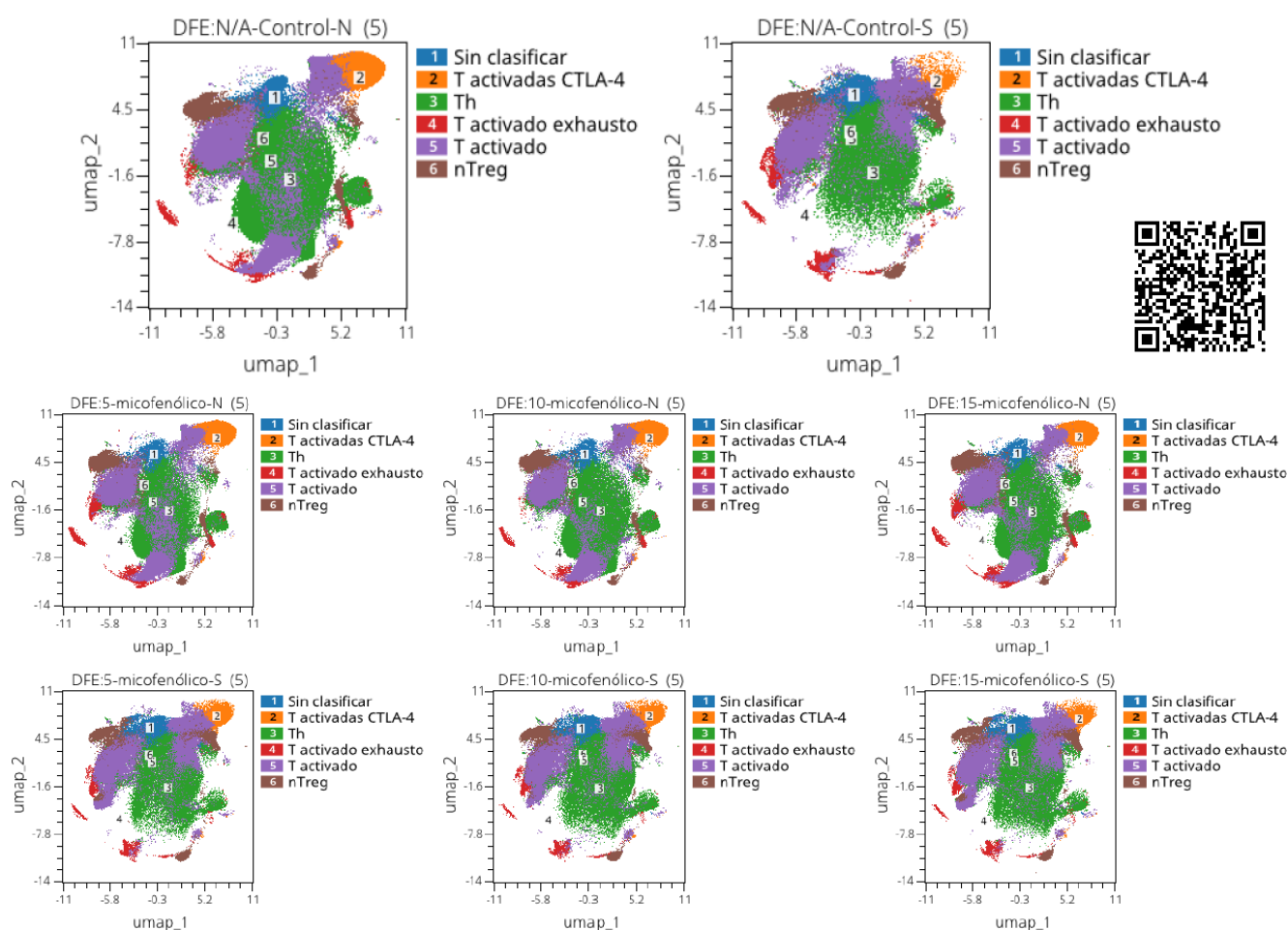


Figura 61 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4+(II) bajo tratamiento con ácido micofenólico a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 6 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con ácido micofenólico a tres concentraciones (5, 10 y 15 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Tras aplicar los métodos estadísticos, los resultados cuantitativos reflejados en el gráfico no revelan diferencias estadísticamente significativas entre condiciones. A nivel descriptivo, las subpoblaciones

analizadas mantienen una distribución relativamente homogénea entre las distintas concentraciones y condiciones de estimulación (**Figura 62**). Aunque se aprecian ligeras variaciones en la mediana y la dispersión (como un leve descenso de las Th en condiciones estimuladas), estos patrones no alcanzan umbrales de significancia. En conjunto, los datos sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, el ácido micofenólico no ejerce un impacto fenotípico relevante sobre las principales subpoblaciones T CD4⁺.

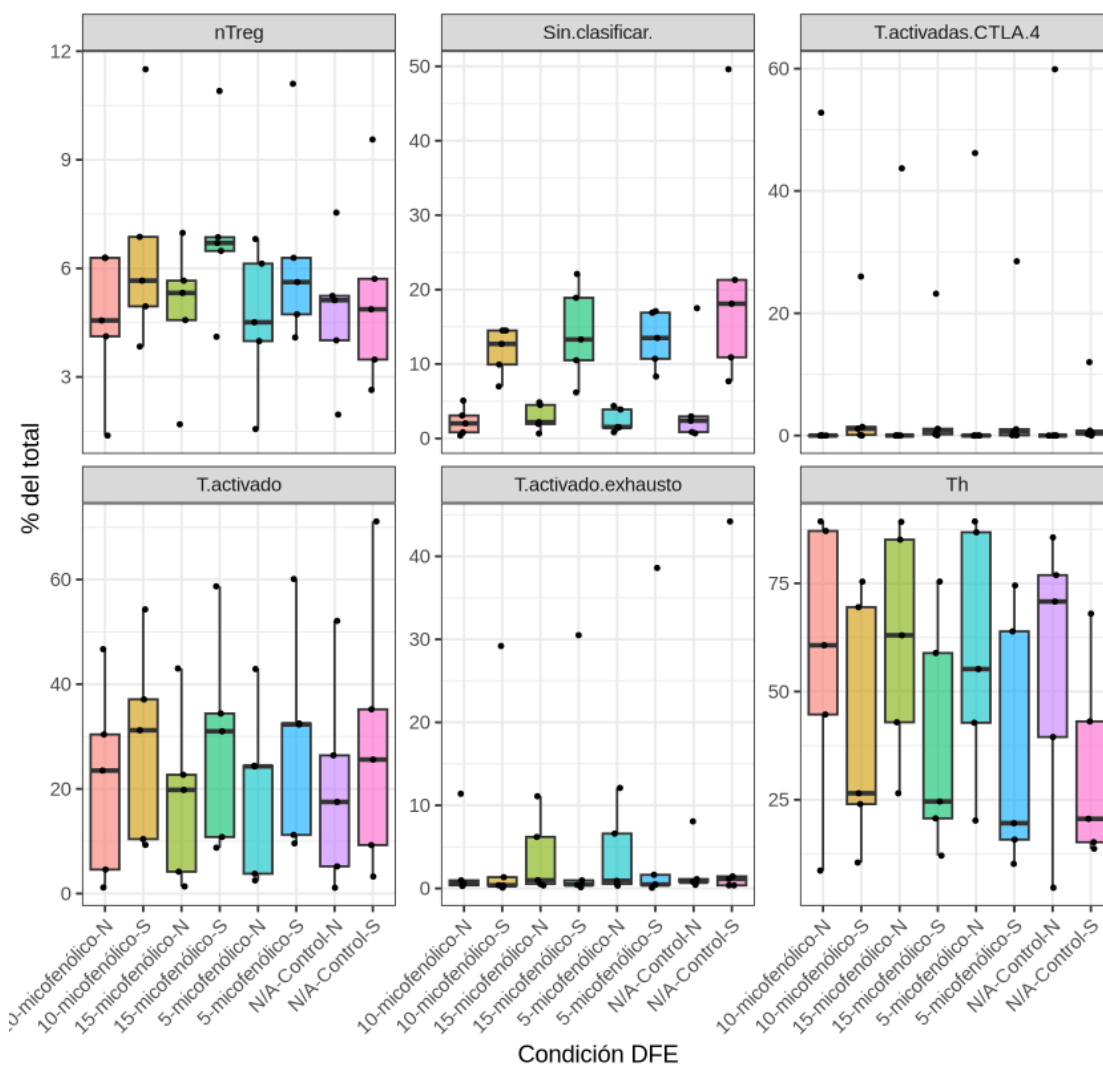


Figura 62 | Distribución porcentual de seis subpoblaciones T tras incubación con ácido micofenólico (5, 10 y 15 ng ml⁻¹) ± estimulación PMA-ionomicina durante 72h. Las cajas muestran mediana y rango intercuartílico; los puntos representan valores individuales. Los tests de Kruskal-Wallis y Dunn (FDR) no revelaron diferencias significativas entre condiciones. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.2.3.4 Rapamicina

En relación con el tratamiento con **rapamicina**, el análisis visual de los mapas UMAP no revela alteraciones sustanciales en la topografía fenotípica global respecto al control, tanto en condiciones

estimuladas como no estimuladas. La distribución espacial de las principales subpoblaciones T CD4⁺ se conserva de manera generalizada, sin observarse desplazamientos evidentes ni expansión o contracción destacable de clústeres específicos (**Figura 63**). Las poblaciones Th, nTreg y T activadas mantienen su localización y densidad relativas a lo largo de las diferentes concentraciones del fármaco, lo que sugiere una estabilidad fenotípica bajo las condiciones evaluadas.

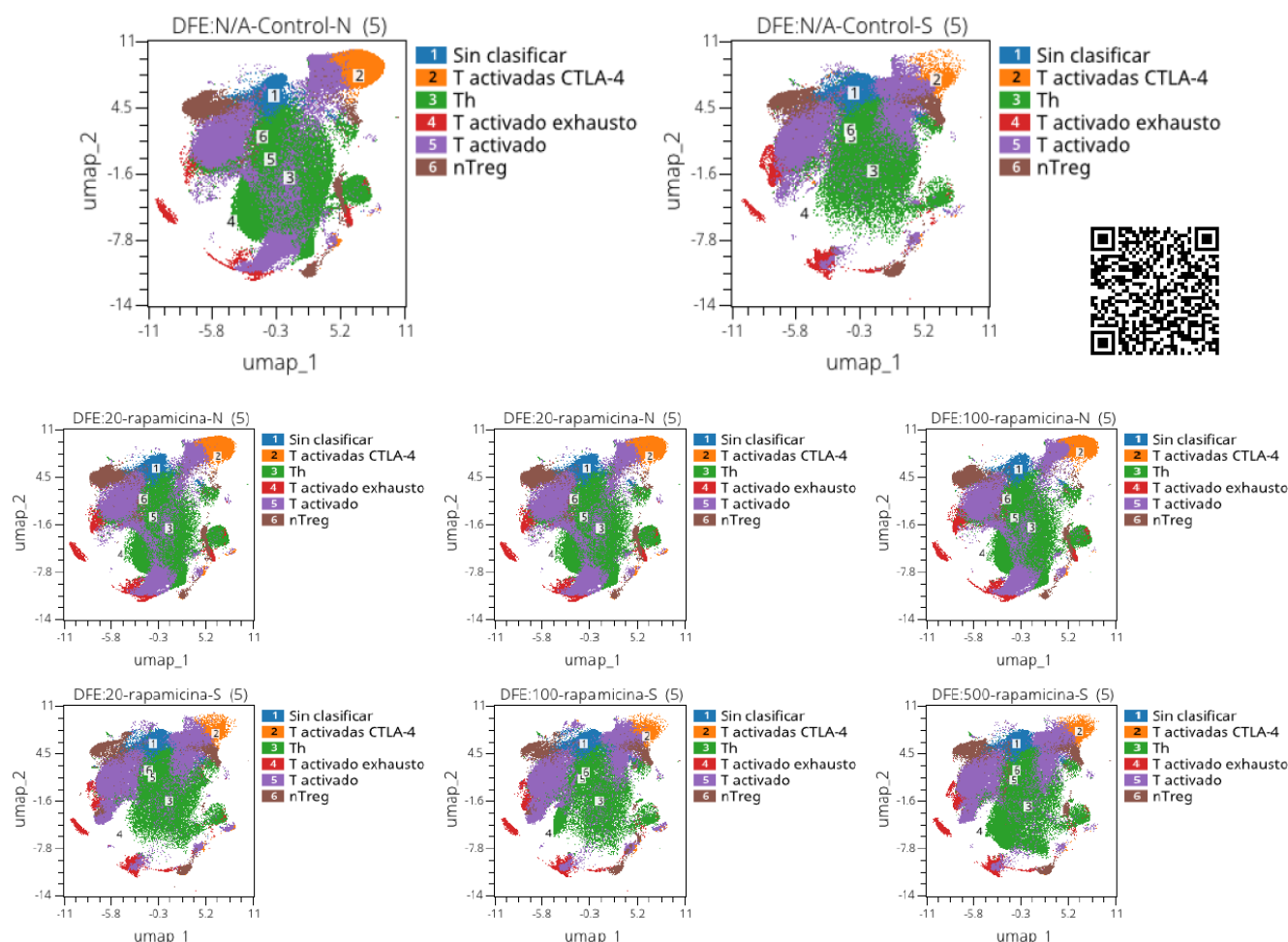


Figura 63 | Representación topológica de las subpoblaciones CD4⁺ (II) bajo tratamiento con rapamicina a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 11 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con rapamicina a tres concentraciones (20, 100 y 500 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

En el análisis cuantitativo de las subpoblaciones T CD4⁺ bajo tratamiento con rapamicina, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre condiciones, como se confirmó mediante pruebas de Kruskal-Wallis con corrección FDR y análisis post hoc de Dunn (**Figura 64**). A nivel visual, las distribuciones de nTreg, Th y células activadas permanecen relativamente estables en todas las concentraciones del fármaco, con perfiles superponibles a los observados en los controles.

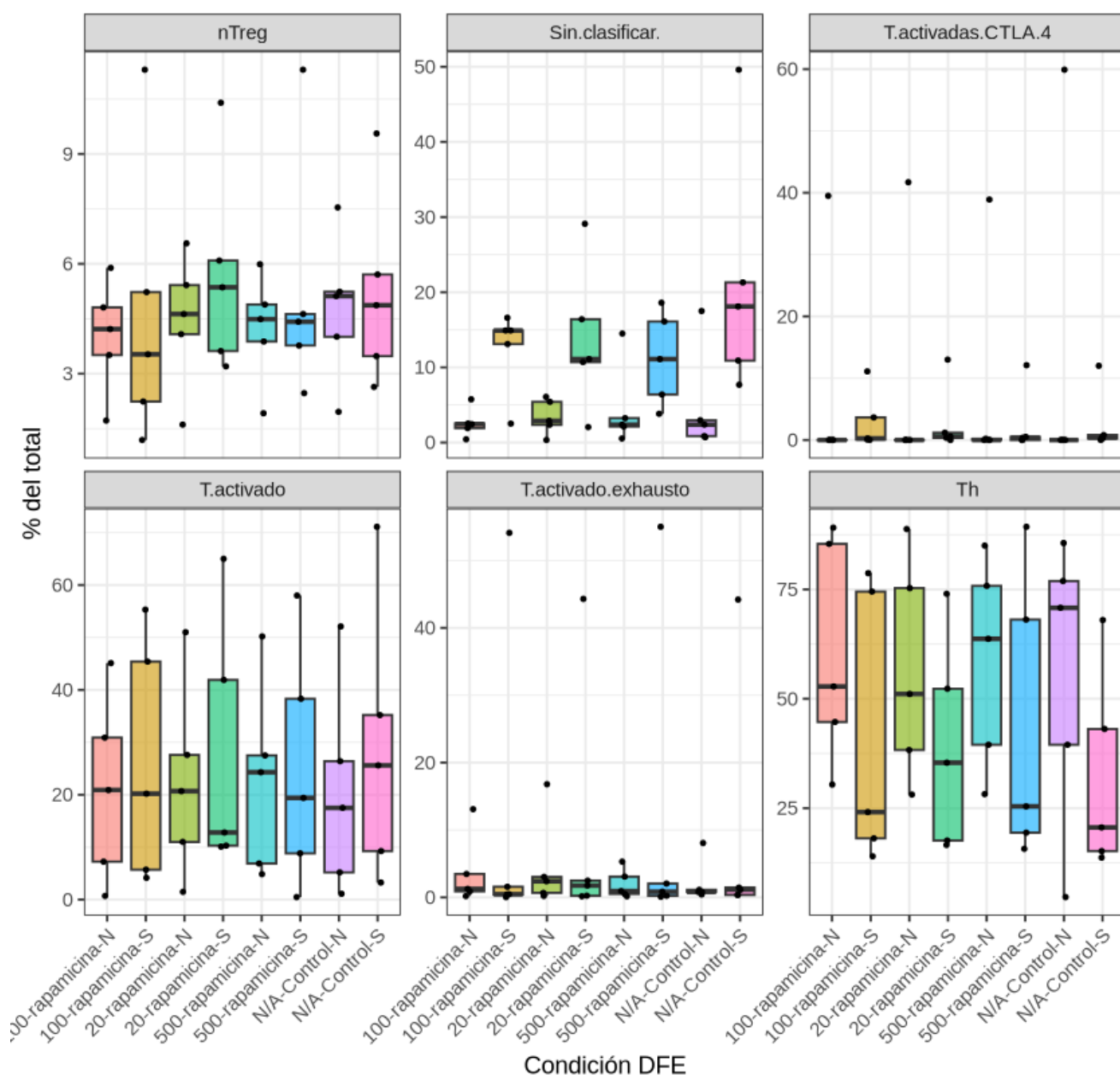


Figura 64 | Distribución porcentual de seis subpoblaciones T tras incubación con rapamicina (20, 100 y 500 ng/ml) ± estimulación PMA-ionomicina. Cada caja representa mediana y rango intercuartílico; los puntos individuales muestran la dispersión muestral. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección FDR no evidenciaron diferencias significativas entre condiciones. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.2.3.5 Ruxolitinib

En las proyecciones UMAP de las condiciones tratadas con **ruxolitinib**, tanto en presencia como en ausencia de estímulo, no se observaron alteraciones notables en la topografía fenotípica global en comparación con los controles (**Figura 65**). Las principales subpoblaciones inmunológicas, incluyendo las células Th, T activadas, T activadas exhaustas y nTreg, conservaron su localización espacial y densidad relativa dentro del mapa. A pesar de ligeras variaciones visuales esperables por la variabilidad biológica,

no se evidencian redistribuciones consistentes o expansiones celulares atribuibles al tratamiento, sugiriendo un impacto fenotípico limitado o ausente del ruxolitinib en esta configuración experimental.

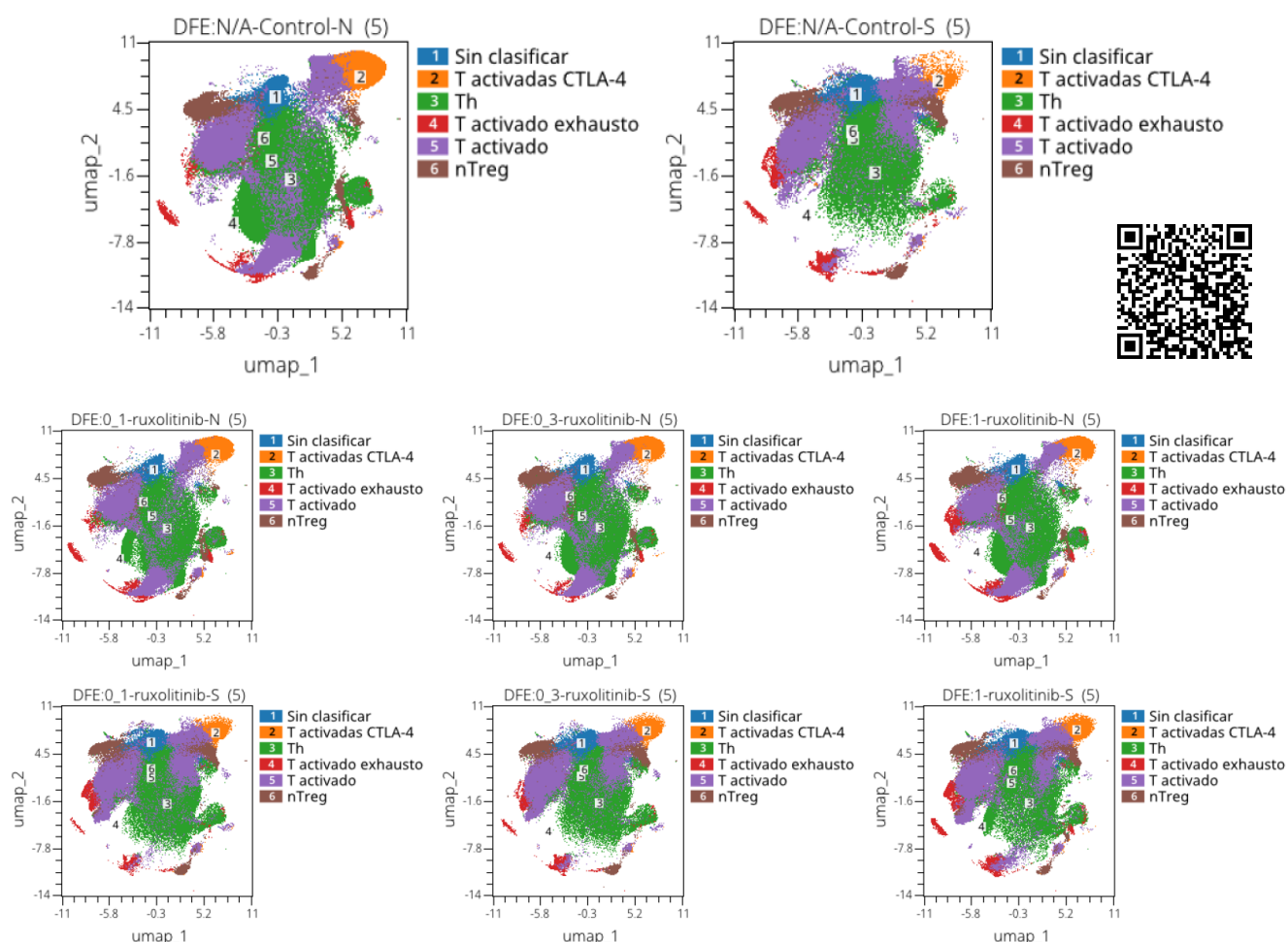


Figura 65 | Distribución fenotípica de subpoblaciones de células T en condiciones de tratamiento con ruxolitinib. Se muestran las proyecciones UMAP correspondientes a PBMCs tratadas con distintas concentraciones de ruxolitinib (0.1, 0.3 y 1 μ M), tanto en condiciones de reposo (N) como estimuladas con PMA e ionomicina (S), comparadas con controles no tratados (NA-control-N y NA-control-S). Cada color representa una subpoblación inmunológica previamente definida tras el proceso de clusterización y anotación fenotípica (ver métodos). En términos generales, no se observaron alteraciones relevantes en la topografía ni redistribuciones significativas de las principales poblaciones celulares tras el tratamiento, lo que sugiere un impacto fenotípico mínimo de ruxolitinib sobre el compartimento T CD4⁺ en este modelo. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

De igual modo que los casos anteriores, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre condiciones, ni en presencia ni en ausencia de estímulo. Aunque se observaron ligeras variaciones en la mediana de algunas poblaciones, como nTreg, células activadas o Th, estas fluctuaciones no fueron consistentes ni relevantes a nivel estadístico (**Figura 66**). En conjunto, los resultados sugieren que ruxolitinib no ejerce un impacto fenotípico robusto sobre las proporciones relativas de las principales subpoblaciones T CD4⁺ en este modelo.

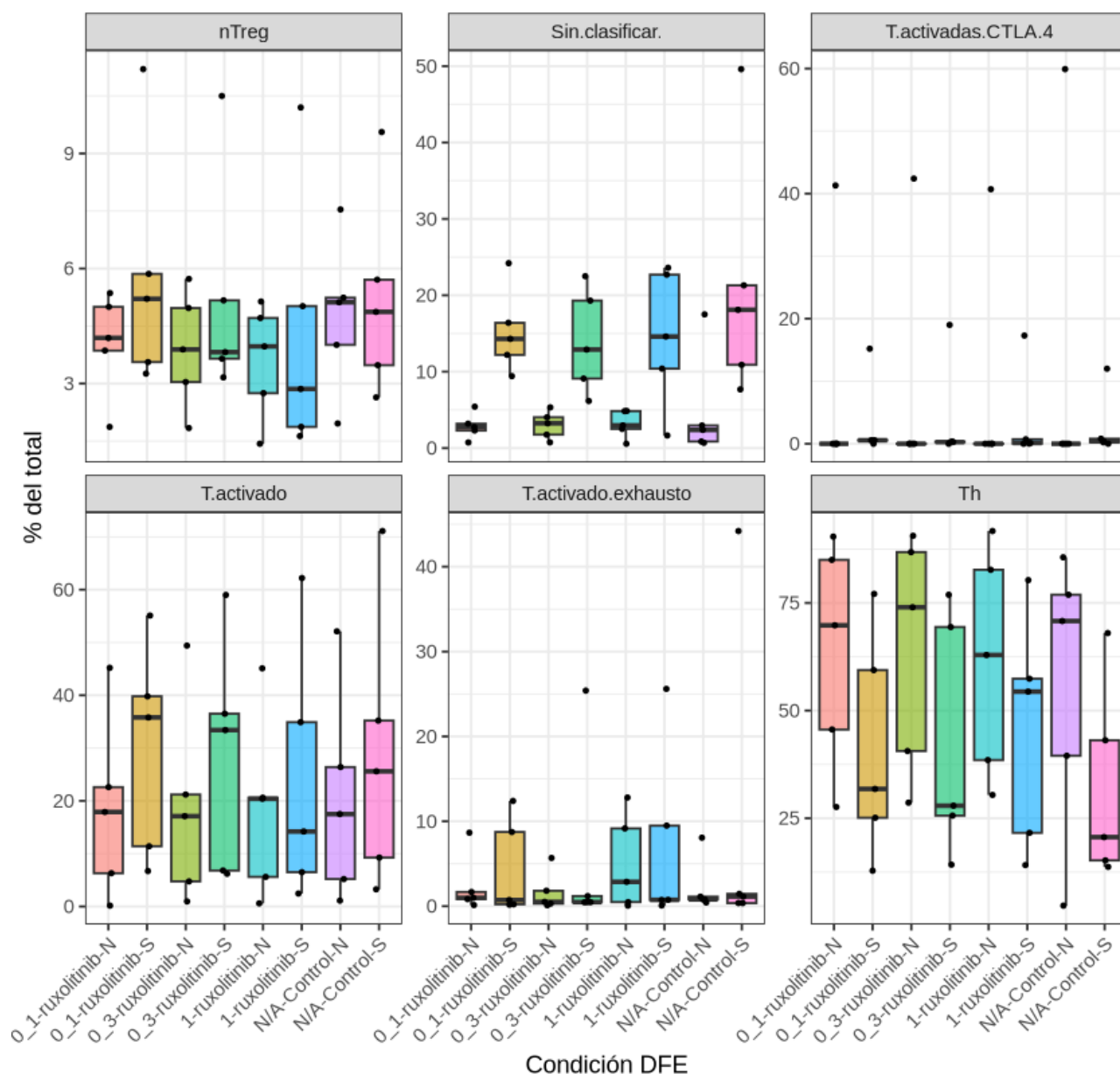


Figura 66 | Porcentaje de las principales subpoblaciones de células T CD4⁺ tras exposición a distintas condiciones de tratamiento con ruxolitinib, en presencia (S) o ausencia (N) de estímulo con PMA e ionomicina. Se representan las medianas y rangos intercuartílicos del porcentaje relativo de cada subpoblación respecto al total de eventos, para cada condición experimental ($n = 5$ por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas mediante prueba de Kruskal-Wallis con corrección por FDR, ni en el análisis post hoc de Dunn para comparaciones múltiples. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

En resumen, el análisis inmunofenotípico de las células T CD4⁺ reveló que ninguno de los cinco fármacos evaluados (leniolisib, tacrolimus, micofenolato, rapamicina y ruxolitinib), ni sus respectivas dosis y condiciones de estimulación, produjo alteraciones estadísticamente significativas en la distribución proporcional de las principales subpoblaciones celulares definidas en el espacio UMAP. A pesar de ciertas variaciones visuales entre condiciones, como la tendencia a una mayor proporción de nTreg en los controles o el incremento de células T activadas o exhaustas en algunos tratamientos, estas diferencias no alcanzaron

significancia tras los análisis no paramétricos (Kruskal-Wallis seguido de Dunn con corrección FDR). Estos hallazgos sugieren que, en las condiciones experimentales evaluadas, los fármacos no generan una remodelación fenotípica robusta y reproducible sobre las subpoblaciones T CD4⁺, lo que resalta la estabilidad relativa del compartimento celular analizado o la necesidad de modelos más sensibles para detectar efectos sutiles.

4.3.3 Impacto sobre células CD8

4.3.3.1 Topografía inmunofarmacológica

En el análisis topográfico de las poblaciones CD8⁺ representadas mediante proyecciones UMAP por condición farmacológica, se observó que la mayoría de los tratamientos preservaron de forma general la arquitectura fenotípica del control, manteniendo las regiones estructurales principales y con una ligera redistribución de la densidad hacia áreas centrales del mapa (**Figura 67**). Esta reorganización sugiere una modulación sutil sin pérdida evidente de subpoblaciones celulares. Sin embargo, el caso del **leniolisib** destacó por mostrar una reducción marcada en la densidad celular global y la pérdida parcial de estructuras periféricas, particularmente una rama prominente en el cuadrante superior derecho, lo que podría indicar una contracción de subtipos específicos o una reprogramación fenotípica más profunda inducida por este fármaco.

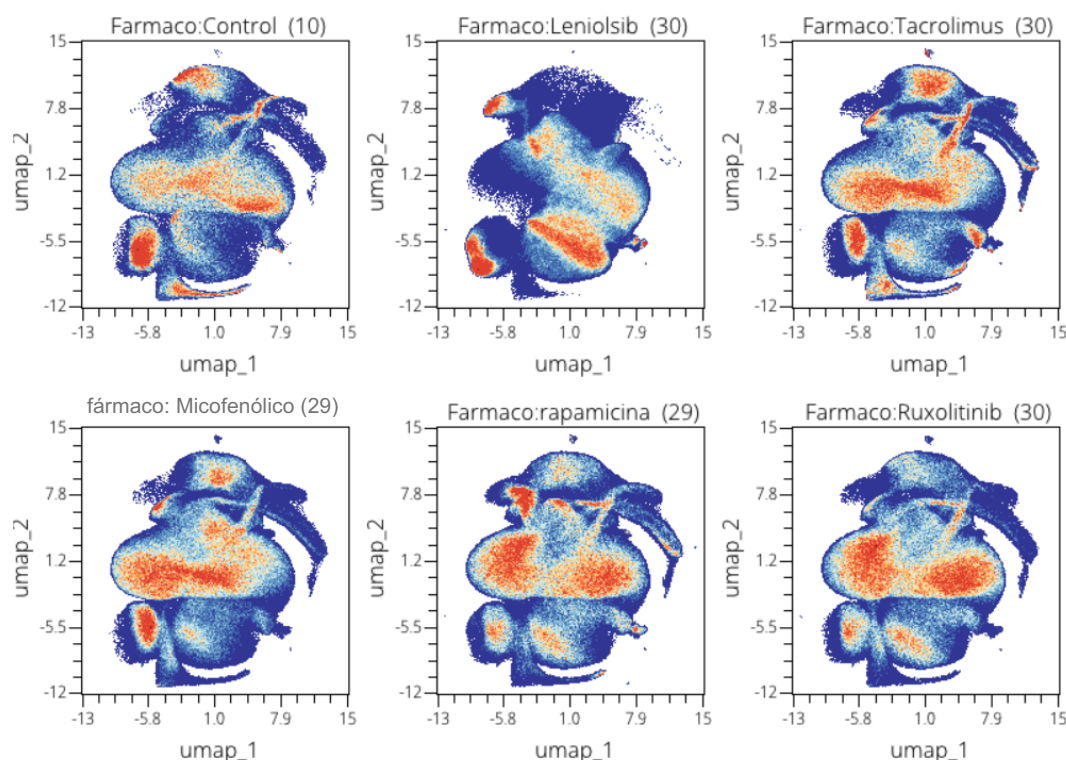


Figura 67 | Proyección UMAP de células T CD8⁺ tras tratamiento con diferentes fármacos inmunomoduladores. Se representa la densidad de eventos celulares en el espacio UMAP para la condición control (sin tratamiento) y para las condiciones tratadas con leniolisib, tacrólimus, micofenolato mofetilo, rapamicina y ruxolitinib. Cada mapa muestra la distribución fenotípica de las células, coloreada según densidad (azul: baja, rojo: alta).

4.3.3.2 Clusterización y definición fenotípica

Para caracterizar fenotípicamente el compartimento CD8⁺ en esta tercera tanda experimental, se aplicó una clusterización no supervisada de los eventos celulares utilizando el método *elbow*, que indicó un número óptimo de agrupamientos de **k = 18**. Los clústeres resultantes fueron proyectados en el espacio UMAP (**Figura 68a**), revelando una organización estructurada y heterogénea del compartimento CD8⁺. Posteriormente, se calcularon las medianas de la intensidad fluorescente (MFI) para cada marcador en cada uno de los 18 clústeres, generando un heatmap comparativo (**Figura 68b**). A partir de estos perfiles de expresión, y utilizando los criterios semicuantitativos previamente definidos para clasificar la MFI como bajo (<1), intermedio (1-2), y alto (>2), se procedió a la asignación fenotípica de cada clúster. Esta caracterización permitió reagrupar los clústeres en **12 poblaciones funcionales distintas** con relevancia inmunobiológica (**Figura 68c**). Esta reclasificación redujo la complejidad del análisis, facilitando la interpretación funcional del mapa inmunológico y destacando la diversidad de estados de activación y diferenciación dentro del compartimento CD8⁺.

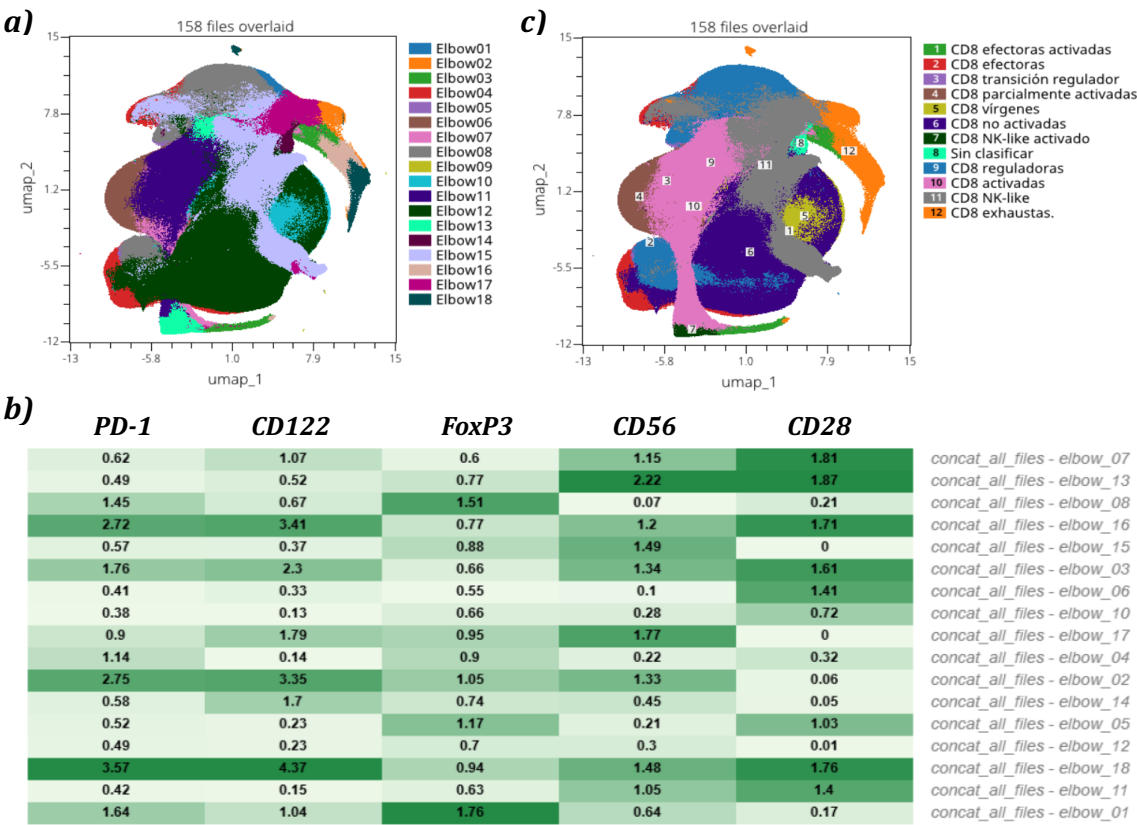


Figura 68 | Análisis fenotípico del compartimento CD8⁺ mediante clusterización no supervisada. a) Representación UMAP de los eventos celulares CD8⁺ agrupados por el método *elbow*, que determinó un número óptimo de 18 clústeres (Elbow01–Elbow18), cada uno representado con un color distinto. b) Reagrupamiento de los clústeres en 10 poblaciones funcionales biológicamente relevantes, según el perfil de expresión de marcadores de activación, regulación e inhibición: CD8 efectoras activadas, CD8 efectoras, CD8 en transición reguladora, CD8 parcialmente activadas, CD8 vírgenes, CD8 no activadas, CD8 NK-like activadas, CD8 reguladoras, CD8 activadas y CD8 exhaustas. c) Heatmap de la mediana de la intensidad fluorescente (MFI) para cada marcador en los 18 clústeres, utilizado como base para la asignación fenotípica. La intensidad del color refleja el nivel relativo de expresión (bajo a alto) para cada marcador, según criterios semicuantitativos.

4.3.3.3 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco

4.3.3.3.1 Leniolisib

A nivel visual general, la comparación entre **NA-N-Control** y **NA-S-Control** revela una clara disminución en la densidad global de eventos en el espacio UMAP tras la estimulación, evidenciada por la pérdida notable de puntos coloreados. Esta reducción indica una disminución en la abundancia de células CD8⁺, posiblemente asociada a activación seguida de apoptosis o a una disfunción inducida por el estímulo. Al observar las condiciones **no estimuladas tratadas con Leniolisib (NA-N)**, se mantiene una distribución relativamente estable de eventos celulares a lo largo del espacio UMAP, similar a la del control no estimulado, aunque con notables pérdidas de densidad sobre todo en los espacios superiores y el brazo inferior del UMAP. Esto sugiere que, en ausencia de estímulo, leniolisib no altera drásticamente la densidad global del compartimento CD8⁺, manteniendo una estructura poblacional conservada incluso a concentraciones altas (**Figura 69**).

En cambio, en las condiciones **estimuladas con Leniolisib (NA-S)**, se evidencia una recuperación parcial de la densidad de eventos en comparación con el control estimulado. A medida que aumenta la concentración del inhibidor, se observa una mayor presencia de puntos en el UMAP, lo que indica que leniolisib podría proteger o preservar la viabilidad de las células CD8⁺ frente al estímulo.

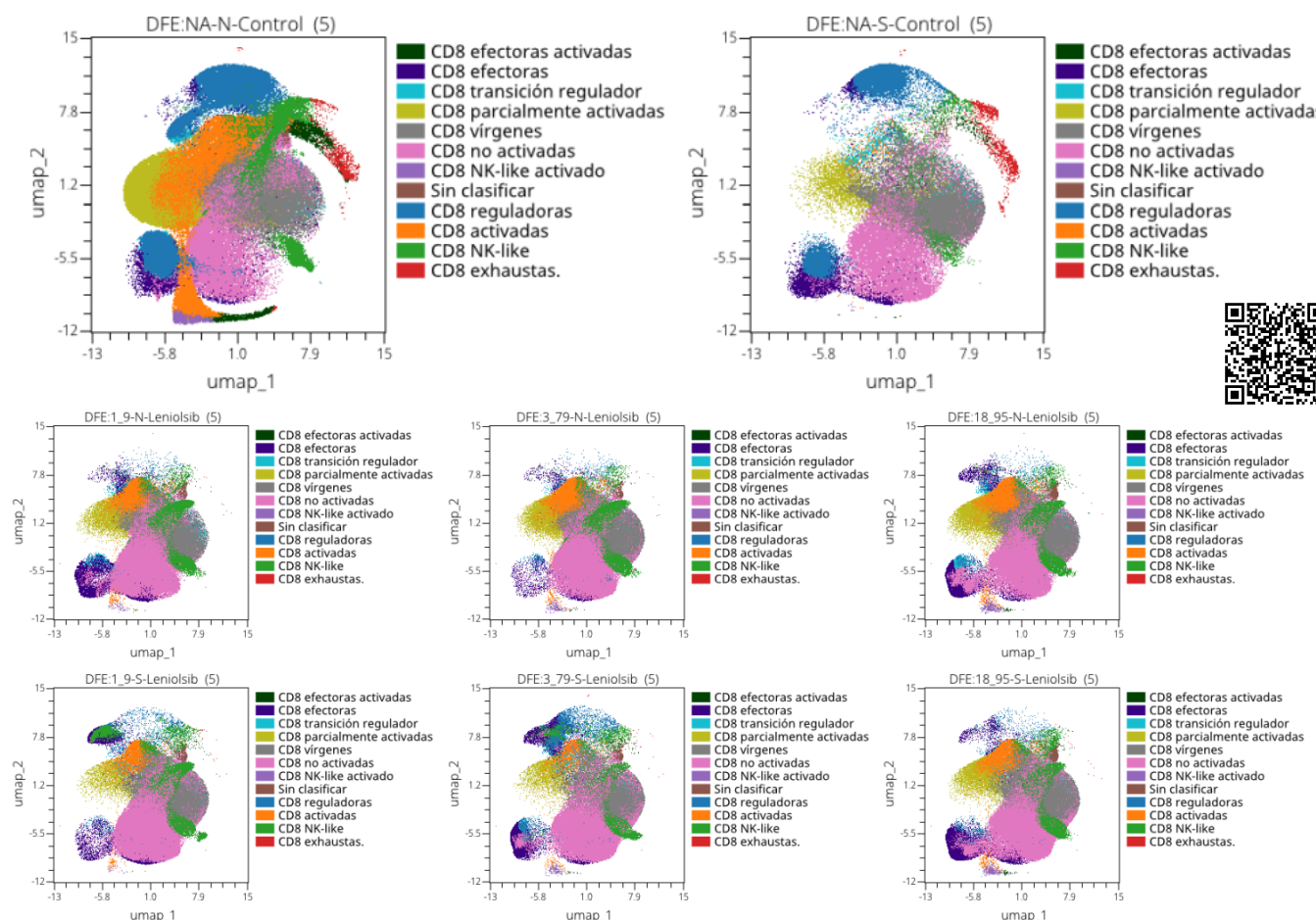


Figura 69 | Representación topológica de las subpoblaciones CD8⁺ bajo tratamiento con leniolisib a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 12 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con leniolisib a tres concentraciones (1.9, 3.79 y 18.95 μ M), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Si bien se aprecian variaciones aparentes en la proporción de varias subpoblaciones tras la cuantificación de las diferencias observadas en el UMAP (en particular, una tendencia a la disminución de CD8 efectoras y un aumento relativo de CD8 no activadas o vírgenes en condiciones tratadas), los análisis estadísticos mediante pruebas de Kruskal-Wallis con corrección por FDR, seguidos de pruebas post hoc de Dunn también con FDR, no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (**Figura 70**). Estos resultados sugieren que, a pesar de la redistribución visual evidente observada en el espacio UMAP, las diferencias cuantitativas en las proporciones de subpoblaciones CD8⁺ no alcanzan significación estadística, lo que puede atribuirse a la variabilidad intra-grupo o al tamaño muestral. En conjunto, estos datos respaldan un efecto modulador de Leniolisib detectable a nivel espacial y cualitativo (UMAP), aunque no cuantitativamente concluyente en términos de frecuencias relativas globales.

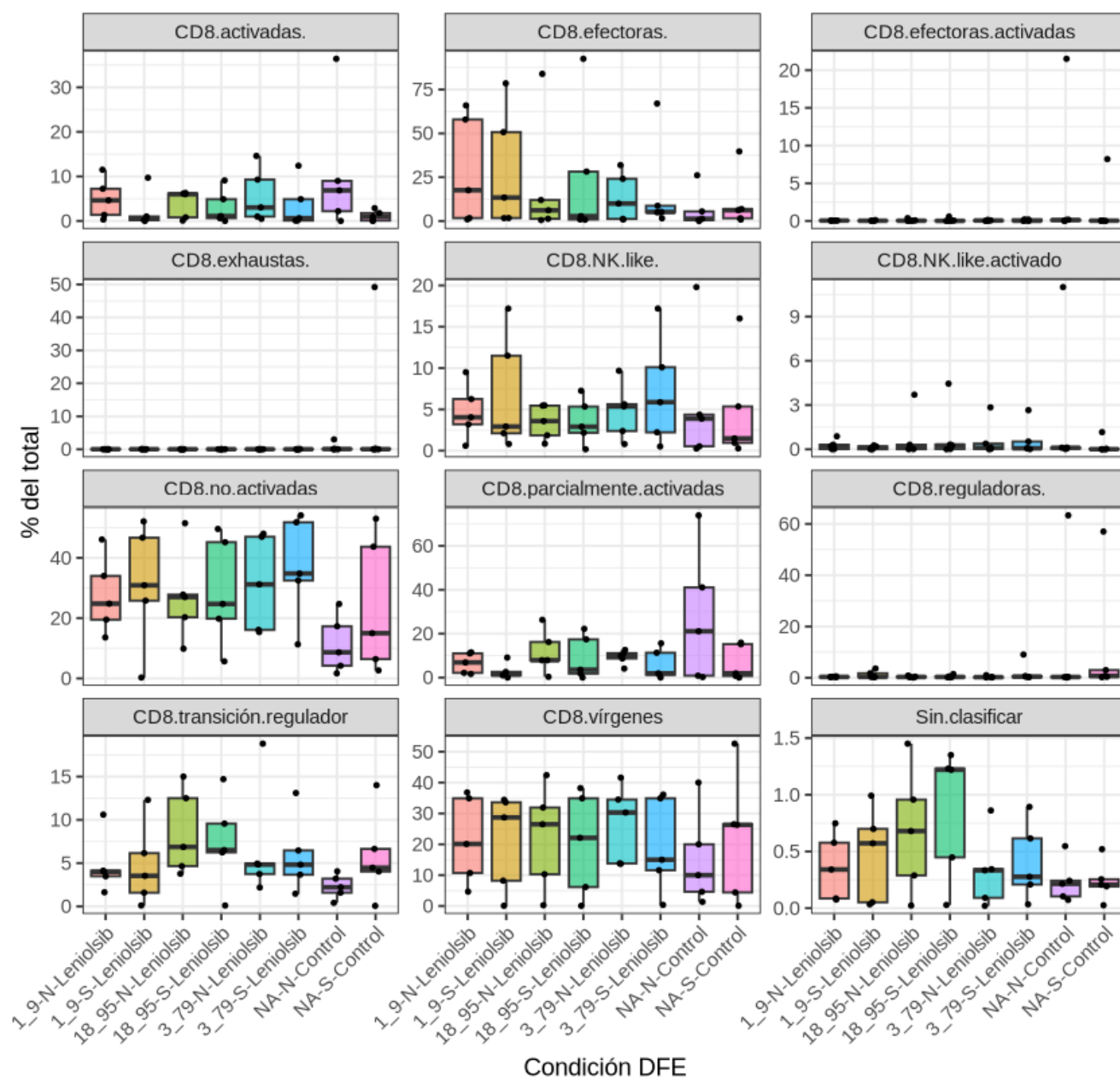
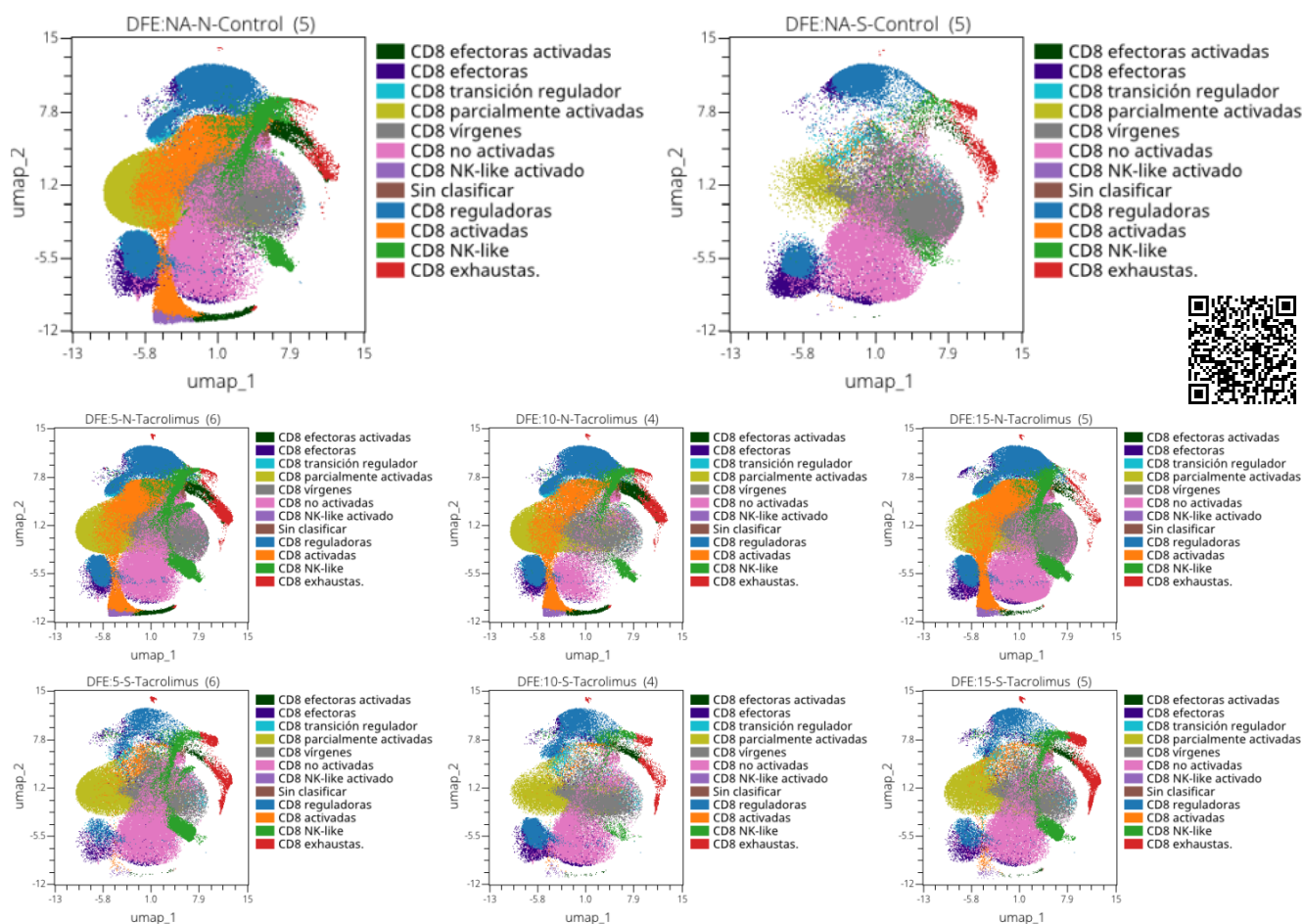


Figura 70 | Distribución porcentual de doce subpoblaciones T tras incubación con leniolisib (1.9, 3.79 y 18.95 μM) \pm estimulación PMA-ionomicina. Cada caja representa mediana y rango intercuartílico; los puntos individuales muestran la dispersión muestral. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección FDR no evidenciaron diferencias significativas entre condiciones DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.3.3.2 Tacrólimus

El análisis topográfico de las células CD8⁺ tras tratamiento con tacrólimus reveló patrones distintos en función de la condición de estimulación. La comparación entre el control sin estímulo (NA-N-Control) y el control con estímulo (NA-S-Control) mostró, como en análisis previos, una **drástica disminución en la densidad celular** en respuesta al estímulo, reflejada en una menor cantidad de puntos distribuidos en el espacio UMAP. En contraste, las condiciones tratadas con tacrólimus sin estímulo (DFE:5, 10 y 15-N) mostraron un **perfil topográfico prácticamente idéntico al control no estimulado**, con una densidad celular alta y una distribución ampliamente conservada, lo que sugiere que tacrólimus no altera de forma apreciable el estado basal del compartimento CD8⁺ (**Figura 71**). Sin embargo, en las condiciones estimuladas tratadas con tacrólimus (DFE:5, 10 y 15-S), se observó una **ligera pérdida de densidad celular generalizada**, aunque **significativamente menor que la observada en el control estimulado**. Este patrón sugiere que tacrólimus atenúa parcialmente la pérdida celular inducida por el estímulo, preservando en mayor medida la densidad y la diversidad topográfica del compartimento CD8⁺.



Al igual que en el análisis anterior, se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis con corrección por FDR y pruebas post hoc de Dunn también ajustadas por FDR, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones. A nivel descriptivo, se observan tendencias interesantes, como una mayor proporción de células CD8⁺ no activadas y vírgenes, así como una menor representación de poblaciones activadas y efectoras en comparación con el control estimulado (**Figura 72**). Estas diferencias, sin embargo, no alcanzaron significación estadística, lo que sugiere que, si bien tacrolimus parece preservar visualmente la densidad celular, estas variaciones no se reflejan de forma robusta en los porcentajes relativos cuantificados. Así, los resultados cuantitativos complementan el análisis topográfico previo, indicando un posible efecto modulador sutil del fármaco que merece análisis más profundo en términos funcionales o longitudinales.

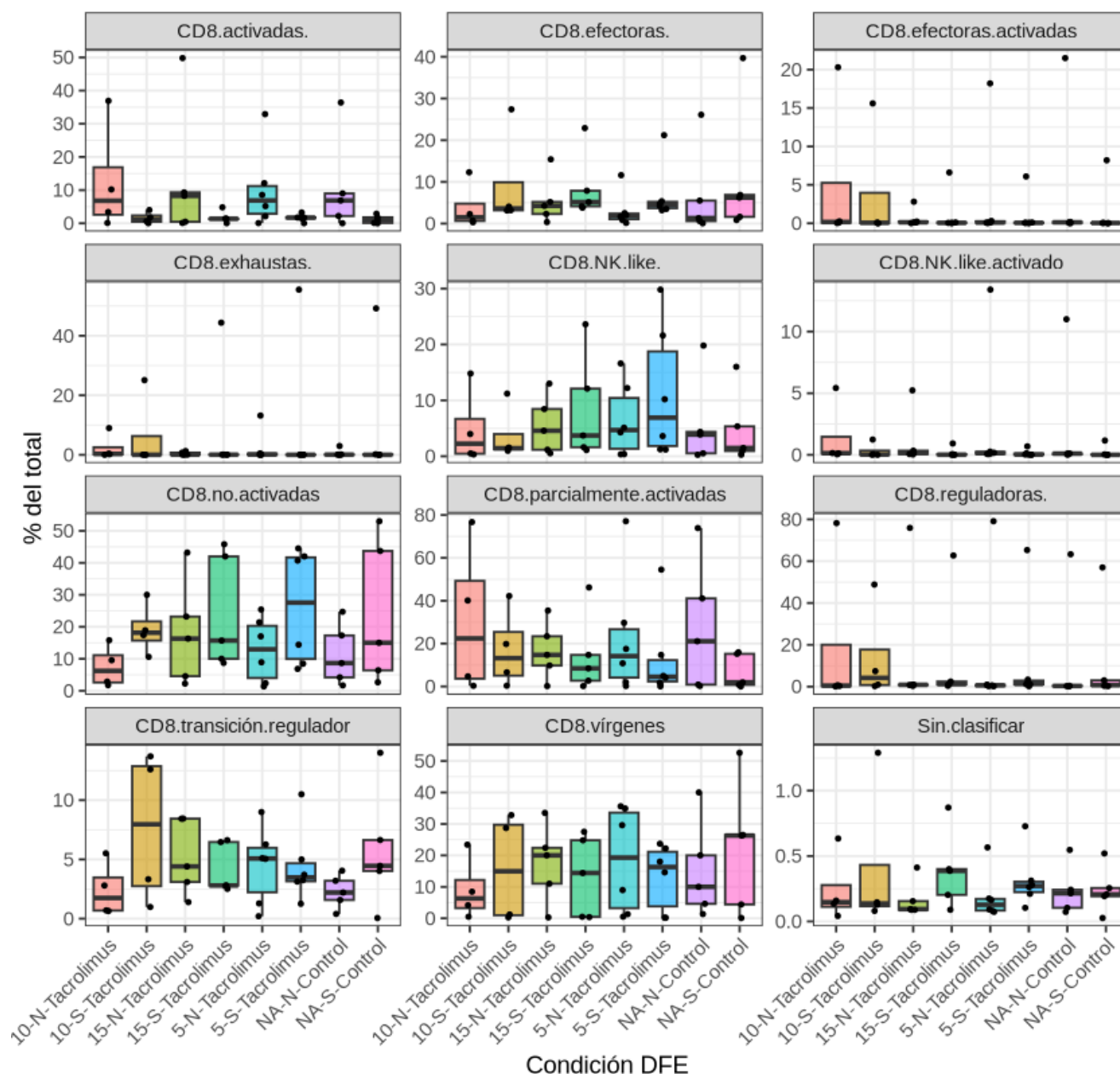


Figura 72 | Distribución porcentual de doce subpoblaciones T tras incubación con tacrolimus (5, 10 y 15 ng/mL) ± estimulación PMA-ionomicina. Cada caja representa mediana y rango intercuartílico; los puntos individuales muestran la dispersión muestral. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn con corrección FDR no evidenciaron diferencias significativas entre condiciones. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.3.3.3 Ácido micofenólico

En el análisis topográfico del compartimento CD8⁺ bajo tratamiento con **ácido micofenólico**, se observó un patrón muy similar al registrado en los casos anteriores. Al comparar el control sin estímulo (NA-N-Control) con el control estimulado (NA-S-Control), se evidenció una notable **pérdida de densidad celular** en respuesta al estímulo, reflejada en una menor cantidad de eventos distribuidos en el espacio UMAP. En las condiciones tratadas con ácido micofenólico sin estímulo (DFE:5, 10 y 15-N), la **distribución celular se mantuvo muy similar al control no estimulado**, con una densidad homogénea y preservación de la topografía global, lo que indica que el tratamiento no modifica sustancialmente el estado basal del compartimento CD8⁺. En las condiciones con estímulo (DFE:5, 10 y 15-S), el patrón espacial **fue muy comparable al observado en el control estimulado**, con una pérdida generalizada de densidad, sin una recuperación aparente atribuible al fármaco. Estos resultados sugieren que, a nivel visual, el ácido micofenólico **no revierte el impacto del estímulo** sobre la topografía del compartimento CD8⁺ y su perfil se asemeja en gran medida al de los controles respectivos, tanto en ausencia como en presencia de estímulo (**Figura 73**).

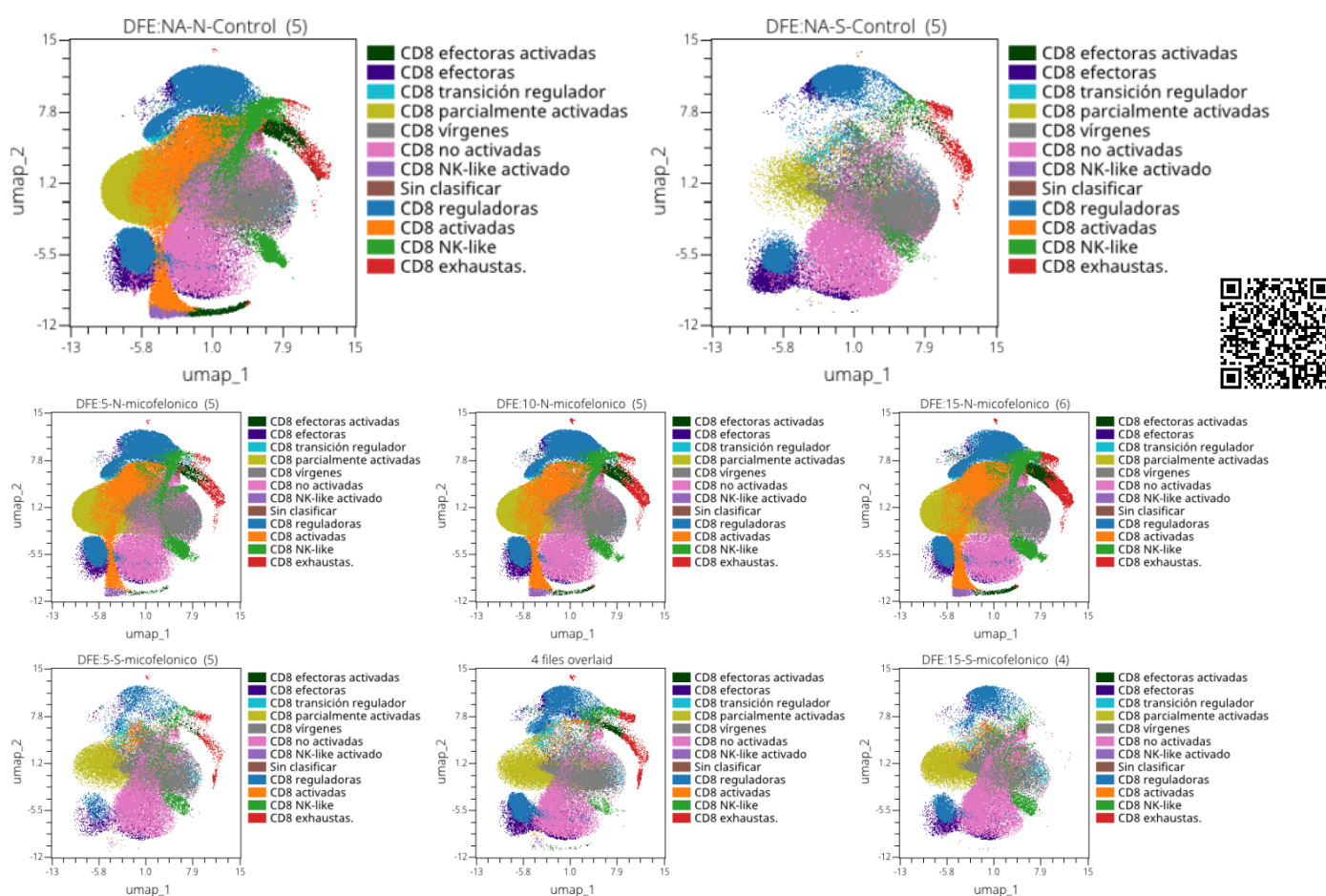


Figura 73 | Representación topológica de las subpoblaciones CD8⁺ bajo tratamiento con ácido micofenólico a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 12 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con ácido micofenólico a tres concentraciones (5, 10 y 15 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

Las frecuencias relativas de las subpoblaciones CD8⁺ bajo tratamiento con ácido micofenólico fueron representadas mediante diagramas de caja para explorar posibles tendencias globales entre condiciones. Si bien se aprecia una considerable variabilidad

interindividual en algunas subpoblaciones (especialmente en CD8 no activadas, parcialmente activadas, vírgenes y de transición reguladora), la distribución general de los porcentajes no mostró patrones consistentes ni desplazamientos marcados entre las condiciones tratadas y los controles (**Figura 74**). Los análisis estadísticos mediante pruebas no paramétricas y correcciones por FDR no revelaron diferencias significativas. En este contexto, los resultados cuantitativos respaldan la observación cualitativa previa en los mapas UMAP, donde el ácido micofenólico no inducía una redistribución celular apreciable respecto a sus controles correspondientes. En conjunto, estos datos sugieren que, en las condiciones evaluadas, el ácido micofenólico mantiene un impacto limitado sobre la composición relativa de las subpoblaciones CD8⁺.

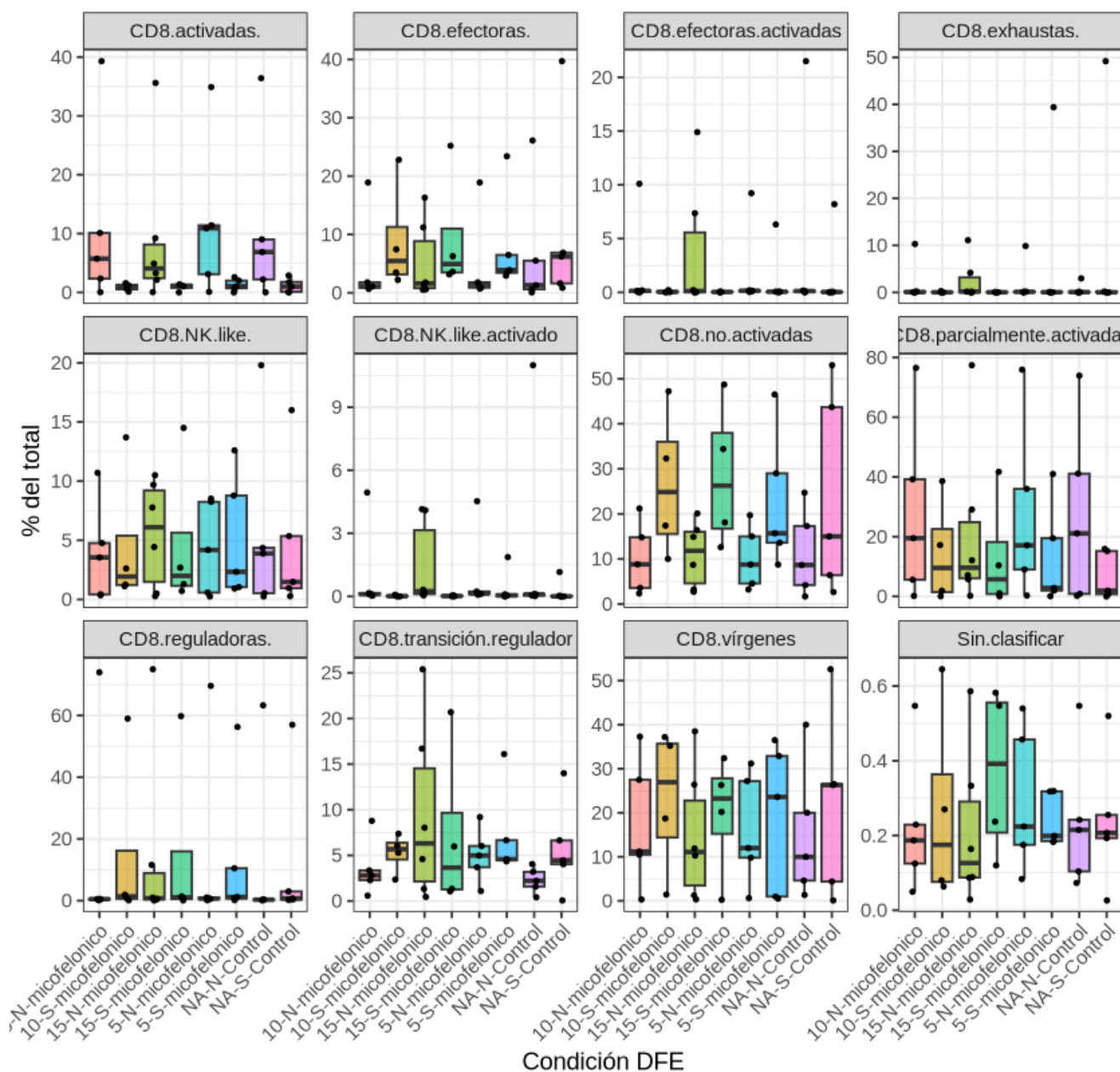


Figura 74 | Cuantificación de subpoblaciones CD8⁺ tras tratamiento con ácido micofenólico. Diagramas de caja que representan el porcentaje de cada subpoblación CD8⁺ sobre el total de eventos, bajo distintas condiciones experimentales con ácido micofenólico (5, 10 y 15 DFE), en presencia o ausencia de estímulo, comparadas con los controles respectivos. Las cajas muestran la mediana, el rango intercuartílico y los valores atípicos individuales. Si bien se aprecian variaciones en la distribución de algunas poblaciones, particularmente en CD8 no activadas, vírgenes y parcialmente activadas, los análisis estadísticos mediante pruebas de Kruskal-Wallis con corrección FDR y post hoc de Dunn no identificaron diferencias significativas entre grupos. Estos resultados cuantitativos son consistentes con el análisis visual previo de los UMAPs, indicando un impacto limitado del tratamiento sobre la composición relativa del compartimento CD8⁺. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.3.3.4 Rapamicina

El perfil espacial de las células CD8⁺ tras tratamiento con **rapamicina** no evidenció alteraciones marcadas respecto a sus respectivos controles. En condiciones sin estímulo, la distribución de eventos en los mapas UMAP permaneció estable a través de las tres concentraciones evaluadas, mostrando una organización celular casi indistinguible de la observada en el control no estimulado. En presencia de estímulo, los mapas correspondientes al tratamiento con rapamicina sí reflejaron una reducción en la densidad celular, aunque esta disminución fue visiblemente menos pronunciada que en el control estimulado. Esta observación sugiere que el tratamiento contribuye a preservar parcialmente la integridad del compartimento CD8⁺ frente al estímulo, sin inducir desplazamientos espaciales relevantes ni reorganizaciones fenotípicas amplias (**Figura 75**). En conjunto, los datos topográficos apuntan a un efecto atenuador de la rapamicina, sin generar un cambio drástico en la estructura global del compartimento.

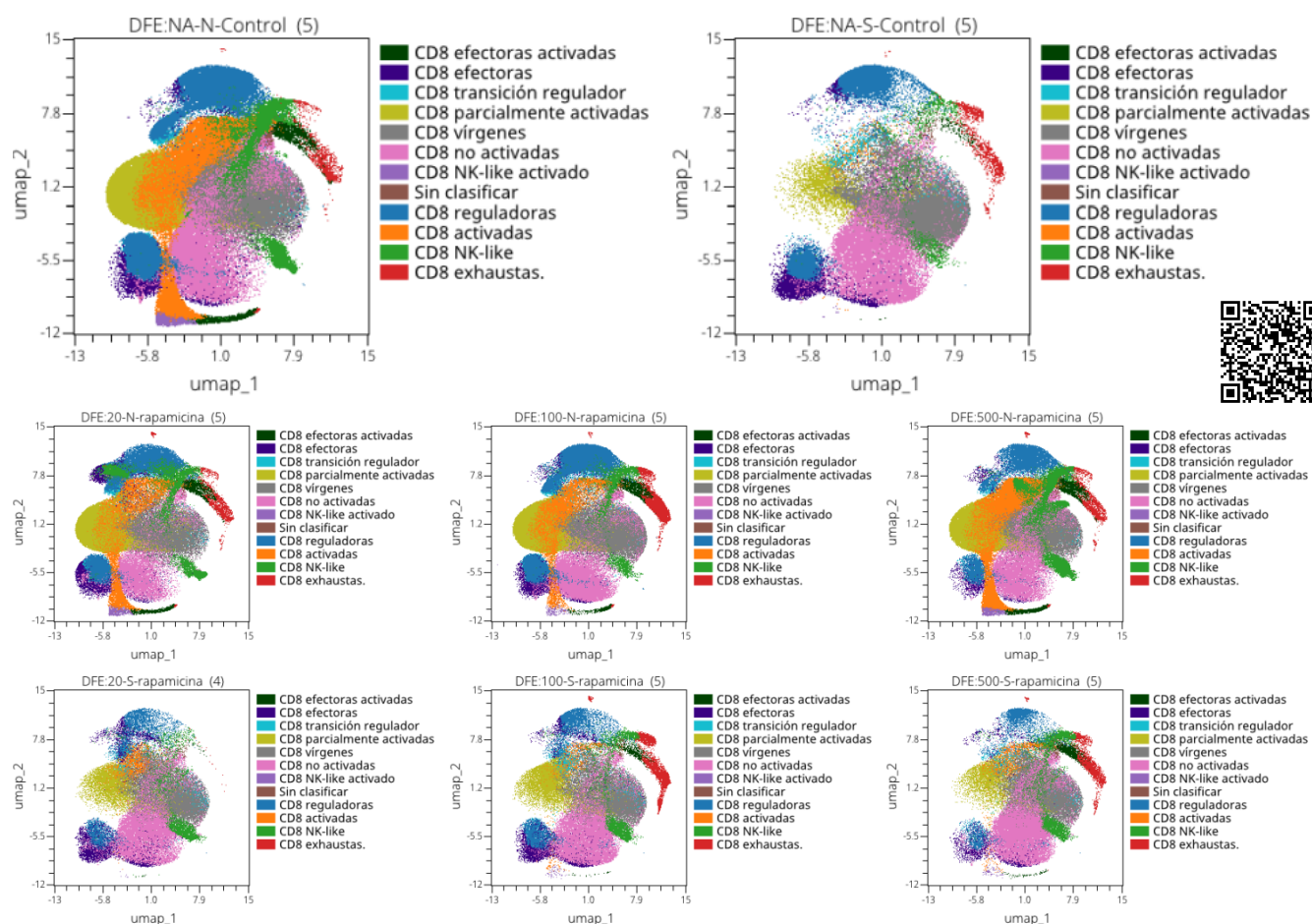


Figura 75 | Representación topológica de las subpoblaciones CD8⁺ bajo tratamiento con rapamicina a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 12 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con rapamicina a tres concentraciones (20, 100 y 500 ng/mL), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

De igual manera que la trayectoria seguida hasta el momento, aunque se observaron ciertas fluctuaciones en la frecuencia de poblaciones como CD8 efectoras, vírgenes y no activadas, estas variaciones no siguieron un patrón consistente entre dosis ni entre condiciones con y sin estímulo. La dispersión de los datos fue considerable en varias poblaciones, reflejando una alta variabilidad

interindividual. Las pruebas estadísticas aplicadas no identificaron diferencias significativas entre grupos (**Figura 76**). Por tanto, los resultados cuantitativos no evidencian un efecto marcado de rapamicina sobre la composición relativa del compartimento CD8⁺, lo que es coherente con los análisis topográficos previos, donde tampoco se observaron reorganizaciones fenotípicas destacables.

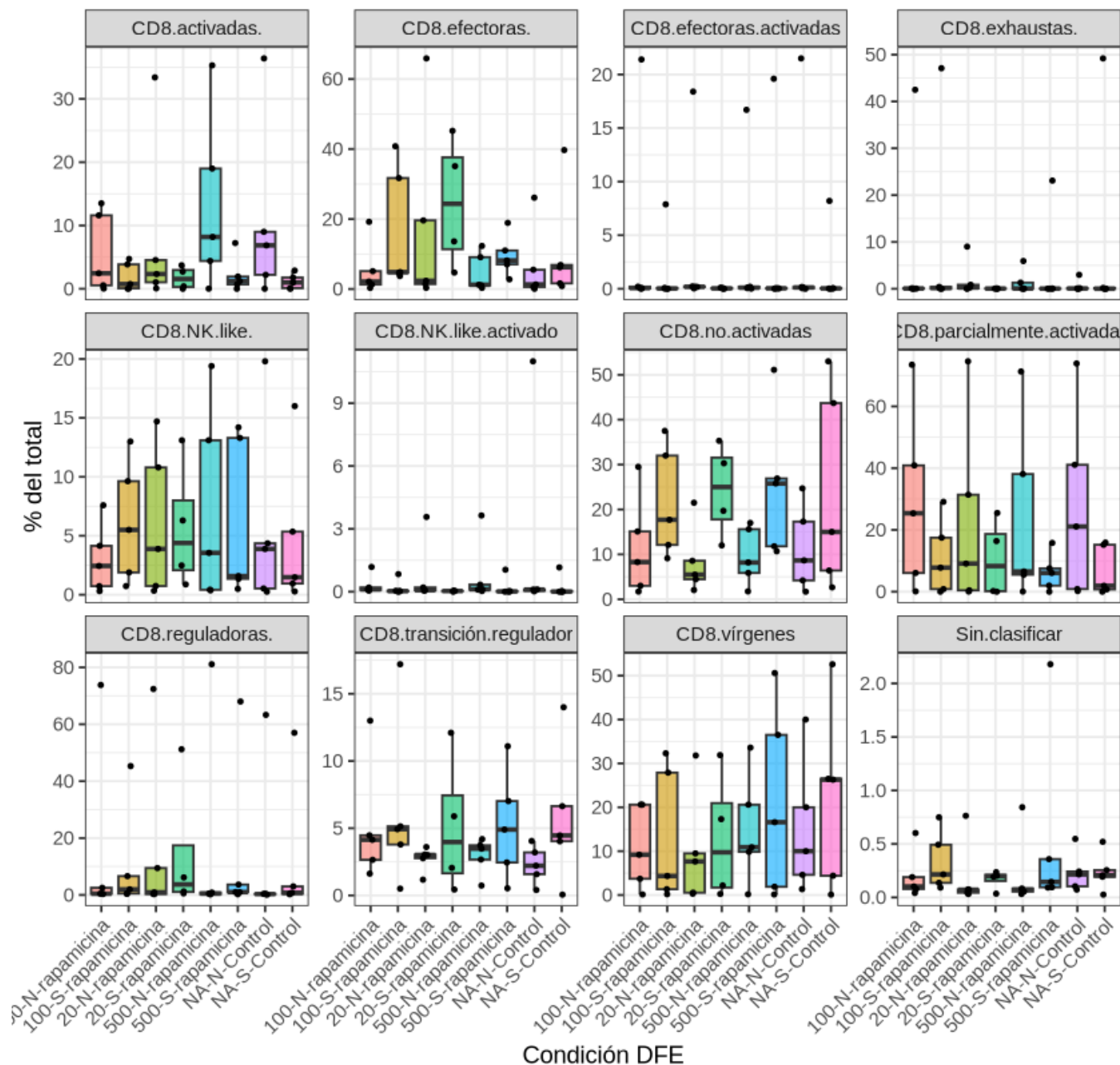


Figura 76 | Cuantificación de subpoblaciones CD8⁺ tras tratamiento con rapamicina. Diagramas de caja representando el porcentaje de cada subpoblación CD8⁺ sobre el total de eventos en las distintas condiciones experimentales con rapamicina (20, 100 y 500 DFE), tanto en ausencia como en presencia de estímulo, comparadas con sus respectivos controles. Las cajas indican la mediana, los rangos intercuartílicos y los valores atípicos individuales. Aunque se observaron variaciones en algunas poblaciones, como CD8 efectoras, vírgenes y no activadas, los análisis estadísticos (Kruskal-Wallis con corrección FDR y test post hoc de Dunn) no mostraron diferencias significativas. Estos resultados cuantitativos son congruentes con la estabilidad observada en el análisis topográfico previo, sugiriendo que rapamicina no produce cambios sustanciales en la composición proporcional del compartimento CD8⁺ bajo las condiciones evaluadas. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo.

4.3.3.3.5 Ruxolitinib

El análisis UMAP del compartimento CD8⁺ en las condiciones tratadas con **ruxolitinib** mostró un perfil topográfico notablemente estable, con **escasas diferencias visuales** respecto a sus controles correspondientes. En las condiciones sin estímulo, las distribuciones celulares bajo ruxolitinib (0.1, 0.3 y 1 DFE) fueron prácticamente **indistinguibles del control no estimulado**, manteniendo una densidad y organización espacial coherentes (**Figura 77**). De igual forma, en presencia de estímulo, los mapas asociados al tratamiento tampoco mostraron una recuperación evidente de la pérdida de densidad observada en el control estimulado, ni una redistribución fenotípica destacable. En conjunto, los datos topográficos sugieren que, en las concentraciones evaluadas, **ruxolitinib no ejerce un efecto detectable sobre la estructura ni la composición espacial del compartimento CD8⁺**, al menos bajo condiciones *in vitro* en este modelo experimental.

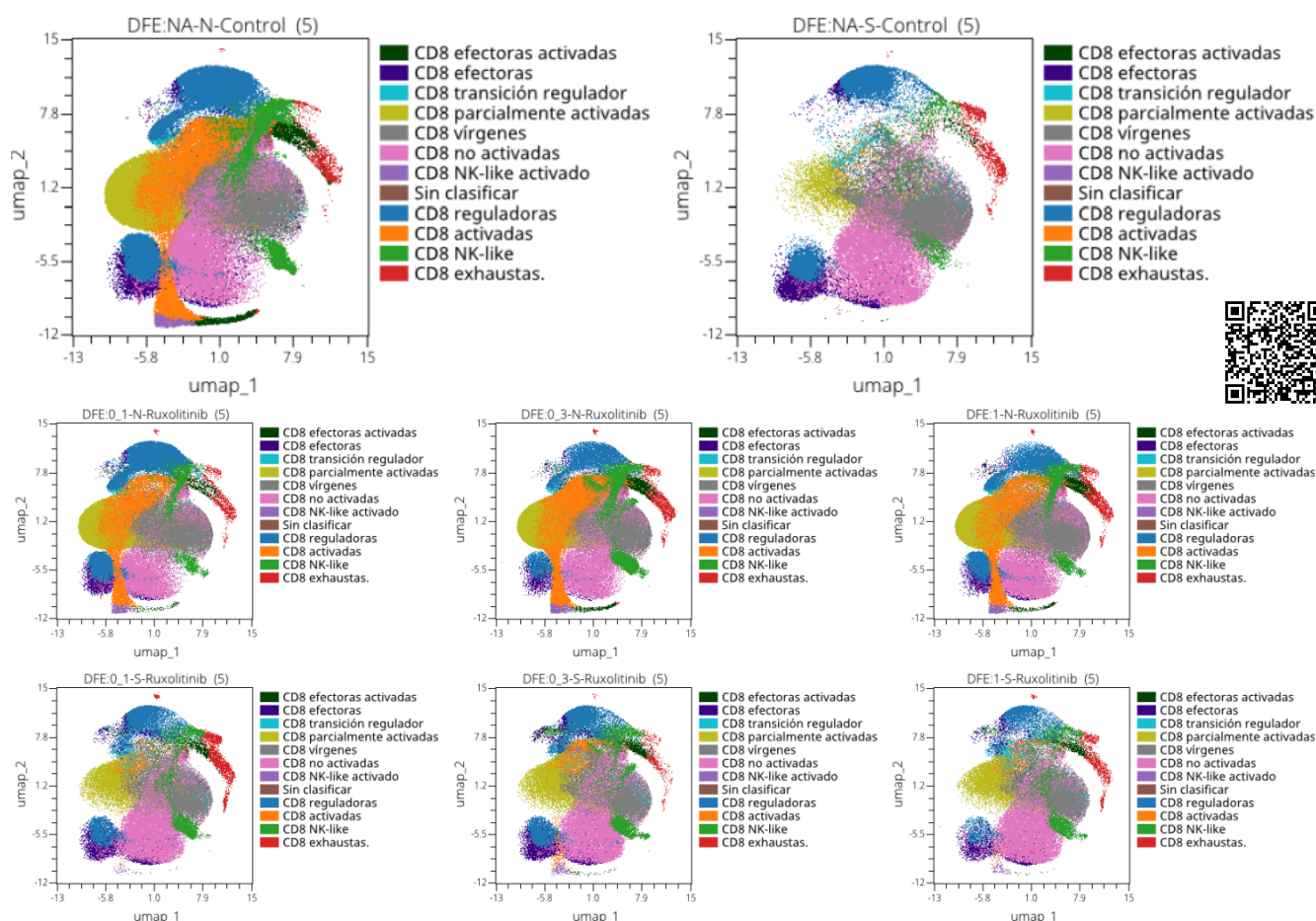
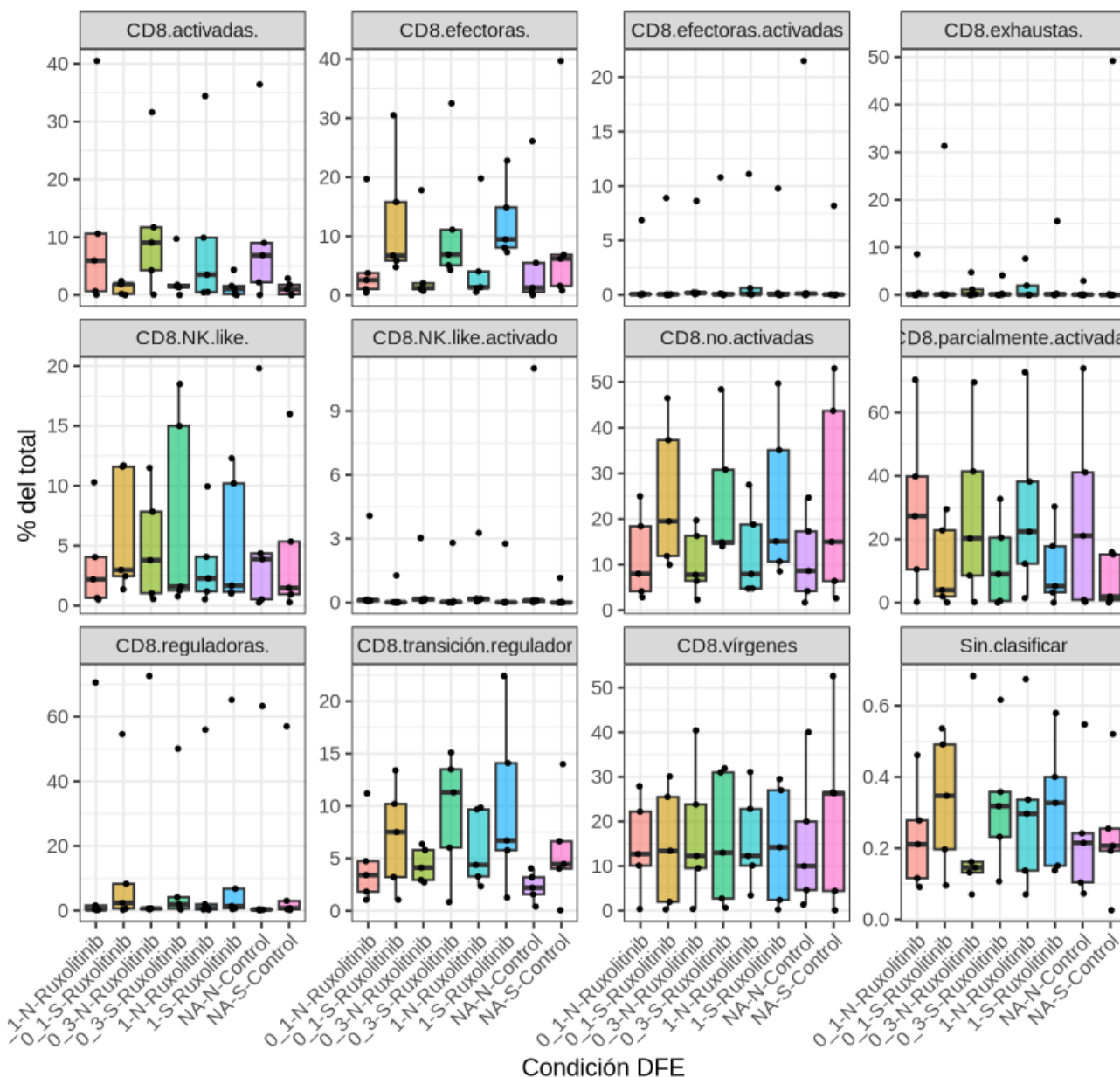


Figura 77 | Representación topológica de las subpoblaciones CD8⁺ bajo tratamiento con ruxolitinib a diferentes concentraciones. Mapas UMAP que muestran la distribución de 12 clústeres inmunofenotípicos definidos previamente, en condiciones de control (sin fármaco, con y sin estímulo) y tras tratamiento con ruxolitinib a tres concentraciones (0.1, 0.3 y 1 μ M), tanto en reposo (N) como bajo estimulación con PMA/ionomicina (S). Cada punto representa un evento individual y cada color corresponde a una subpoblación específica identificada por su perfil de expresión. DFE: Dosis-Fármaco-Estímulo. Escanear QR.

La cuantificación de las subpoblaciones CD8⁺ bajo tratamiento con ruxolitinib mostró una distribución porcentual amplia y heterogénea, sin patrones claramente definidos entre dosis ni entre condiciones con o sin estímulo. Si bien algunas poblaciones, como CD8 efectoras, vírgenes y no activadas, presentaron cierta dispersión en los valores, esta variabilidad fue compartida por los controles, y no se identificaron desplazamientos proporcionales consistentes atribuibles al tratamiento. En general, las medianas

de las frecuencias relativas para cada subpoblación se mantuvieron dentro de rangos similares entre condiciones, y la ausencia de tendencias direccionales refuerza la impresión de estabilidad observada previamente en el análisis topográfico (**Figura 78**). Estos resultados cuantitativos respaldan la interpretación de que, en las condiciones evaluadas, ruxolitinib no induce una modificación sustancial en la composición relativa del compartimento CD8⁺.



4.3.4 Impacto sobre células Tr1

Debido a la disponibilidad limitada de marcadores específicos para identificar células T reguladoras tipo 1 (Tr1), se optó por una estrategia alternativa basada en reducción dimensional. En lugar del enfoque UMAP aplicado previamente, se utilizó un **análisis de componentes principales (PCA)**, dada su idoneidad para estructuras con menor complejidad fenotípica y con el objetivo de preservar la variabilidad explicada de forma lineal. El resultado de esta transformación se muestra en la **Figura 79a**, donde los eventos celulares de los 160 archivos fueron proyectados en el espacio PCA, permitiendo visualizar la densidad global del compartimento.

Posteriormente, sobre el espacio PCA reducido, se implementó un **gating manual** dirigido, utilizando como criterio el patrón de expresión de los marcadores clave disponibles: **FoxP3**, **CD49b** y **LAG-3**. En el panel central, se identificó una subpoblación **FoxP3⁻CD49b⁺** (**Figura 79b**). A continuación, en el panel derecho, se refinó aún más esta población en función de la coexpresión de **LAG-3** y la exclusión de **FoxP3**, obteniéndose el fenotipo Tr1 clásico (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻CD49b⁺LAG-3⁺) (**Figura 79c**).

En conjunto, esta estrategia combinada de reducción dimensional y gating manual permitió abordar la identificación de células Tr1 a pesar de la limitación de marcadores disponibles para su análisis funcional posterior.

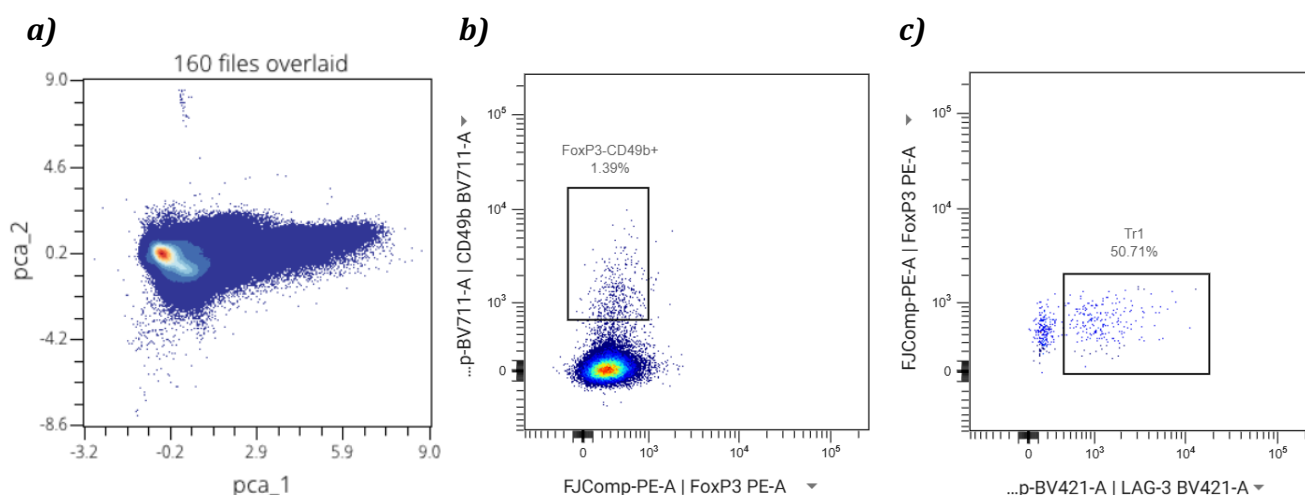


Figura 79 | Estrategia de identificación de células T reguladoras tipo 1 (Tr1) mediante reducción dimensional y gating manual. **a)** Representación de los eventos celulares en el espacio PCA tras la reducción dimensional aplicada sobre datos previamente procesados por UMAP, con 160 archivos superpuestos. **b)** Aplicación de un gating manual sobre la población FoxP3⁻CD49b⁺, seleccionada como población candidata Tr1 inicial (1.39 % del total). **c)** Refinamiento posterior de la subpoblación Tr1 mediante coexpresión de LAG-3 y exclusión de FoxP3, resultando en un 50.71 % de eventos positivos dentro del gate. Esta estrategia permitió la identificación de células con fenotipo compatible con Tr1 (FoxP3⁻CD49b⁺LAG-3⁺), compensando la falta de marcadores clásicos CD3⁺CD4⁺ en esta adquisición.

4.3.4.1 Cuantificación del impacto inmunofenotípico por fármaco

Tras la identificación fenotípica de la población Tr1, se cuantificó su frecuencia relativa (% del total) en cada condición experimental. Los diagramas de caja revelan una alta dispersión en los valores individuales dentro de varios grupos, particularmente en las condiciones tratadas con tacrolimus, ruxolitinib y micofenolato, donde se observaron valores máximos aislados considerablemente elevados. No obstante, en términos globales, la mayoría de las condiciones mostraron frecuencias bajas y sin una tendencia clara asociada al tipo de fármaco o dosis utilizada. Cabe destacar que, en el control estimulado (NA-S-Control), la proporción de Tr1 fue consistentemente baja, mientras que el control no estimulado presentó una mayor variabilidad. A pesar de estas fluctuaciones, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos experimentales, lo que sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, ninguno de los tratamientos induce de forma consistente una expansión de la población Tr1 (**Figura 80**).

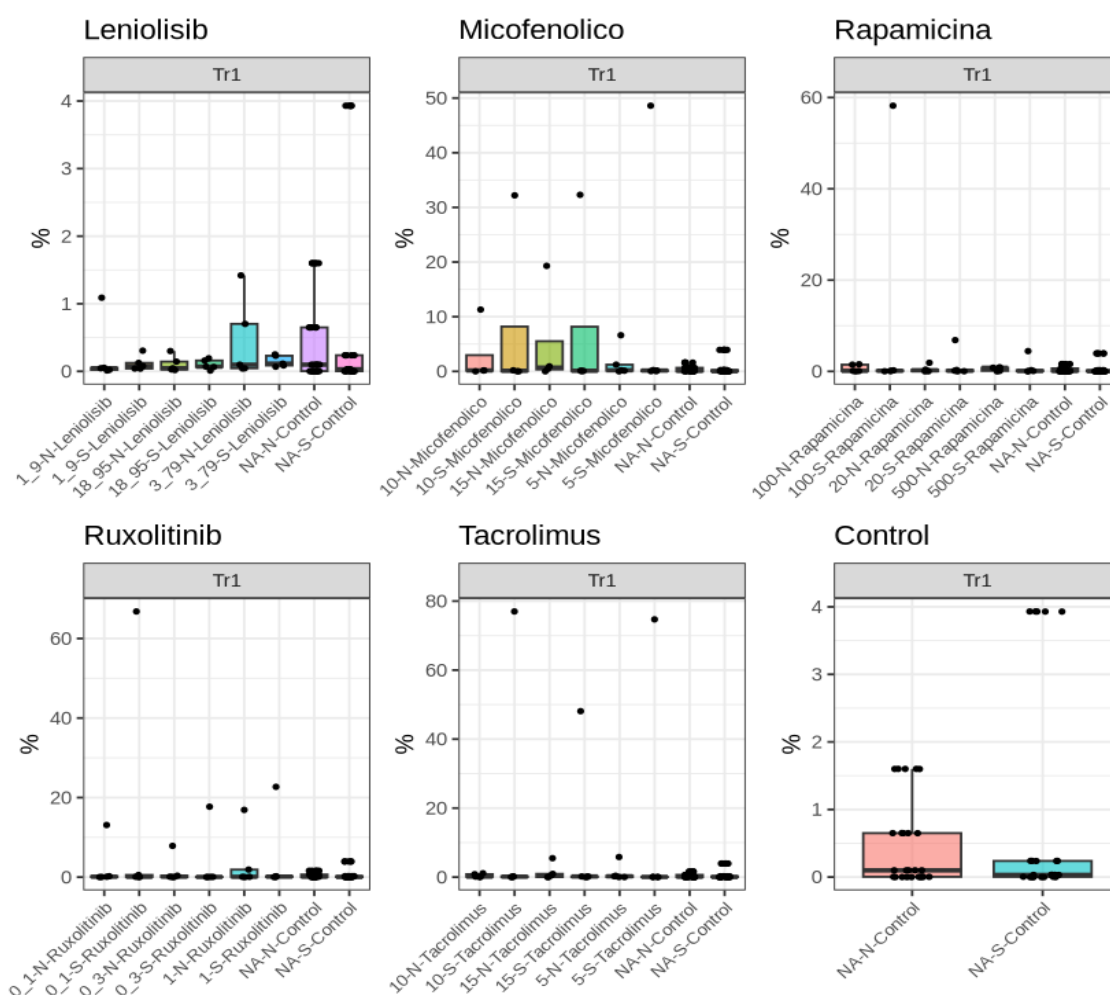


Figura 80 | Cuantificación de células T reguladoras tipo 1 (Tr1) en condiciones control y tras tratamiento con inmunomoduladores. Diagramas de caja que representan la frecuencia relativa (%) de células Tr1 identificadas como FoxP3⁺CD49b⁺LAG-3⁺ en cada condición experimental. Aunque se observaron valores máximos elevados en algunas muestras individuales tratadas, especialmente con tacrolimus, ruxolitinib y micofenolato, la mayoría de las condiciones mostraron frecuencias bajas y sin diferencias significativas.

En este capítulo se abordó la caracterización inmunofenotípica de los principales subtipos de células T reguladoras (incluyendo CD4⁺, CD8⁺ y Tr1) bajo condiciones de estímulo y tratamiento con diferentes agentes inmunomoduladores. A través de técnicas de reducción dimensional (UMAP y PCA), clusterización no supervisada y análisis cuantitativo de frecuencias celulares, se evaluó de forma integrada el impacto de **leniolisib**, **tacrolimus**, **ácido micofenólico**, **rapamicina** y **ruxolitinib** sobre el perfil funcional y estructural del compartimento T.

En el compartimento **CD4⁺**, la estrategia de agrupamiento permitió identificar subconjuntos relevantes como células activadas, reguladoras naturales (nTreg), y células T parcialmente exhaustas. Estas poblaciones fueron posteriormente consolidadas en categorías funcionales mayores, observándose una respuesta heterogénea a los distintos tratamientos. Si bien algunas condiciones mostraron patrones topográficos diferenciados, las cuantificaciones no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción relativa de los subconjuntos.

En cuanto a las células **CD8⁺**, el análisis UMAP evidenció una reorganización espacial dependiente del estímulo, con pérdida de densidad celular en las condiciones estimuladas. Leniolisib y rapamicina lograron preservar parcialmente dicha densidad, mientras que ácido micofenólico y ruxolitinib mostraron perfiles más neutros. Al igual que en CD4⁺, los resultados cuantitativos no demostraron cambios estadísticamente significativos entre grupos, aunque se identificaron algunas tendencias biológicamente relevantes, como la estabilidad de las poblaciones vírgenes y no activadas bajo ciertos tratamientos.

Finalmente, para el análisis de las células **Tr1** se implementó una estrategia alternativa basada en reducción PCA y gating manual. Aunque se observaron muestras individuales con proporciones elevadas en algunas condiciones (particularmente con tacrolimus y ruxolitinib), la alta variabilidad interindividual impidió alcanzar significación estadística. En conjunto, no se evidenció una expansión consistente de esta población bajo ninguno de los tratamientos evaluados.

En resumen, los resultados obtenidos indican que, aunque algunos inmunomoduladores inducen cambios topográficos o tendencias funcionales discretas en el compartimento T, **no se observan alteraciones robustas ni consistentes a nivel cuantitativo**. Estos hallazgos destacan la importancia de combinar enfoques visuales y estadísticos en el estudio inmunológico, y ofrecen una base sólida para futuros análisis funcionales o longitudinales.

4.4 Exploración del uso de un kit comercial para el estudio molecular PIRD

Con el objetivo de valorar la aplicabilidad de un kit multiplexado de cuantificación fosfoproteica en muestras clínicas de PBMCs, se analizaron datos normalizados frente a GAPDH para diez proteínas señalizadoras clave, incluyendo ERK1/2, AKT, STAT3, NFκB, JNK y otras, en múltiples condiciones experimentales de control y tratamiento. Los resultados se interpretaron sobre una escala logarítmica de expresión relativa (\log_{10}) y se complementaron con la estimación del coeficiente de variación (CV) como métrica de dispersión intra-condición. La evaluación del kit multiplexado de detección de fosfo-proteínas sobre PBMCs humanas se abordó mediante un enfoque dual: primero, caracterizando cuantitativamente la respuesta inmunológica en distintos contextos celulares, y posteriormente comparando dichos resultados con los perfiles de activación esperados según los controles estándar proporcionados por el fabricante. Esta estrategia permitió no solo validar la sensibilidad y especificidad del ensayo, sino también explorar su aplicabilidad real sobre muestras valiosas y biológicamente complejas como las obtenidas de pacientes con PIRD.

4.4.1 Concordancia de los controles

En primer lugar, los controles celulares incluidos por el proveedor (**A431 + EGF**, **HeLa + TNFα/Cal A** y **MCF7 + IGF1**) mostraron patrones de activación altamente definidos y diferenciales entre vías de señalización, actuando como referencia para la interpretación biológica. La estimulación con EGF en A431 provocó una activación masiva de ERK1/2, seguida por AKT, STAT3/5 y p70S6K, reflejando una activación robusta del eje EGFR–MAPK–mTOR. De forma análoga, la coestimulación con TNFα y caliculina A en HeLa indujo preferentemente las rutas asociadas a NFκB, p38 y CREB. Finalmente, la exposición de células MCF7 a IGF1 reprodujo la activación conjunta de ERK1/2, AKT y p70S6K, tal como señala la ficha técnica.

Esta correspondencia entre datos propios y perfiles esperados constituye un sólido indicador de la **especificidad del kit**, ya que los patrones de activación observados fueron tanto cualitativa como cuantitativamente coherentes.

4.4.2 Aplicación sobre PBMCs humanas: sensibilidad y reproducibilidad

Una vez validado el sistema frente a estándares de fabricación, se aplicó el protocolo a PBMCs humanas, tanto frescas como congeladas, para evaluar su sensibilidad real frente a muestras clínicas. La cuantificación normalizada por GAPDH reveló perfiles fenotípicos consistentes, con señales detectables incluso en condiciones basales para proteínas clave como ERK1/2, AKT y STAT3 (**Figura 81**). El coeficiente

de variación (CV) intra-condición fue inferior al 15 % en estos marcadores, lo que evidencia una **reproducibilidad técnica adecuada**. En cambio, proteínas con baja abundancia, como NFκB y JNK, mostraron una mayor dispersión (>30 % de CV), y otras con mucho ruido de fondo (CREB, p70S6K) lo cual apunta a la necesidad de mayor input proteico o réplicas adicionales en futuras aplicaciones clínicas.

Destaca especialmente que la **estructura de señalización en PBMCs congeladas se preservó parcialmente**, aunque con una disminución promedio del 20–40 % en varios marcadores frente a las células frescas. Este dato es crítico para la viabilidad del kit en entornos clínicos reales, donde las muestras suelen almacenarse en biobancos.

4.4.3 Rango dinámico y límites de detección

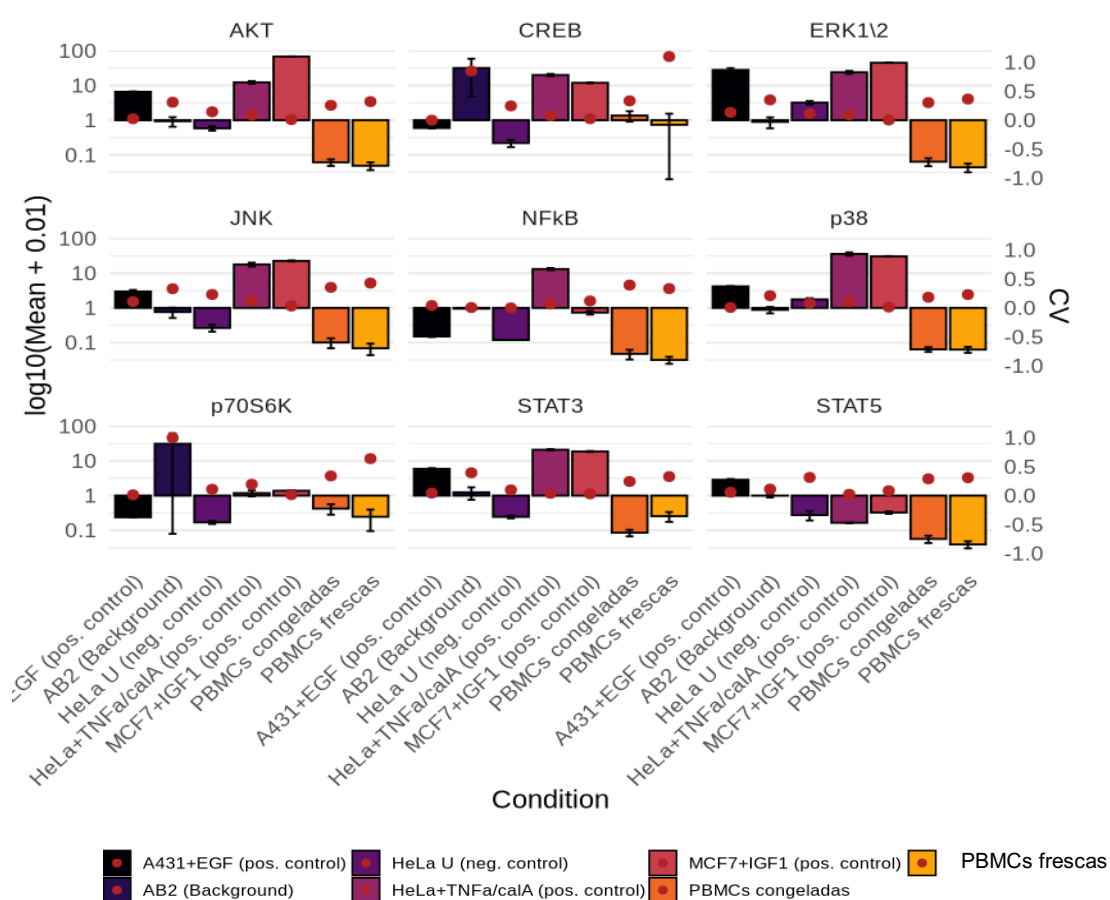


Figura 81 | Niveles de fosfo-proteínas normalizados por GAPDH en líneas celulares control y PBMCs humanas bajo distintas condiciones. Distribución de 10 fosfo-proteínas intracelulares evaluadas en lisados celulares mediante análisis multiplexado, normalizadas respecto a GAPDH y representadas en escala logarítmica ($\log_{10}[\text{media} + 0.01]$). Se incluyen controles positivos (A431 + EGF, HeLa + TNFα/Caliculina A, MCF7 + IGF1), controles negativos (HeLa U) y fondo instrumental (AB2). Las condiciones experimentales de interés (PBMCs frescas y congeladas) muestran un perfil cualitativamente similar entre sí, aunque con reducción de señal entre un 10–40 % en muestras criopreservadas, especialmente en ERK1/2, STAT3 y CREB. Los puntos rojos representan el coeficiente de variación (CV, eje derecho) para cada condición, destacando una baja variabilidad intra-grupo (CV < 15 %) en dianas con señal alta como AKT, ERK y STAT3, y mayor dispersión (CV > 30 %) en marcadores de baja intensidad como NFκB y JNK. Estos resultados reflejan una sensibilidad adecuada del kit para detectar activación basal en PBMCs, incluso sin estimulación, y apoyan su aplicabilidad en muestras clínicas biobancadas.

La capacidad del kit para detectar cambios superiores a 2 veces el valor basal quedó demostrada en múltiples contextos, especialmente en los controles A431 + EGF y MCF7 + IGF1, donde la señal de ERK1/2 superó en más de un orden de magnitud a los controles negativos (**Figura 81**). Además, la señal de fondo permaneció consistentemente baja exceptuando proteínas concretas, permitiendo detectar señales fisiológicamente relevantes (~0.3–0.6 unidades normalizadas) por encima del umbral mínimo (~0.05). Esto confirma que el sistema posee un rango dinámico amplio y un **límite de detección suficiente para estudios con PBMCs no estimuladas**, sin necesidad de manipulación exógena adicional.

Los resultados experimentales, en estrecha concordancia con los perfiles esperados por el fabricante, validan la **utilidad del kit para el análisis multiplexado de fosfo-señalización en PBMCs humanas**, incluyendo muestras congeladas. La buena reproducibilidad en targets de señal media-alta, la baja reactividad de fondo y la capacidad de detección sobre múltiples vías intracelulares posicionan esta plataforma como una herramienta robusta para estudios mecanísticos o de biomarcadores en cohortes clínicas, como la de pacientes con PIRD.

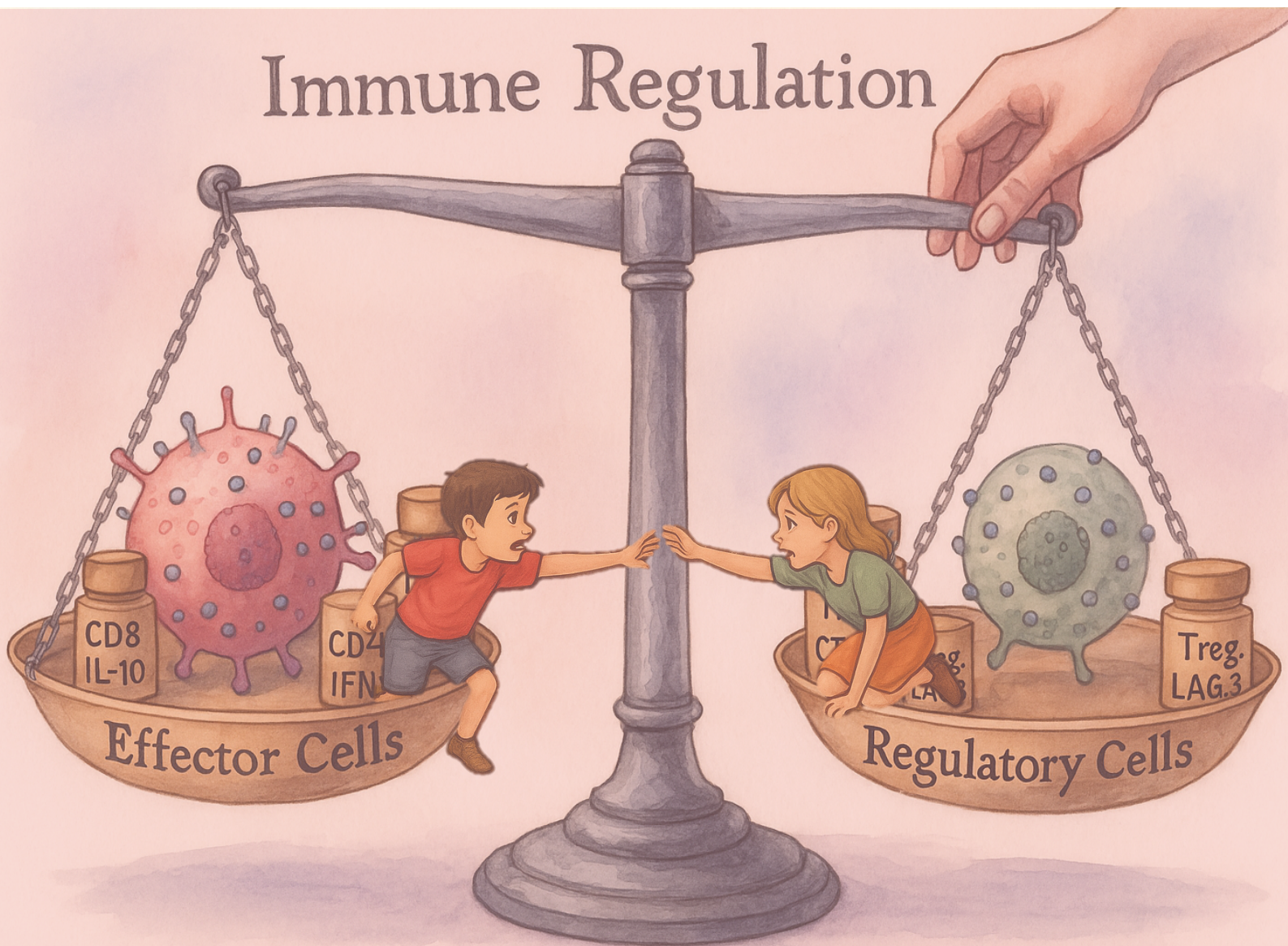
5.

DISCUSIÓN

“La investigación científica es un camino lleno de errores, pero también de hallazgos inesperados.”

— Vera Rubin

Immune Regulation



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

5. Discusión

El presente trabajo se plantea como una exploración multidimensional de los mecanismos inmunopatológicos subyacentes a los síndromes de desregulación inmunitaria en pacientes pediátricos con PIRD. A través de una aproximación clínico-genética e inmunofenotípica exhaustiva, la tesis busca dar respuesta a varias preguntas fundamentales que hasta ahora han permanecido parcialmente sin resolver en el ámbito de la inmunología pediátrica. ¿Qué alteraciones inmunológicas son características y recurrentes en pacientes pediátricos con EII y desregulación inmune más allá de su presentación clínica inicial? ¿Cómo se define funcional y fenotípicamente el compartimento regulador, especialmente las células Treg, en estos contextos? ¿En qué medida las terapias inmunomoduladoras actualmente utilizadas logran restablecer el equilibrio funcional del sistema inmune, y cómo puede evaluarse su impacto de forma objetiva y cuantificable? ¿Es posible cuantificar bioquímicamente la disfunción inmunológica en EII mediante la detección de vías de señalización activadas sin necesidad de estimulación exógena, con potencial valor diagnóstico? Por último, ¿puede el uso de herramientas bioinformáticas avanzadas (como la reducción dimensional, la clusterización no supervisada o la integración clínica) proporcionar un marco más potente que los análisis convencionales para estratificar pacientes, descubrir biomarcadores funcionales y guiar decisiones terapéuticas personalizadas? Estas interrogantes constituyen el eje de la discusión, que integra datos clínicos, genéticos, inmunológicos y funcionales bajo una perspectiva de medicina de precisión.

5.1 PIRD pediátrico: una constelación clínica dominada por autoinmunidad, linfoproliferación y bases genéticas definidas

El presente estudio representa **una de las caracterizaciones clínico-genéticas más completas** en una cohorte pediátrica PIRD, revelando una elevada prevalencia de fenotipos autoinmunes y linfoproliferativos, además de una base genética significativa en la mitad de los pacientes, y en el 100% de aquellos con antecedentes familiares (263–265). La diversidad étnica y clínica refleja la heterogeneidad de estas entidades (264,266). La distribución de mutaciones, particularmente en genes de las vías NF- κ B, FAS/FASL y PI3K, es coherente con los mecanismos inmunopatogénicos descritos en la literatura, donde se reconoce su papel en la homeostasis linfocitaria, la tolerancia periférica y la regulación de la muerte celular programada (264,267,268). Además, otros genes implicados como STAT3, AIRE y LRBA, refuerzan la complejidad molecular de estas enfermedades, tal como lo documentan estudios recientes que destacan el valor de la secuenciación de exoma como primera línea diagnóstica en pacientes con fenotipos autoinmunes

tempranos y atípicos (196,268). Esta aproximación diagnóstica permite una mayor precisión clínica, un enfoque terapéutico más dirigido y una mejor estratificación pronóstica (264).

Desde el punto de vista clínico, la alta prevalencia de autoinmunidad (80,4%) y linfoproliferación (68,6%) confirma su rol como ejes fundamentales del fenotipo PIRD (146,172,196). Las citopenias autoinmunes, especialmente la trombocitopenia inmune, fueron la manifestación más común, coincidiendo con series que reportan este fenotipo como indicativo de patologías como ALPS, IPEX o deficiencias en CTLA-4 (196,269). La co-ocurrencia de citopenias y linfoproliferación en más de la mitad de la cohorte (fenotipo ALPID) resalta su relevancia como marcador clínico de sospecha (172,196). Aunque menos frecuentes, también se documentaron manifestaciones como enfermedad granulomatosa, enteropatías inflamatorias y dermatitis grave, que en otros trabajos se han vinculado a defectos en vías de IL-10, LRBA o STAT3 (172,196,268,270). Estas manifestaciones confirman la amplitud del espectro inflamatorio asociado a PIRD. Al momento de la inclusión (T0), el 84,3% de los pacientes ya mostraban clínica activa, lo que pone de manifiesto la carga de enfermedad previa al diagnóstico molecular, subrayando la necesidad de criterios clínicos más refinados que orienten hacia estudios genéticos tempranos.

Finalmente, el perfil terapéutico revela una tendencia generalizada al uso empírico de inmunomoduladores e inmunosupresores antes de contar con un diagnóstico molecular. El 92,2% de los pacientes habían recibido tratamiento, y un 60,8% fue tratado con múltiples líneas, lo cual coincide con otros estudios que documentan el uso amplio de estas terapias en EII con fenotipos inflamatorios (149,269). Esta estrategia refleja la necesidad clínica de contener los síntomas, pero también expone al paciente a toxicidades acumulativas y a tratamientos subóptimos en ausencia de un enfoque dirigido. La implementación de terapias personalizadas basadas en la alteración molecular subyacente (como inhibidores de mTOR, bloqueadores de JAK/STAT o anticuerpos monoclonales) está emergiendo como una necesidad urgente en el manejo de estos pacientes. En suma, los datos de esta cohorte respaldan el paradigma actual que aboga por una medicina de precisión en inmunología pediátrica, capaz de traducir el conocimiento genético en decisiones terapéuticas eficaces y seguras (146,149,269).

5.2 Heterogeneidad inmunológica en pacientes pediátricos PIRD

5.2.1 Análisis multivariante y descubrimiento de subgrupos inmunofenotípicos

La observación inicial de una separación de individuos en el espacio UMAP asociada a la procedencia geográfica, más que al estado inmunopatológico, es un fenómeno metodológicamente relevante. Este tipo de efectos de lote son ampliamente reconocidos en la literatura de citometría de alta dimensión y

transcriptómica, y su no corrección puede llevar a interpretaciones erróneas de diferencias inmunológicas aparentes que, en realidad, reflejan variabilidad técnica más que biológica (271,272). La implementación del algoritmo ComBat, cuya eficacia en el control de la variabilidad técnica ha sido validada tanto en datasets transcriptómicos como en citometría masiva (273), permitió recuperar la señal inmunológica subyacente y desenmascarar patrones latentes potencialmente biológicamente significativos.

Una vez corregido el efecto de lote, la distribución heterogénea de los pacientes frente a la relativa homogeneidad de los controles en el espacio UMAP adquiere relevancia inmunológica. Esta dispersión no debe interpretarse como una falta de patrón, sino como una representación fiel de la diversidad funcional del sistema inmunológico en el contexto de defectos primarios en su regulación. Los controles inmunológicamente sanos tienden a ocupar un espacio más compacto en este tipo de análisis multivariantes, como se ha documentado previamente en estudios de exploración inmunológica (274). Por el contrario, la variabilidad en los pacientes refleja diferencias profundas en las trayectorias de diferenciación linfocitaria, en los estados de activación crónica, y en las consecuencias fenotípicas de defectos moleculares diversos que convergen clínicamente bajo el paraguas del PIRD (146,270).

El hallazgo de tres subgrupos inmunofenotípicos claramente separados entre los pacientes aporta evidencia de la existencia de subfenotipos funcionales dentro del síndrome clínico PIRD. Esta idea es coherente con estudios recientes que han propuesto que entidades como CVID, ALPS o deficiencias en CTLA-4 o LRBA no son homogéneas, sino que constituyen espectros funcionales con patrones inmunológicos específicos, dependientes del tipo celular más afectado, del grado de activación basal, o de la respuesta a señales de coestimulación e inhibición (196,263,275). En este contexto, los agrupamientos observados en el espacio UMAP corregido no son meros artefactos estadísticos, sino representaciones condensadas de una biología real, donde cada cluster podría estar determinado por la disfunción preferencial de diferentes subtipos inmunológicos. De hecho, la aparición de agrupamientos inmunológicos diferenciados sin haber utilizado a priori información genética, clínica ni terapéutica, sugiere que el inmunofenotipado multivariable puede actuar como marcador independiente y complementario para la estratificación de pacientes.

La exploración visual de los perfiles inmunológicos promedio mediante mapas de calor reveló diferencias sustanciales entre los tres subgrupos de pacientes identificados por K-means y el grupo control, sugiriendo la existencia de patrones inmunofenotípicos distintivos. Estas diferencias trascienden la mera variación cuantitativa y parecen reflejar diferencias cualitativas en el equilibrio funcional del sistema inmunológico, en línea con lo que se ha reportado previamente en cohortes PIRD, donde los perfiles de activación y diferenciación linfocitaria presentan heterogeneidad funcional más allá del defecto genético subyacente (276). La clara segregación del grupo control con un patrón más homogéneo y valores bajos en muchas de las variables estudiadas es coherente con un sistema inmunológico funcionalmente equilibrado, como se ha descrito en atlas inmunológicos poblacionales de referencia (276,277). En contraste, los clusters

de pacientes exhiben un enriquecimiento diferencial en poblaciones activadas o de memoria, lo que puede reflejar tanto la persistencia de estímulos inmunológicos como una remodelación patológica del compartimento linfocitario.

En particular, el análisis focalizado sobre poblaciones inmunorreguladoras permitió profundizar en la disfunción del brazo supresor del sistema inmune. El hallazgo de una expansión de estas subpoblaciones en algunos grupos, frente a su relativa escasez en otros, apunta hacia mecanismos compensatorios diferenciales ante la disregulación inmunitaria. En algunos pacientes, esta expansión puede reflejar una activación funcional en respuesta a un ambiente inflamatorio crónico, mientras que en otros podría denotar una insuficiencia reguladora primaria, como se ha descrito en algunas patologías (278,279). Este hallazgo resulta especialmente relevante si consideramos que los defectos en la regulación inmunológica no siempre se traducen en una deficiencia cuantitativa de Tregs, sino más bien en una alteración cualitativa de su funcionalidad, como han demostrado estudios funcionales en enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias (280–282). La variabilidad observada entre clusters sugiere, por tanto, que existen trayectorias disfuncionales distintas dentro del mismo espectro clínico, lo que refuerza el concepto de que el PIRD no es una entidad monolítica, sino un conjunto de síndromes inmunorregulatorios heterogéneos.

La integración del modelo Random Forest, una herramienta robusta de aprendizaje automático, permitió jerarquizar las variables inmunológicas en función de su capacidad discriminativa entre grupos. La abundancia de subconjuntos CD4+ (naive, memoria central y efectora, RTE) y CD8+ naive no es sorprendente, dado el papel central de los linfocitos T en la orquestación de la respuesta inmune y su disfunción en múltiples PIRD. La presencia destacada de poblaciones como NK CD56+CD16+, eosinófilos y monocitos clásicos refuerza la noción de que la disfunción en PIRD abarca tanto la inmunidad adaptativa como la innata. La validación estadística posterior mediante test de Kruskal-Wallis y Dunn, corregidos por FDR, confirmó diferencias significativas entre los subgrupos en marcadores clave. Por ejemplo, la expansión de CD4+ CM y EM, junto con la reducción de CD4+ RTE en el Cluster 1, puede interpretarse como un fenotipo asociado a activación persistente y pérdida de renovación tímica, lo cual es característico de estados inflamatorios crónicos o de envejecimiento inmunológico acelerado (279,283,284). De forma análoga, la reducción de NK CD56+CD16+ en el Cluster 2 sugiere una disfunción citotóxica natural, lo cual puede asociarse con una mayor susceptibilidad a infecciones virales o a fenómenos autoinflamatorios (285,286).

5.2.2 Disfunción del eje inmunoregulator: una lectura desde las Tregs

El análisis detallado de la funcionalidad inmunorreguladora en pacientes con PIRD revela una profunda disrupción en los ejes clásicos de control inmune mediados por células Tregs y otras subpoblaciones T efectoras con funciones supresoras. A diferencia del patrón coordinado y robusto observado en controles sanos (caracterizado por la coexpresión funcional de CTLA-4, TIGIT, LAP e IL-10), los pacientes presentan

una red funcional fragmentada, con algunos ejes preservados pero una notable pérdida de conectividad entre componentes clave. Este patrón sugiere que, si bien ciertos mecanismos de regulación intentan activarse en contexto patológico, lo hacen de forma disfuncional o ineficaz, lo cual ha sido previamente descrito en inmunopatologías asociadas a mutaciones en genes como FOXP3, LRBA o STAT3, donde la expresión de marcadores como CTLA-4 o IL-10 no se traduce necesariamente en supresión efectiva (287–289).

La sobreexpresión de moléculas como CTLA-4, PD-1, TIGIT y LAP en células Treg y linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de los pacientes, en comparación con los controles, refleja probablemente una activación compensatoria secundaria a una inflamación sistémica sostenida. Este tipo de sobreexpresión ha sido interpretado en diversos contextos, como el lupus o la enfermedad inflamatoria intestinal, no como un indicio de tolerancia activa, sino como un marcador de agotamiento funcional o de una expansión de Tregs ineficaces (290). Es particularmente relevante la disociación observada entre niveles altos de expresión de estos marcadores y la pérdida de correlación funcional en las redes, lo que indica que la inmunorregulación en estos pacientes puede estar presente a nivel fenotípico pero descoordinada a nivel sistémico. Este fenómeno se alinea con modelos experimentales en los que se ha mostrado que Tregs bajo condiciones proinflamatorias crónicas pueden adoptar perfiles plásticos no supresores, o incluso convertirse en productores de citoquinas (291).

La división de los pacientes en dos clústeres funcionales distintos, basada en marcadores como CD4.IL-10, CD8.CTLA-4 y Treg_TIGIT, proporciona una capa adicional de estratificación biológica con potencial clínico. El Cluster 1, con mayor expresión de PD-1 y CTLA-4, podría representar un fenotipo funcionalmente más "exhausto", donde la sobreestimulación antigénica ha inducido un estado de tolerancia disfuncional, análogo al observado en enfermedades autoinmunes refractarias o en cáncer (292,293). Por su parte, el Cluster 2, caracterizado por niveles elevados de IL-10 y LAP en múltiples subconjuntos T, sugiere una activación más efectiva (aunque posiblemente insuficiente) de mecanismos de supresión inmunológica, con un perfil cercano a fenotipos tolerogénicos descritos en modelos de exposición antigénica crónica sin inflamación (294,295). Esta distinción funcional entre los subgrupos es crucial, ya que podría correlacionarse con respuestas diferenciales a tratamientos inmunomoduladores como inhibidores de checkpoint, inmunoglobulinas intravenosas o terapia celular con Tregs *ex vivo* (296,297).

Finalmente, la observación de que las células CD8⁺ reguladoras (CD8.CTLA-4) están significativamente reducidas en pacientes (especialmente en el Cluster 2) refuerza una visión integradora en la que **la inmunorregulación efectiva depende no sólo de Tregs clásicas sino de una red compartida de linfocitos reguladores CD4⁺ y CD8⁺**. La pérdida de esta cooperación funcional puede comprometer la tolerancia periférica, especialmente en tejidos diana, como se ha demostrado en colitis autoinmune y en modelos de rechazo de injertos (298). En conjunto, estos hallazgos sitúan a la funcionalidad Treg y su red

de apoyo como un eje central alterado en los PIRD, cuya caracterización precisa puede servir de guía para estrategias de intervención personalizadas.

5.2.3 Integración clínica e inmunológica: hacia una medicina de precisión

La integración de datos clínicos e inmunológicos en esta cohorte de pacientes pediátricos PIRD reveló hallazgos clave sobre la arquitectura fenotípica subyacente y sus implicaciones clínicas. El análisis conjunto mediante heatmaps complejos mostró que la variabilidad inmunológica no se alinea completamente con la clasificación clínica tradicional (299). La ausencia de una agrupación robusta basada exclusivamente en variables clínicas (grupo diagnóstico, genética o tratamiento) sugiere que los perfiles inmunológicos son más específicos y sensibles para capturar diferencias relevantes entre pacientes (300,301). Esta disociación entre clasificación clínica e inmunológica refuerza la necesidad de enfoques integradores que prioricen biomarcadores funcionales y celulares sobre etiquetas diagnósticas (302).

La proyección multidimensional UMAP, combinando inmunofenotipo, funcionalidad y datos clínicos en tres momentos del tiempo, permitió una visualización más rica del comportamiento dinámico de los pacientes. El hallazgo de clústeres estables a lo largo del tiempo en una proporción significativa de individuos indica la existencia de estados inmunológicos persistentes, posiblemente modulados por características moleculares intrínsecas o efectos terapéuticos mantenidos. Desde una perspectiva molecular, esta constancia podría reflejar la influencia de mutaciones germinales estables que afectan vías señalizadoras específicas (como PI3K/AKT/mTOR, NF- κ B o FAS-FASL) cuya disfunción fija un “set point” inmunológico individual (303–305). Por ejemplo, en mutaciones activadoras de *PIK3CD* (como en APDS), la activación crónica de la vía mTOR puede inducir una expansión mantenida de células T efectoras y una regulación deficiente de Tregs, perpetuando un fenotipo inflamatorio refractario (303). En mutaciones de *NFKB1*, la alteración del eje NF- κ B puede conllevar una menor expresión de genes reguladores clave como *IL10*, comprometiendo mecanismos homeostáticos incluso en ausencia de exacerbación clínica (304). Asimismo, mutaciones en FAS pueden condicionar una resistencia celular a la apoptosis, manteniendo un compartimento linfocitario anómalo estable en el tiempo, típico del fenotipo ALPS (305). Todos estos mecanismos pueden contribuir a una arquitectura inmunológica rígida, difícil de modificar, incluso ante intervenciones terapéuticas. Por otro lado, los cambios observados en algunos pacientes a lo largo de los puntos temporales reflejan plasticidad inmunológica o transición entre estados fisiopatológicos, lo cual ha sido relacionado con respuestas terapéuticas, brotes inflamatorios o progresión subclínica en estudios longitudinales de autoinmunidad e inmunodeficiencia (306,307).

Este enfoque también proporciona herramientas prácticas para el seguimiento longitudinal, permitiendo evaluar el impacto de intervenciones terapéuticas en tiempo real. La capacidad de ciertos pacientes para cambiar de clúster a lo largo del tiempo puede considerarse un biomarcador dinámico de

respuesta o progresión, ofreciendo así un marco útil para decisiones clínicas adaptativas. Este concepto de plasticidad inmunológica ha sido explorado en enfermedades como la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal, donde los cambios fenotípicos preceden o acompañan las recaídas clínicas (308,309).

Finalmente, la estratificación clínica retrospectiva de los tres clústeres reveló patrones en relación con edad, grupo clínico, tipo de mutación genética y uso de inmunosupresores, consolidando la utilidad del análisis no supervisado como herramienta de descubrimiento clínico. El clúster C1, con menor complejidad genética y clínica, refleja probablemente estados de disregulación moderada o en etapas iniciales, mientras que el C3 representa fenotipos severos con requerimientos terapéuticos más intensivos, incluyendo inmunosupresión combinada.

5.3 Cuando el silencio fenotípico habla: inmunomodulación T

La presente investigación proporciona una caracterización exhaustiva del impacto inmunofenotípico de cinco fármacos inmunomoduladores sobre subpoblaciones T humanas reguladoras y efectoras, utilizando PBMCs tratadas in vitro bajo un diseño multifactorial. Mediante el empleo de técnicas de citometría espectral de alta complejidad, reducción dimensional (UMAP y PCA) y análisis de clusterización no supervisada, se generó una cartografía inmunológica de alta resolución que permitió explorar la respuesta de subtipos celulares clave ($CD4^+$ Tregs, $CD8^+$ reguladoras y células Tr1) frente a estímulo policlonal y tratamiento farmacológico. Esta estrategia ofrece una visión integral del paisaje inmunológico modulable, permitiendo evaluar tanto las redistribuciones fenotípicas inducidas como la estabilidad del sistema frente a intervenciones terapéuticas.

5.3.1 Células T $CD4^+$, estabilidad fenotípica y patrones de respuesta sutiles

En relación con el **compartimento $CD4^+$** , los resultados muestran que ninguno de los fármacos ensayados produjo modificaciones estadísticamente significativas en la proporción relativa de las subpoblaciones celulares fenotípicamente definidas. A pesar de que se observaron alteraciones topográficas en las proyecciones UMAP (como contracción o redistribución de ciertas poblaciones), estas no se tradujeron en cambios robustos cuantificables, lo que sugiere una alta resiliencia fenotípica del compartimento $CD4^+$ frente a estos inmunomoduladores en condiciones agudas (72h). Esta estabilidad podría explicarse por la naturaleza funcional, más que fenotípica, de los mecanismos de acción de estos fármacos, cuyo efecto puede manifestarse de forma más clara en dominios transcripcionales, funcionales o en contextos biológicos más complejos (310,311).

Entre los fármacos evaluados, **leniolisib** mostró patrones visuales repetidos compatibles con una contracción del compartimento nTreg y una ligera expansión de células Th, observada tanto en reposo como bajo estímulo. Esta tendencia, aunque no significativa desde el punto de vista estadístico, resulta biológicamente plausible si se consideran los efectos conocidos de la inhibición de PI3Kδ sobre la estabilidad de Tregs y la promoción de perfiles efectoras (312–314). De confirmarse en estudios longitudinales o funcionales, este hallazgo podría tener implicaciones relevantes en contextos clínicos donde se desee modular selectivamente la actividad efectora sin comprometer completamente el eje regulador.

Tacrólimus, ácido micofenólico y rapamicina presentaron un perfil notablemente conservador en términos de arquitectura inmunofenotípica CD4⁺. A pesar de ligeras variaciones visuales, como un incremento puntual de células activadas o parcialmente exhaustas en algunas condiciones, los resultados cuantitativos no permitieron identificar efectos diferenciales significativos. En el caso de rapamicina, se observó una cierta preservación del compartimento Th bajo estímulo, lo cual es coherente con su papel descrito en la promoción de T de memoria y Tregs, aunque tales efectos suelen evidenciarse más claramente en modelos *in vivo* o tras exposiciones prolongadas (315,316).

Por su parte, **ruxolitinib** (inhibidor de JAK1/2) evidenció una topografía inmunológica extremadamente estable en los mapas UMAP y una ausencia completa de diferencias fenotípicas cuantificables en las subpoblaciones CD4⁺. Este perfil es coherente con su mecanismo de acción, que afecta principalmente la transducción de señales mediadas por citocinas, sin modificar directamente la expresión de marcadores de superficie en el corto plazo (317–320). Este comportamiento sugiere que el impacto inmunomodulador de ruxolitinib podría manifestarse preferentemente a nivel funcional (como producción de IL-2, IFN-γ o IL-10) y no necesariamente como una remodelación fenotípica inmediata.

5.3.2 Células T CD8⁺, preservación espacial y estabilidad de poblaciones

A nivel del compartimento CD8⁺, se evidenció una reorganización espacial esperable inducida por el estímulo policlonal (PMA/Iono), caracterizada por una contracción general de la densidad celular, posiblemente asociada a activación y muerte celular programada. En este contexto, los tratamientos con leniolisib, rapamicina y tacrólimus mostraron una tendencia a preservar la densidad topográfica del mapa, lo que sugiere un efecto protector o modulador del ciclo celular y/o vías apoptóticas.

Sin embargo, al igual que en CD4⁺, los análisis cuantitativos no revelaron diferencias significativas en la composición proporcional de subpoblaciones CD8⁺, lo que nuevamente apunta a un desacoplamiento entre el remodelado topográfico y la distribución fenotípica cuantificable.

5.3.3 Células Tr1, exploración metodológica e implicaciones funcionales

La identificación de células Tr1 se abordó mediante una estrategia metodológicamente diferente, combinando PCA con gating manual dirigido por la coexpresión de CD49b y LAG-3, excluyendo FoxP3. Esta aproximación compensó la limitada disponibilidad de marcadores en el panel original y permitió una cuantificación sistemática de esta población. Aunque se observaron muestras individuales con elevaciones notables en la frecuencia de Tr1, particularmente bajo leniolisib y micofenolato, la alta variabilidad interindividual y la ausencia de significancia estadística impiden establecer conclusiones firmes. No obstante, este resultado subraya la necesidad urgente de desarrollar paneles optimizados para la identificación robusta de células Tr1, incluyendo marcadores como IL-10, CD226 y c-MAF, y refuerza el valor de incluir esta población en futuras estrategias terapéuticas centradas en inmunorregulación inducida.

5.4 Capturando la señal: validación fosfoproteica en PBMCs humanas

La presente sección aborda la validación y aplicabilidad funcional de un kit multiplexado de detección de fosfo-proteínas intracelulares en PBMCs humanas, evaluando su desempeño técnico y su potencial como herramienta diagnóstica o investigativa en entornos clínicos reales. La estrategia metodológica combinó análisis cuantitativo normalizado frente a GAPDH, interpretación en escala logarítmica y cálculo de variabilidad intra-condición mediante el coeficiente de variación (CV), permitiendo una caracterización detallada de la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del sistema. Esta aproximación experimental no solo proporciona una validación instrumental del kit, sino que además sienta las bases para su eventual implementación en estudios inmunológicos traslacionales, incluyendo enfermedades con disfunción inmunorreguladora como los PIRD (Primary Immune Regulatory Disorders).

En una primera fase, el ensayo mostró concordancia con los patrones de activación esperados en las líneas celulares de control proporcionadas por el fabricante, lo cual representa una validación directa de su especificidad biológica. Los perfiles fosfoproteicos obtenidos para A431 + EGF, HeLa + TNF α /Caliculina A y MCF7 + IGF1 fueron reproducidos con alta fidelidad, reflejando la activación selectiva de vías como ERK1/2–AKT–mTOR, NF κ B–p38 y STAT3–CREB, respectivamente. Este hallazgo es **clave**: demuestra que el sistema es capaz de discriminar vías de señalización con resolución diferencial y que responde a estímulos específicos con una sensibilidad dinámica adecuada.

Una vez superada la validación con líneas de referencia, el enfoque se trasladó a muestras de PBMCs humanas, representativas de un entorno clínico real. En estas condiciones, el sistema demostró una capacidad sólida para detectar niveles basales de fosforilación en proteínas clave como ERK1/2, AKT y

STAT3, incluso en ausencia de estímulo exógeno. La reproducibilidad intra-condición fue notable, con coeficientes de variación inferiores al 15 % en estos marcadores de alta expresión. Esta baja dispersión técnica valida la precisión del ensayo tal y como exigen agencias reguladoras como la FDA o la EMA en la validación de métodos analíticos (321,322) y lo posiciona como una herramienta confiable para el análisis de señalización basal en células inmunitarias primarias. No obstante, el aumento del CV en proteínas de baja abundancia como NFκB y JNK (frecuentemente >30 %) sugiere que estos targets requieren optimización adicional (ya sea mediante mayor input proteico, ampliación de réplicas o sensibilización por estimulación previa) antes de su uso rutinario en contextos diagnósticos o longitudinales.

Un hallazgo especialmente relevante fue la preservación parcial de la estructura de señalización en PBMCs criopreservadas. Aunque se observó una reducción media del 20–40 % en la señal fosfoproteica respecto a las células frescas, particularmente en marcadores como ERK1/2, STAT3 y CREB, la huella de activación basal se mantuvo detectable y reproducible. Este resultado tiene implicaciones prácticas directas: permite extender el uso del kit a biobancos clínicos o a muestras obtenidas en centros sin capacidad inmediata de procesamiento, ampliando así su aplicabilidad en estudios multicéntricos o retrospectivos. La posibilidad de detectar señal específica en muestras congeladas sin manipulación previa representa un avance metodológico sustancial en la investigación inmunológica aplicada.

En términos técnicos, el sistema demostró un **rango dinámico amplio** y un límite de detección adecuado para capturar variaciones fisiológicamente significativas. En los controles A431 + EGF y MCF7 + IGF1, se detectaron incrementos superiores a 1 log₁₀ en la activación de ERK1/2, y los niveles basales de varias fosfo-proteínas en PBMCs se mantuvieron claramente por encima del umbral de fondo (≥0.3 unidades normalizadas vs. ~0.05 de ruido). Esta capacidad para cuantificar con precisión señales intracelulares sin requerir estímulo adicional convierte al sistema en una herramienta versátil, apta tanto para estudios exploratorios como para diseños con criterios predefinidos de respuesta inmunológica.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman que el kit multiplexado de detección de fosfo-proteínas ofrece un desempeño técnico sólido, con alta especificidad y sensibilidad, y reproducibilidad adecuada incluso en condiciones biológicas complejas. Su implementación sobre PBMCs humanas, tanto frescas como congeladas, valida su uso potencial en estudios clínicos y de investigación traslacional centrados en inmunovigilancia, monitorización terapéutica o diagnóstico funcional. Sin embargo, también se identificaron limitaciones operativas (como la necesidad de mayor input para proteínas de baja abundancia) que deben ser consideradas al diseñar futuros protocolos clínicos o investigativos.

Desde una perspectiva más amplia, este enfoque representa un avance significativo en la capacidad de monitorizar el estado funcional del sistema inmunitario humano *ex vivo*, integrando la dimensión de señalización intracelular en modelos experimentales basados en PBMCs. A diferencia de la inmunofenotipia clásica, que se limita a marcadores de superficie, este tipo de análisis permite inferir la activación real de

vías bioquímicas específicas en respuesta a estímulos internos o tratamientos. Su aplicación en cohortes de pacientes con inmunopatologías complejas (como PIRD, inmunodeficiencias adquiridas, o enfermedades autoinflamatorias) podría facilitar una estratificación funcional más fina y contribuir al desarrollo de medicina de precisión en inmunología clínica.

5.5 Revolución silenciosa: cómo la bioinformática transforma la inmunología clínica

El presente estudio pone de manifiesto las ventajas metodológicas y analíticas que las herramientas bioinformáticas de nueva generación ofrecen frente a los enfoques estadísticos tradicionales en la caracterización de pacientes PIRD. Mientras los métodos convencionales se basan en comparaciones univariadas que, si bien son interpretables clínicamente, pierden capacidad para captar relaciones complejas y multivariantes, el uso de estrategias computacionales permite identificar patrones estructurales latentes, correlaciones funcionales emergentes y subgrupos clínicamente relevantes no definidos por criterios clásicos.

Un claro ejemplo de ello es la aplicación de algoritmos de reducción de dimensionalidad como UMAP, que permiten representar de forma intuitiva relaciones de alta complejidad entre variables fenotípicas y funcionales. Este enfoque ha sido especialmente útil para visualizar patrones ocultos en la distribución de pacientes, mostrando agrupaciones naturales que se correlacionan con variables clínicas o genéticas de interés, incluso cuando estas no son evidentes mediante análisis clásicos.

La identificación de efectos de lote (*batch effects*) mediante UMAP, no atribuibles a condiciones biológicas sino a la procedencia de las muestras, ejemplifica la sensibilidad de estas técnicas a fuentes de ruido técnico que frecuentemente pasan inadvertidas en estadísticas univariadas. La posterior aplicación de métodos como *ComBat* para su corrección no solo reestableció la validez del análisis, sino que demostró la necesidad de un preprocesamiento riguroso en entornos multicéntricos.

Del mismo modo, las técnicas de agrupamiento no supervisado como K-means han permitido estratificar a los pacientes en subgrupos inmunológicamente distintos, revelando clústeres con perfiles celulares y funcionales divergentes. Esta capacidad de segmentación automatizada, imposible de obtener mediante comparaciones individuales, se vio reforzada por la visualización mediante heatmaps y el análisis de importancia de variables mediante Random Forest. El hecho de que estas agrupaciones presenten coherencia clínica y terapéutica respalda la validez del enfoque y su aplicabilidad futura.

En contraste, el análisis convencional ofrece herramientas más limitadas frente a la complejidad de sistemas inmunológicos multidimensionales. A pesar de su robustez y comprensibilidad, los tests paramétricos y no paramétricos, como Shapiro-Wilk, Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, no permiten captar

relaciones de interdependencia entre variables ni ofrecen mecanismos de integración transversal entre información fenotípica, funcional y clínica. Además, su capacidad para discriminar estados inmunológicos intermedios o mixtos es limitada, hecho especialmente crítico en enfermedades con heterogeneidad clínica como las PIRD.

La bioinformática no sustituye, sino que **complementa** el razonamiento clínico e inmunológico tradicional, proporcionando una capa adicional de profundidad para la interpretación de los datos. Su aplicación, sin embargo, requiere precaución: el riesgo de sobreajuste, la dependencia de la calidad del preprocesamiento y la interpretabilidad de los modelos son retos vigentes que requieren validación cruzada, cohortes independientes y colaboración interdisciplinar.

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran que el uso de herramientas bioinformáticas avanzadas en el análisis inmunológico proporciona una ventaja significativa en la caracterización de subgrupos clínicos y funcionales en pacientes con desregulación inmune. Su integración con los enfoques tradicionales constituye una estrategia potente para avanzar hacia una medicina personalizada basada en datos, que permita comprender la heterogeneidad inmunológica en su totalidad.

5.6 Limitaciones y perspectivas de futuro

A pesar del diseño riguroso, el enfoque multidimensional y los resultados prometedores de esta tesis, es fundamental reconocer una serie de **limitaciones metodológicas, técnicas y clínicas** que condicionan la interpretación, **validez externa** y **aplicabilidad** de los hallazgos. En primer lugar, el **tamaño muestral** sigue siendo una restricción relevante. Aunque se logró reclutar una cohorte considerable (n=51 pacientes y n=6 controles sanos) para tratarse de enfermedades raras, este número aún es limitado, especialmente para el análisis funcional de subpoblaciones inmunológicas minoritarias. Esta limitación afecta la **potencia estadística**, restringe las comparaciones robustas entre grupos clínicos y genéticos, y limita la capacidad de generalización.

Otro factor crítico es la **heterogeneidad clínica y genética** de los pacientes incluidos. La diversidad dentro del espectro de trastornos primarios de regulación inmunológica, la variabilidad en la expresión clínica y la falta de una clasificación homogénea basada en mutaciones específicas pueden introducir sesgos en la interpretación de los datos inmunofenotípicos y funcionales. Esta diversidad subraya la necesidad de futuras estrategias de **estratificación más precisas**, posiblemente basadas en **perfiles moleculares integrados**. Además, aunque se diseñó un seguimiento longitudinal con tres puntos temporales (T0, T1, T2), la ausencia de datos completos en todos los pacientes redujo la capacidad de evaluar de forma robusta la **evolución inmunológica** y su relación con la **progresión clínica** o **respuesta terapéutica**.

Desde el punto de vista analítico, el modelo bioinformático de integración inmunológica desarrollado fue validado únicamente en una **cohorte nacional**, sin pruebas de **validación** externa con datasets públicos o cohortes internacionales. Esta limitación reduce su **extrapolabilidad** a otros contextos clínicos o poblaciones pediátricas. Asimismo, aunque se utilizó **citometría de flujo multiparamétrica** para caracterizar múltiples **poblaciones celulares**, no se incorporaron capas adicionales de **información molecular** como **transcriptómica**, **epigenética** o **proteómica**, que podrían haber mejorado la resolución del análisis inmunopatológico y fortalecido los modelos de clasificación y predicción clínica.

En relación con el estudio inmunofarmacológico, también se identificaron limitaciones significativas. El modelo experimental *in vitro* basado en PBMCs de donantes sanos permitió estandarizar condiciones y aislar efectos farmacológicos, pero no reproduce con fidelidad la **complejidad del entorno inmunológico *in vivo***, donde interacciones celulares, microambientes tisulares y farmacocinética influyen sustancialmente en la respuesta terapéutica. Además, el uso de **concentraciones fijas** de fármacos no refleja la variabilidad clínica observada en pacientes pediátricos, lo que sugiere la necesidad de realizar **estudios farmacodinámicos** más sofisticados, incluyendo **curvas de dosis-respuesta**. El análisis se centró principalmente en el impacto fenotípico, pero no en la **funcionalidad directa** de las subpoblaciones, lo cual es una limitación relevante en el caso de **células reguladoras** como **Treg** o **Tr1**. Tampoco se analizaron **efectos combinados** entre inmunosupresores, una situación habitual en la práctica clínica real.

Por otra parte, el uso exploratorio de un kit comercial para la evaluación molecular del estado de activación de vías de señalización en PBMCs humanas ofreció resultados preliminares interesantes, pero también mostró **limitaciones técnicas**. La sensibilidad del kit fue reducida para detectar niveles intermedios de fosforilación, y su eficacia dependió críticamente del control técnico de las condiciones preanalíticas. Su diseño cerrado, con un número fijo de dianas y sin posibilidad de ampliación, restringe su aplicabilidad en estudios más amplios o personalizados. Además, su validación en población pediátrica inmunodeficiente sigue pendiente, lo cual limita su utilidad clínica inmediata.

Para maximizar la fiabilidad de los datos obtenidos con este sistema analítico en contextos clínicos reales y cohortes de alto valor biológico, se recomienda incrementar el número de réplicas técnicas especialmente en aquellas fosfo-proteínas con niveles de señal bajos o mayor variabilidad intraexperimental, como NFκB y JNK. Esta estrategia mejora la robustez estadística de las mediciones y reduce el riesgo de interpretar falsos positivos o negativos debidos a fluctuaciones técnicas. Asimismo, resulta fundamental monitorizar de forma sistemática el impacto del proceso de congelación y descongelación de las muestras, dado que se ha observado una atenuación no homogénea de la señal proteica entre distintos marcadores. Para ello, se sugiere incorporar pools de PBMCs de referencia tratados de forma paralela en cada lote de análisis, lo cual permite establecer puntos de calibración internos y detectar desviaciones técnicas atribuibles al procesamiento preanalítico. Con estas medidas correctivas y de control de calidad, el ensayo puede ser adaptado con fiabilidad a estudios traslacionales de inmunología clínica, incluyendo investigación sobre

mecanismos moleculares en enfermedades inmunomediadas y validación de biomarcadores fosfoproteicos en muestras biobancadas.

A pesar de estas limitaciones, las **proyecciones futuras** derivadas de este trabajo abren múltiples vías de avance. Una prioridad será **ampliar la cohorte multicéntrica**, incorporando hospitales nacionales e internacionales que permitan aumentar la diversidad genética y fenotípica, y mejorar la potencia estadística de los análisis. También es clave **validar externamente** los modelos de aprendizaje automático y clustering mediante bases de datos públicas o nuevas cohortes independientes. La **integración de datos ómicos** (como RNA-seq, WES y proteómica cuantitativa) se presenta como una estrategia clave para mejorar la resolución molecular y descubrir nuevos biomarcadores de **diagnóstico, pronóstico o respuesta terapéutica**.

Una línea concreta de trabajo futuro consistirá en completar los análisis inmunofenotípicos realizados con un **ensayo funcional específico para Treg**, que evalúe directamente su capacidad supresora frente a células efectoras autólogas o alogénicas. Esta aproximación permitirá contrastar el fenotipo con la funcionalidad real de las subpoblaciones Treg identificadas, contribuyendo a una caracterización más completa de su papel en la disfunción inmunorreguladora observada en pacientes con PIRD. En concreto, será de especial interés probar la terapia celular basada en células Treg tímicas (**ThyTreg**, WO2019166658A1) desarrollada por el Laboratorio de Inmunoregulación del Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid. La combinación de datos funcionales con el fenotipo detallado podría servir además para seleccionar candidatos óptimos para inmunoterapia celular.

En el ámbito inmunofarmacológico, futuras investigaciones deberán centrarse en **complementar el análisis fenotípico con ensayos funcionales**, como pruebas de supresión, proliferación y perfil de citoquinas, lo cual será esencial para establecer correlaciones con relevancia clínica directa. Además, el uso combinado de **inmunofenotipado, fosfoproteómica y transcriptómica** permitirá construir modelos mecanísticos más precisos de la modulación intracelular inducida por los fármacos, facilitando así el desarrollo de **biomarcadores más específicos y sensibles** para el seguimiento terapéutico.

Como línea emergente de especial interés, se plantea el uso de **plataformas "organ-on-chip"**, que permiten recrear microambientes tisulares humanos de forma más fisiológica que los modelos in vitro convencionales. Estas tecnologías integran células inmunes en dispositivos microfluídicos que simulan condiciones dinámicas del organismo (como flujo, gradientes de citoquinas o interacción célula-célula), ofreciendo una alternativa más realista para evaluar la eficacia y toxicidad de inmunofármacos. Su aplicación en inmunología personalizada podría optimizar la selección de tratamientos a nivel individual, permitiendo probar ex vivo la respuesta farmacológica de las células de cada paciente en un entorno que imita fielmente el contexto inmunológico humano.

Respecto al **kit comercial**, se propone su validación clínica sistemática en pacientes PIRD, evaluando su capacidad para detectar alteraciones funcionales consistentes con fenotipos inmunológicos o mutaciones específicas. A largo plazo, su uso podría integrarse como una capa funcional dentro de algoritmos diagnósticos hospitalarios, en combinación con **citometría, genética y datos clínicos**.

Finalmente, una de las líneas más prometedoras consiste en la **implementación de un algoritmo clínico automatizado** que integre **datos clínicos, citométricos y genéticos** dentro de sistemas hospitalarios, facilitando el **diagnóstico precoz** de **IEI/PIRD**, la **clasificación de pacientes**, y la **sugerencia de tratamientos dirigidos** incluso en ausencia de **diagnóstico molecular definitivo**. La creación de un biobanco digital interoperable con datos inmunofenotípicos y clínicos estandarizados permitirá alimentar este tipo de herramientas y potenciar futuras investigaciones en medicina de precisión pediátrica.

6.

CONCLUSIONES

*"Los humanos son alérgicos al cambio. Les encanta decir: 'Siempre lo hemos hecho así'.
Yo trato de luchar contra eso."
— Grace Hopper*



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

6. Conclusiones

1. El estudio confirmó la existencia de una **amplia variabilidad inmunológica** entre pacientes pediátricos con errores innatos de la inmunidad con fenotipo PIRD. Esta heterogeneidad se manifestó tanto a nivel inmunofenotípico como funcional, evidenciando múltiples ejes de desregulación inmunitaria.
2. La identificación de clusters inmunofenotípicos mediante análisis UMAP y K-means permitió clasificar a los pacientes en **tres subgrupos con perfiles inmunitarios distintivos** lo que ofrece un marco potencial para la medicina personalizada en inmunodeficiencias primarias con disrregulación.
3. Se identificaron biomarcadores clave como **CD4+ EM, CD4+ CM, CD4+ RTE y NK CD56+ CD16+**, que mostraron alto poder discriminativo entre pacientes y controles, y entre los distintos clusters.
4. Aunque no alcanzaron significación estadística, las subpoblaciones **Treg CM** y **Treg EM** podrían tener un papel relevante en la regulación inmune alterada observada en pacientes, sugiriendo que su presencia, aunque poco abundante, está asociada a patrones inmunológicos distintivos que merecen atención en futuras investigaciones.
5. El análisis centrado en las poblaciones inmunorreguladoras, especialmente en los subtipos de Tregs, reveló una **activación diferencial en pacientes con EII frente a controles sanos**, reflejada en una **expansión fenotípica** que indica un intento compensatorio del sistema inmunológico ante la desregulación, en contraste con el perfil estable observado en individuos sanos. Estos hallazgos, posicionan a las Treg como foco de atención en la desregulación inmunológica.
6. Se evidenció una **sobreexpresión de marcadores inmunorreguladores** como CTLA-4, PD-1, IL-10, TIGIT y LAP, especialmente en células Treg y CD4+ no-Treg. Esta hiperexpresión sugiere un esfuerzo homeostático del sistema inmune para contrarrestar la activación crónica, pero con una pérdida de coordinación funcional reflejada en redes de coexpresión fragmentadas que sienta las bases para estudios de función Treg en el futuro.
7. El enfoque multidimensional aplicado (que integra inmunofenotipado, funcionalidad reguladora e información clínica) permitió una estratificación de los pacientes en clusters con perfiles clínicos, genéticos y rango de edades **sentando las bases para terapias dirigidas y predictivas**. La implementación de este enfoque podría mejorar el pronóstico y la calidad de vida de niños con PIRD, así como optimizar el uso racional de terapias inmunomoduladoras.
8. La validación preliminar de la metodología proteómica basada en la detección de fosfoproteínas en PBMCs humanas sienta las bases para su futura aplicación en la caracterización funcional de pacientes con EII, abriendo la puerta al desarrollo de biomarcadores intracelulares que mejoren el diagnóstico, la estratificación y el seguimiento terapéutico en inmunología clínica de precisión.

9. Los ensayos *in vitro* demostraron que, a corto plazo, los inmunosupresores analizados **no modifican drásticamente el fenotipo de las subpoblaciones T y Treg**, aunque inducen cambios sutiles en la distribución espacial y la actividad funcional. Tales efectos sugieren que la respuesta terapéutica podría depender más de la modulación funcional que de alteraciones fenotípicas masivas.

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

7.

BIBLIOGRAFÍA

“Si hay un libro que quieres leer, pero aún no ha sido escrito, entonces debes escribirlo.”

— Chloe Ardelia Wofford



Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

7. Bibliografía

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001; 357(9270):1777-89.** doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
2. Kroemer G, Montégut L, Kepp O, Zitvogel L. The danger theory of immunity revisited. *Nat Rev Immunol* (2024) doi: 10.1038/s41577-024-01102-9
3. janeways-immunobiology-10th-edition-lly-dr-notes.
4. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: Learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* (2005) 5:772–782. doi: 10.1038/nri1707
5. Wang R, Lan C, Benlagha K, Camara NOS, Miller H, Kubo M, Heegaard S, Lee P, Yang L, Forsman H, et al. The interaction of innate immune and adaptive immune system. *MedComm (Beijing)* (2024) 5: doi: 10.1002/mco2.714
6. Faenza I, Blalock WL. Innate Immunity: A Balance between Disease and Adaption to Stress. *Biomolecules* (2022) 12: doi: 10.3390/biom12050737
7. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2010) 125: doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017
8. Shevyrev D, Tereshchenko V, Berezina TN, Rybtsov S. Hematopoietic Stem Cells and the Immune System in Development and Aging. *Int J Mol Sci* (2023) 24: doi: 10.3390/ijms24065862
9. Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* (2014) 14:232–246. doi: 10.1038/nri3641
10. Mastellos DC, Hajishengallis G, Lambris JD. A guide to complement biology, pathology and therapeutic opportunity. *Nat Rev Immunol* (2024) 24:118–141. doi: 10.1038/s41577-023-00926-1
11. Ledvina HE, Whiteley AT. Conservation and similarity of bacterial and eukaryotic innate immunity. *Nat Rev Microbiol* (2024) 22:420–434. doi: 10.1038/s41579-024-01017-1
12. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:279–289. doi: 10.1038/nri2215
13. Dash SP, Gupta S, Sarangi PP. Monocytes and macrophages: Origin, homing, differentiation, and functionality during inflammation. *Heliyon* (2024) 10: doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e29686
14. Guillemins M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* (2018) 49:595–613. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005

15. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, Andrä I, Andreato F, Annunziato F, Arranz E, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol* (2021) 51:2708–3145. doi: 10.1002/eji.202170126
16. Williams H, Mack C, Baraz R, Marimuthu R, Naralashetty S, Li S, Medbury H. Monocyte Differentiation and Heterogeneity: Inter-Subset and Interindividual Differences. *Int J Mol Sci* (2023) 24: doi: 10.3390/ijms24108757
17. Zhang F, Xia Y, Su J, Quan F, Zhou H, Li Q, Feng Q, Lin C, Wang D, Jiang Z. Neutrophil diversity and function in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* (2024) 9: doi: 10.1038/s41392-024-02049-y
18. Ganz T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2003) 3:710–720. doi: 10.1038/nri1180
19. Wang H, Kim SJ, Lei Y, Wang S, Wang H, Huang H, Zhang H, Tsung A. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. *Signal Transduct Target Ther* (2024) 9:235. doi: 10.1038/s41392-024-01933-x
20. Bongers SH, Chen N, van Grinsven E, van Staveren S, Hassani M, Spijkerman R, Hesselink L, Lo Tam Loi AT, van Aalst C, Leijte GP, et al. Kinetics of Neutrophil Subsets in Acute, Subacute, and Chronic Inflammation. *Front Immunol* (2021) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.674079
21. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:746–760. doi: 10.1038/nri.2017.95
22. Wechsler ME, Munitz A, Ackerman SJ, Drake MG, Jackson DJ, Wardlaw AJ, Dougan SK, Berdnikovs S, Schleich F, Matucci A, et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin Proc* (2021) 96:2694–2707. doi: 10.1016/j.mayocp.2021.04.025
23. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: Form and function. *Journal of Biological Chemistry* (2014) 289:17406–17415. doi: 10.1074/jbc.R113.546218
24. Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: Emerging roles in immunity. *Front Immunol* (2014) 5: doi: 10.3389/fimmu.2014.00570
25. Pellefigues C, Karasuyama H. Editorial: The fundamental biology of basophils in health and disease. *Front Immunol* (2023) 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1292279
26. Miyake K, Ito J, Karasuyama H. Role of Basophils in a Broad Spectrum of Disorders. *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.902494
27. Eberle JU, Voehringer D. Role of basophils in protective immunity to parasitic infections. *Semin Immunopathol* (2016) 38:605–613. doi: 10.1007/s00281-016-0563-3
28. Poto R, Loffredo S, Marone G, Di Salvatore A, de Paulis A, Schroeder JT, Varricchi G. Basophils beyond allergic and parasitic diseases. *Front Immunol* (2023) 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1190034

29. Jiménez-Cortegana C, Palomares F, Alba G, Santa-María C, de la Cruz-Merino L, Sánchez-Margalet V, López-Enríquez S. Dendritic cells: the yin and yang in disease progression. *Front Immunol* (2023) 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1321051
30. Fucikova J, Palova-Jelinkova L, Bartunkova J, Spisek R. Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: Mechanisms and clinical applications. *Front Immunol* (2019) 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.02393
31. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol* (2018) 18:325–339. doi: 10.1038/nri.2017.143
32. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:823–836. doi: 10.1038/nri3084
33. O’Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2015) 72:4309–4325. doi: 10.1007/s00018-015-2005-0
34. Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, Steri V, Nuti S, Sammiceli C, Bardelli M, Montagna D, Locatelli F, Wack A. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. (2007) doi: 10.1182/blood-2006
35. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* (2019) 50:37–50. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.027
36. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: Dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* (2014) 14:495–504. doi: 10.1038/nri3689
37. Qu C, Brinck-Jensen NS, Zang M, Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: Targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases* (2014) 19:1–5. doi: 10.1016/j.ijid.2013.09.023
38. Chen S, Zhu H, Jounaidi Y. Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. *Signal Transduct Target Ther* (2024) 9: doi: 10.1038/s41392-024-02005-w
39. Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol* (2011) 32:364–372. doi: 10.1016/j.it.2011.06.001
40. Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* (2021) 18:85–100. doi: 10.1038/s41571-020-0426-7
41. Li F, Liu S. Focusing on NK cells and ADCC: A promising immunotherapy approach in targeted therapy for HER2-positive breast cancer. *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.1083462
42. Björkström NK, Strunz B, Ljunggren HG. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* (2022) 22:112–123. doi: 10.1038/s41577-021-00558-3

43. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2013) 131:959–971. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.046
44. Martin VG, Wu YCB, Townsend CL, Lu GHC, O'Hare JS, Mozeika A, Coolen ACC, Kipling D, Fraternali F, Dunn-Walters DK. Transitional B cells in early human B cell development - Time to revisit the paradigm? *Front Immunol* (2016) 7: doi: 10.3389/fimmu.2016.00546
45. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.954936
46. Chi X, Li Y, Qiu X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology* (2020) 160:233–247. doi: 10.1111/imm.13176
47. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* (2023) 8: doi: 10.1038/s41392-023-01471-y
48. Domínguez-Domínguez L, Rava M, Bisbal O, Lopez-Cortés L, Portilla J, Podzamczek D, Olalla J, Fuster D, Rubio R, Jarrín I, et al. Low CD4/CD8 ratio is associated with increased morbidity and mortality in late and non-late presenters: results from a multicentre cohort study, 2004–2018. *BMC Infect Dis* (2022) 22: doi: 10.1186/s12879-022-07352-z
49. Chopp L, Redmond C, O'Shea JJ, Schwartz DM. From thymus to tissues and tumors: A review of T-cell biology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2023) 151:81–97. doi: 10.1016/j.jaci.2022.10.011
50. Von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor α -chain: not just a surrogate. (2005). www.nature.com/reviews/immunol
51. Palmer E, Naeher D. Affinity threshold for thymic selection through a T-cell receptor-co-receptor zipper. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):207-13. doi: 10.1038/nri2469. PMID: 19151748.
52. Qi Y, Zhang R, Lu Y, Zou X, Yang W. Aire and Fezf2, two regulators in medullary thymic epithelial cells, control autoimmune diseases by regulating TSAs: Partner or complements? *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.948259
53. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, Kodama T, Takayanagi H. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* (2015) 163:975–987. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.013
54. Hsieh CS, Lee HM, Lio CWJ. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:157–167. doi: 10.1038/nri3155
55. Künzli M, Masopust D. CD4+ T cell memory. *Nat Immunol* (2023) 24:903–914. doi: 10.1038/s41590-023-01510-4
56. Dupage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:149–163. doi: 10.1038/nri.2015.18

57. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4 +T cells: Differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* (2012) 2012: doi: 10.1155/2012/925135
58. Zhu X, Zhu J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. *Int J Mol Sci* (2020) 21:1–26. doi: 10.3390/ijms21218011
59. Lee J, Lozano-Ruiz B, Yang FM, Fan DD, Shen L, González-Navajas JM. The Multifaceted Role of Th1, Th9, and Th17 Cells in Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Front Immunol* (2021) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.625667
60. Yang Y, Xiangt Z, Ertlt HCJ, Wilson JM. Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon γ is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. (1995). 7257–7261 p.
61. Ekkens MJ, Shedlock DJ, Jung E, Troy A, Pearce EL, Shen H, Pearce EJ. Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses. *Infect Immun* (2007) 75:2291–2296. doi: 10.1128/IAI.01328-06
62. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol* (2018) 18:121–133. doi: 10.1038/nri.2017.118
63. Worley L, Tangye SG, Ma CS. What can primary immunodeficiencies teach us about Th9 cell differentiation and function? *Immunol Cell Biol* (2019) 97:380–388. doi: 10.1111/imcb.12215
64. Noelle RJ, Nowak EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol* (2010) 10:683–687. doi: 10.1038/nri2848
65. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, Bettelli E, Oukka M, Van Snick J, Renauld JC, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106:12885–12890. doi: 10.1073/PNAS.0812530106
66. Angkasekwinai P, Dong C. IL-9-producing T cells: potential players in allergy and cancer. *Nat Rev Immunol* (2021) 21:37–48. doi: 10.1038/s41577-020-0396-0
67. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol* (2023) 23:38–54. doi: 10.1038/s41577-022-00746-9
68. Huangfu L, Li R, Huang Y, Wang S. The IL-17 family in diseases: from bench to bedside. *Signal Transduct Target Ther* (2023) 8: doi: 10.1038/s41392-023-01620-3
69. Arshad T, Mansur F, Palek R, Manzoor S, Liska V. A Double Edged Sword Role of Interleukin-22 in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Front Immunol* (2020) 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.02148
70. Zhang K, Chen L, Zhu C, Zhang M, Liang C. Current Knowledge of Th22 Cell and IL-22 Functions in Infectious Diseases. *Pathogens* (2023) 12: doi: 10.3390/pathogens12020176
71. Wang Y, Godec J, Ben-Aissa K, Cui K, Zhao K, Pucsek AB, Lee YK, Weaver CT, Yagi R, Lazarevic V. The transcription factors T-bet and runx are required for the ontogeny of pathogenic

- interferon- γ -producing T helper 17 cells. *Immunity* (2014) 40:355–366. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.002
72. Olatunde AC, Hale JS, Lamb TJ. Cytokine-skewed Tfh cells: functional consequences for B cell help. *Trends Immunol* (2021) 42:536–550. doi: 10.1016/j.it.2021.04.006
73. Ye Y, Wang M, Huang H. Follicular regulatory T cell biology and its role in immune-mediated diseases. *J Leukoc Biol* (2021) 110:239–255. doi: 10.1002/JLB.1MR0321-601RR
74. Koh CH, Lee S, Kwak M, Kim BS, Chung Y. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. *Exp Mol Med* (2023) 55:2287–2299. doi: 10.1038/s12276-023-01105-x
75. Mishra S. CD8+ Regulatory T Cell – A Mystery to Be Revealed. *Front Immunol* (2021) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.708874
76. Pellicci DG, Koay HF, Berzins SP. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:756–770. doi: 10.1038/s41577-020-0345-y
77. Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T Cells: Friend or Foe in Cancer Development. *J Transl Med* (2018) 16: doi: 10.1186/s12967-017-1378-2
78. Pellicci DG, Koay HF, Berzins SP. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:756–770. doi: 10.1038/s41577-020-0345-y
79. Cui G, Abe S, Kato R, Ikuta K. Insights into the heterogeneity of iNKT cells: tissue-resident and circulating subsets shaped by local microenvironmental cues. *Front Immunol* (2024) 15: doi: 10.3389/fimmu.2024.1349184
80. Ohkura N, Sakaguchi S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases. *Cell Res* (2020) 30:465–474. doi: 10.1038/s41422-020-0324-7
81. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T cells: Differentiation and function. *Cancer Immunol Res* (2016) 4:721–725. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0193
82. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* (2018) 19:665–673. doi: 10.1038/s41590-018-0120-4
83. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science* (1979) (1969) 166:753–755.
84. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front Immunol* (2019) 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.00043

85. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Annual Review of Immunology Regulatory T Cells and Human Disease. (2020) doi: 10.1146/annurev-immunol-042718
86. Shevryev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol* (2020) 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.03100
87. Lucca LE, Dominguez-Villar M. Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:680–693. doi: 10.1038/s41577-020-0296-3
88. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and yet-unanswered questions. *Autoimmun Rev* (2015) 14:105–116. doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.012
89. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Journal of Immunology* (2017) 198:981–985. doi: 10.1126/science.1079490
90. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Barbara BF, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine* (2006) 203:1701–1711. doi: 10.1084/jem.20060772
91. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FFX, Gilliet M, Liu YJ. Two Functional Subsets of FOXP3+ Regulatory T Cells in Human Thymus and Periphery. *Immunity* (2008) 28:870–880. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.018
92. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* (2007) 19:345–354. doi: 10.1093/INTIMM/DXM014
93. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* (2009) 30:899–911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
94. Kressler C, Gasparoni G, Nordström K, Hamo D, Salhab A, Dimitropoulos C, Tierling S, Reinke P, Volk HD, Walter J, et al. Targeted De-Methylation of the FOXP3-TSDR Is Sufficient to Induce Physiological FOXP3 Expression but Not a Functional Treg Phenotype. *Front Immunol* (2021) 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.609891
95. Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin Immunol* (2011) 23:202–208. doi: 10.1016/j.smim.2011.07.005
96. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, Hauben E, Roncarolo MG. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* (2010) 116:935–944. doi: 10.1182/blood-2009-07-234872

97. Głobińska A, Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, Kleuskens M, van de Veen W, Sokolowska M, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Diverse mechanisms of immune tolerance to allergens. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* (2018) 121:306–312. doi: 10.1016/j.anai.2018.06.026
98. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M, Gagliani N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity* (2018) 49:1004–1019. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.001
99. De R, Malefyt W, Haanen J, Spits H, Koncarolo M-G, Te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and Viral IL-10 Strongly Reduce Antigen-specific Human T Cell Proliferation by Diminishing the Antigen-presenting Capacity of Monocytes via Downregulation of Class II Major Histocompatibility Complex Expression.
100. Liu Y, Lan Q, Lu L, Chen M, Xia Z, Ma J, Wang J, Fan H, Shen Y, Ryffel B, et al. Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8⁺Foxp3-CD103⁺ regulatory T cells. *J Mol Cell Biol* (2014) 6:81–92. doi: 10.1093/jmcb/mjt026
101. El-Asady R, Yuan R, Liu K, Wang D, Gress RE, Lucas PJ, Drachenberg CB, Hadley GA. TGF- β -dependent CD103 expression by CD8⁺ T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine* (2005) 201:1647–1657. doi: 10.1084/JEM.20041044
102. Uss E, Ajda S, Rowshani T, Hooibrink B, Lardy NM, Van Lier RAW, Ten Berge IJM. CD103 Is a Marker for Alloantigen-Induced Regulatory CD8⁺ T Cells. (2006). 2775–2783 p. <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/177/5/2775/1226066/zim01706002775.pdf>
103. Ho J, Kurtz CC, Naganuma M, Ernst PB, Cominelli F, Rivera-Nieves J. A CD8⁺/CD103^{high} T Cell Subset Regulates TNF-Mediated Chronic Murine Ileitis. *The Journal of Immunology* (2008) 180:2573–2580. doi: 10.4049/JIMMUNOL.180.4.2573
104. Lu L, Yu Y, Li G, Pu L, Zhang F, Zheng S, Wang X. CD8⁺CD103⁺ regulatory T cells in spontaneous tolerance of liver allografts. *Int Immunopharmacol* (2009) 9:546–548. doi: 10.1016/j.INTIMP.2009.01.021
105. Sun J, Yang Y, Huo X, Zhu B, Li Z, Jiang X, Xie R, Gao L, Sun Y, Fan H, et al. Efficient Therapeutic Function and Mechanisms of Human Polyclonal CD8⁺ + CD103⁺ + Foxp3⁺ + Regulatory T Cells on Collagen-Induced Arthritis in Mice. *J Immunol Res* (2019) 2019: doi: 10.1155/2019/8575407
106. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential Roles of CD8⁺CD122⁺ Regulatory T Cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis. *Journal of Experimental Medicine* (2004) 200:1123–1134. doi: 10.1084/JEM.20040395
107. Dai H, Wan N, Zhang S, Moore Y, Wan F, Dai Z. Cutting Edge: Programmed Death-1 Defines CD8⁺CD122⁺ T Cells as Regulatory versus Memory T Cells. *The Journal of Immunology* (2010) 185:803–807. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1000661

108. Dai Z, Zhang S, Xie Q, Wu S, Su J, Li S, Xu Y, Li XC. Natural CD8+CD122+ T cells are more potent in suppression of allograft rejection than CD4+CD25+ regulatory T cells. *American Journal of Transplantation* (2014) 14:39–48. doi: 10.1111/ajt.12515
109. Suzuki H, Shi Z, Okuno Y, Isobe K ichi. Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells? *Hum Immunol* (2008) 69:751–754. doi: 10.1016/J.HUMIMM.2008.08.285
110. Aly MG, Ibrahim EH, Karakizlis H, Weimer R, Opelz G, Morath C, Zeier M, Ekpoom N, Daniel V. CD4+CD25+CD127-Foxp3+ and CD8+CD28- Tregs in Renal Transplant Recipients: Phenotypic Patterns, Association With Immunosuppressive Drugs, and Interaction With Effector CD8+ T Cells and CD19+IL-10+ Bregs. *Front Immunol* (2021) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.716559
111. Fenoglio D, Ferrera F, Fravega M, Balestra P, Battaglia F, Proietti M, Andrei C, Olive D, Antonio LC, Indiveri F, et al. Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8+CD28- regulatory T cells. *Hum Immunol* (2008) 69:745–750. doi: 10.1016/J.HUMIMM.2008.08.282
112. Korecka-Polak A, Duszota A, Wierzbicki P, Niemczyk M, Bocian K, Kłosowska D, Pączek L, Górski A, Korczak-Kowalska G. Human peripheral blood CD8+CD28-t cells of renal allograft recipients do not express FOXP3 protein. *Transplantation Proceedings*. (2011). p. 2917–2921 doi: 10.1016/j.transproceed.2011.08.016
113. Li J, Zaslavsky M, Su Y, Guo J, Sikora MJ, van Unen V, Christophersen A, Chiou SH, Chen L, Li J, et al. KIR+CD8+ T cells suppress pathogenic T cells and are active in autoimmune diseases and COVID-19. *Science (1979)* (2022) 376: doi: 10.1126/science.abi9591
114. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* (2009) 30:636–645. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.010
115. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* (2009) 21:1105–1111. doi: 10.1093/INTIMM/DXP095
116. Alegre M-L, Frauwirth KA, Thompson CB. T-CELL REGULATION BY CD28 AND CTLA-4. (2001). www.nature.com/reviews/immunol
117. Hossen MM, Ma Y, Yin Z, Xia Y, Du J, Huang JY, Huang JJ, Zou L, Ye Z, Huang Z. Current understanding of CTLA-4: from mechanism to autoimmune diseases. *Front Immunol* (2023) 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1198365
118. Schneider H, Rudd CE. Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target CTLA-4. *Front Immunol* (2014) 5: doi: 10.3389/fimmu.2014.00619
119. Huber JA. Making methane down deep. *Science (1979)* (2015) 349:376–377. doi: 10.1126/science.aac6673

120. Gianhecchi E, Fierabracci A. Inhibitory receptors and pathways of lymphocytes: The role of PD-1 in Treg development and their involvement in autoimmunity onset and cancer progression. *Front Immunol* (2018) 9: doi: 10.3389/fimmu.2018.02374
121. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* (2016) 44:989–1004. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.001
122. Sato K, Yamashita-Kanemaru Y, Abe F, Murata R, Nakamura-Shinya Y, Kanemaru K, Muratani M, Veillette A, Goto M, Ito M, et al. DNAM-1 regulates Foxp3 expression in regulatory T cells by interfering with TIGIT under inflammatory conditions. doi: 10.1073/pnas.2021309118/-/DCSupplemental
123. Fuhrman CA, Yeh W-I, Seay HR, Saikumar Lakshmi P, Chopra G, Zhang L, Perry DJ, McClymont SA, Yadav M, Lopez M-C, et al. Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. *The Journal of Immunology* (2015) 195:145–155. doi: 10.4049/jimmunol.1402381
124. Lee DJ. The relationship between TIGIT+ regulatory T cells and autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* (2020) 83: doi: 10.1016/j.intimp.2020.106378
125. Shevach EM, Stephens GL. O P I N I O N The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? (2006). www.nature.com/reviews/immunol
126. Altman JD. T cells in COVID-19 — the kids are all right. *Nat Immunol* (2022) 23:647–649. doi: 10.1038/s41590-022-01190-6
127. Lui Y, Davis SJ. LAG-3: a very singular immune checkpoint. *Nat Immunol* (2018) 19:1278–1279. doi: 10.1038/s41590-018-0257-1
128. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* (2016) 44:989–1004. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.001
129. Li DY, Xiong XZ. ICOS+ Tregs: A Functional Subset of Tregs in Immune Diseases. *Front Immunol* (2020) 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.02104
130. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* (2010) 184:3433–3441. doi: 10.4049/JIMMUNOL.0904028
131. Chougnet C, Hildeman D. Helios-controller of Treg stability and function. *Transl Cancer Res* (2016) 5:S338–S341. doi: 10.21037/tcr.2016.07.37
132. Yu WQ, Ji NF, Gu CJ, Wang YL, Huang M, Zhang MS. Coexpression of Helios in Foxp3+Regulatory T Cells and Its Role in Human Disease. *Dis Markers* (2021) 2021: doi: 10.1155/2021/5574472

133. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia R V, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios– Cells Coexist within the Natural FOXP3+ T Regulatory Cell Subset in Humans. *The Journal of Immunology* (2013) 190:2001–2008. doi: 10.4049/jimmunol.1201379
134. Thornton AM, Shevach EM. Helios: still behind the clouds. *Immunology* (2019) 158:161–170. doi: 10.1111/imm.13115
135. Dhuban K Bin, d’Hennezel E, Nashi E, Bar-Or A, Rieder S, Shevach EM, Nagata S, Piccirillo CA. Coexpression of TIGIT and FCRL3 Identifies Helios+ Human Memory Regulatory T Cells. *J Immunol* (2015) 194:3687. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1401803
136. Polak K, Marchal P, Taroni C, Ebel C, Kirstetter P, Kastner P, Chan S. CD4+ regulatory T cells lacking Helios and Eos. *Biochem Biophys Res Commun* (2023) doi: 10.1016/j.bbrc.2023.06.087
137. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* (2011) 6: doi: 10.1371/journal.pone.0024226
138. Lam AJ, Uday P, Gillies JK, Levings MK. Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability. *Eur J Immunol* (2022) 52:75–84. doi: 10.1002/eji.202149318
139. Morina L, Jones ME, Oguz C, Kaplan MJ, Gangaplara A, Fitzhugh CD, Kanakry CG, Shevach EM, Buszko M. Co-expression of Foxp3 and Helios facilitates the identification of human T regulatory cells in health and disease. *Front Immunol* (2023) 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1114780
140. Aristin Revilla S, Kranenburg O, Coffey PJ. Colorectal Cancer-Infiltrating Regulatory T Cells: Functional Heterogeneity, Metabolic Adaptation, and Therapeutic Targeting. *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.903564
141. Ponader S, Burger JA. Bruton’s tyrosine kinase: From X-linked agammaglobulinemia toward targeted therapy for B-cell malignancies. *Journal of Clinical Oncology* (2014) 32:1830–1839. doi: 10.1200/JCO.2013.53.1046
142. Bousfiha AA, Jeddane L, Moundir A, Poli MC, Aksentijevich I, Cunningham-Rundles C, Hambleton S, Klein C, Morio T, Picard C, et al. The 2024 update of IUIS phenotypic classification of human inborn errors of immunity. *Journal of Human Immunity* (2025) 1: doi: 10.70962/jhi.20250002
143. Poli MC, Aksentijevich I, Bousfiha AA, Cunningham-Rundles C, Hambleton S, Klein C, Morio T, Picard C, Puel A, Rezaei N, et al. Human inborn errors of immunity: 2024 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Human Immunity* (2025) 1: doi: 10.70962/jhi.20250003
144. Yamashita M, Inoue K, Okano T, Morio T. Inborn errors of immunity—recent advances in research on the pathogenesis. *Inflamm Regen* (2021) 41: doi: 10.1186/s41232-021-00159-6

145. Schmidt RE, Grimbacher B, Witte T. Autoimmunity and primary immunodeficiency: Two sides of the same coin? *Nat Rev Rheumatol* (2018) 14:7–18. doi: 10.1038/nrrheum.2017.198
146. Chan AY, Torgerson TR. Primary immune regulatory disorders: A growing universe of immune dysregulation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2020) 20:582–590. doi: 10.1097/ACI.0000000000000689
147. Cepika AM, Sato Y, Liu JMH, Uyeda MJ, Bacchetta R, Roncarolo MG. Tregopathies: Monogenic diseases resulting in regulatory T-cell deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2018) 142:1679–1695. doi: 10.1016/j.jaci.2018.10.026
148. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Oksenhendler E, Picard C, et al. *Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee*. Springer US. (2022). 1473–1507 p. doi: 10.1007/s10875-022-01289-3
149. Kolukisa B, Barış S. Primary immune regulatory disorders and targeted therapies. *Turkish Journal of Hematology* (2021) 38:1–14. doi: 10.4274/tjh.galenos.2021.2020.0724
150. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, Rundles CC, Franco JL, Holland SM, Klein C, et al. The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* (2022) 42:1508–1520. doi: 10.1007/s10875-022-01352-z
151. Kennedy-Batalla R, Acevedo D, Luo Y, Esteve-Solé A, Vlaga A, Correa-Rocha R, Seoane-Reula ME, Alsina L. Treg in inborn errors of immunity: gaps, knowns and future perspectives. *Front Immunol* (2023) 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1278759
152. Chatila TA, Helms C, Bowcock AM, Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. JM2 , encoding a fork head – related protein , is mutated in X- linked autoimmunity – allergic dysregulation syndrome Find the latest version : JM2 , encoding a fork head – related protein , is mutated in X-linked autoimmunity – allergic dysregulation syn. (2000) 106:
153. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* (2001) 27:20–21. doi: 10.1038/83713
154. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* (2006) 108:1571–1579. doi: 10.1182/blood-2006-02-004747
155. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell’Acqua ML, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+

- Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* (2007) 110:1225–1232. doi: 10.1182/blood-2006-12-064527
156. Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: A lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci* (2016) 1417:5–22. doi: 10.1111/nyas.13011
 157. Ben-skowronek I. IpeX syndrome: Genetics and treatment options. *Genes (Basel)* (2021) 12:1–13. doi: 10.3390/genes12030323
 158. Kirchner A, Sanchez IM, Zalan A, Bhat G, Bain M. Identification of a novel variant of FOXP3 resulting in severe immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome highlights potential pitfalls of molecular testing. *Pediatr Dermatol* (2022) 39:483–485. doi: 10.1111/PDE.14936
 159. Du J, Wang Q, Yang S, Chen S, Fu Y, Spath S, Domeier P, Hagin D, Anover-Sombke S, Haouili M, et al. I M M U N O G E N O M I C S FOXP3 exon 2 controls T reg stability and autoimmunity. (2022). 5407 p. <https://www.science.org>
 160. Consonni F, Ciullini Mannurita S, Gambineri E. Atypical Presentations of IPEX: Expect the Unexpected. *Front Pediatr* (2021) 9:643094. doi: 10.3389/FPED.2021.643094/BIBTEX
 161. Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2007) 119:482–487. doi: 10.1016/j.jaci.2006.10.007
 162. Roth TL, Puig-Saus C, Yu R, Shifrut E, Carnevale J, Li PJ, Hiatt J, Saco J, Krystofinski P, Li H, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature* 2018 559:7714 (2018) 559:405–409. doi: 10.1038/s41586-018-0326-5
 163. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, Bulashevskaya A, Petersen BS, Schäffer AA, Grüning BA, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature Medicine* 2014 20:12 (2014) 20:1410–1416. doi: 10.1038/nm.3746
 164. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, Schickel JN, Tran DQ, Stoddard J, Zhang Y, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* (1979) (2014) 345:1623–1627. doi: 10.1126/SCIENCE.1255904/SUPPL_FILE/KUEHN.SM.PDF
 165. Gámez-Díaz L, Grimbacher B. Immune checkpoint deficiencies and autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Biomed J* (2021) 44:400–411. doi: 10.1016/j.bj.2021.04.005
 166. Charbonnier LM, Janssen E, Chou J, Ohsumi TK, Keles S, Hsu JT, Massaad MJ, Garcia-Lloret M, Hanna-Wakim R, Dbaiibo G, et al. Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function

- mutations in LRBA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2015) 135:217-227.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.019
167. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, Zhang Y, Liu Z, Fritz JM, Marsh R, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* (1979) (2015) 349:436–440. doi: 10.1126/SCIENCE.AAA1663/SUPPL_FILE/AAA1663-LO-SM.PDF
 168. Delage L, Carbone F, Riller Q, Zacharyus JL, Kerbellec E, Buzy A, Stolzenberg MC, Luka M, de Cevins C, Kalouche G, et al. NBEAL2 deficiency in humans leads to low CTLA-4 expression in activated conventional T cells. *Nat Commun* (2023) 14: doi: 10.1038/s41467-023-39295-7
 169. Afzali B, Grönholm J, Vandrovcova J, O'Brien C, Sun HW, Vanderleyden I, Davis FP, Khoder A, Zhang Y, Hegazy AN, et al. BACH2 immunodeficiency illustrates an association between super-enhancers and haploinsufficiency. *Nature Immunology* 2017 18:7 (2017) 18:813–823. doi: 10.1038/ni.3753
 170. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006 441:7090 (2006) 441:235–238. doi: 10.1038/nature04753
 171. Pillemer BBL, Xu H, Oriss TB, Qi Z, Ray A. Deficient SOCS3 expression in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and SOCS3-mediated suppression of Treg function. *Eur J Immunol* (2007) 37:2082–2089. doi: 10.1002/EJI.200737193
 172. Vogel TP, Leiding JW, Cooper MA, Forbes Satter LR. STAT3 gain-of-function syndrome. *Front Pediatr* (2023) 10: doi: 10.3389/fped.2022.770077
 173. Canna SW, Marsh RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. (2020). <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/135/16/1332/1724141/bloodbld2019000936c.pdf>
 174. Humblet-Baron S, Franckaert D, Dooley J, Bornschein S, Cauwe B, Schönefeldt S, Bossuyt X, Matthys P, Baron F, Wouters C, et al. IL-2 consumption by highly activated CD8 T cells induces regulatory T-cell dysfunction in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2016) 138:200-209.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1314
 175. Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, Morita R, Asakawa M, Chinen T, Yoshimura A. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *Journal of Experimental Medicine* (2011) 208:2055–2067. doi: 10.1084/JEM.20110428
 176. Hsieh WC, Hsu TS, Chang YJ, Lai MZ. IL-6 receptor blockade corrects defects of XIAP-deficient regulatory T cells. *Nat Commun* (2018) 9: doi: 10.1038/s41467-018-02862-4

177. Toskov V, Ehl S. Autoimmune lymphoproliferative immunodeficiencies (ALPID) in childhood: breakdown of immune homeostasis and immune dysregulation. *Mol Cell Pediatr* (2023) 10: doi: 10.1186/s40348-023-00167-1
178. Mazerolles F, Stolzenberg MC, Pelle O, Picard C, Neven B, Fischer A, Magerus-Chatinet A, Rieux-Laucat F. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-fas patients have an abnormal regulatory T cell (Treg) phenotype but display normal natural Treg-suppressive function on T cell proliferation. *Front Immunol* (2018) 9: doi: 10.3389/fimmu.2018.00718
179. Michalovich D, Nejntsev S. Activated PI3 kinase delta syndrome: From genetics to therapy. *Front Immunol* (2018) 9: doi: 10.3389/fimmu.2018.00369
180. Szczawinska-Poplonyk A, Schwartzmann E, Bukowska-Olech E, Biernat M, Gattner S, Korobacz T, Nowicki F, Wiczuk-Wiczewska M. The pediatric common variable immunodeficiency — from genetics to therapy: a review. *Eur J Pediatr* (2022) 181:1371–1383. doi: 10.1007/s00431-021-04287-6
181. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, Espinosa-Rosales FJ, Hammarström L, Nonoyama S, Quinti I, et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* (2016) 4:38–59. doi: 10.1016/j.jaip.2015.07.025
182. Więsik-Szewczyk E, Rutkowska E, Kwiecień I, Korzeniowska M, Sołdacki D, Jahnz-Różyk K. Patients with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune phenomena have lymphopenia and reduced treg, Th17, and NK cells. *J Clin Med* (2021) 10: doi: 10.3390/jcm10153356
183. Kutukculer N, Azarsiz E, Aksu G, Karaca NE. CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells, Th1 (CCR5, IL-2, IFN- γ) and Th2 (CCR4, IL-4, IL-13) type chemokine receptors and intracellular cytokines in children with common variable immunodeficiency. *Int J Immunopathol Pharmacol* (2016) 29:241–251. doi: 10.1177/0394632015617064
184. Cunill V, Clemente A, Lanio N, Barceló C, Andreu V, Pons J, Ferrer JM. Follicular T cells from smB- common variable immunodeficiency patients are skewed toward a Th1 phenotype. *Front Immunol* (2017) 8: doi: 10.3389/fimmu.2017.00174
185. Yesillik S, Agrawal S, Gollapudi S V, Gupta S. Phenotypic Analysis of CD4+ Treg, CD8+ Treg, and Breg Cells in Adult Common Variable Immunodeficiency Patients. *Int Arch Allergy Immunol* (2019) 180:150–158. doi: 10.1159/000501457
186. Humblet-Baron S, Sather B, Anover S, Becker-Herman S, Kasprovicz DJ, Khim S, Nguyen T, Hudkins-Loya K, Alpers CE, Ziegler SF, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *Journal of Clinical Investigation* (2007) 117:407–418. doi: 10.1172/JCI29539
187. Hsu AP. Not too little, not too much: the impact of mutation types in Wiskott-Aldrich syndrome and RAC2 patients. *Clin Exp Immunol* (2023) 212:137–146. doi: 10.1093/cei/uxad001

188. Lexmond WS, Goettel JA, Lyons JJ, Jacobse J, Deken MM, Lawrence MG, DiMaggio TH, Kotlarz D, Garabedian E, Sackstein P, et al. FOXP3+ Tregs require WASP to restrain Th2-mediated food allergy. *Journal of Clinical Investigation* (2016) 126:4030–4044. doi: 10.1172/JCI85129
189. Singh AK, Eken A, Hagin D, Komal K, Bhise G, Shaji A, Arkatkar T, Jackson SW, Bettelli E, Torgerson TR, et al. DOCK8 regulates fitness and function of regulatory T cells through modulation of IL-2 signaling. *JCI Insight* (2017) 2: doi: 10.1172/jci.insight.94275
190. Wilkie H, Janssen E, Leyva-Castillo JM, Geha RS. DOCK8 Expression in Regulatory T Cells Maintains their Stability and Limits Contact Hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology* (2021) 141:1503-1511.e3. doi: 10.1016/j.jid.2020.09.027
191. Villa A, Notarangelo LD, Roifman CM. Omenn syndrome: Inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2008) 122:1082–1086. doi: 10.1016/j.jaci.2008.09.037
192. Cassani B, Poliani PL, Moratto D, Sobacchi C, Marrella V, Imperatori L, Vairo D, Plebani A, Giliani S, Vezzoni P, et al. Defect of regulatory T cells in patients with Omenn syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2010) 125:209–216. doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.023
193. Nadeau K, Hwa V, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: An unsuspected cause of growth failure, immunodeficiency, and severe pulmonary disease. *Journal of Pediatrics* (2011) 158:701–708. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.12.042
194. Cohen AC, Nadeau KC, Tu W, Hwa V, Dionis K, Bezrodnik L, Teper A, Gaillard M, Heinrich J, Krensky AM, et al. Cutting Edge: Decreased Accumulation and Regulatory Function of CD4+CD25^{high} T Cells in Human STAT5b Deficiency. *The Journal of Immunology* (2006) 177:2770–2774. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.2770
195. Torgerson TR. “IPEX and IPEX-like disorders,” *Stiehm’s Immune Deficiencies: Inborn Errors of Immunity*. Elsevier (2020). p. 617–632 doi: 10.1016/B978-0-12-816768-7.00026-0
196. López-Nevado M, González-Granado LI, Ruiz-García R, Pleguezuelo D, Cabrera-Marante O, Salmón N, Blanco-Lobo P, Domínguez-Pinilla N, Rodríguez-Pena R, Sebastián E, et al. Primary Immune Regulatory Disorders With an Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome-Like Phenotype: Immunologic Evaluation, Early Diagnosis and Management. *Front Immunol* (2021) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.671755
197. Hargadon KM. Genetic dysregulation of immunologic and oncogenic signaling pathways associated with tumor-intrinsic immune resistance: a molecular basis for combination targeted therapy-immunotherapy for cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2023) 80: doi: 10.1007/s00018-023-04689-9
198. Toskov V, Ehl S. Autoimmune lymphoproliferative immunodeficiencies (ALPID) in childhood: breakdown of immune homeostasis and immune dysregulation. *Mol Cell Pediatr* (2023) 10: doi: 10.1186/s40348-023-00167-1

199. Wagner EF, Nebreda ÁR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* (2009) 9:537–549. doi: 10.1038/nrc2694
200. Canovas B, Nebreda AR. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2021) 22:346–366. doi: 10.1038/s41580-020-00322-w
201. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* (2012) 26:203–234. doi: 10.1101/gad.183434.111
202. Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH, Eng H, Nair MG, Makvandi P, Geoerger B, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol Cancer* (2023) 22: doi: 10.1186/s12943-023-01827-6
203. Hu X, li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther* (2021) 6: doi: 10.1038/s41392-021-00791-1
204. Xu Z, Chu M. Advances in Immunosuppressive Agents Based on Signal Pathway. *Front Pharmacol* (2022) 13: doi: 10.3389/fphar.2022.917162
205. Oray M, Abu Samra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf* (2016) 15:457–465. doi: 10.1517/14740338.2016.1140743
206. Fevang B. Treatment of inflammatory complications in common variable immunodeficiency (CVID): current concepts and future perspectives. *Expert Rev Clin Immunol* (2023) 19:627–638. doi: 10.1080/1744666X.2023.2198208
207. Wang M, Zhou J, Niu Q, Wang H. Mechanism of tacrolimus in the treatment of lupus nephritis. *Front Pharmacol* (2024) 15: doi: 10.3389/fphar.2024.1331800
208. Park YJ, Yoo SA, Kim M, Kim WU. The Role of Calcium–Calcineurin–NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases. *Front Immunol* (2020) 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.00195
209. Krawczyk A, Kravčenia B, Maślanka T. Mycophenolate mofetil: an update on its mechanism of action and effect on lymphoid tissue. *Front Immunol* (2024) 15: doi: 10.3389/fimmu.2024.1463429
210. Staats CE, Tett SE. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolate in Solid Organ Transplant Recipients. (2007). 13–58 p.
211. Burgers PMJ, Kunkel TA. Guest (guest) IP: 149.74.55.18 On: Wed. (2025) 18:59. doi: 10.1146/annurev-biochem
212. Cramer P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* (2019) 573:45–54. doi: 10.1038/s41586-019-1517-4
213. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* (2018) 87:897–919. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033910

214. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. (2000). 85–118 p. www.elsevier.com/locate/immpharm
215. Ali A, Qureshi A, Shigri AF, Alvi AM, Malikzai A. Leniolisib: a drug providing a promising avenue for the treatment of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome (APDS). *Annals of Medicine & Surgery* (2024) 86:3812–3813. doi: 10.1097/ms9.0000000000002189
216. Okkenhaug K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:675–704. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095946
217. Rao VK, Webster S, Dalm VASH, Annašediv AA, Annašedivá A, Martin Van Hagen P, Holland S, Rosenzweig SD, Christ AD, Sloth B, et al. Effective “activated PI3K δ syndrome”-targeted therapy with the PI3K δ inhibitor leniolisib Key Points. doi: 10.1182/blood
218. Specialization and Complementation of Humoral Immune Responses to Infection. Scholars Portal. (2019).
219. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3K δ and primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:702–714. doi: 10.1038/nri.2016.93
220. Coulter TI, Chandra A, Bacon CM, Babar J, Curtis J, Screaton N, Goodlad JR, Farmer G, Steele CL, Leahy TR, et al. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome: A large patient cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2017) 139:597–606.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.021
221. Duggan S, Al-Salama ZT. Leniolisib: First Approval. *Drugs* (2023) 83:943–948. doi: 10.1007/s40265-023-01895-4
222. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* (2012) 149:274–293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017
223. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009) 10:307–318. doi: 10.1038/nrm2672
224. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:39–68. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075024
225. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B, Worley PF, Kozma SC, Powell JD. The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment. *Immunity* (2009) 30:832–844. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.014
226. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, Sullivan SA, Nichols AG, Rathmell JC. Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4 $^{+}$ T Cell Subsets. *The Journal of Immunology* (2011) 186:3299–3303. doi: 10.4049/jimmunol.1003613
227. Zeng H, Yang K, Cloer C, Neale G, Vogel P, Chi H. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T reg-cell function. *Nature* (2013) 499:485–490. doi: 10.1038/nature12297

228. Bride KL, Vincent T, Smith-Whitley K, Lambert MP, Bleesing JJ, Seif AE, Manno CS, Casper J, Grupp SA, Teachey DT. Sirolimus is effective in relapsed/refractory autoimmune cytopenias: results of a prospective multi-institutional trial Key Points. (2016) doi: 10.1182/blood-2015-07
229. Demirkiran A, Hendrikx TK, Baan CC, Van Der Laan LJW. Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: Does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation* (2008) 85:783–789. doi: 10.1097/TP.0b013e318166910b
230. Williams NK, Bamert RS, Patel O, Wang C, Walden PM, Wilks AF, Fantino E, Rossjohn J, Lucet IS. Dissecting Specificity in the Janus Kinases: The Structures of JAK-Specific Inhibitors Complexed to the JAK1 and JAK2 Protein Tyrosine Kinase Domains. *J Mol Biol* (2009) 387:219–232. doi: 10.1016/j.jmb.2009.01.041
231. Quintás-Cardama A, Verstovsek S. Molecular pathways: JAK/STAT pathway: Mutations, inhibitors, and resistance. *Clinical Cancer Research* (2013) 19:1933–1940. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0284
232. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshouri T, Li J, Scherle PA, Caulder E, Wen X, Li Y, Waeltz P, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: Therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* (2010) 115:3109–3117. doi: 10.1182/blood-2009-04-214957
233. Das R, Guan P, Sprague L, Verbist K, Tedrick P, An QA, Cheng C, Kurachi M, Levine R, Wherry EJ, et al. Janus kinase inhibition lessens inflammation and ameliorates disease in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis Key Points. (2016) doi: 10.1182/blood
234. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer. *New England Journal of Medicine* (2013) 368:161–170. doi: 10.1056/nejmra1202117
235. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, DiPersio JF, Catalano J V., Deininger MWN, Miller CB, Silver RT, Talpaz M, et al. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol* (2017) 10:1–14. doi: 10.1186/s13045-017-0417-z
236. Xu Z, Chu M. Advances in Immunosuppressive Agents Based on Signal Pathway. *Front Pharmacol* (2022) 13: doi: 10.3389/fphar.2022.917162
237. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, et al. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* (2006) 126:375–387. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.042
238. Han JW, Joo DJ, Kim JH, Rha MS, Koh JY, Park HJ, Lee JG, Kim MS, Kim S Il, Shin EC, et al. Early reduction of regulatory T cells is associated with acute rejection in liver transplantation under tacrolimus-based immunosuppression with basiliximab induction. *American Journal of Transplantation* (2020) 20:2058–2069. doi: 10.1111/ajt.15789

239. Lee SK, Park MJ, Jhun JY, Beak JA, Choi JW, Rye JY, Jang JW, Bae SH, Yoon SK, Choi HJ, et al. Combination Treatment With Metformin and Tacrolimus Improves Systemic Immune Cellular Homeostasis by Modulating Treg and Th17 Imbalance. *Front Immunol* (2021) 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.581728
240. He X, Smeets RL, Koenen HJPM, Vink PM, Wagenaars J, Boots AMH, Joosten I. Mycophenolic acid-mediated suppression of human CD4+ T cells: More than mere guanine nucleotide deprivation. *American Journal of Transplantation* (2011) 11:439–449. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03413.x
241. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. (2000). 85–118 p. www.elsevier.com/locate/immpharm
242. Abdelwahab OA, Mechi A, Gahlan S, Hamadein FE, Kadhim H, Ismail D, Soliman Y, El-Samahy M. Efficacy and safety of mycophenolate mofetil in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol* (2024) 43:621–632. doi: 10.1007/s10067-023-06820-4
243. Mollaei-Kandelous Y, Ahmadpoor P, Nafar M, Khatami MR, Bonab SF, Tajik N, Shekarabi M, Amirzargar A. Frequency of CD39+, LAG3+, and CTLA4+ Regulatory T Cells in Two Different Immunosuppressive Protocols in Renal Allograft Recipients (Sirolimus vs Mycophenolate mofetil): A Cohort Report. *Iranian Journal of Immunology* (2022) 19:219–231. doi: 10.22034/iji.2022.92623.2161
244. Rodríguez-Gil A, Escamilla-Gómez V, Nufer M, Andújar-Sánchez F, Lopes-Ramos T, Bejarano-García JA, García-Guerrero E, Calderón-Cabrera C, Caballero-Velázquez T, García-Calderón CB, et al. Combined treatment of graft versus host disease using donor regulatory T cells and ruxolitinib. *Sci Rep* (2022) 12: doi: 10.1038/s41598-022-12407-x
245. Keenan C, Nichols KE, Albeituni S. Use of the JAK Inhibitor Ruxolitinib in the Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Front Immunol* (2021) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.614704
246. Fan S, Huo WX, Yang Y, Shen MZ, Mo XD. Efficacy and safety of ruxolitinib in steroid-refractory graft-versus-host disease: A meta-analysis. *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.954268
247. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, DiPersio JF, Catalano J V, Deininger MWN, Miller CB, Silver RT, Talpaz M, et al. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol* (2017) 10:1–14. doi: 10.1186/s13045-017-0417-z
248. Duggan S, Al-Salama ZT. Leniolisib: First Approval. *Drugs* (2023) 83:943–948. doi: 10.1007/s40265-023-01895-4
249. Rao VK, Webster S, Dalm VASH, Annašediv AA, Annašedivá A, Martin Van Hagen P, Holland S, Rosenzweig SD, Christ AD, Sloth B, et al. Effective “activated PI3Kd syndrome”-targeted therapy with the PI3Kd inhibitor leniolisib Key Points. doi: 10.1182/blood

250. Rao VK, Webster S, Annašediv AA, Annašedivá A, Plebani A, Schuetz C, Shcherbina A, Conlon N, Coulter T, Dalm VA, et al. A randomized, placebo-controlled phase 3 trial of the PI3K δ inhibitor leniolisib for activated PI3K δ syndrome. http://ashpublications.org/blood/article-pdf/141/9/971/2036280/blood_bld-2022-018546-main.pdf
251. Ali A, Qureshi A, Shigri AF, Alvi AM, Malikzai A. Leniolisib: a drug providing a promising avenue for the treatment of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome (APDS). *Annals of Medicine & Surgery* (2024) 86:3812–3813. doi: 10.1097/ms9.0000000000002189
252. Fanigliulo D, Lazzerini PE, Capecchi PL, Ulivieri C, Baldari CT, Laghi-Pasini F. Clinically-relevant cyclosporin and rapamycin concentrations enhance regulatory T cell function to a similar extent but with different mechanisms: An in-vitro study in healthy humans. *Int Immunopharmacol* (2015) 24:276–284. doi: 10.1016/j.intimp.2014.12.021
253. Hussain Y, Khan H. “Immunosuppressive Drugs,,” *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Elsevier (2022). p. 726–740 doi: 10.1016/B978-0-12-818731-9.00068-9
254. Seger C, Shipkova M, Christians U, Billaud EM, Wang P, Holt DW, Brunet M, Kunicki PK, Pawi T, Langman LJ, et al. Assuring the Proper Analytical Performance of Measurement Procedures for Immunosuppressive Drug Concentrations in Clinical Practice: Recommendations of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Immunosuppressive Drug Scientific Committee. (2016). <http://journals.lww.com/drug-monitoring>
255. Velleca A, Shullo MA, Dhital K, Azeka E, Colvin M, DePasquale E, Farrero M, García-Guereta L, Jamero G, Khush K, et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients. *Journal of Heart and Lung Transplantation* (2023) 42:e1–e141. doi: 10.1016/j.healun.2022.10.015
256. Nelson J, Alvey N, Bowman L, Schulte J, Segovia MC, McDermott J, Te HS, Kapila N, Levine DJ, Gottlieb RL, et al. Consensus recommendations for use of maintenance immunosuppression in solid organ transplantation: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy, American Society of Transplantation, and the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Pharmacotherapy* (2022) 42:599–633. doi: 10.1002/phar.2716
257. Ewp. COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP) GUIDELINE ON CLINICAL INVESTIGATION OF IMMUNOSUPPRESSANTS FOR SOLID ORGAN TRANSPLANTATION DRAFT AGREED BY EFFICACY WORKING PARTY END OF CONSULTATION (DEADLINE FOR COMMENTS). (2007). <http://www.emea.europa.eu>
258. Rodríguez-Gil A, Escamilla-Gómez V, Nufer M, Andújar-Sánchez F, Lopes-Ramos T, Bejarano-García JA, García-Guerrero E, Calderón-Cabrera C, Caballero-Velázquez T, García-Calderón CB, et al. Combined treatment of graft versus host disease using donor regulatory T cells and ruxolitinib. *Sci Rep* (2022) 12: doi: 10.1038/s41598-022-12407-x

259. Keenan C, Nichols KE, Albeituni S. Use of the JAK Inhibitor Ruxolitinib in the Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Front Immunol* (2021) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.614704
260. Fan S, Huo WX, Yang Y, Shen MZ, Mo XD. Efficacy and safety of ruxolitinib in steroid-refractory graft-versus-host disease: A meta-analysis. *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.954268
261. Rao VK, Webster S, Annašediv AA, Annašedivá A, Plebani A, Schuetz C, Shcherbina A, Conlon N, Coulter T, Dalm VA, et al. A randomized, placebo-controlled phase 3 trial of the PI3Kδ inhibitor leniolisib for activated PI3Kδ syndrome. http://ashpublications.org/blood/article-pdf/141/9/971/2036280/blood_bld-2022-018546-main.pdf
262. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, Andrä I, Andreati F, Annunziato F, Arranz E, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol* (2021) 51:2708–3145. doi: 10.1002/eji.202170126
263. Schiavo E, Martini B, Attardi E, Consonni F, Ciullini Mannurita S, Coniglio ML, Tellini M, Chiocca E, Fotzi I, Luti L, et al. Autoimmune Cytopenias and Dysregulated Immunophenotype Act as Warning Signs of Inborn Errors of Immunity: Results From a Prospective Study. *Front Immunol* (2022) 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.790455
264. Eckstein OS, Gulati N, Forbes L, Peckham-Gregory E, Ozuah NW, Poli MC, Vogel T, Mace EM, Orange JS, Caldwell J, et al. Genomic Characterization of a Pediatric Cohort with Non-Malignant Lymphoproliferative Disorders. *Blood* (2019) 134:83–83. doi: 10.1182/blood-2019-131884
265. Tsilifis C, Slatter MA, Gennery AR. Too much of a good thing: a review of primary immune regulatory disorders. *Front Immunol* (2023) 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1279201
266. Nelson CS, Baloh CH. Immunodeficiency: Overview of primary immune regulatory disorders (PIRDs). *Allergy Asthma Proc* (2024) 45:332–339. doi: 10.2500/aap.2024.45.240070
267. Sgrulletti M, Cifaldi C, Di Cesare S, Kroegler B, Del Duca E, Ferradini V, Graziani S, Bengala M, Di Matteo G, Moschese V. Case Report: Crossing a rugged road in a primary immune regulatory disorder. *Front Pediatr* (2023) 10: doi: 10.3389/fped.2022.1055091
268. Faletti L, Ehl S, Heeg M. Germline STAT3 gain-of-function mutations in primary immunodeficiency: Impact on the cellular and clinical phenotype. *Biomed J* (2021) 44:412–421. doi: 10.1016/j.bj.2021.03.003
269. Makkoukdji N, Pundit V, Wyke M, Giraldo J, Satnarine T, Kleiner GI, Gans M. Targeted treatments for immune dysregulation in inborn errors of immunity. *Exploration of Immunology* (2024) 4:218–237. doi: 10.37349/ei.2024.00138

270. Aykut A, Durmaz A, Karaca N, Gulez N, Genel F, Celmeli F, Cogurlu MT, Akcan M, Cicek D, Cipe FE, et al. Primary immune regulatory disorders (PIRD): expanding the mutation spectrum in Turkey and identification of sixteen novel variants. *Immunol Res* (2024) 72:714–726. doi: 10.1007/s12026-024-09477-6
271. Schuyler RP, Jackson C, Garcia-Perez JE, Baxter RM, Ogolla S, Rochford R, Ghosh D, Rudra P, Hsieh EWY. Minimizing Batch Effects in Mass Cytometry Data. *Front Immunol* (2019) 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.02367
272. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, Geman D, Baggerly K, Irizarry RA. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet* (2010) 11:733–739. doi: 10.1038/nrg2825
273. Büttner M, Miao Z, Wolf FA, Teichmann SA, Theis FJ. A test metric for assessing single-cell RNA-seq batch correction. *Nat Methods* (2019) 16:43–49. doi: 10.1038/s41592-018-0254-1
274. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:21–29. doi: 10.1038/nri.2016.125
275. Campos JS, Henrickson SE. Defining and targeting patterns of T cell dysfunction in inborn errors of immunity. *Front Immunol* (2022) 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.932715
276. Carr EJ, Dooley J, Garcia-Perez JE, Lagou V, Lee JC, Wouters C, Meyts I, Goris A, Boeckxstaens G, Linterman MA, et al. The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol* (2016) 17:461–468. doi: 10.1038/ni.3371
277. Garcia-Prat M, Álvarez-Sierra D, Aguiló-Cucurull A, Salgado-Perandrés S, Briongos-Sebastian S, Franco-Jarava C, Martin-Nalda A, Colobran R, Montserrat I, Hernández-González M, et al. Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. *Cytometry B Clin Cytom* (2019) 96:223–233. doi: 10.1002/cyto.b.21728
278. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, Schickel JN, Tran DQ, Stoddard J, Zhang Y, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* (1979) (2014) 345:1623–1627. doi: 10.1126/science.1255904
279. Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, Niemela JE, Deenick EK, Palendira U, Avery DT, Moens L, Cannons JL, Biancalana M, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol* (2014) 15:88–97. doi: 10.1038/ni.2771
280. Passerini L, Di Nunzio S, Gregori S, Gambineri E, Cecconi M, Seidel MG, Cazzola G, Perroni L, Tommasini A, Vignola S, et al. Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome. *Eur J Immunol* (2011) 41:1120–1131. doi: 10.1002/eji.201040909

281. Waldmann TA, Blaes RM, Broder S, Krakauer RS. Disorders of suppressor immunoregulatory cells in the pathogenesis of immunodeficiency and autoimmunity. *Ann Intern Med* (1978) 88:226–238. doi: 10.7326/0003-4819-88-2-226
282. Sagawa A, Abdou NI. Suppressor-cell dysfunction in systemic lupus erythematosus. Cells involved and in vitro correction. *Journal of Clinical Investigation* (1978) 62:789–796. doi: 10.1172/JCI109190
283. Westera L, van Hoeven V, Drylewicz J, Spierenburg G, van Velzen JF, de Boer RJ, Tesselaar K, Borghans JAM. Lymphocyte maintenance during healthy aging requires no substantial alterations in cellular turnover. *Aging Cell* (2015) 14:219–227. doi: 10.1111/accel.12311
284. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: Emerging concepts in aging of the immune system review-article. *Nat Immunol* (2018) 19:10–19. doi: 10.1038/s41590-017-0006-x
285. Eguizabal C, Herrera L, Inglés-Ferrándiz M, Izpisua Belmonte JC. Treating primary immunodeficiencies with defects in NK cells: from stem cell therapy to gene editing. *Stem Cell Res Ther* (2020) 11: doi: 10.1186/s13287-020-01964-5
286. Wu Y, Sun X, Kang K, Yang Y, Li H, Zhao A, Niu T. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: current treatment advances, emerging targeted therapy and underlying mechanisms. *J Hematol Oncol* (2024) 17: doi: 10.1186/s13045-024-01621-x
287. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, Bulashevskaya A, Petersen BS, Schäffer AA, Grüning BA, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* (2014) 20:1410–1416. doi: 10.1038/nm.3746
288. Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C, Xia J, Tan TG, Sefik E, Yajnik V, et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* (2014) 40:569–581. doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.012
289. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, Zhang Y, Liu Z, Fritz JM, Marsh R, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* (1979) (2015) 349:436–440. doi: 10.1126/science.aaa1663
290. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3 + Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* (2019) 50:302–316. doi: 10.1016/j.immuni.2019.01.020
291. NovalRivas M, Burton OT, Wise P, Charbonnier LM, Georgiev P, Oettgen HC, Rachid R, Chatila TA. Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-Cell-like lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy. *Immunity* (2015) 42:512–523. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.004
292. McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* (2015) 523:612–616. doi: 10.1038/nature14468

293. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:486–499. doi: 10.1038/nri3862
294. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, Weaver CT. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* (2007) 8:931–941. doi: 10.1038/ni1504
295. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* (2012) 32:23–63. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30
296. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* (1979) (2018) 359:1350–1355. doi: 10.1126/science.aar4060
297. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* (2015) 7: doi: 10.1126/scitranslmed.aad4134
298. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* (2006) 212:256–271. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00423.x
299. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:21–29. doi: 10.1038/nri.2016.125
300. Saeys Y, Van Gassen S, Lambrecht BN. Computational flow cytometry: Helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:449–462. doi: 10.1038/nri.2016.56
301. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:191–200. doi: 10.1038/nri3158
302. Pulendran B, Davis MM. The science and medicine of human immunology. *Science* (1979) (2020) 369: doi: 10.1126/science.aay4014
303. Coulter TI, Chandra A, Bacon CM, Babar J, Curtis J, Screaton N, Goodlad JR, Farmer G, Steele CL, Leahy TR, et al. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome: A large patient cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2017) 139:597–606.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.021
304. Tuijnenburg P, Lango Allen H, Burns SO, Greene D, Jansen MH, Staples E, Stephens J, Carss KJ, Biasci D, Baxendale H, et al. Loss-of-function nuclear factor κ B subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2018) 142:1285–1296. doi: 10.1016/j.jaci.2018.01.039
305. Magerus-Chatinet A, Neven B, Stolzenberg MC, Daussy C, Arkwright PD, Lanzarotti N, Schaffner C, Cluet-Dennetiere S, Haerynck F, Michel G, et al. Onset of autoimmune

- lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *Journal of Clinical Investigation* (2011) 121:106–112. doi: 10.1172/JCI43752
306. Thaventhiran JED, Lango Allen H, Burren OS, Rae W, Greene D, Staples E, Zhang Z, Farmery JHR, Simeoni I, Rivers E, et al. Whole-genome sequencing of a sporadic primary immunodeficiency cohort. *Nature* (2020) 583:90–95. doi: 10.1038/s41586-020-2265-1
 307. Zhang Q, Liu Z, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Bigio B, Yang R, Arias AA, Zhou Q, Han JE, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* (1979) (2020) 370: doi: 10.1126/science.abd4570
 308. Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J, Sullivan KM, Burgin G, Graham DB, Herbst RH, Rogel N, Slyper M, Waldman J, et al. Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis. *Cell* (2019) 178:714–730.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.029
 309. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, Goodman SM, Tabechian D, Hughes LB, Salomon-Escoto K, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* (2019) 20:928–942. doi: 10.1038/s41590-019-0378-1
 310. Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (2018) 18:35–45. doi: 10.1038/nri.2017.76
 311. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev* (2009) 228:273–287. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x
 312. Patton DT, Garden OA, Pearce WP, Clough LE, Monk CR, Leung E, Rowan WC, Sancho S, Walker LSK, Vanhaesebroeck B, et al. Cutting Edge: The Phosphoinositide 3-Kinase p110δ Is Critical for the Function of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* (2006) 177:6598–6602. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.6598
 313. Soond DR, Bjørge E, Moltu K, Dale VQ, Patton DT, Torgersen KM, Galleway F, Twomey B, Clark J, Gaston JSH, et al. PI3K p110δ regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. *Blood* (2010) 115:2203–2213. doi: 10.1182/blood-2009-07-232330
 314. Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One* (2009) 4: doi: 10.1371/journal.pone.0005994
 315. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3 + regulatory T cells. *Blood* (2005) 105:4743–4748. doi: 10.1182/blood-2004-10-3932
 316. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B, Worley PF, Kozma SC, Powell JD. The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment. *Immunity* (2009) 30:832–844. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.014
 317. Shen C, Mao Z, Chen T, Wei Y, Zhou T, Zhong N, Zhu G, Shi Q, Xie Z, Zhao H, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2-Arylamino-pyrimidine Derivatives as Dual

- Cathepsin L and JAK Inhibitors for the Treatment of Acute Lung Injury. *J Med Chem* (2024) doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c02030
318. Fridman JS, Scherle PA, Collins R, Burn TC, Li Y, Li J, Covington MB, Thomas B, Collier P, Favata MF, et al. Selective Inhibition of JAK1 and JAK2 Is Efficacious in Rodent Models of Arthritis: Preclinical Characterization of INCB028050. *The Journal of Immunology* (2010) 184:5298–5307. doi: 10.4049/jimmunol.0902819
 319. Villarino A V., Kanno Y, O'Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol* (2017) 18:374–384. doi: 10.1038/ni.3691
 320. Ghoreschi K, Jesson MI, Li X, Lee JL, Ghosh S, Alsup JW, Warner JD, Tanaka M, Steward-Tharp SM, Gadina M, et al. Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550). *The Journal of Immunology* (2011) 186:4234–4243. doi: 10.4049/jimmunol.1003668
 321. Committee for Medicinal Products for Human Use ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis Step5. (2022). www.ema.europa.eu/contact
 322. Fda, Cder. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations. (2018). <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm>

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

8.

ANEXOS

"Ella no solo dominó las máquinas. Enseñó a otras mujeres a dominarlas."

— Dorothy Vaughan

```
each: function(e, n), {  
  var n = 1;  
  4 = length,  
  e = e(e);  
  if (r) {  
    for (i in o : e i+)  
      if (r = t.apply(e[1], n), r === 1) break  
  } else  
    for (! in e)  
      if (r = t.call(e[1], 1, e = 1) break  
  } else  
    return e  
}  
b && b.call('wefeffu0000') ? function(e) {  
  return null == e ? ".b.call(e)  
} : function(e) { == e + "" ) .+ " ).replace(C, ", )  
makeArray: function(e, t) {  
  var a = 1 | 1;  
  return null == a & M(MObject()) ? x.merge(n, "string" ==  
  )  
  inArray: function(e, t) {  
    var a = 1 | 1;  
    return null == e & M(MObject(e) ? x.merge(n, "string" ==
```

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

8. Anexos

8.1 Anexo I: Consentimiento informado de pacientes

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar a usted o su "hijo/a. El estudio ha sido aprobado por un Comité de Ética de la Investigación, de acuerdo con la legislación vigente. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en el tratamiento de usted o su "hijo/a.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Las inmunodeficiencias primarias, también conocidas como errores innatos de la inmunidad, son un grupo de enfermedades congénitas (nacemos con ellas) denominadas raras o minoritarias por ser poco frecuentes. Aunque inicialmente se pensó que las infecciones eran la principal manifestación de estas enfermedades, actualmente sabemos que alrededor del 25% de los pacientes afectados sufrirán alguna complicación que llamamos de "desregulación inmune", lo que implica: alguna enfermedad autoinmune, autoinflamatoria o linfoproliferación. Estas manifestaciones en ocasiones son difíciles de tratar y afectan a la calidad de vida de los pacientes. Se han descrito Las células T reguladoras (Treg) son un tipo de célula, que como su nombre indica, tienen como principal función regular el sistema inmunitario. Hipotetizamos que cuando esta célula no funciona adecuadamente en una persona, esta puede desarrollar síntomas de desregulación inmune. Por ello, evaluar la función de la Treg puede ser crucial para conocer si efectivamente existen alteraciones en su función. Además, consideramos que modificar directamente esta célula podría ser una opción de tratamiento futuro en algunos pacientes. Por este motivo se ha diseñado este estudio: estudiaremos las células inmunes de la sangre, incluidas las células Treg, mediante técnicas sofisticadas y exhaustivas, para entender mejor cuál es su disfunción en pacientes con inmunodeficiencias primarias y síntomas de desregulación inmune; y finalmente, averiguar si una terapia basada en Treg podría ser el tratamiento de ciertas manifestaciones autoinmunes o inflamatorias. Por este motivo

consideramos seleccionar pacientes con estas manifestaciones y estudiar la función inmune y de las células Treg en usted o su "hijo/a.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

De este estudio usted o su "hijo/a no obtendrá un beneficio personal directo, sino que contribuirá a mejorar el conocimiento de la enfermedad que padece usted o su "hijo/a y a explorar nuevas alternativas terapéuticas. Por otro lado, no supone ningún riesgo para usted o su "hijo/a.

CONFIDENCIALIDAD

El Hospital Sant Joan de Deu (Calle Sant Joan de Deu no 2 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona) como responsable del tratamiento de sus datos, le informa que el tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustará a la legislación vigente (Reglamento Europeo UE 2016/679 y Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de Protección de Datos Personales). Los datos para este estudio se recogerán identificados únicamente mediante un código, por lo que no se incluirá ningún tipo de información que permita identificar a los participantes. Solo el médico del estudio y sus colaboradores podrán relacionar los datos recogidos en el estudio con su historia clínica. Su identidad no estará al alcance de ninguna otra persona a excepción de una urgencia médica o requerimiento legal. Podrán tener acceso a su información personal identificada, las autoridades sanitarias, el Comité de Ética de Investigación y personal autorizado por el promotor del estudio, cuando sea necesario para comprobar datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de acuerdo con la legislación vigente. Solo se cederán a terceros y a otros países los datos codificados, que en ningún caso contendrán información que pueda identificar al participante directamente (como nombre y apellidos, iniciales, dirección, número de la seguridad social, etc.). En el supuesto de que se produjera esta cesión, sería para la misma finalidad del estudio descrito y garantizando la confidencialidad. No se tomarán decisiones automatizadas de sus datos ni se elaborarán perfiles. Si se realizara una transferencia de datos codificados fuera de la UE, ya sea a entidades relacionadas con el centro hospitalario donde usted participa, o a investigadores que colaboren con su médico, sus datos quedaran protegidos por salvaguardas como contratos u otros mecanismos establecidos por las autoridades de protección de datos. Usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición, supresión, limitación del tratamiento y portabilidad (solicitar una copia o que se trasladen a un tercero) de los datos que ha facilitado para el estudio. Para ejercitar estos derechos, o si desea saber más sobre confidencialidad, deberá dirigirse al investigador principal del estudio o al delegado de Protección de Datos del Hospital Sant Joan de Deu a través de dpd@sjdhospitalbarcelona.org. Asimismo, tienen derecho a dirigirse, si no quedara satisfecho/a, a la Autoritat Catalana de Protecció de dades (<http://apdcat.gencat.cat/ca/contacte/apdcat@gencat.cat>) o a la Agencia de Protección de Datos (<http://www.agpd.es/portalwebAGPD/CanalDelCiudadano/index-ides-idphp.php>). Los datos ya recogidos no se pueden eliminar, aunque usted abandone el estudio, para

garantizar la validez de la investigación, pero no se recogerán nuevos datos si usted decide dejar de participar. El Investigador conservaran los datos recogidos para el estudio al menos hasta 5 años tras su finalización. Posteriormente, la información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el investigador o promotor para otros fines de investigación científica si el paciente hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Si da su consentimiento, los datos recogidos durante este estudio, podrían utilizarse para futuros proyectos de investigación relacionados con este, siempre manteniendo la confidencialidad tal como se ha expuesto.

OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

La participación usted o su "hijo/a en este estudio conlleva la obtención de datos clínicos y de muestras de sangre que se obtendrán en el curso del proceso de seguimiento habitual de la enfermedad de usted o su "hijo/a. No supondrá más visitas que las propias del seguimiento habitual. La visita puede alargarse aproximadamente 15 minutos más, para la discusión de la información detallada en esta hoja. La obtención de las muestras de sangre será al inicio del estudio y tras obtención del consentimiento informado, y a los 3 y 6 meses (3 veces en total) solo en caso de que usted o su "hijo/a inicie algún tratamiento inmunosupresor, y siempre que esta cantidad se encuentre dentro de los parámetros éticos establecidos sobre el volumen de sangre extraíble para recerca según el peso del paciente. De conformidad con lo que establece la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011 por el que se regula la utilización de muestras biológicas en investigación, al firmar este documento usted acepta que se utilicen las muestras que se obtendrán para las finalidades del presente estudio. Los estudios que se realizaran sobre la muestra de sangre de usted o su hijo/a son estudios de función inmune de los linfocitos T reguladores y las vías inmunes relacionadas que permiten evitar las enfermedades por desregulación inmune y estudios genéticos sobre el DNA de usted o su hijo/a para el diagnóstico de su inmunodeficiencia primaria.

Las muestras usted o su hijo/a serán procesadas en el momento o se mantendrán almacenadas en el Biobanco del hospital hasta su utilización, según cada uno de los objetivos de este estudio. Se utilizará un código para identificar su muestra y no se utilizará ningún dato de usted o su "hijo/a que pueda desvelar su identidad. Únicamente el médico del estudio y sus colaboradores podrán relacionar la muestra con usted o su hijo/a. Los datos que se deriven de la utilización de estas muestras se trataran del mismo modo que el resto de los datos que se obtengan durante este estudio.

La cesión de muestras biológicas para este estudio es gratuita y voluntaria. Esto supone que usted o su hijo/a no tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que pudieran derivarse del resultado de la investigación biomédica. Si se obtuviera información relevante que pudiera afectar a la salud usted o su hijo/a o a la de sus familiares, se le notificara. En caso de que fuera necesario

contactar con usted o su hijo/a, se utilizarían los datos que constan en su historia clínica. No obstante, se respetará su derecho a decidir que no se le comuniquen estos, para lo que puede marcar la casilla que se encuentra en el formulario de consentimiento. En el curso del proceso asistencial se realizarán análisis genéticos por paneles de genes conocidos hasta la fecha; en caso de no identificarse la causa genética, podrán realizarse en un futuro estudios avanzados con relación a la enfermedad de usted o su hijo/a, y cuyos resultados, al tratarse de estudios de investigación exploratorios, pueden no proporcionar de forma inmediata, información útil para guiar el diagnóstico o el tratamiento.

8.2 Anexo II: Plan de gestión de datos



Plan de gestión de datos del proyecto coordinado PI21/00211 y PI21/0132

Investigadoras Principales: Laia Alsina. Elena Seoane.
Coordinadora del Proyecto: Laia Alsina.

Versión 1: 24 de agosto 2022

Versión 2: 26 noviembre de 2022.

Versión 3: 2 de febrero de 2023.

1-Resumen de los datos:

Para este proyecto se utilizarán datos clínicos y analíticos de pacientes pediátricos afectados de errores congénitos de la inmunidad (ECI) y manifestaciones de desregulación inmune, atendidos en los Hospitales Sant Joan de Déu y Gregorio Marañón.

Se prevé la participación de 50 pacientes por el HSJD y otros 50 por parte del HGUGM.

Tipo y formato de datos que serán recolectados/generados dentro del Proyecto

Solo se recopilarán los datos necesarios para lograr los objetivos de la investigación.

Durante el proyecto se producirán los siguientes datos (147 tipos de datos en total, **ver documento Anexo 1**):

- Datos demográficos: fecha de nacimiento, edad, sexo, raza y etnia.
- Datos clínicos: historial de la enfermedad (fecha en el diagnóstico de la ECI, manifestaciones clínicas infecciosas y de desregulación, daño de órganos diana), tratamientos, talla, peso, examen físico, resultados radiológicos, anatomo-patológicos y analíticos de rutina, antecedentes familiares de consanguinidad.
- Datos de investigación: inmunofenotipado, transcriptómica, función de células Treg, datos de matriz de fosforilación, datos genéticos relacionados con la enfermedad (existencia de variantes patogénicas en los genes asociados a ECI).
- Otros datos: puntuación de actividad de desregulación e inmunodeficiencia (IDDA score).

Las variables clínicas necesarias para completar el estudio se obtendrán directamente de los participantes a través de su consentimiento, y de conformidad con lo dispuesto en los artículos 6.1.a) y 9.2.a) del Reglamento General de Protección de Datos-RGPD (UE) 2016/679 (en adelante (en adelante. RGPD).



Las variables inmunológicas necesarias para completar el estudio se obtendrán de las muestras de sangre extraídas a los pacientes a través de su consentimiento, y de conformidad con lo dispuesto en los artículos 6.1.a) y 9.2.a) del RGPD.

Por otro lado, se abordan diversas preguntas en el proyecto y las mismas están contempladas en la página 11 de la *"HEALTH RESEARCH PROJECTS PROPOSAL APPLICATION FORM"*- Characterization of the immunological alterations, specifically in Treg cells, involved in immune dysregulation in pediatric patients with inborn errors of immunity, towards targeted therapies, apartados *"HYPOTHESIS"*, *"Specific objectives"*:

2-Procedimiento proporcionado para acceder a los datos (quién, cómo y cuándo puede acceder):

La información obtenida durante el estudio sólo se utilizará para los fines del estudio. Los datos personales no serán utilizados con fines comerciales. Solo el personal directamente involucrado en el proyecto de investigación y autorizado por el Hospital Sant Joan de Déu y el Hospital Gregorio Marañón, el Comité de Ética y las autoridades sanitarias podrán disponer de los datos de los pacientes incluidos en el estudio. Los datos serán seudonimizados y recolectados en un repositorio seguro, aplicando las medidas de seguridad que reglamentariamente se establecen (ver punto 4). Posteriormente, las muestras serán enviadas al Hospital Sant Joan de Déu para su posterior y parcial almacenamiento, en lo relativo a las muestras de RNA y PBMCs. Las muestras facilitadas al Hospital Sant Joan de Déu podrán a su vez enviarse a países fuera de la Comunidad Europea, produciéndose, por lo tanto, una transferencia internacional de datos que será gestionada por el propio Hospital con el centro colaborador cuyo investigador principal es Damien Chaussabel, previa firma de un contrato que garantice y respalde dicho intercambio.

Parte de los datos generados en el estudio serán anonimizados para su posterior publicación y distribución en medios científicos (ej. revistas, congresos, etc.)

3-Propiedad y origen de los datos: Los resultados son propiedad de quien los genera. Ambas investigadoras principales son responsables de la recogida de datos, la base de datos general, así como su propiedad. La IP coordinadora del estudio (Dra. Laia Alsina) actuará como controladora de los datos en el marco de este estudio (ej. cuaderno de recogida de datos, petición de pruebas médicas, revisión de los estudios realizados).

Toda la información recogida y procesada, se almacenará en el Red Cap del Hospital Sant Joan de Déu.



En relación al origen de los datos indicar que los mismos se van a obtener de las propias Historias Clínicas de los pacientes, del propio paciente, así como de las pruebas que se requieran dentro del alcance del proyecto.

4-Repositorio para depósito de datos: El almacenamiento de datos se realizará aplicando las medidas de seguridad que reglamentariamente se establecen. Los datos se recogerán mediante la plataforma REDCap (Research Electronic Data Capture) alojada en el servidor del Hospital Sant Joan de Déu y sólo serán accesibles en equipos que dispongan de una conexión de confianza vía VPN y credenciales seguras (certificados, claves RSA o contraseñas complejas). REDCap es una aplicación web segura que cumple con la normativa de protección de datos digitales.

Los datos de identificación, datos clínicos y otros datos especificados en [Anexo 1](#) serán recabados por los profesionales médicos responsables del paciente en REDCap. Así mismo, dentro de REDCap se distinguirá entre los datos que pertenecen a cada paciente y a cada Hospital.

La Dra Laia Alsina, como coordinadora del proyecto, tendrá asignado en REDCap un rol administrador del proyecto (acceso y control sobre toda la base de datos). El resto de usuarios con credenciales de acceso sólo tendrán acceso limitado para añadir datos. Ver [Anexo 2](#). Al inicio del proyecto, la base de datos REDCap se moverá a modo Producción para que no se pueda modificar fácilmente (que puede hacer que se pierdan datos introducidos) y periódicamente se realizará una copia de seguridad de la base de datos.

5-Procedimiento previsto para garantizar los requisitos éticos y legales específicos: El proyecto incluye la recopilación y tratamiento de datos personales. Respecto al tratamiento de datos de identificación (pseudonimizados) las partes implementarán medidas técnicas y organizativas apropiadas para garantizar que los requisitos del RGPD y la ley nacional de protección de datos (Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales o LOPGDD), garantizando la protección de los datos personales y demostrando el cumplimiento de dichas leyes y reglamentos. Concretamente, las IP Dra. Alsina y Dra. Seoane crearán un el código peusoanónimo para cada paciente, y custodiarán un documento con el que irán generando nuevos códigos pseudoanónimos y registrando a qué número de historia clínica (NHC) corresponde cada código. Así, el código de cada paciente será su NHC seguido de S (si proviene de Sant Joan de Déu) o G (si proviene del Hospital Gregorio Marañón). Este código peusoanónimo será utilizado para identificar las muestras de sangre para los estudios inmunológicos. De esta forma, además, los operarios del laboratorio estarán cegados a la hora de interpretar los resultados. La codificación de las muestras será la siguiente: PIRD-S o G-número consecutivo-T0,T1,T2.

Se ha desarrollado una evaluación del impacto en la privacidad de los datos. El delegado de protección de datos de la Fundació Sant Joan de Déu y la



Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM) revisarán y aprobarán el presente documento. Se definirán todas las acciones necesarias para garantizar un enfoque responsable y un control adecuado.

Se observarán medidas de confidencialidad y seguridad durante todo el proyecto, de acuerdo con la legislación vigente en la protección de datos de carácter personal. El consentimiento específico del estudio se detalla en el [Anexo 3](#).

El proyecto empleará diferentes mecanismos para garantizar la armonización y comparabilidad de los datos entre los socios: un marco analítico y metodología, un plan de investigación y protocolos y herramientas para proporcionar orientación científica para la recopilación de datos y análisis de datos, así como la coordinación y comunicación regular a lo largo del proceso de investigación. Se ha redactado un protocolo consensuado para el estudio funcional de las Treg así como unificado el panel de citometría de flujo extendido y de Treg. Asimismo, se ha realizado una prueba de análisis de poblaciones celulares en paralelo entre los dos laboratorios para asegurar concordancia. Por último, cada dos meses, desde el 30 de noviembre de 2021, se realizan reuniones cada 2 meses de seguimiento.

6-Requisitos éticos y legales: el proyecto cumplirá con todos los principios éticos fundamentales expuestos en la Carta de Derechos de la Unión Europea (Diario Oficial de la Unión Europea, C 303, 14 de diciembre de 2007); el reglamento de protección de datos europeo, el Reglamento General de Protección de Datos (GDPR 2016/679), la Ley española 14/2007 (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica). El protocolo de estudio y las hojas de consentimiento informado han sido aprobadas por el Comité de Ética del Hospital Joan de Déu y Gregorio Marañón ([Anexo 3](#)). Por cada individuo enrolado en el estudio, se solicitará el consentimiento informado. Como los sujetos son menores de edad, el consentimiento informado será firmado por sus padres o tutores. Para pacientes con 12 o más años, también se solicitará un asentimiento informado.

7-Datos FAIR: Al inicio del proyecto se creará un diccionario de metadatos en base al Anexo 1. Los resultados inmunológicos se harán accesibles al acabar el estudio bajo demanda al investigador principal dado que en la actualidad no existe un repositorio de datos de citometría de flujo o de cultivos de función celular. La nomenclatura y metodología utilizadas para el estudio de las poblaciones celulares es la estándar (Cossarizza A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). Eur J Immunol. 2021 Dec;51(12):2708-3145), lo que permitirá que sean datos interoperables y reutilizables. Los datos de transcriptómica si se harán accesibles a través de Gene Expression Omnibus (GEO) repository at the

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) siendo accesibles, interoperables y reutilizables.

8-Recursos utilizados

Se realizó una mesa redonda con carácter formativo cuyo propósito era explicar el alcance, importancia y funcionamiento del Plan de Gestión de Datos, además se difundió una serie de directrices con el contenido mínimo del PGD y necesidad de su implementación para una serie de proyectos, así como recursos online para ayudar en la generación de PGD.

Se anexa al presente PGD parte de las directrices recibidas por la Fundación de Investigación Biomédica del HGUGM.

9- Políticas relacionadas

Tanto SJD como HGUGM disponen de políticas sobre protección de datos. En la intranet del HGUGM existen publicadas una serie de políticas, procedimientos y normativa relativa a la seguridad de la información y protección de Datos. Se adjunta captura de alguna de las normativas publicadas:



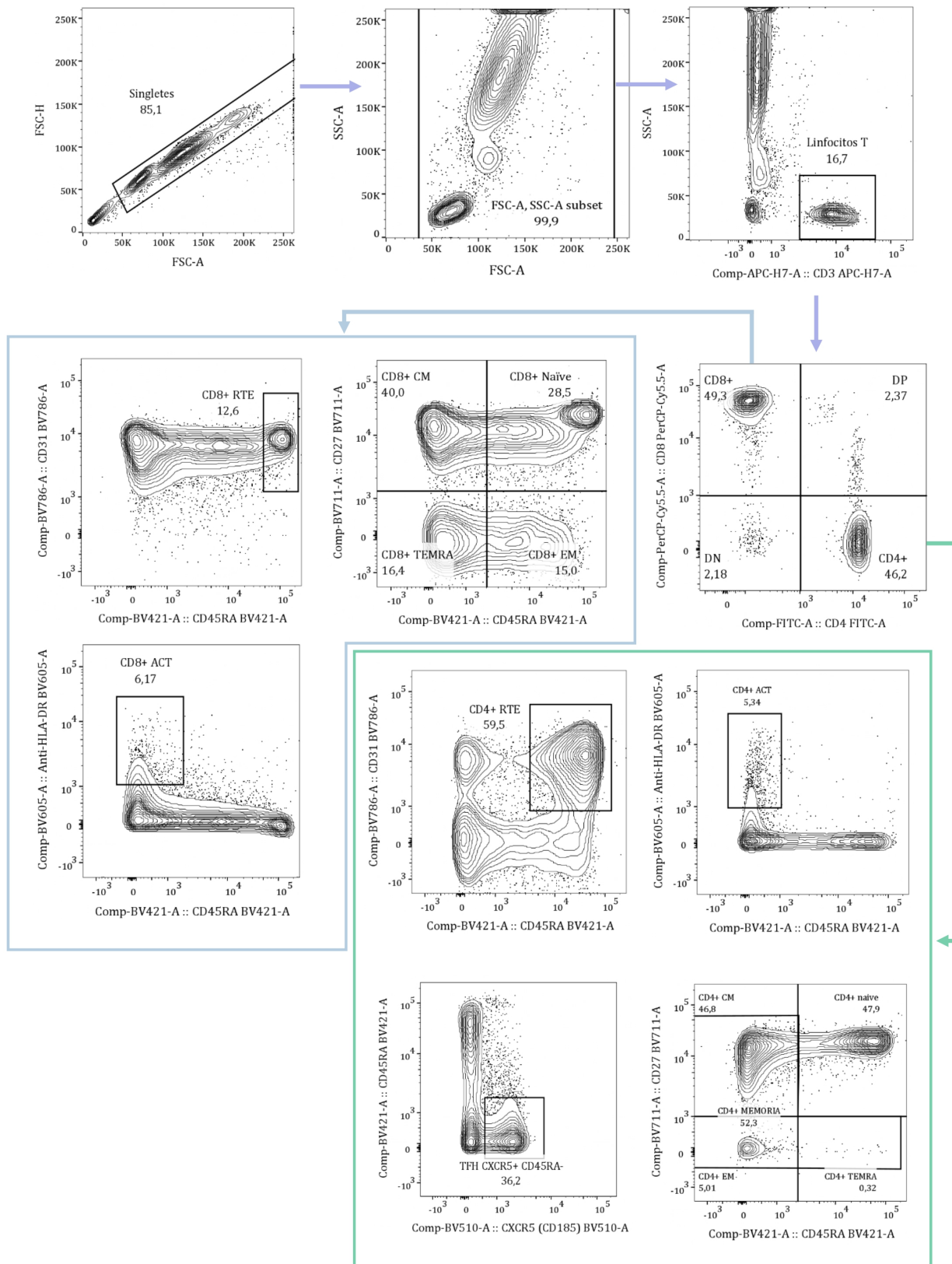
Además, a nivel de Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, existe una política de información:

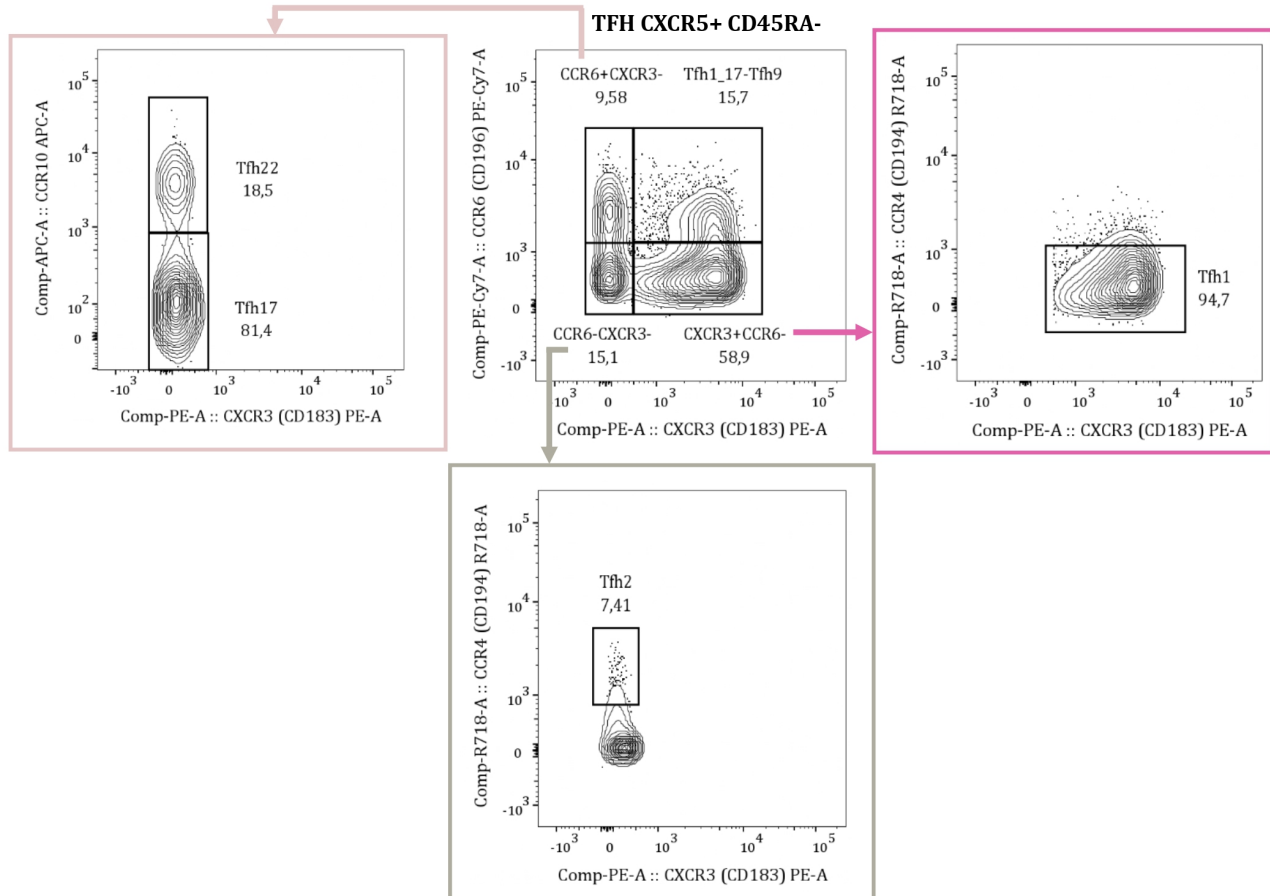
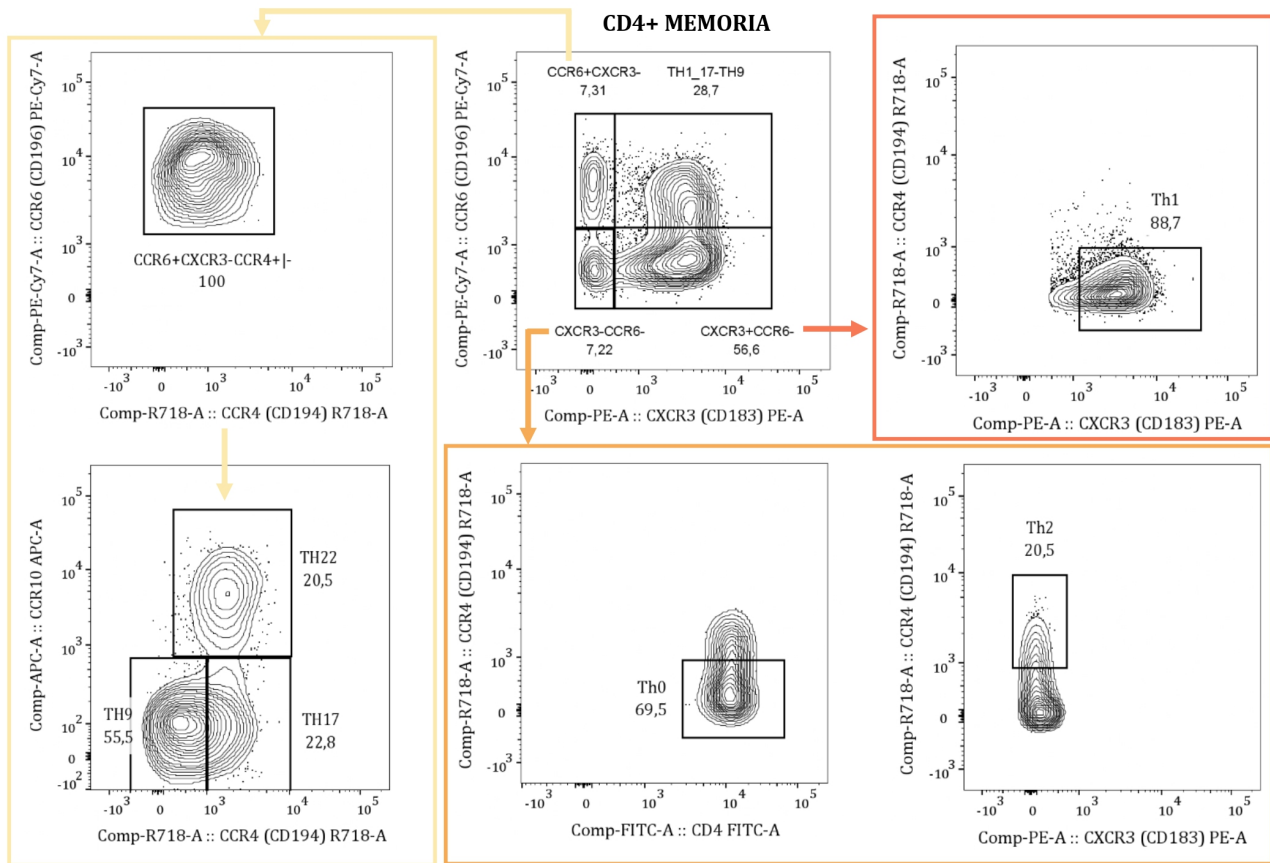
http://www.madrid.org/wleg_pub/servlet/Servidor?opcion=VerHtml&nmnorma=8228

Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco

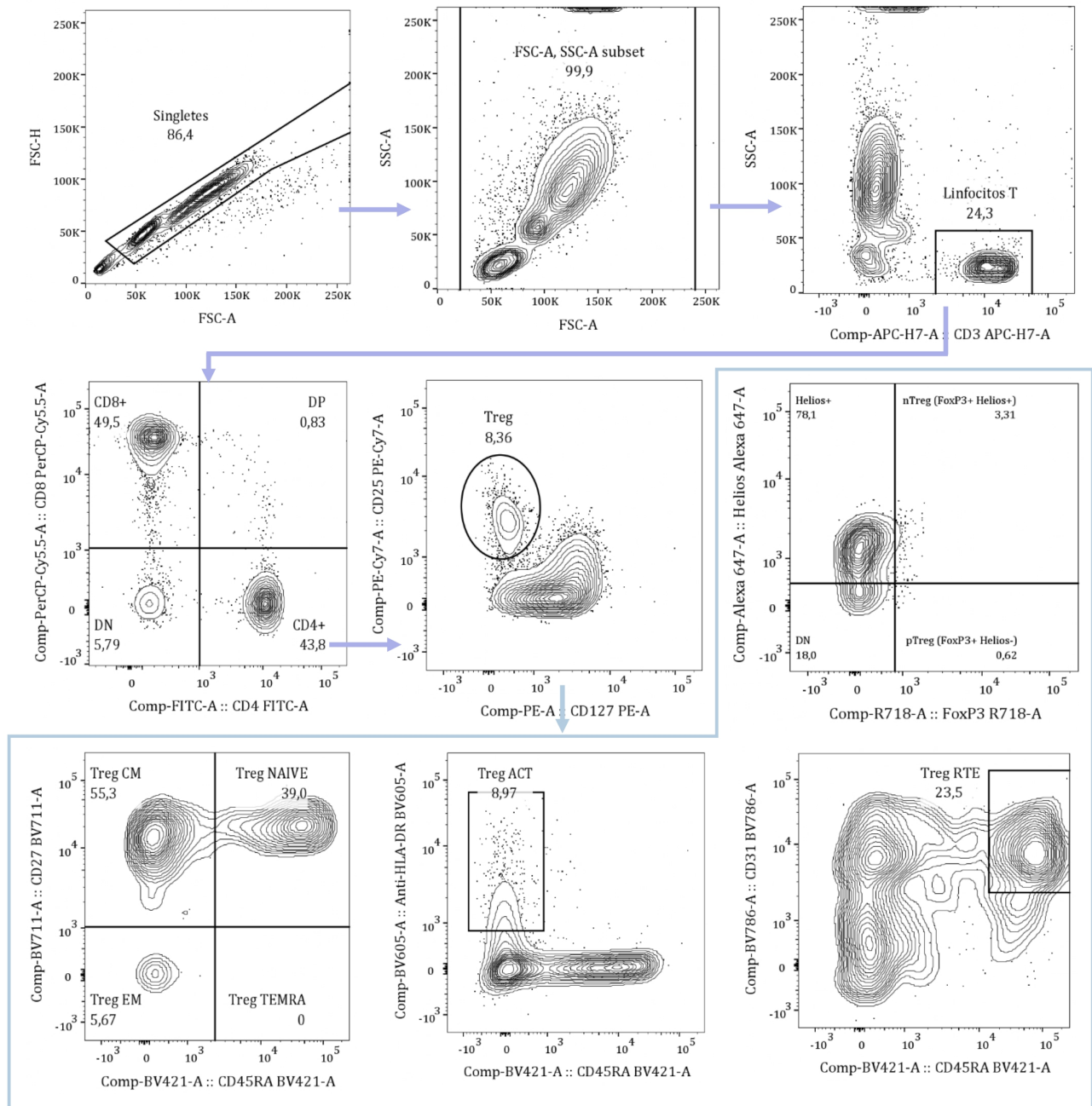
8.3 Anexo III: Estrategia de gating

8.3.1 Panel de Linfocitos T

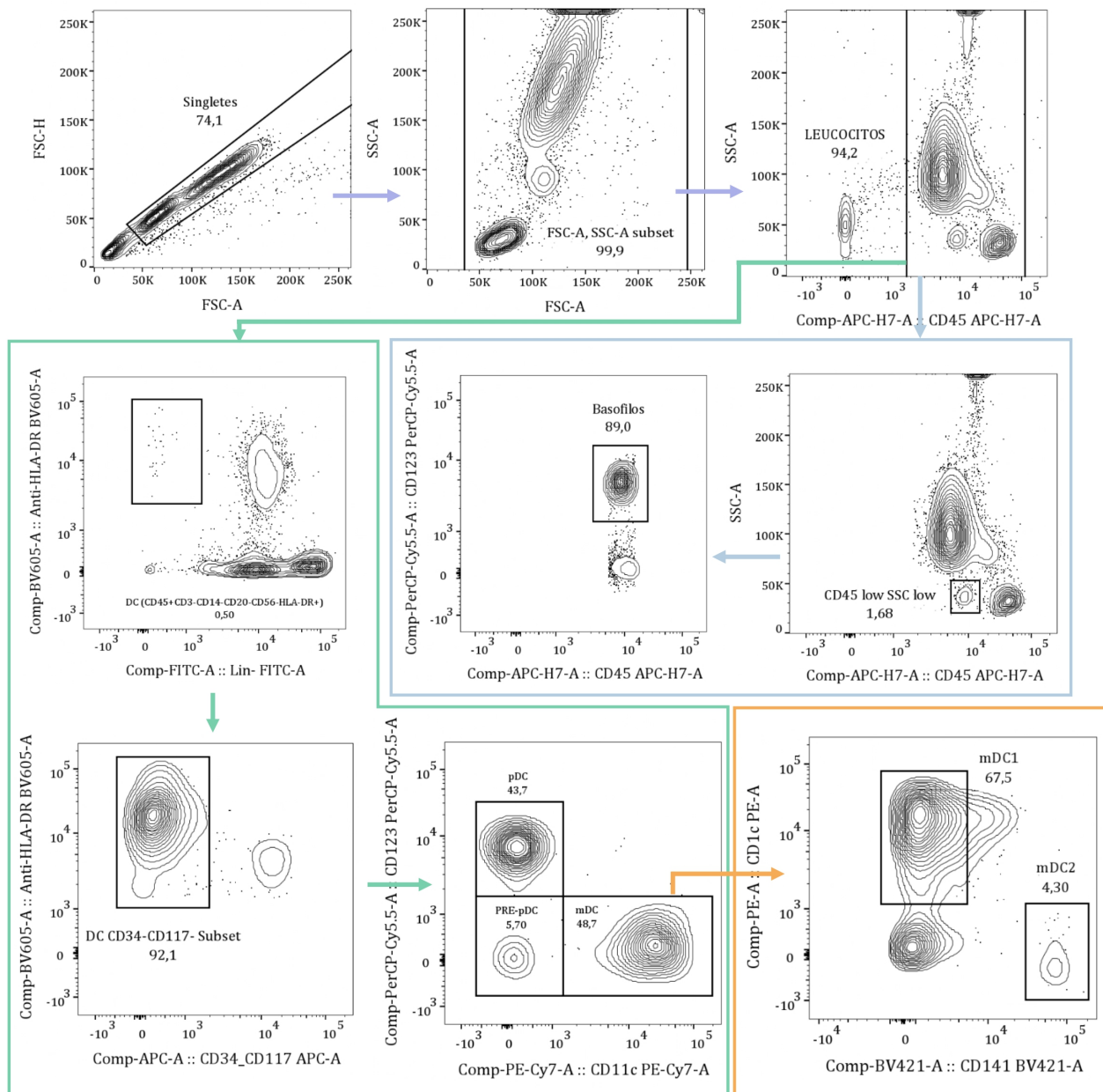




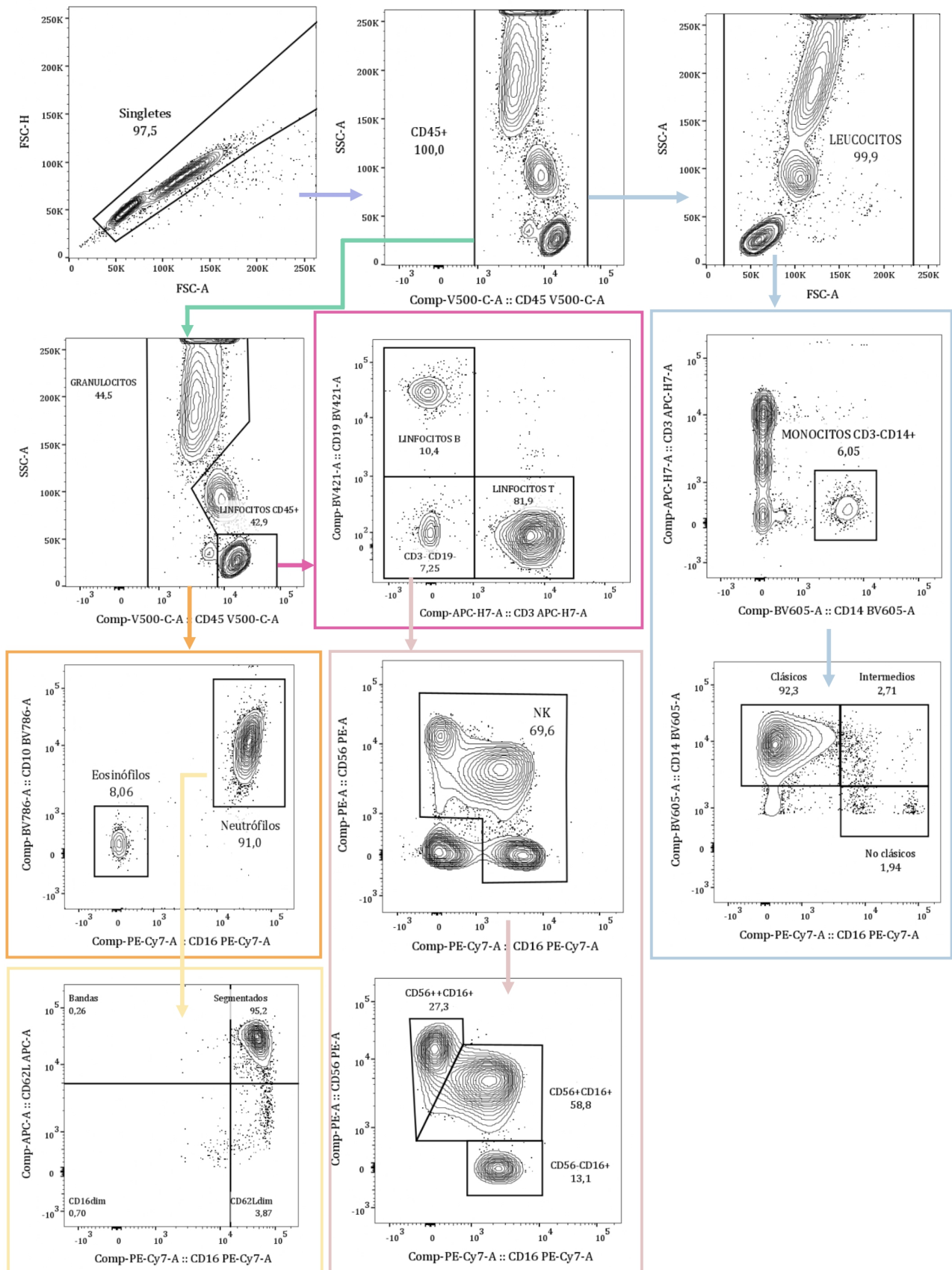
8.3.2 Panel de Linfocitos Treg

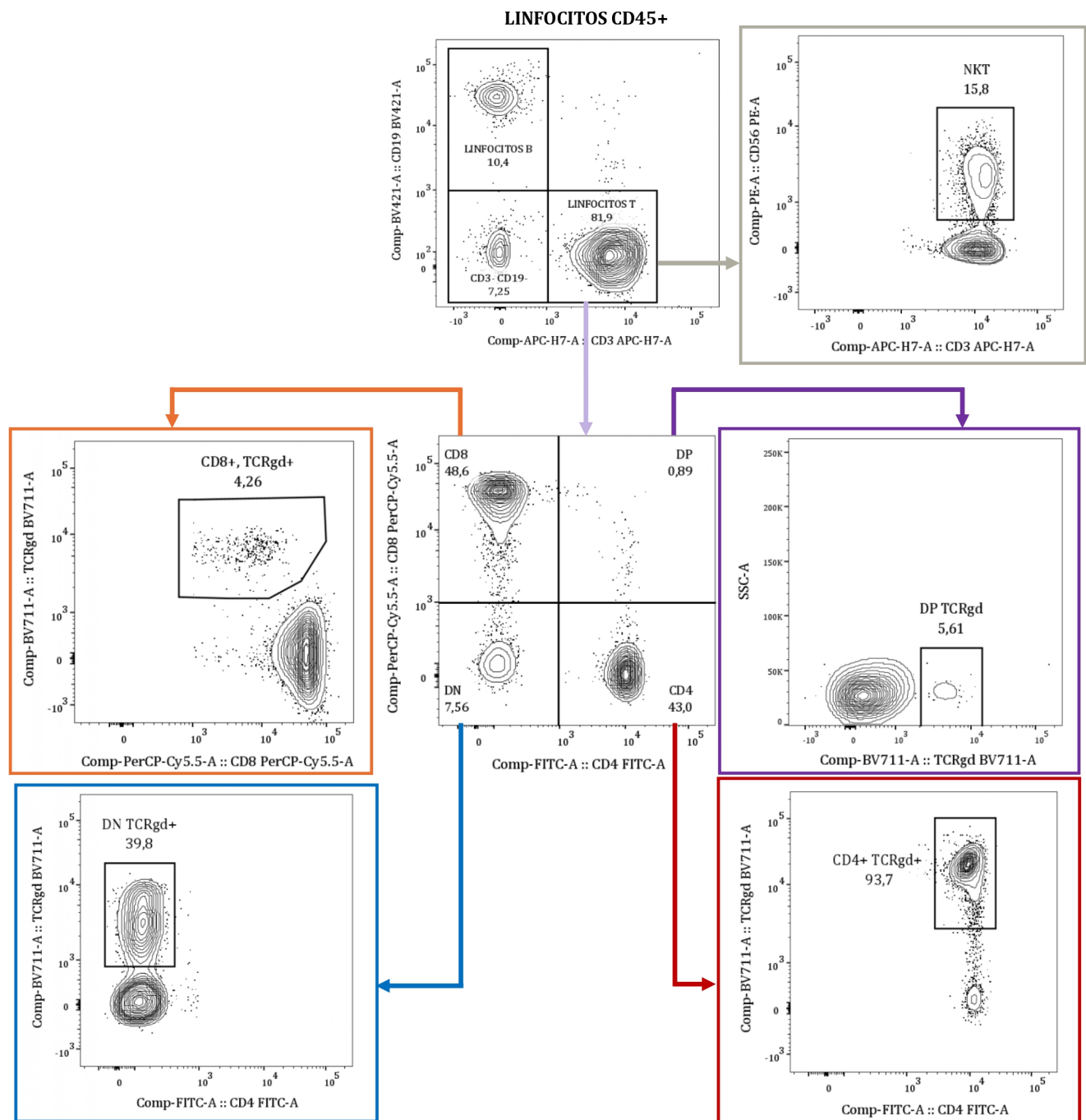


8.3.3 Panel de dendríticas (DC)

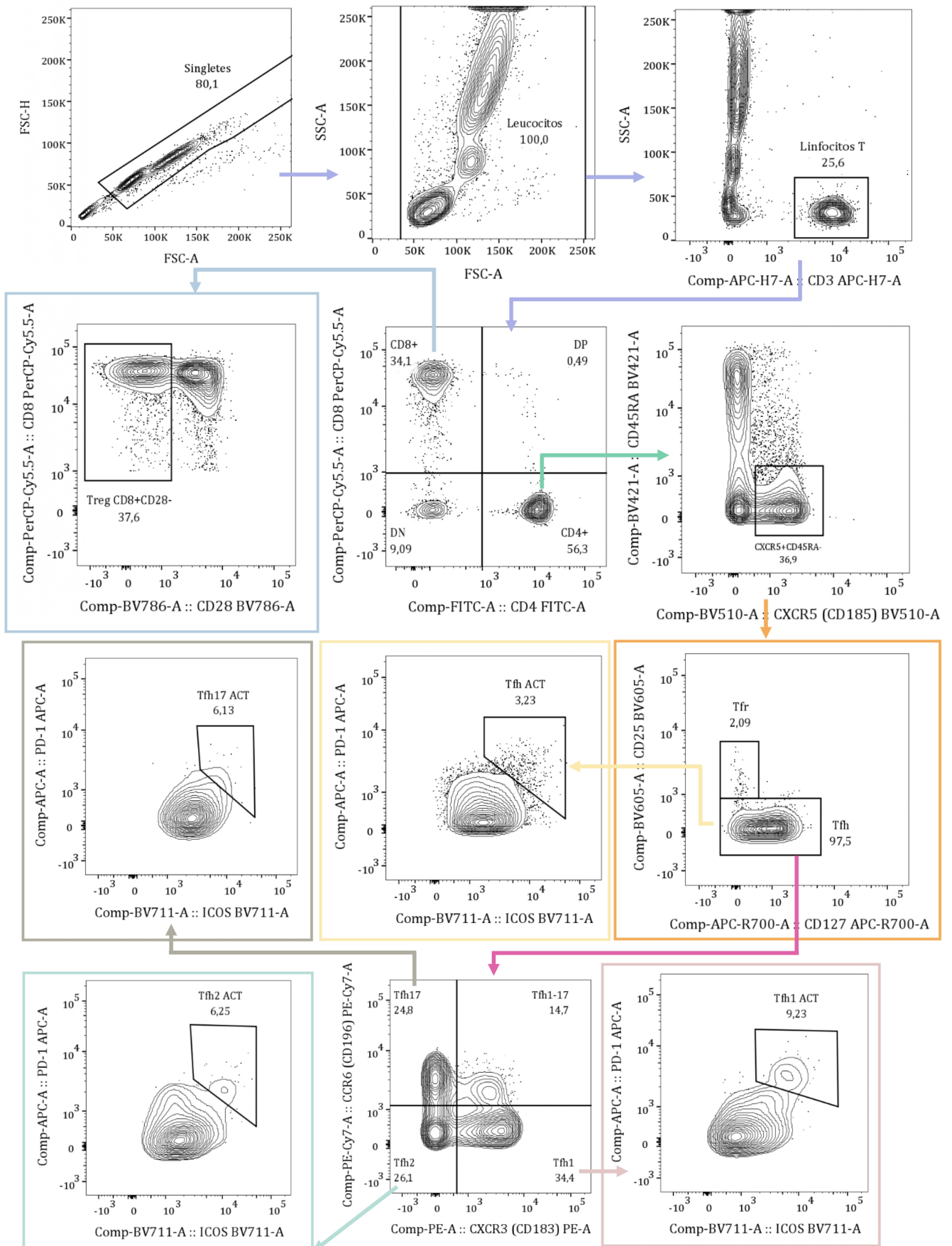


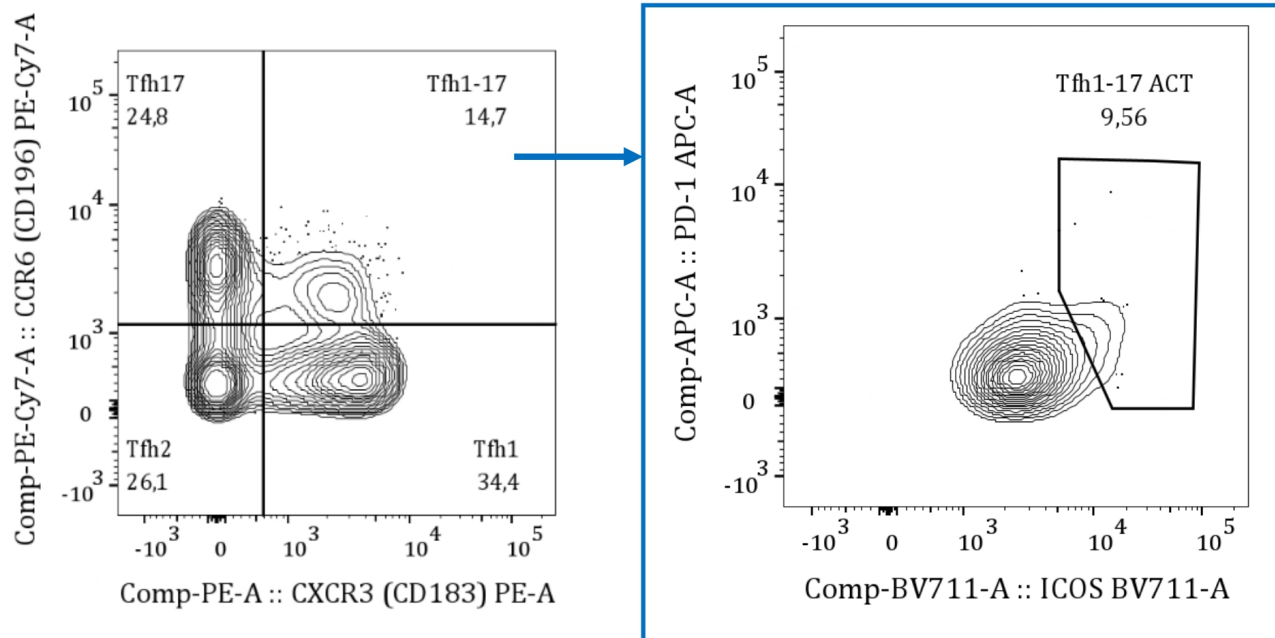
8.3.4 Panel de TBNK



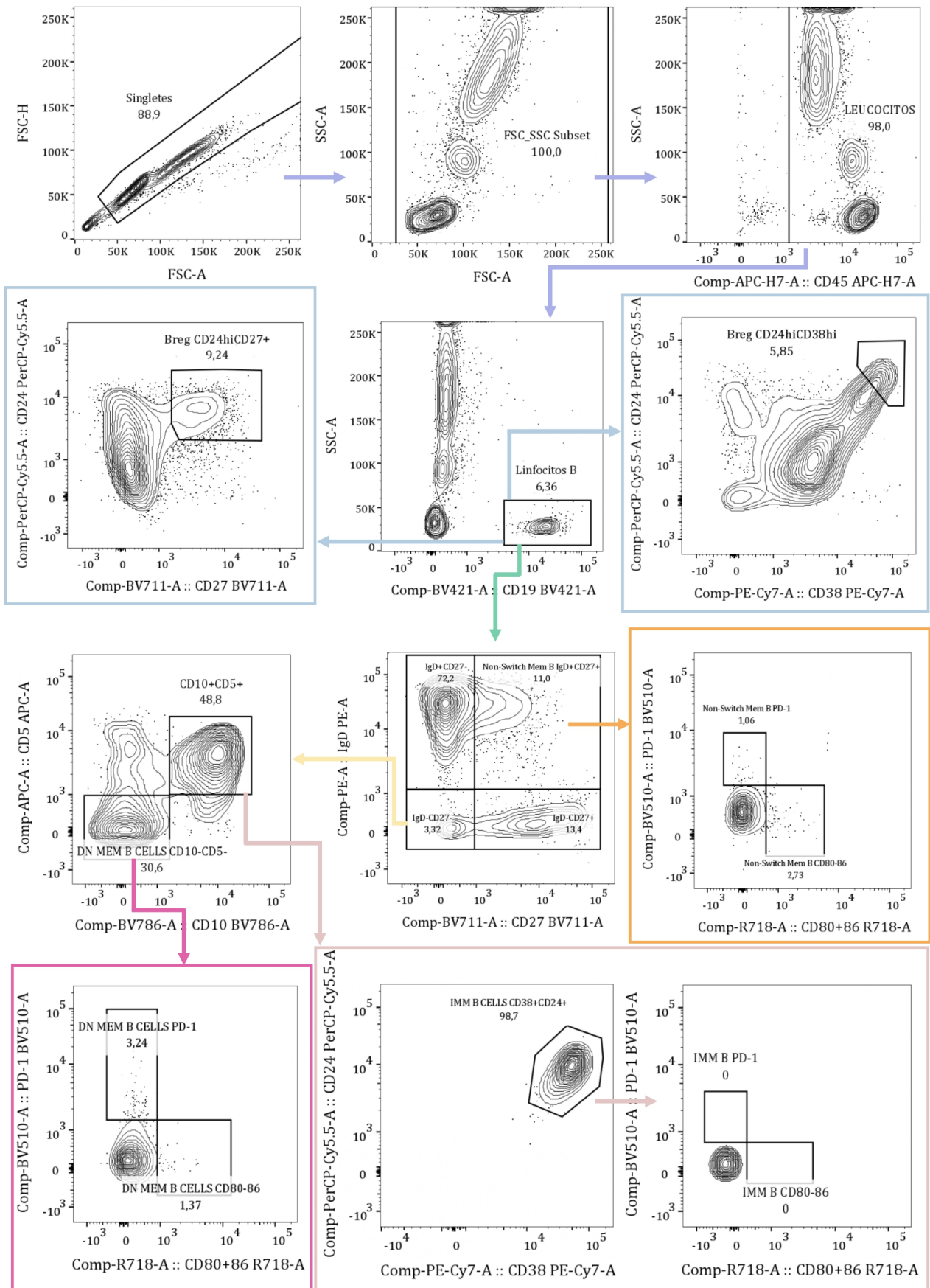


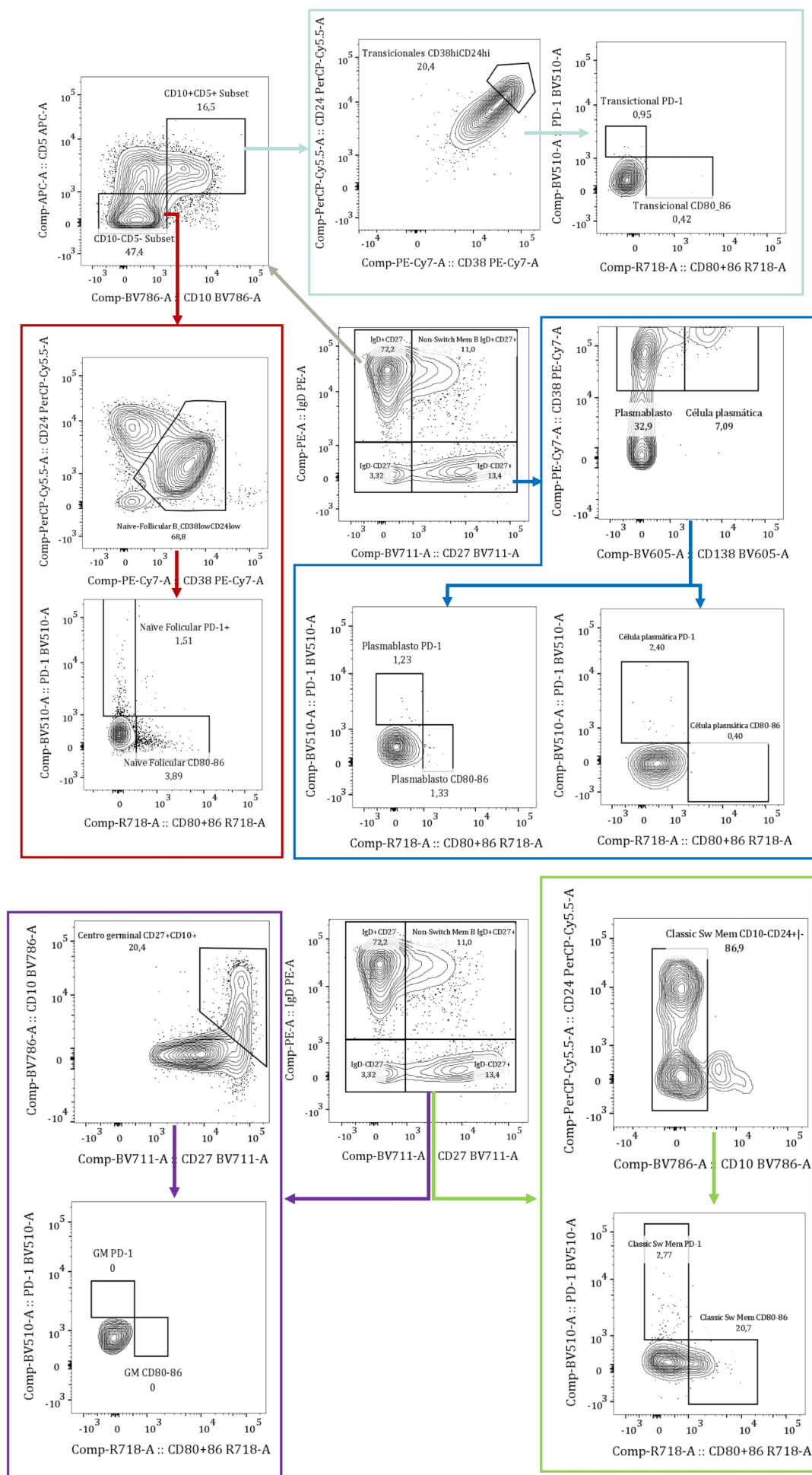
8.3.5 Panel de TFH



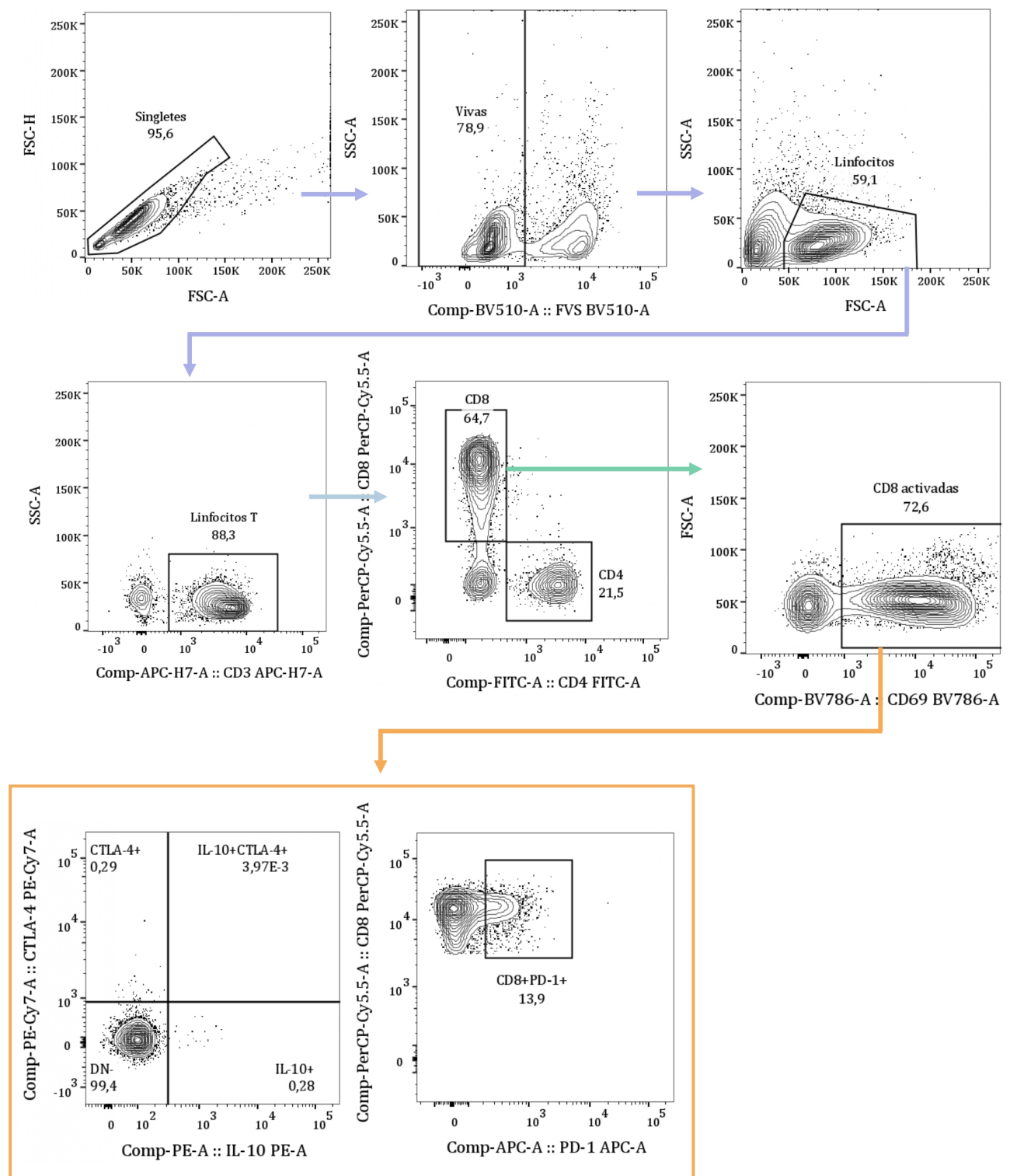


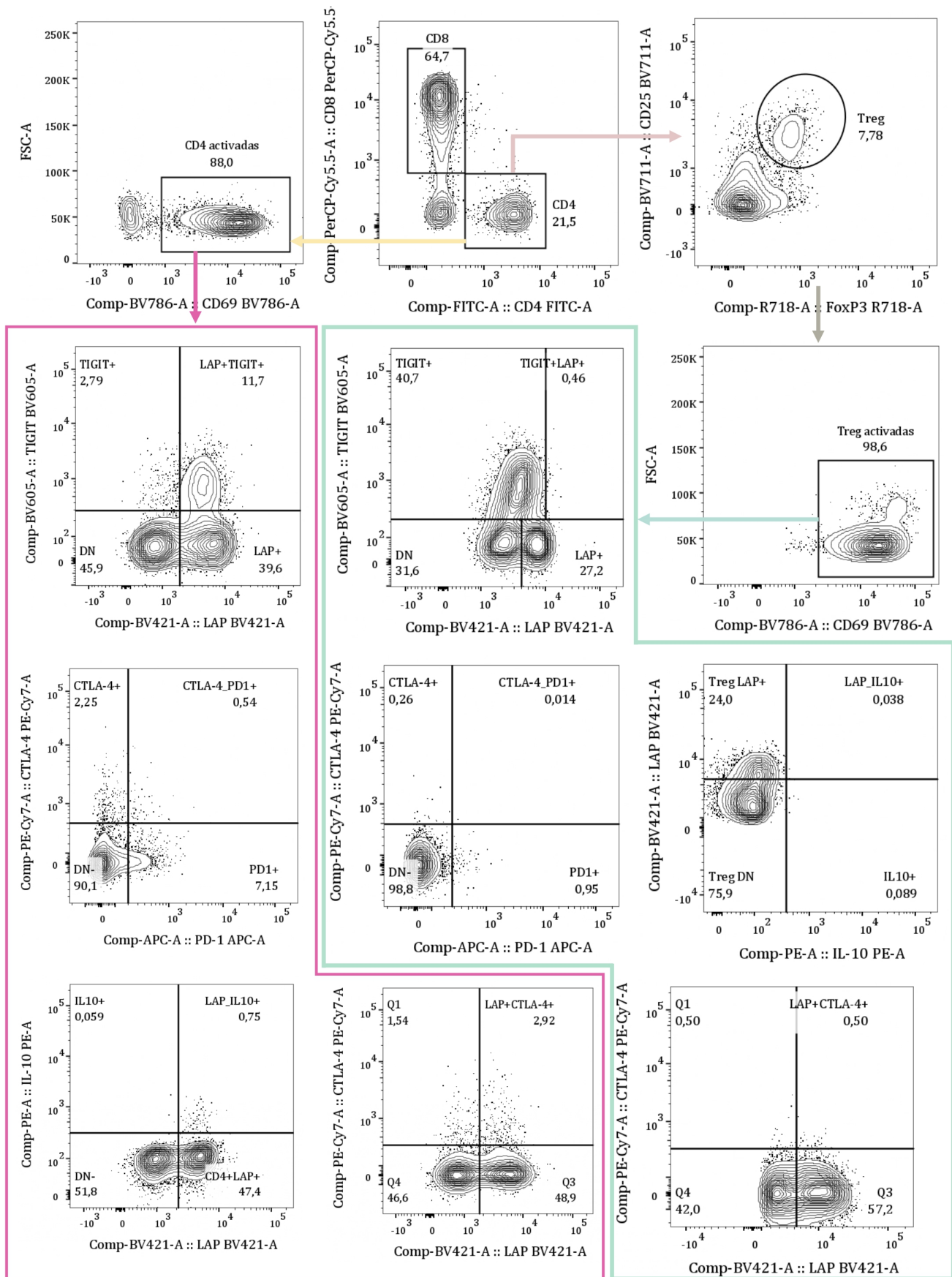
8.3.6 Panel de Linfocitos B





8.3.7 Panel de funcionalidad Treg





8.4 Anexo IV: Códigos de R

```

```{r}
Cargar tidyverse para usar dplyr
library(tidyverse)
...

```{r}
# Leer el CSV
df <- read.csv2(file.choose(), stringsAsFactors = FALSE)

# Añadir la columna 'Timepoint' extrayendo T0, T1, T2, T3 o TBIS de la columna 'Paciente'
df <- df %>%
  mutate(Timepoint = str_extract(Paciente, "\\bT0\\b|\\bT1\\b|\\bT2\\b|\\bT3\\b|\\bTBIS\\b"))

# Verificar que se haya creado correctamente
head(df)

write.csv(df, "/Users/albertomecazapata/Desktop/Excel_timepoints_con_grupos.csv", row.names =
FALSE)
...

```{r}
Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Especificar columnas que NO se deben normalizar
excluir_cols <- c("Poblacion", "Paciente", "Timepoint")

Seleccionar columnas numéricas que NO están en la lista de exclusión
columnas_a_normalizar <- df %>%
 select(-all_of(excluir_cols)) %>%
 select(where(is.numeric)) %>%
 colnames()

```

```

Aplicar normalización (Z-score) a las columnas seleccionadas
df_normalizado <- df %>%
 mutate(across(all_of(columnas_a_normalizar),
 ~ (. - mean(., na.rm = TRUE)) / sd(., na.rm = TRUE)))

Guardar el resultado
write_csv(df_normalizado, "Pacientes_normalizado_sin_grupo.csv")
```

AHORA PARA CREAR EL CSV SOLO CON LOS T0
```{r}
Cargar librerías necesarias
library(readr)
library(dplyr)

Leer el archivo normalizado
df_normalizado <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Filtrar solo las filas con Timepoint == "T0"
df_T0 <- df_normalizado %>%
 filter(Timepoint == "T0")

Guardar el nuevo CSV con solo T0
write_csv(df_T0, "/Users/albertomecazapata/Desktop/Sin_normalizar_T0_sin_grupo.csv")
```

```{r}
Paquetes necesarios
library(reshape2)
library(ggplot2)
```

APLICAMOS SHAPIRO-WILK A LOS DATOS SIN NORMALIZAR
```{r}
Asegurarse de que todas las columnas son numéricas

```



```

Sin_normalizar_T0_sin_grupo <- data.frame(
 lapply(Sin_normalizar_T0_sin_grupo, function(x) as.numeric(as.character(x)))
)

Aplicar test de normalidad a cada columna
normality_pvals <- apply(Sin_normalizar_T0_sin_grupo, 2, function(col) {
 if (length(unique(col)) > 3 && !all(is.na(col))) {
 tryCatch(shapiro.test(col)$p.value, error = function(e) NA)
 } else {
 NA # Variables con pocos valores únicos, constantes o fallos
 }
})

Crear un data frame para graficar
normality_df <- data.frame(Variable = names(normality_pvals), P_Value = normality_pvals)

Eliminar NA
normality_df <- na.omit(normality_df)

Añadir categoría de normalidad
normality_df$Normality <- ifelse(normality_df$P_Value > 0.05, "Normal", "No normal")

Graficar como heatmap
library(ggplot2)
ggplot(normality_df, aes(x = reorder(Variable, -P_Value), y = 1, fill = P_Value)) +
 geom_tile() +
 scale_fill_gradient2(
 low = "red", mid = "yellow", high = "green", midpoint = 0.05,
 name = "p-value\nShapiro-Wilk"
) +
 theme_minimal() +
 labs(
 title = "Mapa de normalidad por variable (Shapiro-Wilk)",

```

```

x = "Variables", y = ""
) +
theme(
 axis.text.y = element_blank(),
 axis.ticks.y = element_blank(),
 axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1, size = 4)
)
...

```

AHORA APLICAMOS LO MISMO PERO A LOS DATOS NORMALIZADOS

```

```{r}
# Asegurarse de que todas las columnas son numéricas
Normalizado_T0_sin_grupo <- data.frame(
  lapply(Normalizado_T0_sin_grupo, function(x) as.numeric(as.character(x)))
)

```

```

# Aplicar test de normalidad a cada columna
normality_pvals <- apply(Normalizado_T0_sin_grupo, 2, function(col) {
  if (length(unique(col)) > 3 && !all(is.na(col))) {
    tryCatch(shapiro.test(col)$p.value, error = function(e) NA)
  } else {
    NA
  }
})

```

```

# Crear un data frame para graficar
normality_df <- data.frame(Variable = names(normality_pvals), P_Value = normality_pvals)

```

```

# Eliminar NA
normality_df <- na.omit(normality_df)

```

```

# Añadir categoría de normalidad
normality_df$Normality <- ifelse(normality_df$P_Value > 0.05, "Normal", "No normal")

```

```

# Graficar como heatmap
library(ggplot2)
ggplot(normality_df, aes(x = reorder(Variable, -P_Value), y = 1, fill = P_Value)) +
  geom_tile() +
  scale_fill_gradient2(
    low = "red", mid = "yellow", high = "green", midpoint = 0.05,
    name = "p-value\nShapiro-Wilk"
  ) +
  theme_minimal() +
  labs(
    title = "Mapa de normalidad por variable (Shapiro-Wilk)",
    x = "Variables", y = ""
  ) +
  theme(
    axis.text.y = element_blank(),
    axis.ticks.y = element_blank(),
    axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1, size = 4)
  )
...

LLEGAMOS A LA CONCLUSION DE QUE NO SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL
AHORA PASAMOS A GRAFICAR PARA DIFERENCIAR ENTRE PACIENTES Y CONTROLES
```{r}
Cargar librerías
library(umap)
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(readr)
...

```{r}
# Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

```

```
# Eliminar columnas no necesarias
df_umap <- df %>% select(-Poblacion, -Timepoint)

# Separar etiquetas
pacientes <- df_umap$Paciente
grupos <- df_umap$Grupo

# Eliminar columnas no numéricas
datos_numericos <- df_umap %>% select(-Paciente, -Grupo)

# Imputar NA con la media de cada columna
datos_imputados <- datos_numericos %>%
  mutate(across(everything(), ~ ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)))

# Asegurarse de que los datos son numéricos
datos_imputados <- datos_imputados %>% mutate(across(everything(), as.numeric))

# Aplicar UMAP
library(umap)
set.seed(42)
umap_result <- umap(datos_imputados)

# Preparar dataframe para visualización
umap_df <- as.data.frame(umap_result$layout)
colnames(umap_df) <- c("UMAP1", "UMAP2")
umap_df$Paciente <- pacientes
umap_df$Grupo <- factor(grupos, labels = c("Control", "Paciente"))

# Graficar por grupo
library(ggplot2)
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Grupo)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
  theme_minimal() +
```

```

labs(
  title = "UMAP de pacientes (T0)",
  x = "UMAP 1", y = "UMAP 2", color = "Grupo"
)
```

```{r}
# Añadir columna Poblacion para visualizarla
umap_df$Poblacion <- df$Poblacion

# Graficar coloreando por Poblacion
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Poblacion)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
  theme_minimal() +
  labs(
    title = "UMAP de pacientes coloreado por Poblacion",
    x = "UMAP 1", y = "UMAP 2", color = "Poblacion"
  )
```

PARA CORREGIR EL EFECTO LOTE QUE PARECE QUE ESTAMOS OBTENIENDO; USAMOS EL COMBATCH

```{r}
if (!requireNamespace("sva", quietly = TRUE)) {
  install.packages("sva")
}
```

```{r}
library(sva)
```

```{r}
# Transponer los datos para ComBat (con variables en filas y muestras en columnas)
datos_mat <- t(as.matrix(datos_imputados))

```

```

batch <- df$Poblacion # Variable de lote

#
mod <- model.matrix(~ as.factor(df$Grupo)) # Opcional, para ajustar grupo

datos_combat <- ComBat(dat = datos_mat, batch = batch, mod = mod, par.prior = TRUE, prior.plots =
FALSE)

datos_corregidos <- t(datos_combat)
```


```

library(umap)
set.seed(42)
umap_result <- umap(datos_corregidos)

umap_df <- as.data.frame(umap_result$layout)
colnames(umap_df) <- c("UMAP1", "UMAP2")
umap_df$Paciente <- df$Paciente
umap_df$Grupo <- factor(df$Grupo, labels = c("Control", "Paciente"))
umap_df$Poblacion <- df$Poblacion

library(ggplot2)
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Grupo)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
  theme_minimal() +
  labs(title = "UMAP corregido por Poblacion (ComBat)", x = "UMAP 1", y = "UMAP 2", color = "Grupo")
```


AHORA PARA VER LA K NECESARIA


```

library(readr)
library(dplyr)

# Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

```


```


```



```

# Eliminar las últimas 6 filas (controles)
df_sin_ult6 <- df %>% slice(1:(n() - 6))

# Guardar el nuevo CSV
write_csv(df_sin_ult6, "Normalizado_T0_sin_grupo_sin_ult6.csv")
```

```r
install.packages("ConsensusClusterPlus")
```

```r
library(readr)
library(dplyr)
library(factoextra) # para fviz_nbclust, fviz_gap_stat
library(ConsensusClusterPlus) # para consensus clustering
library(cluster)

# Leer CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

# Eliminar columnas no necesarias
df_umap <- df %>% select(-Poblacion, -Timepoint)

# Extraer las columnas numéricas (sin Paciente)
datos_numericos <- df_umap %>% select(-Paciente)

# Imputar NA con la media de cada columna
datos_imputados <- datos_numericos %>%
  mutate(across(everything(), ~ ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)))

# Escalar los datos

```

```

expr_scaled <- scale(datos_imputados)

# Heurística raíz cuadrada
k_init <- round(sqrt(nrow(expr_scaled)) / 2)

# Elbow Method
fviz_nbclust(expr_scaled, kmeans, method = "wss")

# Silhouette
fviz_nbclust(expr_scaled, kmeans, method = "silhouette")

# Gap Statistic
set.seed(123)
gap_stat <- clusGap(expr_scaled, FUN = kmeans, K.max = 10, B = 100)
fviz_gap_stat(gap_stat)

# Consensus clustering
results <- ConsensusClusterPlus(as.matrix(expr_scaled),
                                maxK = 6,
                                reps = 100,
                                pItem = 0.8,
                                clusterAlg = "hc",
                                distance = "euclidean",
                                seed = 1234,
                                plot = "pdf")
```


ESTO ES OPCIONAL; NO PARECE QUE NOS ESTE SALIENDO LO QUE QUEREMOS


```

```{r}
if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
 install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("flowCore")
Instalar BiocManager si no lo tienes

```


```

```

if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
  install.packages("BiocManager")

# Usar BiocManager para instalar FlowSOM
BiocManager::install("FlowSOM")
...

```{r}
library(flowCore)
library(FlowSOM)
library(tidyverse)
library(umap)
...

```{r}
# ---- 1. Leer datos completos (igual que antes) ----
df_completo <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

# ---- 2. Separar datos de entrenamiento (sin últimos 6 controles) ----
df_entrenamiento <- df_completo %>% slice(1:(n()-6))

# ---- 3. Preprocesamiento datos entrenamiento CON CORRECCIÓN DE LOTE ----
# 3.1 Preparar datos numéricos (igual que antes)
df_clean <- df_entrenamiento %>%
  select(-any_of(c("Paciente", "Poblacion", "Timepoint"))) %>%
  select(where(is.numeric)) %>%
  mutate(across(everything(), ~ ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .))) %>%
  mutate(across(everything(), as.numeric))

# 3.2 Corrección de efecto lote con ComBat
mat_entrenamiento <- t(as.matrix(df_clean)) # ComBat necesita variables x muestras (transpuesta)
batch <- df_entrenamiento$Poblacion # Variable de lote (Madrid/Barcelona)

```

```

# Ajustar por grupos
# mod <- model.matrix(~ as.factor(df_entrenamiento$Grupo)) # Descomentar si hay grupos

mat_combat <- ComBat(
  dat = mat_entrenamiento,
  batch = batch,
  # mod = mod,
  par.prior = TRUE,
  prior.plots = FALSE
)

# Volver a la estructura original (muestras x variables)
df_clean_corregido <- as.data.frame(t(mat_combat))

# ---- 4. PCA sobre datos corregidos ----
mat <- as.matrix(df_clean_corregido)
pca_modelo <- prcomp(mat, scale. = TRUE)
n_components <- which(cumsum(pca_modelo$sdev^2/sum(pca_modelo$sdev^2)) >= 0.8)[1]

# ---- 5. Entrenar FlowSOM ----
set.seed(123)
fsom <- FlowSOM(
  input = flowFrame(pca_modelo$x[, 1:n_components]),
  scale = FALSE,
  colsToUse = 1:n_components,
  xdim = 5, ydim = 5,
  nClus = 3,
  rlen = 10
)

# ---- 6. Preprocesamiento datos COMPLETOS ----
df_completo_clean <- df_completo %>%
  select(-any_of(c("Paciente", "Poblacion", "Timepoint")) %>%

```

```

select(where(is.numeric)) %>%

mutate(across(everything(), ~ ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .))) %>% # Este %>% conecta con
lo siguiente

mutate(across(everything(), as.numeric))

mat_completo <- as.matrix(df_completo_clean)
mat_completo_scaled <- scale(mat_completo,
                             center = pca_modelo$center,
                             scale = pca_modelo$scale)
pca_completo <- mat_completo_scaled %*% pca_modelo$rotation[,1:n_components]

# ---- 7. Asignar clusters (compatible con S4) ----
if(exists("predictMetaclusters", where="package:FlowSOM", mode="function")) {
  cluster_assignment <- FlowSOM::predictMetaclusters(fsom, pca_completo)
} else {
  # Método alternativo manual
  distances <- apply(pca_completo, 1, function(x) colSums((t(fsom$map$codes) - x)^2))
  cluster_assignment <- fsom$metaclustering[apply(distances, 2, which.min)]
}

# ---- Conversión segura de S4 a vector ----
if(isS4(cluster_assignment)) {
  tryCatch({
    cluster_assignment <- as.numeric(cluster_assignment) # Opción 1
  }, error = function(e) {
    try({
      cluster_assignment <- cluster_assignment@values # Opción 2
    }, silent = TRUE)
  })
}

# Verificación final
stopifnot(is.vector(cluster_assignment) || is.factor(cluster_assignment))

```

---- 8. Crear UMAP ----

```
umap_df <- data.frame(
  UMAP1 = umap_result$layout[,1],
  UMAP2 = umap_result$layout[,2],
  Cluster = factor(cluster_assignment), # Ahora debería funcionar
  Tipo = factor(c(
    rep("Muestra", nrow(df_entrenamiento)),
    rep("Control", nrow(df_completo) - nrow(df_entrenamiento))
  ))
)
```

#VISUALIZACION UMAP

```
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Cluster, shape = Tipo)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.7) +
  scale_shape_manual(values = c(16, 17)) + # 16=círculo (muestras), 17=triángulo (controles)
  labs(
    title = "Visualización UMAP de los clusters",
    subtitle = paste("Muestras:", sum(umap_df$Tipo == "Muestra"),
      "| Controles:", sum(umap_df$Tipo == "Control")),
    x = "UMAP1",
    y = "UMAP2"
  ) +
  theme_minimal() +
  theme(legend.position = "right")
...
```

COMPROBAR SI LO ESTA SEPARANDO POR POBLACION O NO PORQUE PARECE QUE SÍ

```
``{r}
```

---- 1. Leer datos COMPLETOS ----

```
df_completo <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))
```

---- 2. Separar datos de entrenamiento (sin últimos 6 controles) ----

```
df_entrenamiento <- df_completo %>% slice(1:(n()-6))
```



```

# ---- 3. Preprocesamiento datos entrenamiento CON CORRECCIÓN DE LOTE ----

# 3.1 Preparar datos numéricos
df_clean <- df_entrenamiento %>%
  select(-any_of(c("Paciente", "Poblacion", "Timepoint")) %>%
  select(where(is.numeric)) %>%
  mutate(across(everything(), ~ ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .))) %>%
  mutate(across(everything(), as.numeric))

# 3.2 Diagnóstico PCA sin corregir (antes de ComBat)
mat_entrenamiento <- t(as.matrix(df_clean)) # Variables x muestras
batch <- df_entrenamiento$Poblacion # Variable de lote

# PCA sin corrección
pca_sin_corregir <- prcomp(t(mat_entrenamiento), scale. = TRUE)
plot(pca_sin_corregir$x[,1:2], col = as.factor(batch),
     pch = 19, main = "PCA sin corrección (por Población)",
     xlab = "PC1", ylab = "PC2")
legend("topright", legend = levels(as.factor(batch)),
     col = 1:length(unique(batch)), pch = 19)

# 3.3 Corrección de efecto lote con ComBat
mat_combat <- ComBat(
  dat = mat_entrenamiento,
  batch = batch,
  # mod = mod, # Opcional: incluir si hay grupos conocidos
  par.prior = TRUE,
  prior.plots = FALSE
)

# PCA después de ComBat (diagnóstico)
pca_corregido <- prcomp(t(mat_combat), scale. = TRUE)
plot(pca_corregido$x[,1:2], col = as.factor(batch),
     pch = 19, main = "PCA con ComBat (por Población)",

```

```

xlab = "PC1", ylab = "PC2")
legend("topright", legend = levels(as.factor(batch)),
      col = 1:length(unique(batch)), pch = 19)

# Volver a estructura original (muestras x variables)
df_clean_corregido <- as.data.frame(t(mat_combat))

# ---- 4. PCA sobre datos corregidos ----
mat <- as.matrix(df_clean_corregido)
pca_modelo <- prcomp(mat, scale. = TRUE)
n_components <- which(cumsum(pca_modelo$sdev^2/sum(pca_modelo$sdev^2)) >= 0.8)[1]

# ---- 5. Entrenar FlowSOM ----
set.seed(123)
fsom <- FlowSOM(
  input = flowFrame(pca_modelo$x[, 1:n_components]),
  scale = FALSE,
  colsToUse = 1:n_components,
  xdim = 5, ydim = 5,
  nClus = 3,
  rlen = 10
)

# ---- 6. Preprocesamiento datos COMPLETOS ----
df_completo_clean <- df_completo %>%
  select(-any_of(c("Paciente", "Poblacion", "Timepoint")))%>%
  select(where(is.numeric)) %>%
  mutate(across(everything(), ~ ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .))) %>%
  mutate(across(everything(), as.numeric))

mat_completo <- as.matrix(df_completo_clean)
mat_completo_scaled <- scale(mat_completo,
  center = pca_modelo$center,

```

```

scale = pca_modelo$scale)
pca_completo <- mat_completo_scaled %*% pca_modelo$rotation[,1:n_components]

# ---- 7. Asignar clusters ----
if(exists("predictMetaclusters", where="package:FlowSOM", mode="function")) {
  cluster_assignment <- FlowSOM::predictMetaclusters(fsom, pca_completo)
} else {
  distances <- apply(pca_completo, 1, function(x) colSums((t(fsom$map$codes) - x)^2))
  cluster_assignment <- fsom$metaclustering[apply(distances, 2, which.min)]
}

# Conversión segura de S4 a vector
if(isS4(cluster_assignment)) {
  tryCatch({
    cluster_assignment <- as.numeric(cluster_assignment)
  }, error = function(e) {
    try({
      cluster_assignment <- cluster_assignment@values
    }, silent = TRUE)
  })
}

# ---- 8. Crear UMAP ----
set.seed(42)
umap_result <- umap(pca_completo)

umap_df <- data.frame(
  UMAP1 = umap_result$layout[,1],
  UMAP2 = umap_result$layout[,2],
  Cluster = factor(cluster_assignment),
  Tipo = factor(c(
    rep("Muestra", nrow(df_entrenamiento)),
    rep("Control", nrow(df_completo) - nrow(df_entrenamiento))
  ))

```

```

)),
Poblacion = df_completo$Poblacion # Para verificar efecto lote en UMAP
)

# Visualización UMAP
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Cluster, shape = Tipo)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.7) +
  scale_shape_manual(values = c(16, 17)) +
  labs(title = "UMAP después de ComBat (Clusters por FlowSOM)",
       x = "UMAP1", y = "UMAP2") +
  theme_minimal()

# Verificación adicional para ver si persiste el efecto de Población
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Poblacion, shape = Tipo)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.7) +
  labs(title = "UMAP: Verificación de efecto lote (Población)",
       x = "UMAP1", y = "UMAP2") +
  theme_minimal()
```


```

```{r}
Cargar los datos
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Especificar las columnas que NO quieres normalizar
excluir <- c("Poblacion", "Paciente", "Grupo", "Timepoint")

Seleccionar las columnas a normalizar
cols_a_normalizar <- setdiff(colnames(df), excluir)

Aplicar la normalización (z-score) solo a esas columnas
df_normalizado <- df
df_normalizado[cols_a_normalizar] <- scale(df[cols_a_normalizar])

```


```

```

# Guardar el resultado
write.csv(df_normalizado, "TEST NORMALIZANDO.csv", row.names = FALSE)
...

VAMOS POR AQUI
```{r}
Cargar librerías
library(umap)
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(readr)
library(sva)
...

```{r}
# Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

# Primero verificar los nombres exactos de las columnas
colnames(df)
table(df$Grupo)
...

```{r}
Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Separar controles y pacientes (0 = Control, 1 = Paciente)
df_controles <- df[df[["Grupo"]] == 0,]
df_pacientes <- df[df[["Grupo"]] == 1,]

Procesar solo los pacientes para el UMAP (eliminar columnas no numéricas)
df_umap_pacientes <- df_pacientes %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente)

```

```
Imputar NA con la media de cada columna
datos_imputados_pacientes <- df_umap_pacientes %>%
 mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
 })) %>%
 mutate(across(everything(), as.numeric))

Aplicar ComBat solo a los pacientes para corregir efecto lote
datos_mat_pacientes <- t(as.matrix(datos_imputados_pacientes))
batch_pacientes <- df_pacientes$Poblacion
mod_pacientes <- model.matrix(~1, data = df_pacientes) # Modelo solo con intercepto

datos_combat_pacientes <- ComBat(
 dat = datos_mat_pacientes,
 batch = batch_pacientes,
 mod = mod_pacientes,
 par.prior = TRUE,
 prior.plots = FALSE
)

datos_corregidos_pacientes <- t(datos_combat_pacientes)

Aplicar UMAP solo a pacientes
set.seed(42)
umap_model <- umap(datos_corregidos_pacientes)

Preparar datos de controles para proyección (asegurando compatibilidad con pacientes)
datos_controles <- df_controles %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente) %>%
 # Asegurar que tenemos las mismas columnas que en pacientes
 select(colnames(datos_imputados_pacientes)) %>%
 # Imputación de datos
```



```

mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
})) %>%
mutate(across(everything(), as.numeric))

Verificar que no quedan NA
stopifnot(!any(is.na(datos_controles)))

Proyectar controles usando el modelo entrenado con pacientes
controles_proyectados <- predict(umap_model, as.matrix(datos_controles))

Crear dataframe final combinado
umap_df_final <- data.frame(
 UMAP1 = c(umap_model$layout[,1], controles_proyectados[,1]),
 UMAP2 = c(umap_model$layout[,2], controles_proyectados[,2]),
 Paciente = c(df_pacientes$Paciente, df_controles$Paciente),
 Grupo = factor(c(rep("Paciente", nrow(df_pacientes)),
 rep("Control", nrow(df_controles)))),
 Poblacion = c(df_pacientes$Poblacion, df_controles$Poblacion)
)

Graficar
ggplot(umap_df_final, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Grupo, shape = Poblacion)) +
 geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
 theme_minimal() +
 labs(
 title = "UMAP de pacientes (corregido por población) con controles proyectados",
 x = "UMAP 1",
 y = "UMAP 2",
 color = "Grupo",
 shape = "Población"
) +
 scale_color_manual(values = c("Paciente" = "#F8766D", "Control" = "#00BFC4")) +

```

```

scale_shape_manual(values = c(16, 17, 15, 18)) # Diferentes formas para cada población
...

PARA SACAR EL UMAP de pacientes (clusterizados en 3 grupos) y con los controles proyectados
``{r}

Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Separar controles y pacientes (0 = Control, 1 = Paciente)
df_controles <- df[df[["Grupo"]] == 0,]
df_pacientes <- df[df[["Grupo"]] == 1,]

Procesar solo los pacientes para el UMAP
df_umap_pacientes <- df_pacientes %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente)

Imputar NA con la media de cada columna
datos_imputados_pacientes <- df_umap_pacientes %>%
 mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
 })) %>%
 mutate(across(everything(), as.numeric))

Aplicar ComBat solo a los pacientes para corregir efecto lote
datos_mat_pacientes <- t(as.matrix(datos_imputados_pacientes))
batch_pacientes <- df_pacientes$Poblacion
mod_pacientes <- model.matrix(~1, data = df_pacientes) # Modelo solo con intercepto

datos_combat_pacientes <- ComBat(
 dat = datos_mat_pacientes,
 batch = batch_pacientes,
 mod = mod_pacientes,
 par.prior = TRUE,
 prior.plots = FALSE

```

)

```

datos_corregidos_pacientes <- t(datos_combat_pacientes)

Aplicar UMAP solo a pacientes
set.seed(42)
umap_model <- umap(datos_corregidos_pacientes)

--- CLUSTERING (k-means) SOLO PARA PACIENTES ---
set.seed(42)
k <- 3 # Número de clusters deseado
clusters_pacientes <- kmeans(umap_model$layout, centers = k)$cluster

Preparar datos de controles para proyección (sin clustering)
datos_controles <- df_controles %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente) %>%
 select(colnames(datos_imputados_pacientes)) %>%
 mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
 })) %>%
 mutate(across(everything(), as.numeric))

Proyectar controles (sin incluirlos en el clustering)
controles_proyectados <- predict(umap_model, as.matrix(datos_controles))

Crear dataframe final combinado (pacientes + controles)
umap_df_final <- data.frame(
 UMAP1 = c(umap_model$layout[,1], controles_proyectados[,1]),
 UMAP2 = c(umap_model$layout[,2], controles_proyectados[,2]),
 Paciente = c(df_pacientes$Paciente, df_controles$Paciente),
 Grupo = factor(c(rep("Paciente", nrow(df_pacientes)),
 rep("Control", nrow(df_controles)))),
 Poblacion = c(df_pacientes$Poblacion, df_controles$Poblacion),

```

```

Añadir columna de clusters (NA para controles)
Cluster = factor(c(clusters_pacientes, rep(NA, nrow(df_controles))))
)

Graficar (colores por cluster, formas por población)
ggplot(umap_df_final, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Cluster, shape = Grupo)) +
 geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
 theme_minimal() +
 labs(
 title = "UMAP de pacientes (clusterizados en 3 grupos) y controles proyectados",
 x = "UMAP 1",
 y = "UMAP 2",
 color = "Cluster (Pacientes)",
 shape = "Grupo"
) +
 scale_color_manual(
 values = c("#F8766D", "#00BA38", "#619CFF"), # Colores para los clusters
 na.value = "gray", # Color para controles (NA)
 labels = c("Cluster 1", "Cluster 2", "Cluster 3", "Control")
) +
 scale_shape_manual(values = c(16, 17)) # 16: Pacientes, 17: Controles
'''

```

#### EXTRAER LOS DATOS PROMEDIO DE LOS CLUSTERS

```

```{r}
# Combinar los datos originales de pacientes con la información de clusters
df_pacientes_con_cluster <- df_pacientes %>%
  mutate(Cluster = as.factor(clusters_pacientes))

# Agregar los controles con Cluster = NA
df_final_con_cluster <- bind_rows(
  df_pacientes_con_cluster,
  df_controles %>% mutate(Cluster = NA)
)

```

)

```
# Calcular promedios por cluster (solo para pacientes, excluyendo controles)
promedios_por_cluster <- df_pacientes_con_cluster %>%
  group_by(Cluster) %>%

# Calcular la media para columnas numéricas
summarise(across(where(is.numeric), mean, na.rm = TRUE),

# Para columnas no numéricas
across(c(Poblacion, Timepoint), ~ paste(unique(.), collapse = ", ")),
.groups = "drop")

# Para incluir también un resumen de los controles:
promedios_controles <- df_controles %>%
  summarise(across(where(is.numeric), mean, na.rm = TRUE),
    across(c(Poblacion, Timepoint), ~ paste(unique(.), collapse = ", "))) %>%
  mutate(Cluster = "Control")

# Combinar ambos resultados
resultado_final <- bind_rows(
  promedios_por_cluster,
  promedios_controles
)

# Reordenar columnas para que Cluster sea la primera
resultado_final <- resultado_final %>%
  select(Cluster, everything())

# Guardar el resultado en un CSV
write_csv(resultado_final, "promedios_por_cluster.csv")

# Mostrar el resultado
print(resultado_final)
``
```

RANDOM FOREST CON LOS CLUSTERES

```

``{r}
# Instalar el paquete
if (!requireNamespace("pheatmap", quietly = TRUE)) {
  install.packages("pheatmap")
}
if (!requireNamespace("randomForest", quietly = TRUE)) {
  install.packages("randomForest")
}
if (!require("missForest")) install.packages("missForest")

# Cargar el paquete
library(pheatmap)
library(randomForest)
library(missForest)
...

``{r}
# ---- HEATMAP DE PERFILES ----
# Usamos el resultado_final que contiene los promedios por cluster
perfil_mat <- as.matrix(resultado_final %>%
  select(-Cluster, -Poblacion, -Timepoint, -Grupo) %>%
  select(where(is.numeric)))

# Asignamos nombres de fila
rownames(perfil_mat) <- paste0("Cluster_", resultado_final$Cluster)

# Generamos el heatmap
pheatmap(perfil_mat,
  cluster_rows = TRUE,
  cluster_cols = TRUE,
  scale = "column",
  main = "Perfil inmunológico promedio por cluster",

```

```

    fontsize = 6,          # Reduce el tamaño de todo el texto
    fontsize_col = 3,      # Texto de columnas (eje X)
    fontsize_row = 8)      # Texto de filas (opcional)

# ---- TEST ESTADÍSTICO POR MARCADOR (Kruskal-Wallis) ----
# Primero preparar los datos originales con la asignación de clusters
expr_df <- df_pacientes_con_cluster %>%
  select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente) %>%
  mutate(Cluster = as.factor(Cluster))

# Escalar los datos
expr_data_scaled <- expr_df %>%
  select(-Cluster) %>%
  scale()

# Calcular p-values (usamos Kruskal-Wallis para datos no paramétricos)
pvalues <- apply(expr_data_scaled, 2, function(x) {
  kruskal.test(x ~ expr_df$Cluster)$p.value
})
p_adj <- p.adjust(pvalues, method = "BH")

# ---- TOP MARCADORES SIGNIFICATIVOS ----
top_markers <- names(sort(p_adj))[1:10]

# Preparar datos para gráfico
expr_long <- expr_df %>%
  select(all_of(top_markers), Cluster) %>%
  pivot_longer(cols = -Cluster, names_to = "variable", values_to = "value")

ggplot(expr_long, aes(x = Cluster, y = value, fill = Cluster)) +
  geom_boxplot() +
  facet_wrap(~ variable, scales = "free_y") +
  theme_minimal() +

```



```

labs(title = "Top marcadores inmunológicos que discriminan clusters",
     y = "Valor escalado")

# ---- RANDOM FOREST CON IMPUTACIÓN DE VALORES FALTANTES ----
set.seed(42)

# 1. Preparar los datos manteniendo solo variables relevantes
rf_data <- expr_df %>%
  select(where(is.numeric), Cluster) %>%
  mutate(Cluster = as.factor(Cluster))

# 2. Verificar estructura de los datos
str(rf_data)
print(paste("Número de NA antes de imputación:", sum(is.na(rf_data))))

# 3. Imputación con verificación
rf_data_imputed <- tryCatch({
  imp <- missForest(rf_data, verbose = TRUE)
  print(paste("Error de imputación OOB:", imp$OOBError))
  imp$ximp
}, error = function(e) {
  message("Falló missForest, usando imputación por mediana: ", e$message)
  rf_data %>%
    mutate(across(where(is.numeric), ~ifelse(is.na(.), median(., na.rm = TRUE), .)))
})

# 4. Verificación post-imputación
print(paste("Número de NA después de imputación:", sum(is.na(rf_data_imputed))))
stopifnot(nrow(rf_data_imputed) == nrow(rf_data))

# 5. Asegurar que las clases no están desbalanceadas
table(rf_data_imputed$Cluster)
if(min(table(rf_data_imputed$Cluster)) < 5) {

```

```

warning("Algunos clusters tienen muy pocas observaciones!")
}

# 6. Ejecutar Random Forest con verificación
rf_model <- tryCatch({
  randomForest(
    Cluster ~ .,
    data = rf_data_imputed,
    importance = TRUE,
    ntree = 500,
    sampsize = rep(min(table(rf_data_imputed$Cluster)), nlevels(rf_data_imputed$Cluster)),
    strata = rf_data_imputed$Cluster
  )
}, error = function(e) {
  message("Error en randomForest: ", e$message)
  # Versión más robusta con parámetros ajustados
  randomForest(
    Cluster ~ .,
    data = rf_data_imputed,
    importance = TRUE,
    ntree = 200,
    mtry = max(floor(ncol(rf_data_imputed)/3), 1),
    nodesize = 5
  )
})

# 7. Verificar que el modelo se ejecutó correctamente
if(!exists("rf_model")) stop("No se pudo ejecutar randomForest")

# 8. Procesar y visualizar resultados (como antes)
rf_importance <- importance(rf_model)
rf_df <- as.data.frame(rf_importance) %>%
  rownames_to_column("Marker") %>%

```

```
arrange(desc(MeanDecreaseGini))
```

```
# Visualización
```

```
ggplot(head(rf_df, 15), aes(x = reorder(Marker, MeanDecreaseGini), y = MeanDecreaseGini)) +
  geom_col(fill = "steelblue") +
  coord_flip() +
  labs(title = "Importancia de Variables (Random Forest)",
       subtitle = paste("Modelo con", rf_model$ntree, "árboles"),
       x = "Marcador",
       y = "Mean Decrease Gini") +
  theme_minimal()
```

```
```
```

```
CON COLUMNAS ESPECÍFICAS
```

```
```{r}
```

```
library(tidyverse)
library(pheatmap)
```

```
```
```

```
```{r}
```

```
# ---- HEATMAP DE PERFILES (filtrado por subconjunto específico que queremos estudiar) ----
```

```
# Cargar datos con readr::read_csv para forzar porque nos está dando error...
```

```
promedios <- readr::read_csv("T0/promedios_por_cluster.csv")
```

```
# Define las columnas que quieres para el heatmap
```

```
columnas_interes <- c(
  "Treg",
  "nTreg.FoxP3..Helios.",
  "pTreg.FoxP3..Helios.",
  "Treg.activadas",
  "Treg.memoria.central",
  "Treg.memoria.efectora",
  "Treg.Naive",
```

```

"Treg.RTE",
"Treg.TEMRA",
"T.follicular.regulador",
"Linfocitos.T.CD8.CD28.",
"Breg.CD24hi.CD27.",
"Breg.CD24hi.CD38hi"
)

# Extraer solo esas columnas como matriz para pheatmap
matriz_heatmap <- promedios %>%
  select(all_of(columnas_interes)) %>%
  as.matrix()

rownames(matriz_heatmap) <- as.character(promedios$Cluster)

# Crear heatmap
pheatmap(matriz_heatmap,
  scale = "row",
  clustering_method = "complete",
  main = "Heatmap perfiles celulares",
  fontsize_row = 10)
```


SI QUISIERAMOS QUE ORDENARA LOS CLUSTERS HABRÍA QUE CAMBIAR EL CÓDIGO CON


```

pheatmap(matriz_heatmap,
  scale = "row",
  clustering_method = "complete",
  cluster_rows = FALSE,
  main = "Heatmap perfiles celulares",
  fontsize_row = 10)

```


AHORA QUEREMOS KRUSCAL + FDR


```

```{r}
str(kruskal_table)
colnames(kruskal_table)

```


```

```

...

```{r}
str(merged)
colnames(merged)
...

```{r}
library(dplyr)
...

```{r}
Asegurarse de que los nombres de los marcadores coincidan
kruskal_table$Marker <- toupper(trimws(kruskal_table$Marker))
rf_df$Marker <- toupper(trimws(rf_df$Marker))

Fusionar las dos tablas por marcador
merged <- inner_join(kruskal_table, rf_df, by = "Marker")

Verificar que haya coincidencias
if (nrow(merged) == 0) stop("No hay marcadores coincidentes entre Kruskal y RF. Revisa los nombres.")

Elegir los top 15 marcadores más importantes según Random Forest
top_markers_rf <- head(rf_df$Marker, 15)

Filtrar los biomarcadores que sean significativos (FDR < 0.05) y estén entre los más importantes para RF
final_biomarkers <- merged %>%
 dplyr::filter(FDR < 0.05 & Marker %in% top_markers_rf) %>%
 dplyr::arrange(FDR)

Ver resultado
print(final_biomarkers)
...

POSTHOC

```{r}

```

```

install.packages("FSA")
...

```{r}
library(FSA)
...

```{r}
# Crear lista donde guardar los resultados
dunn_results_list <- list()
print(dunn_results_final)
...

```{r}
missing_markers <- setdiff(final_biomarkers$Marker, colnames(expr_df))
print(missing_markers)
...

```{r}
valid_markers <- intersect(final_biomarkers$Marker, colnames(expr_df))
...

```{r}
dunn_results_list <- list()

for (marker in valid_markers) {
 # Comprobar si toda la columna es NA
 if (all(is.na(expr_df[[marker]]))) {
 warning(paste("El marcador", marker, "tiene solo NA, se omite"))
 next
 }
}

```

```

Imputar NAs con la media
if (any(is.na(expr_df[[marker]]))) {
 mean_val <- mean(expr_df[[marker]], na.rm = TRUE)
 if (is.na(mean_val)) {
 warning(paste("El marcador", marker, "tiene solo NA, se omite"))
 next
 }
 expr_df[[marker]][is.na(expr_df[[marker]])] <- mean_val
}

formula <- as.formula(paste(marker, "~ Cluster"))

dunn_df <- dunnTest(formula, data = expr_df, method = "bh")$res

dunn_df$Marker <- marker

dunn_results_list[[marker]] <- dunn_df
}

dunn_results_final <- bind_rows(dunn_results_list)
head(dunn_results_final)
'''

GRAFICAMOS AHORA, PRIMERO HEATMAP
```{r}
library(pheatmap)
'''

```{r}
Seleccionar datos de los marcadores finales
heatmap_data <- expr_df %>%
 dplyr::select(all_of(valid_markers), Cluster)

```



```
heatmap_means <- heatmap_data %>%
 group_by(Cluster) %>%
 summarise(across(all_of(valid_markers), mean, na.rm = TRUE)) %>%
 as.data.frame()
```

```
rownames(heatmap_means) <- heatmap_means$Cluster
heatmap_means$Cluster <- NULL
```

```
heatmap_scaled <- t(scale(t(heatmap_means)))
```

```
pheatmap(heatmap_scaled,
 cluster_rows = TRUE,
 cluster_cols = TRUE,
 main = "Heatmap expresión media por Cluster",
 fontsize_row = 10,
 fontsize_col = 10)
...

```

## AHORA GRAFICAMOS BOXPLOTS

```
```{r}
```

```
library(ggplot2)
```

```
library(tidyr)
```

```
...

```

```
```{r}
```

```
boxplot_data <- expr_df %>%
```

```
 dplyr::select(Cluster, all_of(valid_markers)) %>%
```

```
 pivot_longer(cols = -Cluster, names_to = "Marker", values_to = "Expression")
```

```
ggplot(boxplot_data, aes(x = factor(Cluster), y = Expression, fill = factor(Cluster))) +
```

```
 geom_boxplot(outlier.size = 0.8) +
```

```
 facet_wrap(~ Marker, scales = "free_y") +
```

```
 theme_minimal() +
```

```

labs(x = "Cluster", y = "Expresión", fill = "Cluster") +
 theme(strip.text = element_text(size = 8))
...

```{r}
install.packages("fmsb")
...

```{r}
library(fmsb)
...

```{r}
# Datos promedio por cluster
radar_data <- expr_df %>%
  dplyr::select(Cluster, all_of(valid_markers)) %>%
  group_by(Cluster) %>%
  summarise(across(everything(), mean, na.rm = TRUE)) %>%
  as.data.frame()

rownames(radar_data) <- radar_data$Cluster
radar_data$Cluster <- NULL

# Máximos y mínimos para escala
max_vals <- apply(radar_data, 2, max)
min_vals <- apply(radar_data, 2, min)

radar_input <- rbind(max_vals, min_vals, radar_data)

# Colores para clusters
radar_colors <- rainbow(nrow(radar_data))

radarchart(radar_input, axistype = 1,
  pcol = radar_colors, pfc = scales::alpha(radar_colors, 0.3),
  plwd = 2, plty = 1,

```

```

cglcol = "grey", cglty = 1, axislabcol = "grey",
vlcex = 0.8,
title = "Perfil de expresión promedio por Cluster")

legend("topright", legend = rownames(radar_data), bty = "n", pch = 20,
      col = radar_colors, text.col = radar_colors, cex = 0.8)

```

GRAFICOS INCLUYENDO CONTROLES

```

```{r}
--- PASO 1: Combinar pacientes con clusters y controles ---

df_pacientes_con_cluster <- df_pacientes %>%
 mutate(Cluster = as.factor(clusters_pacientes))

df_controles_con_cluster <- df_controles %>%
 mutate(Cluster = "Control") %>%
 mutate(Cluster = factor(Cluster))

expr_df <- bind_rows(
 df_pacientes_con_cluster,
 df_controles_con_cluster
)

--- PASO 2: Filtrar solo los 4 marcadores validados ---

valid_markers <- c("CD4..EM", "CD4..RTE", "CD4..CM", "NK.CD56.CD16.")

--- PASO 3: Test Kruskal-Wallis solo con esos marcadores ---

library(FSA)
library(dplyr)

```

```
pvalues <- sapply(valid_markers, function(marker) {
 kruskal.test(expr_df[[marker]] ~ expr_df$Cluster)$p.value
})
p_adj <- p.adjust(pvalues, method = "BH")
names(p_adj) <- valid_markers
print(p_adj)
```

# --- PASO 4: Test posthoc Dunn para esos marcadores ---

```
dunn_results <- lapply(valid_markers, function(marker) {
 dunn <- dunnTest(expr_df[[marker]] ~ expr_df$Cluster, method = "bh")
 dunn$res %>%
 mutate(Marker = marker)
})
dunn_df <- do.call(rbind, dunn_results)
```

# --- PASO 5: Calcular promedios para heatmap y el radar grafico---

```
heatmap_means <- expr_df %>%
 group_by(Cluster) %>%
 summarise(across(all_of(valid_markers), mean, na.rm = TRUE)) %>%
 as.data.frame()
rownames(heatmap_means) <- heatmap_means$Cluster
```

```
heatmap_mat <- heatmap_means %>%
 select(-Cluster) %>%
 as.matrix()
```

```
library(pheatmap)
```

```
pheatmap(heatmap_mat,
 cluster_rows = TRUE,
 cluster_cols = TRUE,
```

```

scale = "column",
main = "Perfil inmunológico promedio por cluster (incluyendo controles)",
fontsize = 8)

```

```
--- PASO 6: Boxplots por marcador ---
```

```

library(tidyr)
library(ggplot2)

```

```

expr_long <- expr_df %>%
 select(Cluster, all_of(valid_markers)) %>%
 pivot_longer(cols = -Cluster, names_to = "Marker", values_to = "Expression")

ggplot(expr_long, aes(x = Cluster, y = Expression, fill = Cluster)) +
 geom_boxplot() +
 facet_wrap(~ Marker, scales = "free_y") +
 theme_minimal() +
 labs(title = "Distribución de marcadores significativos por Cluster (con controles)",
 y = "Valor")

```

```
--- PASO 7: Random Forest (con controles incluidos) ---
```

```

library(randomForest)
library(missForest)

```

```
set.seed(42)
```

```

rf_data <- expr_df %>%
 select(all_of(valid_markers), Cluster) %>%
 mutate(Cluster = as.factor(Cluster))

```

```

rf_data_imputed <- tryCatch({
 imp <- missForest(rf_data, verbose = TRUE)

```

```

imp$rimp
}, error = function(e) {
 message("Falló missForest, imputación por mediana.")
 rf_data %>% mutate(across(where(is.numeric), ~ ifelse(is.na(.), median(., na.rm = TRUE), .)))
})

rf_model <- randomForest(Cluster ~ ., data = rf_data_imputed, importance = TRUE, ntree = 500)

rf_importance <- importance(rf_model)
rf_df <- as.data.frame(rf_importance) %>%
 rownames_to_column("Marker") %>%
 arrange(desc(MeanDecreaseGini))

ggplot(rf_df, aes(x = reorder(Marker, MeanDecreaseGini), y = MeanDecreaseGini)) +
 geom_col(fill = "steelblue") +
 coord_flip() +
 labs(title = "Importancia de Variables (Random Forest)",
 subtitle = paste("Modelo con", rf_model$ntree, "árboles"),
 x = "Marcador",
 y = "Mean Decrease Gini") +
 theme_minimal()
```



```

--- PASO 8: Radar plot ---

library(fmsb)

radar_data <- expr_df %>%
 group_by(Cluster) %>%
 summarise(across(all_of(valid_markers), mean, na.rm = TRUE)) %>%
 as.data.frame()

```


```

```

rownames(radar_data) <- radar_data$Cluster
radar_data <- radar_data %>% select(-Cluster)

# Escalar entre 0 y 1
max_vals <- apply(radar_data, 2, max)
min_vals <- apply(radar_data, 2, min)

radar_scaled <- as.data.frame(scale(radar_data, center = min_vals, scale = max_vals - min_vals))
radar_scaled <- rbind(rep(1, ncol(radar_scaled)), rep(0, ncol(radar_scaled)), radar_scaled)

radarchart(radar_scaled, axistype=1,
  pcol=rainbow(nrow(radar_scaled)-2),
  pfcol=rainbow(nrow(radar_scaled)-2, alpha=0.3),
  plwd=2,
  cglcol="grey", cglty=1, axislabcol="grey", caxislabels=seq(0,1,0.2), cglwd=0.8,
  vlce=0.7,
  title = "Radar plot de perfiles promedio por Cluster (incluyendo controles)")
```

```{r}
# --- PASO 8: Radar plot pero mejor ---
library(fmsb)

# Preparar datos (igual que antes)
radar_data <- expr_df %>%
  group_by(Cluster) %>%
  summarise(across(all_of(valid_markers), mean, na.rm = TRUE)) %>%
  as.data.frame()

rownames(radar_data) <- radar_data$Cluster
radar_data <- radar_data %>% select(-Cluster)

# Escalar entre 0 y 1 (igual que antes)

```



```

max_vals <- apply(radar_data, 2, max)
min_vals <- apply(radar_data, 2, min)

radar_scaled <- as.data.frame(scale(radar_data, center = min_vals, scale = max_vals - min_vals))
radar_scaled <- rbind(rep(1, ncol(radar_scaled)), rep(0, ncol(radar_scaled)), radar_scaled)

```

```
# 3. Configurar gráfico
```

```

dev.new(width = 10, height = 10, unit = "in") # Dispositivo externo de 8x8 pulgadas
par(mar = c(1, 1, 3, 1)) # Márgenes reducidos pero no cero

```

```
# 4. Generar el radar plot
```

```

radarchart(
  radar_scaled,
  axistype = 1,
  pcol = rainbow(nrow(radar_scaled) - 2),
  pfc col = rainbow(nrow(radar_scaled) - 2, alpha = 0.1),
  plwd = 1.5,
  cglcol = "gray",
  caxislabels = seq(0, 1, 0.25),
  vlce x = 0.5,
  calce x = 0.5,
  title = "Perfiles por clúster (normalizado)"
)
```

```

```
```{r}
```

```
# --- PASO 5.1: Gráficos con anotaciones de Dunn ---
```

```
library(ggpubr)
```

```
```
```

```
```{r}
```

```

for (marcador in valid_markers) {
  if (p_adj[marcador] < 0.05) {

```

```

message(paste("\nProcesando:", marcador))

# Extraer comparaciones significativas
dunn_filtrado <- dunn_df[dunn_df$Marker == marcador & dunn_df$P.adj < 0.05, ]

if (nrow(dunn_filtrado) > 0) {
  # Preparar comparaciones
  comparaciones <- strsplit(dunn_filtrado$Comparison, " - ")

  # Calcular posición de y
  y_values <- expr_df[[marcador]]
  y_max <- max(y_values, na.rm = TRUE)
  y_step <- (max(y_values, na.rm = TRUE) - min(y_values, na.rm = TRUE)) * 0.1

  # Crear gráfico
  p <- ggboxplot(expr_df,
    x = "Cluster",
    y = marcador,
    fill = "Cluster",
    palette = "Set1",
    width = 0.7) +
    stat_compare_means(method = "kruskal.test",
      label.y = y_max + y_step * 1.8,
      label = "p.format") +
    {if(length(comparaciones) > 0)
      stat_compare_means(comparisons = comparaciones,
        method = "wilcox.test",
        label = "p.signif",
        hide.ns = TRUE,
        step.increase = 0.12)
    } +
  labs(title = marcador,
    y = "Nivel de expresión") +

```

```

theme_minimal() +
theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1),
      legend.position = "none")

print(p)
} else {
  message(paste("No hay comparaciones significativas para", marcador))
}
}
}
```

TRABAJAMOS AHORA CON LA FUNCIONALIDAD TREG

Leer el CSV
df <- read.csv2(file.choose(), stringsAsFactors = FALSE)

Añadir la columna 'Timepoint' extrayendo T0, T1, T2, T3 o TBIS de la columna 'Paciente'
df <- df %>%
 mutate(Timepoint = str_extract(Paciente, "\\bT0\\b|\\bT1\\b|\\bT2\\b|\\bT3\\b|\\bTBIS\\b"))

Verificar que se haya creado correctamente
head(df)

write.csv(df, "/Users/albertomecazapata/Desktop/Timepoints_funcionalidad_con_grupos.csv",
row.names = FALSE)

Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Especificar columnas que NO se deben normalizar
excluir_cols <- c("Poblacion", "Paciente", "Grupo", "Timepoint")

Seleccionar columnas numéricas que NO están en la lista de exclusión
columnas_a_normalizar <- df %>%
 select(-all_of(excluir_cols)) %>%
 select(where(is.numeric)) %>%

```

```

colnames()

Aplicar normalización (Z-score) a las columnas seleccionadas
df_normalizado <- df %>%
 mutate(across(all_of(columnas_a_normalizar),
 ~ (. - mean(., na.rm = TRUE)) / sd(., na.rm = TRUE)))

Guardar el resultado
write_csv(df_normalizado, "Funcionalidad_normalizado_con_grupo.csv")
library(dplyr)
Leer el archivo normalizado
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

#Lectura
colnames(df)
colnames(df)[34] == "Timepoint"
unique(df$Timepoint)

Filtrar solo las filas con Timepoint == "T0"
df_T0 <- dplyr::filter(df, Timepoint == "T0")

Guardar el nuevo CSV con solo T0
write_csv(df_T0, "/Users/albertomecazapata/Desktop/Funcionalidad_T0_con_grupo.csv")
Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Separar controles y pacientes (0 = Control, 1 = Paciente)
df_controles <- df[df[["Grupo"]] == 0,]
df_pacientes <- df[df[["Grupo"]] == 1,]

Procesar solo los pacientes para el UMAP eliminando columnas no numéricas
df_umap_pacientes <- df_pacientes %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente)

```

```

Imputar NA con la media de cada columna
datos_imputados_pacientes <- df_umap_pacientes %>%
 mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
 })) %>%
 mutate(across(everything(), as.numeric))

Aplicar ComBat solo a los pacientes para corregir efecto lote
datos_mat_pacientes <- t(as.matrix(datos_imputados_pacientes))
batch_pacientes <- df_pacientes$Poblacion
mod_pacientes <- model.matrix(~1, data = df_pacientes)

datos_combat_pacientes <- ComBat(
 dat = datos_mat_pacientes,
 batch = batch_pacientes,
 mod = mod_pacientes,
 par.prior = TRUE,
 prior.plots = FALSE
)

datos_corregidos_pacientes <- t(datos_combat_pacientes)

Aplicar UMAP solo a pacientes
set.seed(42)
umap_model <- umap(datos_corregidos_pacientes)

Preparar datos de controles para proyección (asegurando compatibilidad con pacientes)
datos_controles <- df_controles %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente) %>%
 # Asegurar que tenemos las mismas columnas que en pacientes
 select(colnames(datos_imputados_pacientes)) %>%
 # Imputación (atribuyendo 0 si toda la columna es NA)

```

```

mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
})) %>%
mutate(across(everything(), as.numeric))

Verificar que no quedan NA
stopifnot(!any(is.na(datos_controles)))

Proyectar controles usando el modelo entrenado con pacientes
controles_proyectados <- predict(umap_model, as.matrix(datos_controles))

Crear dataframe final
umap_df_final <- data.frame(
 UMAP1 = c(umap_model$layout[,1], controles_proyectados[,1]),
 UMAP2 = c(umap_model$layout[,2], controles_proyectados[,2]),
 Paciente = c(df_pacientes$Paciente, df_controles$Paciente),
 Grupo = factor(c(rep("Paciente", nrow(df_pacientes)),
 rep("Control", nrow(df_controles)))),
 Poblacion = c(df_pacientes$Poblacion, df_controles$Poblacion)
)

Graficar
ggplot(umap_df_final, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Grupo, shape = Poblacion)) +
 geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
 theme_minimal() +
 labs(
 title = "UMAP de funcionalidad de pacientes (corregido por población) con controles proyectados",
 x = "UMAP 1",
 y = "UMAP 2",
 color = "Grupo",
 shape = "Población"
) +
 scale_color_manual(values = c("Paciente" = "#F8766D", "Control" = "#00BFC4")) +

```

```
scale_shape_manual(values = c(16, 17, 15, 18)) # Diferentes formas para cada población
Leer CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Eliminar columnas no necesarias
df_umap <- df %>% select(-Poblacion, -Timepoint)

Extraer las columnas numéricas (sin Paciente)
datos_numericos <- df_umap %>% select(-Paciente)

Imputar NA con la media de cada columna
datos_imputados <- datos_numericos %>%
 mutate(across(everything(), ~ ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)))

Escalar los datos
expr_scaled <- scale(datos_imputados)

Heurística raíz cuadrada
k_init <- round(sqrt(nrow(expr_scaled)) / 2)

Elbow Method
fviz_nbclust(expr_scaled, kmeans, method = "wss")

Silhouette
fviz_nbclust(expr_scaled, kmeans, method = "silhouette")

Gap Statistic
set.seed(123)
gap_stat <- clusGap(expr_scaled, FUN = kmeans, K.max = 10, B = 100)
fviz_gap_stat(gap_stat)

Consensus clustering
results <- ConsensusClusterPlus(as.matrix(expr_scaled),
```



```

 maxK = 6,
 reps = 100,
 pItem = 0.8,
 clusterAlg = "hc",
 distance = "euclidean",
 seed = 1234,
 plot = "pdf")

Leer el CSV
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Separar controles y pacientes (0 = Control, 1 = Paciente)
df_controles <- df[df[["Grupo"]] == 0,]
df_pacientes <- df[df[["Grupo"]] == 1,]

Procesar solo los pacientes para el UMAP eliminando columnas no numéricas
df_umap_pacientes <- df_pacientes %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente)

Imputar NA con la media de cada columna
datos_imputados_pacientes <- df_umap_pacientes %>%
 mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
 })) %>%
 mutate(across(everything(), as.numeric))

Aplicar ComBat solo a los pacientes para corregir efecto lote
datos_mat_pacientes <- t(as.matrix(datos_imputados_pacientes))
batch_pacientes <- df_pacientes$Poblacion
mod_pacientes <- model.matrix(~1, data = df_pacientes) # Modelo solo con intercepto

datos_combat_pacientes <- ComBat(
 dat = datos_mat_pacientes,
 batch = batch_pacientes,

```

```

mod = mod_pacientes,
par.prior = TRUE,
prior.plots = FALSE
)

datos_corregidos_pacientes <- t(datos_combat_pacientes)

Aplicar UMAP solo a pacientes
set.seed(42)
umap_model <- umap(datos_corregidos_pacientes)

--- CLUSTERING (k-means) SOLO PARA PACIENTES ---
set.seed(42)
k <- 2 # Número de clusters deseado
clusters_pacientes <- kmeans(umap_model$layout, centers = k)$cluster

Preparar datos de controles para proyección (sin clustering)
datos_controles <- df_controles %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente) %>%
 select(colnames(datos_imputados_pacientes)) %>%
 mutate(across(everything(), ~ {
 if (all(is.na(.))) 0 else ifelse(is.na(.), mean(., na.rm = TRUE), .)
 })) %>%
 mutate(across(everything(), as.numeric))

Proyectar controles (sin incluirlos en el clustering)
controles_proyectados <- predict(umap_model, as.matrix(datos_controles))

Crear dataframe final combinado (pacientes + controles)
umap_df_final <- data.frame(
 UMAP1 = c(umap_model$layout[,1], controles_proyectados[,1]),
 UMAP2 = c(umap_model$layout[,2], controles_proyectados[,2]),
 Paciente = c(df_pacientes$Paciente, df_controles$Paciente),

```

```

Grupo = factor(c(rep("Paciente", nrow(df_pacientes)),
 rep("Control", nrow(df_controles)))),
Poblacion = c(df_pacientes$Poblacion, df_controles$Poblacion),
Añadir columna de clusters (con NA para controles)
Cluster = factor(c(clusters_pacientes, rep(NA, nrow(df_controles))))
)

Graficar (colores para cluster y formas para población)
ggplot(umap_df_final, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Cluster, shape = Grupo)) +
 geom_point(size = 4, alpha = 0.8) +
 theme_minimal() +
 labs(
 title = "UMAP de pacientes (clusterizados en 2 grupos) y controles proyectados",
 x = "UMAP 1",
 y = "UMAP 2",
 color = "Cluster (Pacientes)",
 shape = "Grupo"
) +
 scale_color_manual(
 values = c("#F8766D", "#4f1dd2"), # Colores para los clusters
 na.value = "gray", # Color para controles (NA)
 labels = c("Cluster 1", "Cluster 2", "Control")
) +
 scale_shape_manual(values = c(16, 17)) # 16: Pacientes, 17: Controles
Combinar los datos originales de pacientes con la información de clusters
df_pacientes_con_cluster <- df_pacientes %>%
 mutate(Cluster = as.character(clusters_pacientes))

Agregar los controles con Cluster = NA
df_final_con_cluster <- bind_rows(
 df_pacientes_con_cluster,
 df_controles %>% mutate(Cluster = "Control")
) %>%

```

```

mutate(Cluster = factor(Cluster, levels = c("Control", "1", "2")))

Calcular promedios por cluster (solo para pacientes, excluyendo controles)
promedios_por_cluster <- df_pacientes_con_cluster %>%
 group_by(Cluster) %>%
 # Calcular la media para columnas numéricas
 summarise(across(where(is.numeric), mean, na.rm = TRUE),
 # Para columnas no numéricas
 across(c(Poblacion, Timepoint), ~ paste(unique(.), collapse = ", ")),
 .groups = "drop")

Incluir resumen de los controles:
promedios_controles <- df_controles %>%
 summarise(across(where(is.numeric), mean, na.rm = TRUE),
 across(c(Poblacion, Timepoint), ~ paste(unique(.), collapse = ", "))) %>%
 mutate(Cluster = "Control")

Combinar ambos resultados
resultado_final <- bind_rows(
 promedios_por_cluster,
 promedios_controles
)

Reordenar columnas para que Cluster sea la primera
resultado_final <- resultado_final %>%
 select(Cluster, everything())

Guardar el resultado en un CSV
write_csv(resultado_final, "promedios_por_cluster.csv")

Mostrar el resultado
print(resultado_final)

```

```

---- HEATMAP DE PERFILES ----

Usamos el resultado_final que contiene los promedios por cluster
perfil_mat <- as.matrix(resultado_final %>%
 select(-Cluster, -Poblacion, -Timepoint, -Grupo) %>%
 select(where(is.numeric)))

Asignamos nombres de fila
rownames(perfil_mat) <- paste0("Cluster_", resultado_final$Cluster)

Generamos el heatmap
pheatmap(perfil_mat,
 cluster_rows = TRUE,
 cluster_cols = TRUE,
 scale = "column",
 main = "Perfil funcional promedio por cluster",
 fontsize = 6, # Reduce el tamaño de todo el texto
 fontsize_col = 3, # Texto de columnas (eje X)
 fontsize_row = 8) # Texto de filas (opcional)

---- TEST ESTADÍSTICO POR MARCADOR (Kruskal-Wallis) ----

Primero preparar los datos originales con la asignación de clusters
expr_df <- df_final_con_cluster %>%
 select(-Poblacion, -Timepoint, -Grupo, -Paciente) %>%
 mutate(Cluster = factor(Cluster, levels = c("Control", "1", "2")))

Escalamos los datos
expr_data_scaled <- expr_df %>%
 select(-Cluster) %>%
 scale()

Calcular p-values (usamos Kruskal-Wallis para datos no paramétricos)
pvalues <- apply(expr_data_scaled, 2, function(x) {
 kruskal.test(x ~ expr_df$Cluster)$p.value

```

```
})
p_adj <- p.adjust(pvalues, method = "BH")

---- TOP MARCADORES SIGNIFICATIVOS ----
top_markers <- names(sort(p_adj))[1:10]

Preparar datos para el gráfico
expr_long <- expr_df %>%
 select(all_of(top_markers), Cluster) %>%
 pivot_longer(cols = -Cluster, names_to = "variable", values_to = "value")

ggplot(expr_long, aes(x = Cluster, y = value, fill = Cluster)) +
 geom_boxplot() +
 facet_wrap(~ variable, scales = "free_y") +
 theme_minimal() +
 labs(title = "Top moléculas supresoras que discriminan clusters",
 y = "Valor escalado")

---- RANDOM FOREST CON IMPUTACIÓN DE VALORES FALTANTES ----
set.seed(42)

1. Preparar los datos manteniendo solo variables relevantes
rf_data <- expr_df %>%
 select(where(is.numeric), Cluster) %>%
 mutate(Cluster = as.factor(Cluster))

2. Verificar estructura de los datos
str(rf_data)
print(paste("Número de NA antes de imputación:", sum(is.na(rf_data))))

3. Imputación con verificación
rf_data_imputed <- tryCatch({
 imp <- missForest(rf_data, verbose = TRUE)
```

```

print(paste("Error de imputación OOB:", imp$OOBError))
imp$ximp
}, error = function(e) {
 message("Falló missForest, usando imputación por mediana: ", e$message)
 rf_data %>%
 mutate(across(where(is.numeric), ~ifelse(is.na(.), median(., na.rm = TRUE), .)))
})

4. Verificación post-imputación
print(paste("Número de NA después de imputación:", sum(is.na(rf_data_imputed))))
stopifnot(nrow(rf_data_imputed) == nrow(rf_data)) # Verificar que no se perdieron filas

5. Asegurar que las clases no estén desbalanceadas
table(rf_data_imputed$Cluster)
if(min(table(rf_data_imputed$Cluster)) < 5) {
 warning("Algunos clusters tienen muy pocas observaciones!")
}

6. Ejecutar Random Forest con verificación
rf_model <- tryCatch({
 randomForest(
 Cluster ~ .,
 data = rf_data_imputed,
 importance = TRUE,
 ntree = 500,
 sampsize = rep(min(table(rf_data_imputed$Cluster)), nlevels(rf_data_imputed$Cluster)),
 strata = rf_data_imputed$Cluster
)
}, error = function(e) {
 message("Error en randomForest: ", e$message)
 # Versión con parámetros ajustados para hacerla más robusta
 randomForest(
 Cluster ~ .,

```



```

data = rf_data_imputed,
importance = TRUE,
ntree = 200,
mtry = max(floor(ncol(rf_data_imputed)/3), 1),
nodesize = 5
)
})

```

# 7. Verificar que el modelo se ejecutó correctamente

```
if(!exists("rf_model")) stop("No se pudo ejecutar randomForest")
```

# 8. Procesar y visualizar resultados (como antes)

```

rf_importance <- importance(rf_model)
rf_df <- as.data.frame(rf_importance) %>%
 rownames_to_column("Marker") %>%
 arrange(desc(MeanDecreaseGini))

```

# Visualización

```

ggplot(head(rf_df, 15), aes(x = reorder(Marker, MeanDecreaseGini), y = MeanDecreaseGini)) +
 geom_col(fill = "steelblue") +
 coord_flip() +
 labs(title = "Importancia de Variables (Random Forest)",
 subtitle = paste("Modelo con", rf_model$ntree, "árboles"),
 x = "Marcador",
 y = "Mean Decrease Gini") +
 theme_minimal()

```

AHORA QUEREMOS KRUSCAL + FDR

```

library(dplyr)
library(tidyr)

Extraer nombres de los marcadores (todas las columnas numéricas excepto Cluster)
marker_names <- setdiff(colnames(expr_df), "Cluster")

```

```

Crear dataframe vacío para guardar resultados
kruskal_results <- data.frame(
 Marker = character(),
 PValue = numeric(),
 stringsAsFactors = FALSE
)

Loop para hacer test Kruskal-Wallis por marcador
for (marker in marker_names) {
 values <- expr_df[[marker]]
 group <- as.factor(expr_df$Cluster)

 # Omitir si todo es NA
 if (all(is.na(values))) next

 # Imputar NA con la media del marcador
 values[is.na(values)] <- mean(values, na.rm = TRUE)

 # Test Kruskal-Wallis
 test <- kruskal.test(values ~ group)

 kruskal_results <- rbind(
 kruskal_results,
 data.frame(Marker = marker, PValue = test$p.value)
)

 # Guardar resultado
 kruskal_results <- rbind(kruskal_results, data.frame(Marker = marker, PValue = test$p.value))
}

Ajustar p-values con FDR (método Benjamini-Hochberg)
kruskal_results$FDR <- p.adjust(kruskal_results$PValue, method = "BH")

```

```
Ordenar por FDR ascendente
kruskal_results <- kruskal_results %>% arrange(FDR)

Ver cuáles son los significativos
kruskal_signif <- kruskal_results %>% dplyr::filter(FDR < 0.05)

Mostrar y guardar los resultados obtenidos
print(head(kruskal_signif, 15)) # Top 15

write.csv(kruskal_results, "kruskal_results.csv", row.names = FALSE)
write.csv(kruskal_signif, "kruskal_signif.csv", row.names = FALSE)

PASO DESPUÉS DEL KRUSKAL + FDR
Asegurar nombres coherentes
kruskal_results$Marker <- toupper(trimws(kruskal_results$Marker))
rf_df$Marker <- toupper(trimws(rf_df$Marker))

Fusionar y filtrar
merged <- inner_join(kruskal_results, rf_df, by = "Marker")

Verificar si hay coincidencias
if (nrow(merged) == 0) stop("No hay marcadores coincidentes entre Kruskal y RF. Revisa los nombres.")

final_biomarkers <- merged %>%
 dplyr::filter(FDR < 0.05) %>%
 arrange(FDR)

Ver resultados
print(final_biomarkers)

Cargar paquete
library(FSA)

Comprobar que los marcadores están en expr_df
```

```

missing_markers <- setdiff(final_biomarkers$Marker, colnames(expr_df))
if (length(missing_markers) > 0) {
 warning("Los siguientes marcadores no están en expr_df: ", paste(missing_markers, collapse = ", "))
}
valid_markers <- intersect(final_biomarkers$Marker, colnames(expr_df))

Crear lista para guardar los resultados
dunn_results_list <- list()

Posthoc Dunn para cada marcador
for (marker in valid_markers) {
 # Si todos los valores son NA, saltamos
 if (all(is.na(expr_df[[marker]]))) {
 warning(paste("El marcador", marker, "tiene solo NA, se omite"))
 next
 }

 # Imputar con media si hay NA
 if (any(is.na(expr_df[[marker]]))) {
 mean_val <- mean(expr_df[[marker]], na.rm = TRUE)
 expr_df[[marker]][is.na(expr_df[[marker]])] <- mean_val
 }

 # Saltar si no hay variabilidad en los valores
 if (length(unique(expr_df[[marker]])) == 1) {
 warning(paste("El marcador", marker, "no tiene variabilidad (todos los valores iguales), se omite"))
 next
 }

 # Construir formula con backticks para nombres con puntos
 formula_str <- paste0("`", marker, "` ~ Cluster")

 # Realizar el test de Dunn con corrección BH

```

```

dunn_result <- tryCatch({
 dunn_res <- dunnTest(as.formula(formula_str), data = expr_df, method = "bh")$res
 if (!is.data.frame(dunn_res)) stop("Resultado no es data.frame")
 dunn_res
}, error = function(e) {
 warning(paste("Error con marcador", marker, ":", e$message))
 return(NULL)
})

if (!is.null(dunn_result)) {
 dunn_result$Marker <- marker
 dunn_results_list[[marker]] <- dunn_result
}
}

Combinar resultados en un solo dataframe
dunn_results_funcionalidad_final <- bind_rows(dunn_results_list)

Mostrar ejemplo de resultados
head(dunn_results_funcionalidad_final)
write.csv(dunn_results_funcionalidad_final, "dunn_results_funcionalidad.csv", row.names = FALSE)

Ahora procedemos a generar los gráficos PRIMERO BOXPLOT
library(ggpubr)

Iterar por cada marcador válido
for (marcador in valid_markers) {

 # Extraer las comparaciones significativas para ese marcador
 dunn_filtrado <- dunn_results_funcionalidad_final %>%
 dplyr::filter(Marker == marcador & P.adj < 0.05)

 # Solo si hay comparaciones significativas
 if (nrow(dunn_filtrado) > 0) {

```

```

message(paste("\nProcesando:", marcador))

Preparar comparaciones para ggpubr
comparaciones <- strsplit(dunn_filtrado$Comparison, " - ")

Calcular posición y para el gráfico
y_values <- expr_df[[marcador]]
y_max <- max(y_values, na.rm = TRUE)
y_min <- min(y_values, na.rm = TRUE)
y_step <- (y_max - y_min) * 0.1

Crear gráfico
p <- ggboxplot(expr_df,
 x = "Cluster",
 y = marcador,
 fill = "Cluster",
 palette = "Set1",
 width = 0.7) +
 stat_compare_means(method = "kruskal.test",
 label.y = y_max + y_step * 1.8,
 label = "p.format") +
 stat_compare_means(comparisons = comparaciones,
 method = "wilcox.test",
 label = "p.signif",
 hide.ns = TRUE,
 step.increase = 0.12) +
 labs(title = marcador,
 y = "Nivel de expresión") +
 theme_minimal() +
 theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1),
 legend.position = "none")

print(p)

```

```

} else {
 message(paste("No hay comparaciones significativas para", marcador))
}
}

```

## REDES DE COEXPRESIÓN

```

install.packages("widyrr")
install.packages("igraph")
install.packages("ggraph")
install.packages("tidygraph")
install.packages("corrr")
Librerías necesarias
library(tidyverse)
library(corrr)
library(igraph)
library(ggraph)

Definiciones
marker_cols <- colnames(expr_df)[1:30]

Paso 1: Crear columna 'Grupo' con dos valores: 'Control' y 'Paciente'
expr_df <- expr_df %>%
 mutate(Grupo = case_when(
 Cluster == "Control" ~ "Control",
 Cluster %in% c("1", "2") ~ "Paciente",
 TRUE ~ NA_character_
))

Crear red de coexpresión
crear_red_coexpresion <- function(df_sub, titulo) {
 cor_matrix <- correlate(df_sub, method = "spearman") %>%
 stretch(na.rm = TRUE) %>%
 filter(abs(r) > 0.6, x != y)

```



```

print(paste("Número de correlaciones fuertes:", nrow(cor_matrix)))

if (nrow(cor_matrix) == 0) {
 plot.new()
 title(main = paste(titulo, "(Sin correlaciones fuertes)"))
 return(NULL)
}

g <- graph_from_data_frame(cor_matrix)

ggraph(g, layout = "fr") +
 geom_edge_link(aes(edge_alpha = abs(r), edge_width = abs(r), edge_color = r)) +
 scale_edge_color_gradient2(low = "blue", mid = "grey", high = "red", midpoint = 0) +
 geom_node_point(size = 2, color = "lightblue") +
 geom_node_text(aes(label = name), repel = TRUE, size = 3) +
 theme_void() +
 ggtitle(titulo)
}

Separar controles y pacientes usando la columna 'Grupo'
controles <- expr_df %>%
 filter(Grupo == "Control") %>%
 select(all_of(marker_cols))

pacientes <- expr_df %>%
 filter(Grupo == "Paciente") %>%
 select(all_of(marker_cols))

Generar redes
crear_red_coexpresion(controles, "Red Coexpresión - Controles")
crear_red_coexpresion(pacientes, "Red Coexpresión - Pacientes")
cluster1 <- expr_df %>%

```

```
filter(Cluster == "1") %>%
select(all_of(marker_cols))
```

```
cluster2 <- expr_df %>%
filter(Cluster == "2") %>%
select(all_of(marker_cols))
```

```
crear_red_coexpresion(cluster1, "Red Coexpresión - Cluster 1")
crear_red_coexpresion(cluster2, "Red Coexpresión - Cluster 2")
```

```
Fusionar los datos (control + paciente) para calcular la red conjunta
todos <- expr_df %>%
filter(Grupo %in% c("Control", "Paciente")) %>%
select(all_of(marker_cols))
```

```
crear_red_coexpresion(todos, "Red Coexpresión - Fusionada")
```

AQUI EMPIEZA LA ETAPA 3, TRABAJAMOS CON LA CLINICA

```
library(readxl)
library(readr)
```

```
Leer el archivo Excel
df <- read_excel("/Users/albertomecazapata/Desktop/Máster Bioinformática/2º año/TFM/_Etapa
3/Excel con datos clínicos integrados.xlsx")
```

```
Guardar el CSV
write_csv(df, "/Users/albertomecazapata/Desktop/Máster Bioinformática/2º año/TFM/_Etapa
3/datos_clinicos_convertido.csv")
```

```
data_clinica <- read.csv("/Users/albertomecazapata/Desktop/Máster Bioinformática/2º
año/TFM/_Etapa 3/datos_clinicos_convertido.csv")
```

```
excluir_cols <- c("Poblacion", "Paciente", "Grupo", "Sexo", "Edad..escrito.", "Grupo.IDP..interno.", "Genetica",
"Inmunosupresor.T0", "Inmunomodulador.T0")
```

```
Indicar las columnas para normalizar
```

```

cols_a_normalizar <- setdiff(names(data_clinica), excluir_cols)

De esos, quedarnos solo con las que son numéricas
cols_a_normalizar <- cols_a_normalizar[sapply(data_clinica[cols_a_normalizar], is.numeric)]

Normalizamos (z-score), manteniendo los NAs
data_clinica_norm <- data_clinica %>%
 mutate(across(all_of(cols_a_normalizar), ~ (. - mean(., na.rm = TRUE)) / sd(., na.rm = TRUE)))

write.csv(data_clinica_norm, "/Users/albertomecazapata/Desktop/Máster Bioinformática/2º
año/TFM/_Etapa 3/datos_clinicos_normalizados.csv", row.names = FALSE)

install.packages(c("lattice", "caret", "locfit", "nlme", "Matrix"))
install.packages("mice")
install.packages("caret")
library(mice)
library(pROC)
library(randomForest)
library(dplyr)

Cargar el dataset ya normalizado e imputar con mice
datos_modelo <- read.csv("/Users/albertomecazapata/Desktop/Máster Bioinformática/2º
año/TFM/_Etapa 3/datos_clinicos_normalizados.csv")

colnames(datos_modelo)

Definir variable respuesta
datos_modelo$grupo <- datos_modelo$`Grupo.IDP.interno.`
datos_modelo$`Grupo.IDP.interno.` <- NULL

Imputación con mice (queremos 1 imputación, 5 iteraciones)
set.seed(123)
imputacion <- mice(datos_modelo, m = 1, maxit = 5, seed = 123)
datos_modelo_imput <- complete(imputacion)
str(trainData)

```

```
head(trainData$grupo)
table(trainData$grupo)
table(datos_modelo_imput$grupo)
set.seed(123)

datos <- datos_modelo_imput
datos$grupo <- as.factor(datos$grupo) # convertir a factor
target <- datos$grupo
n <- nrow(datos)

Estratificación 80/20
trainIndex <- unlist(lapply(split(seq_len(n), target),
 function(x) sample(x, size = floor(0.8 * length(x))))))

trainData <- datos[trainIndex,]
testData <- datos[-trainIndex,]

Imputar NA con mediana en variables numéricas
impute_median <- function(df) {
 for (col in names(df)) {
 if (any(is.na(df[[col]]))) {
 if (is.numeric(df[[col]])) {
 med <- median(df[[col]], na.rm = TRUE)
 df[[col]][is.na(df[[col]])] <- med
 }
 }
 }
 return(df)
}

Imputar NAs en train y test
trainData <- impute_median(trainData)
testData <- impute_median(testData)
```

```

Entrenar modelo Random Forest
modelo_rf <- randomForest(grupo ~ ., data = trainData)

Predecir probabilidades para la clase positiva (nivel 2 del factor)
pred <- predict(modelo_rf, testData, type = "prob")[, 2]

Curva ROC
roc_obj <- roc(testData$grupo, pred)
plot(roc_obj)
cat("AUC:", auc(roc_obj), "\n")
library(umap)

1. Quitar columnas no numéricas (es decir, 'Poblacion' y 'Paciente')
datos_umap_clean <- datos_modelo_imput[, !(colnames(datos_modelo_imput) %in% c("Poblacion",
"Paciente"))]

2. Convertir todo a numérico e imputar NAs
datos_umap_clean <- as.data.frame(lapply(datos_umap_clean, function(col) {
 suppressWarnings(col <- as.numeric(as.character(col)))
 col[is.na(col)] <- mean(col, na.rm = TRUE)
 return(col)
})))

3. Confirmar que no quedan NAs
stopifnot(!any(is.na(datos_umap_clean)))

4. Aplicar UMAP
umap_result <- umap(datos_umap_clean)

5. Visualizar coloreado por diagnóstico
plot(umap_result$layout,
 col = as.numeric(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 pch = 16,

```

```

main = "UMAP - Coloreado por diagnóstico")
legend("topright",
 legend = levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 col = 1:length(levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo))),
 pch = 16)

```

## QUEREMOS CORREGIR EL EFECTO LOTE AHORA

```

library(umap)
library(sva)

1. Extraer datos numéricos sin 'Poblacion', 'Paciente' ni 'grupo'
datos_batch <- datos_modelo_imput[, !(colnames(datos_modelo_imput) %in% c("Poblacion", "Paciente",
"grupo"))]

2. Convertir todo a numérico e imputar NAs con la media
datos_batch <- as.data.frame(lapply(datos_batch, function(col) {
 suppressWarnings(col <- as.numeric(as.character(col)))
 col[is.na(col)] <- mean(col, na.rm = TRUE)
 return(col)
}))

3. Crear variable de batch (población)
batch <- as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion)

4. Aplicar ComBat para corregir efecto lote
datos_batch_combat <- ComBat(dat = t(as.matrix(datos_batch)), batch = batch, par.prior = TRUE)
datos_batch_combat <- t(datos_batch_combat)

5. Aplicar UMAP sobre los datos corregidos
umap_result <- umap(datos_batch_combat)

6. Visualizar coloreado por grupo
plot(umap_result$layout,
 col = as.numeric(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 pch = 16,

```

```

main = "UMAP - ComBat corregido (coloreado por grupo)")
legend("topright",
 legend = levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 col = 1:length(levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo))),
 pch = 16)

```

## COMPARATIVA

```
library(umap)
```

```
library(sva)
```

```
1. Extraer datos numéricos sin 'Poblacion', 'Paciente' ni 'grupo'
```

```
datos_batch <- datos_modelo_imput[, !(colnames(datos_modelo_imput) %in% c("Poblacion", "Paciente",
"grupo"))]
```

```
2. Convertir a numérico e imputar NAs con la media
```

```
datos_batch <- as.data.frame(lapply(datos_batch, function(col) {
 suppressWarnings(col <- as.numeric(as.character(col)))
 col[is.na(col)] <- mean(col, na.rm = TRUE)
 return(col)
}))
```

```
3. UMAP antes de ComBat
```

```
umap_before <- umap(datos_batch)
```

```
4. Corregir con ComBat
```

```
batch <- as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion)
datos_batch_combat <- ComBat(dat = t(as.matrix(datos_batch)), batch = batch, par.prior = TRUE)
datos_batch_combat <- t(datos_batch_combat)
```

```
5. UMAP después de ComBat
```

```
umap_after <- umap(datos_batch_combat)
```

```
6. Visualizar comparación
```

```
par(mfrow = c(1, 2)) # dividir la ventana en 2 paneles
```



```
Antes de ComBat
```

```
plot(umap_before$layout,
 col = as.numeric(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 pch = 16,
 main = "UMAP sin corrección (grupo)")
legend("topright",
 legend = levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 col = 1:length(levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo))),
 pch = 16)
```

```
Después de ComBat
```

```
plot(umap_after$layout,
 col = as.numeric(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 pch = 16,
 main = "UMAP corregido con ComBat (grupo)")
legend("topright",
 legend = levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo)),
 col = 1:length(levels(as.factor(datos_modelo_imput$grupo))),
 pch = 16)
```

```
par(mfrow = c(1, 1)) # restaurar layout por defecto
```

```
1. Quitar columnas no numéricas
```

```
datos_batch <- datos_modelo_imput[, !(colnames(datos_modelo_imput) %in% c("Poblacion", "Paciente",
"grupo"))]
```

```
2. Convertir a numérico e imputar NAs con la media
```

```
datos_batch <- as.data.frame(lapply(datos_batch, function(col) {
 suppressWarnings(col <- as.numeric(as.character(col)))
 col[is.na(col)] <- mean(col, na.rm = TRUE)
 return(col)
})))
```

```
3. UMAP antes de ComBat
```

```
umap_before <- umap(datos_batch)
```

```
4. Corregir con ComBat
```

```
batch <- as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion)
```

```
datos_batch_combat <- ComBat(dat = t(as.matrix(datos_batch)), batch = batch, par.prior = TRUE)
```

```
datos_batch_combat <- t(datos_batch_combat)
```

```
5. UMAP después de ComBat
```

```
umap_after <- umap(datos_batch_combat)
```

```
6. Visualización (solo por Población)
```

```
par(mfrow = c(1, 2))
```

```
A) Antes de ComBat
```

```
plot(umap_before$layout,
```

```
 col = as.numeric(as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion)),
```

```
 pch = 16,
```

```
 main = "Antes de ComBat - Población")
```

```
legend("topright",
```

```
 legend = levels(as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion)),
```

```
 col = 1:length(levels(as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion))),
```

```
 pch = 16, cex = 0.8)
```

```
B) Después de ComBat
```

```
plot(umap_after$layout,
```

```
 col = as.numeric(as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion)),
```

```
 pch = 16,
```

```
 main = "Después de ComBat - Población")
```

```
legend("topright",
```

```
 legend = levels(as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion)),
```

```
 col = 1:length(levels(as.factor(datos_modelo_imput$Poblacion))),
```

```
 pch = 16, cex = 0.8)
```

```

Restaurar layout
par(mfrow = c(1, 1))

if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
 install.packages("BiocManager")

BiocManager::install("ComplexHeatmap")
library(ComplexHeatmap)
library(circlize)
colnames(datos_modelo_imput)
library(pheatmap)
library(RColorBrewer)

Subset: solo las columnas de poblaciones celulares (del 4 al 146)
matriz <- datos_modelo_imput[, 4:146]

Escalado por filas (para el heatmap)
matriz_esc <- t(scale(t(matriz)))

Anotaciones clínicas
anotaciones <- datos_modelo_imput[, c("Sexo", "Edad..escrito.", "Genetica", "Inmunosupresor.T0",
"Immunomodulador.T0", "grupo", "Poblacion")]
rownames(anotaciones) <- datos_modelo_imput$Paciente

Asignar nombres de filas a la matriz también
rownames(matriz_esc) <- datos_modelo_imput$Paciente

Definir colores para las anotaciones categóricas
anot_colors <- list(
 Sexo = c("1" = "#FF69B4", "0" = "#1E90FF"),
 Genetica = c("0" = "#56B4E9", "1" = "#E69F00", "2" = "#F0E442", "3" = "#D55E00", "4" = "#CC79A7"),
 Inmunosupresor.T0 = c("0" = "#009E73", "1" = "#D55E00"),
 Immunomodulador.T0 = c("0" = "#CC79A7", "1" = "#999999"),
 grupo = c("0" = "#999999", "1" = "#E41A1C", "2" = "#377EB8", "3" = "#4DAF4A", "4" = "#984EA3"),
 Poblacion = c("BARCELONA" = "#377EB8", "MADRID" = "#4DAF4A")

```

```

)

Dibujar el heatmap
pheatmap(
 matriz_esc,
 annotation_row = anotaciones,
 annotation_colors = anot_colors,
 show_rownames = FALSE,
 show_colnames = FALSE,
 cluster_cols = TRUE,
 cluster_rows = TRUE,
 fontsize = 2,
 fontsize_row = 2,
 fontsize_col = 5,
 annotation_names_row = TRUE,
 annotation_names_col = FALSE,
 legend = FALSE,
 main = "Heatmap poblaciones celulares + datos clínicos"
)

```

#### COMPLEXHEATMAP

```

Subset: solo las columnas de poblaciones celulares (del 4 al 146)
matriz <- datos_modelo_imput[, 4:146]

Escalado por filas
matriz_esc <- t(scale(t(matriz)))

Anotaciones clínicas
anotaciones <- datos_modelo_imput[, c("Sexo", "Edad..escrito.", "Genetica",
 "Inmunosupresor.T0", "Inmunomodulador.T0",
 "grupo", "Poblacion")]
rownames(anotaciones) <- datos_modelo_imput$Paciente

```

```
for (col in c("Sexo", "Genetica", "Inmunosupresor.T0", "Inmunomodulador.T0", "grupo", "Poblacion")) {
 anotaciones[[col]] <- factor(anotaciones[[col]])
}
```

```
Escala de color para la edad
```

```
edad_col_fun <- colorRamp2(
 c(min(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE),
 median(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE),
 max(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE)),
 c("lightblue", "white", "darkred")
)
```

```
colores_annot <- list(
 Sexo = c("1" = "#FF69B4", "0" = "#1E90FF"),
 Genetica = c("0" = "#56B4E9", "1" = "#E69F00", "2" = "#F0E442", "3" = "#D55E00", "4" = "#CC79A7"),
 Inmunosupresor.T0 = c("0" = "#009E73", "1" = "#D55E00"),
 Inmunomodulador.T0 = c("0" = "#CC79A7", "1" = "#999999"),
 grupo = c("0" = "#999999", "1" = "#E41A1C", "2" = "#377EB8", "3" = "#4DAF4A", "4" = "#984EA3"),
 Poblacion = c("BARCELONA" = "#377EB8", "MADRID" = "#4DAF4A"),
 `Edad..escrito.` = edad_col_fun # <- AÑADIDO para que edad tenga escala continua correcta
)
```

```
row_annot <- rowAnnotation(
 df = anotaciones,
 col = colores_annot,
 annotation_name_side = "top",
 annotation_name_gp = gpar(fontsize = 8, fontface = "bold"),
 gap = unit(1, "mm"),
 show_legend = FALSE
)
```

```
png("heatmapcomplejito.png", width = 1500, height = 800, res = 150)
```

```
Heatmap(
```

```

matriz_esc,
name = "Escalado",
show_row_names = FALSE,
show_column_names = TRUE,
cluster_rows = TRUE,
cluster_columns = TRUE,
row_title = NULL,
column_title = "Poblaciones celulares",
left_annotation = row_annot,
show_heatmap_legend = FALSE,
column_names_gp = gpar(fontsize = 4),
column_names_side = "bottom",
row_names_gp = gpar(fontsize = 0.1)
)

```

Para guardar leyenda

```

library(ComplexHeatmap)
library(grid)

```

# Definir escala de color para la Edad

```

edad_col_fun <- colorRamp2(
 c(min(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE),
 median(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE),
 max(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE)),
 c("lightblue", "white", "darkred")
)

```

# Crear cada leyenda como objeto individual

```

lgd_sexo <- Legend(title = "Sexo", at = c("1", "0"), legend_gp = gpar(fill = c("#FF69B4", "#1E90FF")))
lgd_genetica <- Legend(title = "Genetica", at = c("0","1","2","3","4"),
 legend_gp = gpar(fill = c("#56B4E9","#E69F00","#F0E442","#D55E00","#CC79A7")))
lgd_inmunosup <- Legend(title = "Inmunosupresor.T0", at = c("0", "1"), legend_gp = gpar(fill =
c("#009E73", "#D55E00")))

```

```
lgd_inmunomod <- Legend(title = "Inmunomodulador.T0", at = c("0", "1"), legend_gp = gpar(fill =
c("#CC79A7", "#999999")))
```

```
lgd_grupo <- Legend(title = "grupo", at = c("0","1","2","3","4"),
 legend_gp = gpar(fill = c("#999999","#E41A1C","#377EB8","#4DAF4A", "#984EA3")))
```

```
lgd_poblacion <- Legend(title = "Poblacion", at = c("BARCELONA", "MADRID"),
 legend_gp = gpar(fill = c("#377EB8", "#4DAF4A")))
```

```
lgd_edad <- Legend(title = "Edad", col_fun = edad_col_fun)
```

```
Empaquetar las leyendas
```

```
packed_legends <- packLegend(
 lgd_sexo, lgd_genetica, lgd_inmunosup, lgd_inmunomod, lgd_grupo, lgd_poblacion, lgd_edad,
 direction = "vertical"
)
```

```
Guardar como imagen
```

```
png("leyenda_cheatmap.png", width = 500, height = 1800)
```

```
grid.newpage()
```

```
draw(packed_legends)
```

```
dev.off()
```

```
df$Poblacion <- as.factor(df$Poblacion)
```

AHORA HACEMOS SANKEY

```
1. Imputar NAs por la media en cada columna
```

```
matriz <- datos_modelo_imput[, 4:146]
```

```
impute_mean <- function(x) {
 x[is.na(x)] <- mean(x, na.rm = TRUE)
 return(x)
}
```

```
matriz_imput <- as.data.frame(lapply(matriz, impute_mean))
```

```
2. Escalar los datos (para clustering)
```

```
matriz_scaled <- scale(matriz_imput)
```



# 3. Para calcular gap statistic se usa matriz

```
matriz_scaled_matrix <- as.matrix(matriz_scaled)
```

# 4. Evaluar con factoextra: Elbow y Silhouette

```
fviz_nbclust(matriz_scaled, kmeans, method = "wss") +
 ggtitle("Método del codo (Elbow method)")
```

```
fviz_nbclust(matriz_scaled, kmeans, method = "silhouette") +
 ggtitle("Método de la silueta (Silhouette method)")
```

# 5. Evaluar con gap statistic

```
set.seed(123)
gap_stat <- clusGap(matriz_scaled_matrix, FUN = kmeans, nstart = 25, K.max = 10, B = 50)
print(gap_stat, method = "firstmax")
fviz_gap_stat(gap_stat)
Selección de columnas y reemplazo de NAs (si no hecho antes)
datos_cluster <- datos_modelo_imput[, 4:146]
```

# Asegurarse que no haya NAs (y si es necesario, imputar con la media)

```
for(i in 1:ncol(datos_cluster)) {
 datos_cluster[is.na(datos_cluster[, i]), i] <- mean(datos_cluster[, i], na.rm = TRUE)
}
```

# Escalado de datos

```
datos_cluster_esc <- scale(datos_cluster)
```

# K-means con 2 clusters

```
set.seed(123) # para reproducibilidad
km_res <- kmeans(datos_cluster_esc, centers = 2, nstart = 25)
```

# Añadir la asignación de cluster al dataframe original

```
datos_modelo_imput$cluster <- as.factor(km_res$cluster)
```

```

sankey_data <- datos_modelo_imput %>%
 group_by(cluster, grupo) %>%
 summarise(n = n(), .groups = "drop")
install.packages("ggalluvial")
install.packages("alluvial")
remove.packages("alluvial")
library(ggalluvial)
library(ggplot2)

ggplot(data = sankey_data,
 aes(axis1 = cluster, axis2 = grupo, y = n)) +
 ggalluvial::geom_alluvium(aes(fill = cluster)) +
 ggalluvial::geom_stratum() +
 ggplot2::geom_text(stat = "stratum", aes(label = after_stat(stratum))) +
 scale_x_discrete(limits = c("Cluster", "Grupo")) +
 theme_minimal()

```

#### PARA VER QUE HAY EN CADA CLUSTER

# Filtrar datos para cluster 1

```
cluster1_data <- datos_modelo_imput %>% filter(cluster == 1)
```

# Filtrar datos para cluster 2

```
cluster2_data <- datos_modelo_imput %>% filter(cluster == 2)
```

# Guardar en CSV

```
write.csv(cluster1_data, "cluster1_data.csv", row.names = FALSE)
```

```
write.csv(cluster2_data, "cluster2_data.csv", row.names = FALSE)
```

#### VAMOS A PROBAR AHORA CON LA VARIABLE SEXO

```

sankey_data <- datos_modelo_imput %>%
 group_by(cluster, Sexo) %>%
 summarise(n = n(), .groups = "drop")
ggplot(data = sankey_data,

```

```

aes(axis1 = cluster, axis2 = Sexo, y = n)) +
ggalluvial::geom_alluvium(aes(fill = cluster)) +
ggalluvial::geom_stratum() +
ggplot2::geom_text(stat = "stratum", aes(label = after_stat(stratum))) +
scale_x_discrete(limits = c("Cluster", "Sexo")) +
theme_minimal()

```

#### AHORA VARIABLE GENETICA

```

sankey_data <- datos_modelo_imput %>%
 group_by(cluster, Genetica) %>%
 summarise(n = n(), .groups = "drop")

ggplot(data = sankey_data,
 aes(axis1 = cluster, axis2 = Genetica, y = n)) +
ggalluvial::geom_alluvium(aes(fill = cluster)) +
ggalluvial::geom_stratum() +
ggplot2::geom_text(stat = "stratum", aes(label = after_stat(stratum))) +
scale_x_discrete(limits = c("Cluster", "Genetica")) +
theme_minimal()

```

#### AHORA VARIABLE Inmunosupresor

```

sankey_data <- datos_modelo_imput %>%
 group_by(cluster, Inmunosupresor.T0) %>%
 summarise(n = n(), .groups = "drop")

ggplot(data = sankey_data,
 aes(axis1 = cluster, axis2 = Inmunosupresor.T0, y = n)) +
ggalluvial::geom_alluvium(aes(fill = cluster)) +
ggalluvial::geom_stratum() +
ggplot2::geom_text(stat = "stratum", aes(label = after_stat(stratum))) +
scale_x_discrete(limits = c("Cluster", "Inmunosupresor T0")) +
theme_minimal()

```

AHORA VARIABLE Inmunomodulador

```
sankey_data <- datos_modelo_imput %>%
 group_by(cluster, Inmunomodulador.T0) %>%
 summarise(n = n(), .groups = "drop")

ggplot(data = sankey_data,
 aes(axis1 = cluster, axis2 = Inmunomodulador.T0, y = n)) +
 ggalluvial::geom_alluvium(aes(fill = cluster)) +
 ggalluvial::geom_stratum() +
 ggplot2::geom_text(stat = "stratum", aes(label = after_stat(stratum))) +
 scale_x_discrete(limits = c("Cluster", "Inmunomodulador T0")) +
 theme_minimal()
```

AHORA VARIABLE Edad

```
sankey_data <- datos_modelo_imput %>%
 group_by(cluster, Edad..escrito.) %>%
 summarise(n = n(), .groups = "drop")

ggplot(data = sankey_data,
 aes(axis1 = cluster, axis2 = Edad..escrito., y = n)) +
 ggalluvial::geom_alluvium(aes(fill = cluster)) +
 ggalluvial::geom_stratum() +
 ggplot2::geom_text(stat = "stratum", aes(label = after_stat(stratum)), size = 2) +
 scale_x_discrete(limits = c("Cluster", "Edad")) +
 theme_minimal()
```

NORMALIZAMOS UN ARCHIVO PARA USAR TIMEPOINTS INCLUYENDO T1 Y T2

# Ejecutar UMAP

```
set.seed(123)
umap_resultado <- umap(df_umap_imputado, n_neighbors = 15, min_dist = 0.1, metric = "euclidean")
```

# Crear data.frame con resultados UMAP y metadatos

```

umap_df <- as.data.frame(umap_resultado)
colnames(umap_df) <- c("UMAP1", "UMAP2")

Añadir columnas para colorear, usando filas originales
umap_df$Timepoint <- df$Timepoint
umap_df$Grupo <- df$Grupo

Visualizar con ggplot2
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Timepoint)) +
 geom_point(size = 2, alpha = 0.7) +
 theme_minimal() +
 labs(title = "UMAP con imputación de NA", color = "Timepoint")
library(sva)

Cargar datos
df <- read_csv(file.choose(), locale = locale(encoding = "UTF-8"))

Columnas que no queremos usar en el UMAP
columnas_excluir <- c("Poblacion", "Grupo", "Timepoint", "Paciente")

Extraer datos numéricos para corregir
datos_num <- df[, !(names(df) %in% columnas_excluir)]
datos_num <- datos_num[, sapply(datos_num, is.numeric)]

Imputar NA con la media por columna
imputar_media <- function(x) {
 x[is.na(x)] <- mean(x, na.rm = TRUE)
 return(x)
}
datos_num <- as.data.frame(lapply(datos_num, imputar_media))

Preparar matriz para ComBat
datos_mat <- t(as.matrix(datos_num))

```

```
Variable batch
batch <- df$Poblacion

Modelo nulo (no conservar variables biológicas)
mod <- NULL

Corregir batch con ComBat
datos_combat <- ComBat(dat = datos_mat, batch = batch, mod = mod, par.prior = TRUE, prior.plots = FALSE)

Volver a matriz samples x features
datos_corregidos <- t(datos_combat)

Ejecutar UMAP sobre datos corregidos
set.seed(123)
umap_resultado <- umap(datos_corregidos, n_neighbors = 15, min_dist = 0.1, metric = "euclidean")

Preparar data.frame para ggplot
umap_df <- as.data.frame(umap_resultado)
colnames(umap_df) <- c("UMAP1", "UMAP2")

Añadir metadatos
umap_df$Timepoint <- df$Timepoint
umap_df$Grupo <- df$Grupo

Crear variable para diferenciar controles y pacientes
umap_df$Tipo <- ifelse(umap_df$Grupo == 0, "Control", "Paciente")

Crear variable de color: Timepoint solo para pacientes, "Control" para controles
umap_df$ColorTP <- ifelse(umap_df$Tipo == "Control", "Control", as.character(umap_df$Timepoint))

Visualización diferenciando por ColorTP (color) y Tipo (forma)
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = ColorTP, shape = Tipo)) +
```

```

geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
scale_shape_manual(values = c("Control" = 17, "Paciente" = 16)) +
theme_minimal() +
labs(title = "UMAP tras ComBat: pacientes por Timepoint, controles separados",
 color = "Condición",
 shape = "Tipo")
set.seed(123)
k <- 3 # Número de clusters que quieres, cambia si quieres otro

km_res <- kmeans(umap_df[, c("UMAP1", "UMAP2")], centers = k)

Añadir clusters al data.frame
umap_df$Cluster <- factor(km_res$cluster)

Visualizar con clusters, Timepoint y Tipo
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Timepoint, shape = Tipo)) +
 geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
 geom_point(aes(fill = Cluster), shape = 21, color = "black", size = 3, alpha = 0.3, stroke = 1) +
 scale_shape_manual(values = c("Control" = 17, "Paciente" = 16)) +
 theme_minimal() +
 labs(title = paste("UMAP con k-means clustering (k =", k, ")"),
 color = "Timepoint",
 shape = "Tipo",
 fill = "Cluster")
set.seed(123)
k <- 3 # Número de clusters

Aplicar k-means solo a pacientes
umap_pacientes <- umap_df[umap_df$Tipo == "Paciente", c("UMAP1", "UMAP2")]
km_res <- kmeans(umap_pacientes, centers = k)

Asignar clusters solo a pacientes
umap_df$Cluster <- NA

```



```
umap_df$Cluster[umap_df$Tipo == "Paciente"] <- km_res$cluster[match(1:nrow(umap_pacientes),
which(umap_df$Tipo == "Paciente"))]
```

```
Convertir a factor, etiquetar controles aparte
```

```
umap_df$Cluster <- factor(ifelse(is.na(umap_df$Cluster), "Control", paste0("C", umap_df$Cluster)))
```

```
Guardar CSV con info de paciente y su cluster
```

```
write.csv(
 umap_df[, c("Paciente", "Tipo", "Cluster", "UMAP1", "UMAP2")],
 file = "pacientes_clusterizadosT0T1T2.csv",
 row.names = FALSE
)
```

```
Visualización con clusters (color) y tipo (forma)
```

```
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Cluster, shape = Tipo)) +
 geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
 scale_shape_manual(values = c("Control" = 17, "Paciente" = 16)) +
 theme_minimal() +
 labs(title = paste("UMAP con clustering k-means (k =", k, ") sin incluir controles"),
 color = "Cluster",
 shape = "Tipo")
library(ggrepel)
```

```
Columnas que no queremos usar en UMAP
```

```
columnas_excluir <- c("Poblacion", "Grupo", "Timepoint", "Paciente")
```

```
Extraer datos numéricos
```

```
datos_num <- df[, !(names(df) %in% columnas_excluir)]
datos_num <- datos_num[, sapply(datos_num, is.numeric)]
```

```
Imputar NA con la media
```

```
imputar_media <- function(x) {
 x[is.na(x)] <- mean(x, na.rm = TRUE)
 return(x)
}
```

```

}
datos_num <- as.data.frame(lapply(datos_num, imputar_media))

Preparar matriz para ComBat
datos_mat <- t(as.matrix(datos_num))
batch <- df$Poblacion
mod <- NULL

Corregir batch
datos_combat <- ComBat(dat = datos_mat, batch = batch, mod = mod, par.prior = TRUE, prior.plots =
FALSE)

Volver a matriz
datos_corregidos <- t(datos_combat)

Ejecutar UMAP
set.seed(123)
umap_resultado <- umap(datos_corregidos, n_neighbors = 15, min_dist = 0.1, metric = "euclidean")

Crear data.frame con resultados UMAP
umap_df <- as.data.frame(umap_resultado)
colnames(umap_df) <- c("UMAP1", "UMAP2")

Añadir metadatos
umap_df$Grupo <- df$Grupo
umap_df$Tipo <- ifelse(df$Grupo == 0, "Control", "Paciente")
umap_df$Paciente <- df$Paciente

Clustering solo con pacientes
umap_df_cluster <- subset(umap_df, Tipo == "Paciente")
set.seed(123)
k <- 3 # Número de clusters
km_res <- kmeans(umap_df_cluster[, c("UMAP1", "UMAP2")], centers = k)

```

```

Asignar cluster a pacientes
umap_df_cluster$Cluster <- factor(km_res$cluster)

Asignar NA a controles
umap_df$Cluster <- NA
umap_df$Cluster[umap_df$Tipo == "Paciente"] <- as.character(umap_df_cluster$Cluster)

Visualización
ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2, color = Cluster, shape = Tipo)) +
 geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +
 scale_shape_manual(values = c("Control" = 17, "Paciente" = 16)) +
 geom_text_repel(
 data = subset(umap_df, Tipo == "Paciente"),
 aes(label = Paciente),
 size = 3,
 max.overlaps = 100
) +
 theme_minimal() +
 labs(
 title = paste("UMAP con clustering k-means (k =", k, ") y etiquetas de pacientes"),
 color = "Cluster",
 shape = "Tipo"
)

```

## PASAMOS AHORA A LOS MODELOS PREDICTIVOS

Gráfico de coeficientes

```

final_model <- cv.glmnet(x_matrix, y, family="multinomial", alpha=1, type.measure="class")

Extraer coeficientes en lambda.min
coef_list <- coef(final_model, s = "lambda.min")

Mostrar coeficientes para cada clase (excluyendo interceptos)
library(tidyverse)

```

```

coef_df <- map_df(coef_list, function(mat) {
 data.frame(
 Variable = rownames(mat),
 Coef = as.vector(mat)
)
}, .id = "Clase") %>%
 filter(Variable != "(Intercept)", Coef != 0)

Gráfico de barras de coeficientes
ggplot(coef_df, aes(x = reorder(Variable, Coef), y = Coef, fill = Clase)) +
 geom_col(show.legend = FALSE) +
 facet_wrap(~Clase, scales = "free_y") +
 coord_flip() +
 labs(title = "Variables seleccionadas por LASSO multinomial",
 x = "Variables", y = "Coeficiente")
library(ComplexHeatmap)
library(grid)

Definir escala de color para la Edad
edad_col_fun <- colorRamp2(
 c(min(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE),
 median(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE),
 max(anotaciones$Edad..escrito., na.rm = TRUE)),
 c("lightblue", "white", "darkred")
)

Crear cada leyenda como objeto individual
lgd_genetica <- Legend(title = "Genetica", at = c("0", "1", "2", "3", "4"),
 legend_gp = gpar(fill = c("#56B4E9", "#E69F00", "#F0E442", "#D55E00", "#CC79A7")))
lgd_inmunosup <- Legend(title = "Inmunosupresor.T0", at = c("0", "1"), legend_gp = gpar(fill =
c("#009E73", "#D55E00")))
lgd_inmunomod <- Legend(title = "Inmunomodulador.T0", at = c("0", "1"), legend_gp = gpar(fill =
c("#CC79A7", "#999999")))

```

```
lgd_grupo <- Legend(title = "grupo", at = c("0","1","2","3","4"),
 legend_gp = gpar(fill = c("#999999","#E41A1C","#377EB8","#4DAF4A", "#984EA3")))
```

```
Empaquetar las leyendas
packed_legends <- packLegend(
 lgd_sexo, lgd_genetica, lgd_inmunosup, lgd_inmunomod, lgd_grupo, lgd_poblacion, lgd_edad,
 direction = "vertical"
)
```

```
Guardar como imagen
png("leyenda_cheatmap_simple.png", width = 500, height = 1800)
grid.newpage()
draw(packed_legends)
dev.off()
```

HEATMAP PERO SOLO CON LAS 4 PEDIDAS

```
Subset: solo las columnas de poblaciones celulares (del 4 al 146)
matriz <- datos_modelo_imput[, 4:146]
```

```
Escalado por filas (opcional, pero útil para heatmap)
matriz_esc <- t(scale(t(matriz)))
```

```
Anotaciones clínicas
anotaciones <- datos_modelo_imput[, c("Genetica",
 "Inmunosupresor.T0", "Inmunomodulador.T0",
 "grupo")]
rownames(anotaciones) <- datos_modelo_imput$Paciente
```

```
for (col in c("Genetica", "Inmunosupresor.T0", "Inmunomodulador.T0", "grupo")) {
 anotaciones[[col]] <- factor(anotaciones[[col]])
}
```

```
colores_annot <- list(
```

```

Genetica = c("0" = "#56B4E9","1" = "#E69F00","2" = "#F0E442","3" = "#D55E00","4" = "#CC79A7"),
Inmunosupresor.T0 = c("0" = "#009E73", "1" = "#D55E00"),
Inmunomodulador.T0 = c("0" = "#CC79A7", "1" = "#999999"),
grupo = c("0" = "#999999","1" = "#E41A1C","2" = "#377EB8","3" = "#4DAF4A", "4" = "#984EA3")
)

```

```

row_annot <- rowAnnotation(
 df = anotaciones,
 col = colores_annot,
 annotation_name_side = "top",
 annotation_name_gp = gpar(fontsize = 8, fontface = "bold"),
 gap = unit(1, "mm"),
 show_legend = FALSE # <- Aquí ocultas leyendas de anotaciones
)

```

```

png("heatmapcomplejitosimple.png", width = 1500, height = 800, res = 150)
Heatmap(
 matriz_esc,
 name = "Escalado",
 show_row_names = FALSE,
 show_column_names = TRUE,
 cluster_rows = TRUE,
 cluster_columns = TRUE,
 row_title = NULL,
 column_title = "Poblaciones celulares",
 left_annotation = row_annot,
 show_heatmap_legend = FALSE,
 column_names_gp = gpar(fontsize = 4),
 column_names_side = "bottom", # <-- aquí las pones abajo
 row_names_gp = gpar(fontsize = 0.1)
)

```

VER QUE VARIABLES CLINICAS CONTRIBUIAN MAS A LA CLUSTERIZACION DE LUMAP

```
Variables clínicas que quieres evaluar
```

```
clin_vars <- c("Sexo", "Edad..escrito.", "Grupo.IDP.interno.", "Genetica", "Inmunosupresor.T0",
"Inmunomodulador.T0")
```

```
Imputar NAs: para numéricas con media, para factores con la moda
```

```
imputar_na <- function(x) {
 if (is.numeric(x)) {
 x[is.na(x)] <- mean(x, na.rm = TRUE)
 } else if (is.factor(x) || is.character(x)) {
 mode_val <- names(sort(table(x), decreasing = TRUE))[1]
 x[is.na(x)] <- mode_val
 x <- factor(x) # asegurar factor tras imputación
 }
 return(x)
}
```

```
Crear dataframe solo con pacientes y sus variables clínicas e imputar NAs
```

```
clin_data <- df %>%
 filter(Paciente %in% umap_df$Paciente[umap_df$Tipo == "Paciente"]) %>% # solo pacientes que tienes
clusterizados
 select(Paciente, all_of(clin_vars)) %>%
 mutate(across(all_of(clin_vars), imputar_na))
```

```
Añadir cluster asignado
```

```
clin_data <- clin_data %>%
 left_join(umap_df %>% select(Paciente, Cluster), by = "Paciente")
```

```
Asegurar que Cluster sea factor
```

```
clin_data$Cluster <- factor(clin_data$Cluster)
```

```
Ahora, tests por variable
```

```
resultados <- list()
```



```

for (var in clin_vars) {
 if (is.numeric(clin_data[[var]])) {
 # Kruskal-Wallis test para variable numérica entre clusters
 test <- kruskal.test(clin_data[[var]] ~ clin_data$Cluster)
 resultados[[var]] <- list(tipo = "numérica", p_valor = test$p.value)
 } else {
 # Chi-cuadrado para categóricas
 tabla <- table(clin_data[[var]], clin_data$Cluster)
 # Si alguna celda < 5, usar test exacto de Fisher
 if (any(tabla < 5)) {
 test <- fisher.test(tabla)
 } else {
 test <- chisq.test(tabla)
 }
 resultados[[var]] <- list(tipo = "categórica", p_valor = test$p.value)
 }
}

Mostrar resumen de resultados ordenado por p-valor
resumen <- tibble(
 Variable = names(resultados),
 Tipo = map_chr(resultados, "tipo"),
 P_valor = map_dbl(resultados, "p_valor")
) %>%
 arrange(P_valor)

print(resumen)
library(ggplot2)

for (var in clin_vars) {
 p <- NULL
 if (resultados[[var]]$tipo == "numérica") {
 p <- ggplot(clin_data, aes(x = Cluster, y = .data[[var]], fill = Cluster)) +

```

```

 geom_boxplot() +
 theme_minimal() +
 labs(title = paste("Distribución de", var, "por Cluster"), y = var)
} else {
 p <- ggplot(clin_data, aes(x = .data[[var]], fill = Cluster)) +
 geom_bar(position = "fill") +
 theme_minimal() +
 labs(title = paste("Proporción de", var, "por Cluster"), y = "Proporción") +
 scale_y_continuous(labels = scales::percent_format())
}
print(p)
}

Función para limpiar el ID y quitar el sufijo de tiempo (T1, T2, etc.)
clean_id <- function(x) {
 x %>%
 str_trim() %>%
 str_replace_all("-", "_") %>%
 str_remove("\\s+T\\d+$") # elimina " T1", " T2", etc. al final
}

Limpiar identificadores en ambos dataframes
umap_df <- umap_df %>%
 mutate(Paciente_clean = clean_id(Paciente))

df <- df %>%
 mutate(Paciente_clean = clean_id(Paciente))

Hacer el join usando el ID limpio
pacientes_con_genetica <- umap_df %>%
 filter(Tipo == "Paciente") %>%
 left_join(df %>% select(Paciente_clean, Genetica), by = "Paciente_clean")

Filtrar solo pacientes con Genetica no NA (es decir, que existen en df original)

```

```

pacientes_con_genetica_filtrado <- pacientes_con_genetica %>%
 filter(!is.na(Genetica))

Verificar que no quedan NAs en Genetica después del filtrado
cat("Pacientes con Genetica == NA después del filtrado:\n")
print(sum(is.na(pacientes_con_genetica_filtrado$Genetica)))

Gráfico de barras: distribución porcentual de Genetica por cluster
ggplot(pacientes_con_genetica_filtrado, aes(x = Cluster, fill = as.factor(Genetica))) +
 geom_bar(position = "fill") +
 scale_y_continuous(labels = scales::percent) +
 labs(
 title = "Distribución porcentual de la variable Genetica por cluster",
 x = "Cluster",
 y = "Porcentaje",
 fill = "Genetica"
) +
 theme_minimal()

Función para limpiar el ID y quitar el sufijo de tiempo (T1, T2, etc.)
clean_id <- function(x) {
 x %>%
 str_trim() %>%
 str_replace_all("-", "_") %>%
 str_remove("\\s+T\\d+$") # elimina " T1", " T2", etc. al final
}

Limpiar identificadores en ambos dataframes
umap_df <- umap_df %>%
 mutate(Paciente_clean = clean_id(Paciente))

df <- df %>%
 mutate(Paciente_clean = clean_id(Paciente))

```

```

Variables clínicas que quieres analizar

vars_clinicas <- c("Genetica", "Inmunosupresor.T0", "Inmunomodulador.T0", "Sexo", "Edad..escrito.",
"Grupo.IDP.interno.")

Función para generar el gráfico para una variable dada
plot_distribucion_por_cluster <- function(varname) {
 # Hacer join y filtrar pacientes con dato no NA en la variable
 pacientes <- umap_df %>%
 filter(Tipo == "Paciente") %>%
 left_join(df %>% select(Paciente_clean, all_of(varname)), by = "Paciente_clean") %>%
 filter(!is.na(.data[[varname]]))

 # Para edad, que es numérica continua, mejor hacer boxplot
 if(varname == "Edad..escrito.") {
 p <- ggplot(pacientes, aes(x = Cluster, y = .data[[varname]])) +
 geom_boxplot(aes(fill = Cluster), alpha = 0.7) +
 labs(
 title = paste("Distribución de", varname, "por cluster"),
 x = "Cluster",
 y = varname
) +
 theme_minimal() +
 theme(legend.position = "none")
 } else {
 # Para variables categóricas (factor o numérica discretizada), barra apilada porcentual
 p <- ggplot(pacientes, aes(x = Cluster, fill = as.factor(.data[[varname]]))) +
 geom_bar(position = "fill") +
 scale_y_continuous(labels = scales::percent) +
 labs(
 title = paste("Distribución porcentual de", varname, "por cluster"),
 x = "Cluster",
 y = "Porcentaje",
 fill = varname
) +

```

```
 theme_minimal()
 }
 return(p)
}

Generar y guardar gráficos para todas las variables
plots <- lapply(vars_clinicas, plot_distribucion_por_cluster)

Mostrar los gráficos uno a uno (puedes también usar grid.arrange u otro método para visualizarlos
todos juntos)
for(i in seq_along(vars_clinicas)) {
 print(plots[[i]])
}
```

*Esta página ha sido intencionalmente dejada En Blanco*

## 8.5 Anexo V: Producción científica



### OPEN ACCESS

EDITED BY  
Veronica De Rosa,  
National Research Council (CNR), Italy

REVIEWED BY  
Peter Hsu,  
Children's Hospital at Westmead, Australia  
Ekaterini Simoes Goudouris,  
Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

### \*CORRESPONDENCE

Laia Alsina  
✉ laia.alsina@sjd.es  
Ma Elena Seoane-Reula  
✉ elenaseoane71@gmail.com

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share  
first authorship

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share  
last authorship

RECEIVED 16 August 2023

ACCEPTED 13 December 2023

PUBLISHED 08 January 2024

### CITATION

Kennedy-Batalla R, Acevedo D, Luo Y,  
Esteve-Solé A, Vlaga A, Correa-Rocha R,  
Seoane-Reula ME and Alsina L (2024) Treg in  
inborn errors of immunity: gaps, knowns and  
future perspectives.  
*Front. Immunol.* 14:1278759.  
doi: 10.3389/fimmu.2023.1278759

### COPYRIGHT

© 2024 Kennedy-Batalla, Acevedo, Luo,  
Esteve-Solé, Vlaga, Correa-Rocha, Seoane-  
Reula and Alsina. This is an open-access article  
distributed under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The  
use, distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Treg in inborn errors of immunity: gaps, knowns and future perspectives

Rebeca Kennedy-Batalla<sup>1†</sup>, Daniel Acevedo<sup>2,3,4†</sup>, Yiyi Luo<sup>2,3,4</sup>,  
Ana Esteve-Solé<sup>2,3,4</sup>, Alexandru Vlaga<sup>3,5</sup>, Rafael Correa-Rocha<sup>1†</sup>,  
Ma Elena Seoane-Reula<sup>1,6,7\*†</sup> and Laia Alsina<sup>2,3,4,8\*†</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immune-Regulation, Gregorio Marañón Health Research Institute (IISGM), Madrid, Spain, <sup>2</sup>Clinical Immunology and Primary Immunodeficiencies Unit, Allergy and Clinical Immunology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Clinical Immunology Unit, Hospital Sant Joan de Déu-Hospital Clínic, Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Study Group for Immune Dysfunction Diseases in Children (GEMDIP), Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Immunology Department, Biomedic Diagnostic Center (CDB), Hospital Clínic of Barcelona, Clinical Immunology Unit Hospital Sant Joan de Déu-Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>6</sup>Pediatric Immuno-Allergy Unit, Allergy Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, <sup>7</sup>Primary Immunodeficiencies Unit, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, <sup>8</sup>Department of Surgery and Surgical Specializations, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Regulatory T cells (Treg) are essential for immune balance, preventing overreactive responses and autoimmunity. Although traditionally characterized as CD4+CD25+CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>hi</sup>, recent research has revealed diverse Treg subsets such as Tr1, Tr1-like, and CD8 Treg. Treg dysfunction leads to severe autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory disorders. Inborn errors of immunity (IEI) are a group of disorders that affect correct functioning of the immune system. IEI include Tregopathies caused by genetic mutations affecting Treg development or function. In addition, Treg dysfunction is also observed in other IEIs, whose underlying mechanisms are largely unknown, thus requiring further research. This review provides a comprehensive overview and discussion of Treg in IEI focused on: A) advances and controversies in the evaluation of Treg extended subphenotypes and function; B) current knowledge and gaps in Treg disturbances in Tregopathies and other IEI including Treg subpopulation changes, genotype-phenotype correlation, Treg changes with disease activity, and available therapies, and C) the potential of Treg cell-based therapies for IEI with immune dysregulation. The aim is to improve both the diagnostic and the therapeutic approaches to IEI when there is involvement of Treg. We performed a non-systematic targeted literature review with a knowledgeable selection of current, high-quality original and review articles on Treg and IEI available since 2003 (with 58% of the articles within the last 6 years) in the PubMed database.

### KEYWORDS

Treg, IPEX syndrome, immune tolerance, primary immunodeficiency, primary immune regulatory disorders, cell-based therapies, immune dysregulation, Helios



## 1 Introduction

Regulatory T cells (Treg) are a subtype of T lymphocytes essential for immune homeostasis. Due to their regulatory function, Treg are able to suppress and control immune responses to restore the immune system's steady state, and they are necessary to tolerate autoantigens. Treg are essential in physiological processes such as pregnancy, host-commensal interactions, tolerance to allergens, and tissue repair, as they help decide between what should be considered threatening or harmless and, hence, allow the immune system to mount a response or suppress it, respectively. Because they are so essential for correct immune function, Treg are also involved in numerous diseases (1, 2). Defective Treg can disturb immune balance, leading to pathologies such as allergies, autoimmune and inflammatory disorders, infections, cancer, and primary immune regulatory disorders (PIRD) (2). This review aims at providing an integrated view of Treg in the context of inborn errors of immunity (IEIs) highlighting what is known and what is not known, the problems in Treg characterisation, and how they affect understanding of underlying pathological mechanisms of IEIs. In addition, it is intended to provide insight into potential Treg cell-based treatments that could be of use in IEI management. We performed a non-systematic targeted literature review with a knowledgeable selection of current, high-quality original and review articles on Treg and IEI available since 2003 (with 58% of the articles within the last 6 years) in the PubMed database.

### 1.1 History of Treg: from CD4+ Treg to CD8+ Treg

Discovered in 1969 as thymic-derived T cells with suppressive capacity in mice (3–5), Treg have gained great interest in immune regulation and their implications in different diseases. Shortly after their discovery, during the 1970s and 1980s, it was seen that these suppressive T cells were able to slow down autoimmune disease in rodent models (6, 7). During the decade of the 1990s, several discoveries were made. First and foremost, these cells were seen to express high levels of the IL-2 receptor alpha chain (IL-2R $\alpha$ , CD25) (4, 6, 8) that is now one of the markers used for Treg characterisation. Although discovery of the suppressive cytokines IL-10 and transforming factor-beta (TGF- $\beta$ ) was made in the 1990s, it was not until later that they were associated with Treg function (7). Despite the growing knowledge, human Treg were not discovered until 2001 both in thymus and periphery (4, 6, 7). The identification of the autoimmune scurfy mice and immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked (IPEX) syndrome in humans caused by loss of function of *FOXP3* pointed towards the role of this gene in Treg function (2, 6). A few years later, in 2003, FoxP3 expression was detected in Treg, in mice (6, 7) and later in humans (9, 10). FoxP3 expression was correlated with CD25 levels (7) and in 2006, thanks to the discovery of an inverse correlation between CD127 (IL-7 receptor) and FoxP3, Treg definition by surface markers was defined as follows: CD3

+CD4+CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup> which is still the most common phenotype used for their characterization by flow cytometry (4, 8, 11). The inducible T-cell costimulator (ICOS) surface molecule was known to be expressed in activated T cells. In 2008, ICOS expression was observed in Treg. According to its expression, Treg could be divided into two subsets depending on the suppressive mechanisms used: ICOS+, which use IL-10 to suppress dendritic cells (DCs) and TGF- $\beta$  to suppress T cell function, and ICOS-, which only use TGF- $\beta$  (12, 13). With all the developments in Treg characterization, function, and their disease-related role, in 2013 Abbas et al. proposed, in addition to the phenotypic classification, a unified nomenclature for Treg in order to facilitate their description, dividing them depending on where they completed their development (14). According to the new classification, Treg can be thymus-derived or natural Treg (tTreg or nTreg) if they complete their development in the thymus, or peripherally derived Treg (pTreg) if development occurs in the periphery. Moreover, they can also be induced *in vitro* and called induced Treg (iTreg) (5–7, 14). tTreg comprise around 80% of circulating Treg and have stable FoxP3 expression (15). pTreg, on the other hand, express ectopic FoxP3 which is not stable and only provides suppressive functions while it is expressed (16).

In mice, FoxP3 seems to be a Treg exclusive marker which makes it possible to characterise Treg as CD25+FoxP3+. On the other hand, human conventional T cells (Tconv) can also gain FoxP3 expression and, currently, there are no distinct markers available to distinguish between true tTreg and pTreg. Classical Treg are commonly described as CD3+CD4+CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3+ (4, 7, 8). However, the best way to identify these cells is by measuring the level of methylation in the Treg-specific demethylated region (TSDR) of the *FOXP3* gene. FoxP3 is not the only gene that needs to be demethylated to ensure Treg function. CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), Eos, GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related), and CD25 are also responsible for correct Treg function – all of which can be used as markers to define Treg by flow cytometry (16).

As previously noted, there is still a lack of specific markers to differentiate tTreg and pTreg. Recent investigations have proposed Helios as a possible differentiating factor for tTreg. Helios expression presents a high correlation with tTreg whereas pTreg are mostly Helios-. This has been further confirmed by higher complete demethylation of TSDR of the *FOXP3* gene in tTreg compared to not more than 50% in pTreg (17). However, Helios is not yet established as a definitive marker to differentiate tTreg and pTreg as many questions are still unanswered (18).

Although Treg research has always been more focused on CD4 T cell population, CD8 Treg populations were described in mice as early as 1970, when Gershon and Kondo described CD8 T cells from bone marrow responsible for tolerance (19, 20). In 1978, they saw CD8 suppressive capacity on CD4 cells *in vitro*, further confirmed in 1992 in an allergic encephalomyelitis animal model (21). In 2007, CD8 Treg were seen under different infections and tumour environments in rat models, and it was clear that IFN $\gamma$  was important for the regulatory function of these cells (22). During this decade, it was also observed that most CD8 T cells with suppressive function were memory cells expressing high CD122

and Ly49 and that they were dependant on Helios expression, in contrast to CD4 Treg that are dependent on FoxP3 (21). These CD122<sup>hi</sup> Ly49+ CD8+ T cells have been considered the “CD8 Treg” in mice. Whether this subtype exists in humans has been, and probably still is, debatable. Very recently, killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR)+ CD8+ T cells were described as the counterpart of Ly49+CD8+ T cells in humans. Because from an evolutionary point of view KIR are the human equivalent of Ly49 in mice, these cells were studied in autoimmune and infectious human diseases such as celiac disease and COVID-19 (23). Because of the novelty of this regulatory subtype, the definition of CD8 Treg is even less established than that for CD4 Treg (24). Other human studies define CD8 Treg depending on their CD28, FoxP3, CD122, or Helios expression (24, 25). The timeline of CD4 and CD8 Treg description in mice and humans is summarized in Figure 1 and the phenotypic markers in humans in Table 1.

## 1.2 Suppressive functions of CD4 and CD8 Treg

*FOXP3* is essential for CD4 Treg suppressive function although it is not the only gene necessary. In this context, FoxP3 expression suppresses IL-2 production as well as upregulating CD25 and CTLA-4 expression – all involved in Treg mechanisms of action (16). Treg can exert their function directly or indirectly. As direct mechanisms, Tregs secrete suppressive cytokines such as IL-10, TGF- $\beta$ , and IL-35 that act directly on effector T cells (Teff). They also produce perforin and granzyme-inducing apoptosis in target cells (39). Besides these secreted proteins, Tregs express a number of surface molecules that enable them to perform their inhibitory functions: through CTLA-4 and lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) they can inhibit dendritic cells (DCs) (5) and through programmed cell death 1 (PD-1) they directly inhibit B cells (39).

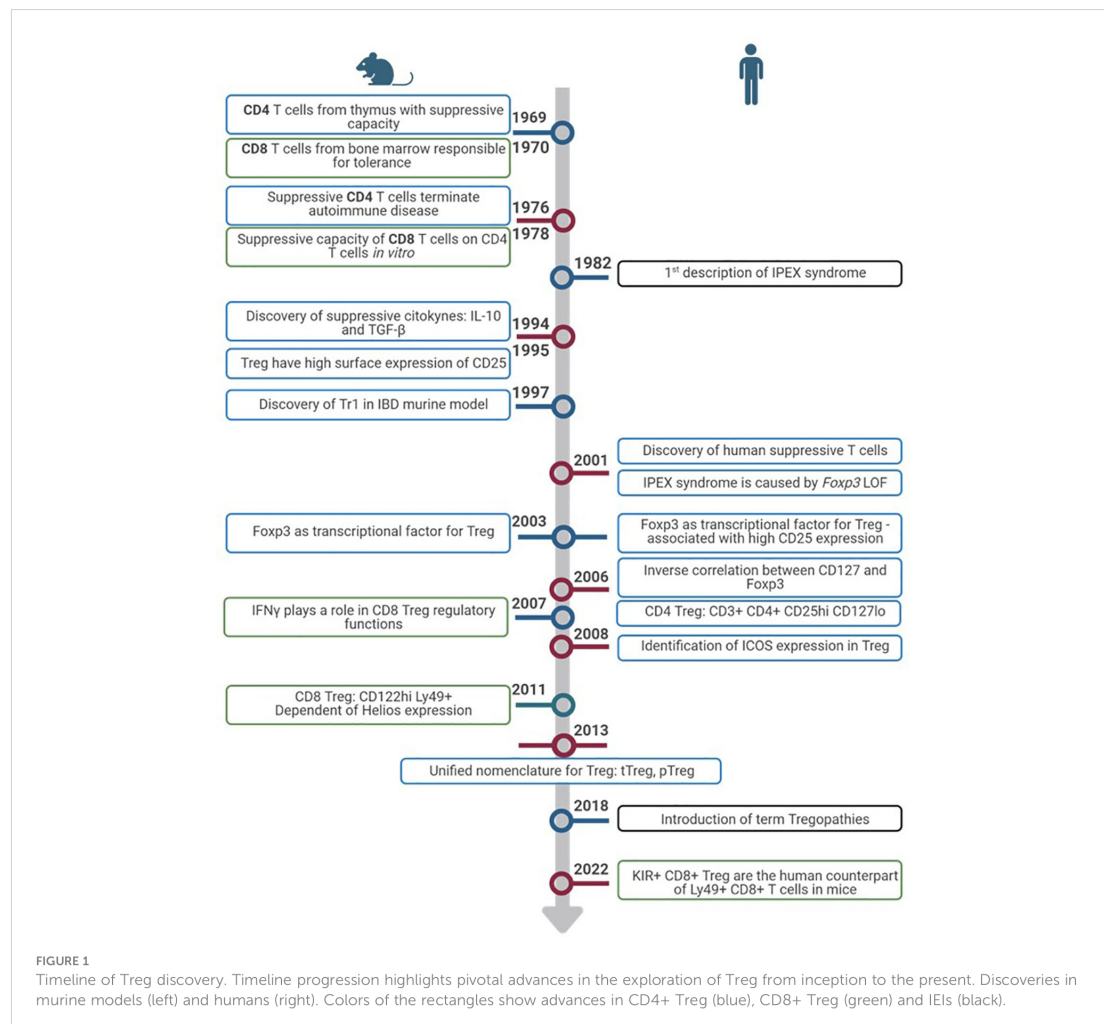


TABLE 1 Controversies and considerations in the study of Treg and in Treg cell-based therapies in humans.

| Treg phenotypic studies                                          |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Cell type                                                        | Staining | Different definitions                                                                                                                                                                                                                                                                  | Reference |
| CD4 Treg                                                         | SP       | CD3+CD4+CD25hiCD127low                                                                                                                                                                                                                                                                 | (26)      |
|                                                                  | IC       | CD3+CD4+CD25hiFoxP3+                                                                                                                                                                                                                                                                   | (27)      |
|                                                                  | IC       | CD3+CD4+CD25hiFoxP3+CD127low                                                                                                                                                                                                                                                           | (28)      |
|                                                                  | SP       | CD25hiCD127lowCCR4+                                                                                                                                                                                                                                                                    | (29)      |
| CD4 tTreg                                                        | IC       | CD3+CD4+CD25hiCD127lowFoxP3+Helios+                                                                                                                                                                                                                                                    | (30)      |
|                                                                  | SP       | CD3+CD4+CD25hiCD127lowTIGIT+GPA33+                                                                                                                                                                                                                                                     | NFS       |
| CD4 pTreg                                                        | IC       | CD3+CD4+CD25hiCD127lowFoxP3+Helios-CD3+CD4                                                                                                                                                                                                                                             | (30)      |
|                                                                  | SP       | +CD25hiCD127lowTIGIT+GPA33-                                                                                                                                                                                                                                                            | NFS       |
| CD8 Treg                                                         | SP       | CD3+CD8+CD103+                                                                                                                                                                                                                                                                         | (31)      |
|                                                                  | SP       | CD3+CD8+CD122+PD-1+                                                                                                                                                                                                                                                                    | (32, 33)  |
|                                                                  | SP       | CD3+CD8+CD28-CD56+                                                                                                                                                                                                                                                                     | (28, 34)  |
|                                                                  | SP       | CD3+CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ +HLA-E+                                                                                                                                                                                                                                      | (35)      |
|                                                                  | SP       | CD3+CD8+KIR+                                                                                                                                                                                                                                                                           | (23)      |
| Treg functional studies                                          |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |           |
| Functional effect                                                |          | Considerations                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
| T-cell proliferation                                             |          | Sufficient number of cells<br>Need to isolate cells<br>Dose-dependent study<br>Ensuring cell viability (susceptibility to cell death)<br>Minimum incubation time of 3-5 days<br>Use of CFSE as a replacement for 3H-tritylated<br>Use of the division index as an analytical parameter | (36)      |
| Expression of T cell activation markers                          |          | Sufficient number of cells<br>Need to isolate cells<br>Dose-dependent study<br>Minimum incubation time 5-7 hours<br>Use of activation markers like CD69 and CD154                                                                                                                      | (36)      |
| Measurement of analytes                                          |          | IFN $\gamma$ and IL-2 mRNA expression<br>Cytokine analysis in supernatant by ELISA or Luminex technology<br>Measurement of ATP/ADP ratio                                                                                                                                               | NFS       |
| Dendritic cell activation                                        |          | NFS                                                                                                                                                                                                                                                                                    | NFS       |
| IL-9 signaling via the IL-9R $\alpha$ receptor (STAT3 and STAT5) |          | NFS                                                                                                                                                                                                                                                                                    | NFS       |
| Treg cell-based therapies                                        |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |           |
| General considerations                                           |          | Risk (R) and potential solutions (S)                                                                                                                                                                                                                                                   |           |
| Live cells                                                       |          | R: Potential instability of Treg – acquisition of T-bet, ROR $\gamma$ t or GATA-3<br>S: NFS – DNA methyltransferase, IL-6, suicide casquets, integration sites.                                                                                                                        | (37, 38)  |

(Continued)

TABLE 1 Continued

| Specific considerations | Risk (R) and Potential solutions (S)                                                                                                                   |          |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| FoxP3 destabilization   | R: Acquisition of an inflammatory phenotype by Treg<br>S: Addition of DNA methyltransferase                                                            | (37, 38) |
| Oncogene activation     | R: Increased risk of cancer development<br>S: NFS – Strategies to eliminate Treg in vivo if needed: insertion of suicide casquets or integration sites | (37, 38) |

NFS, need further studies; IC, intracellular; SP, superficial.

Moreover, the high levels of CD25 allow Tregs to hijack IL-2 preventing it from stimulating T and natural killer (NK) cells (2). As indirect mechanisms, Tregs also present ectoenzymes on their membrane, specifically CD39 and CD73, that are responsible for ATP metabolism and control Teff activation. ATP acts as an inflammatory molecule when it is cleaved, AMP acts as an anti-inflammatory signal (5, 39).

Amongst other genes necessary for Treg functionality, there is a group of molecules that enhance Treg inhibitory functions without being selective of Treg. These include ICOS, CTLA-4, PD-1, TIGIT, Helios, and LAG-3.

ICOS increases Treg effectivity and, under certain circumstances, can suppress Treg apoptosis, playing an important role in their survival (7). In order to do so, ICOS needs to bind to its ligand, ICOS-L, expressed on antigen-presenting cells (APCs): DCs, B cells, and macrophages. Upon ICOS-L binding, it enhances FoxP3 transcription which, in turn, increases IL-4, TGF- $\beta$ , and IL-10 secretion. ICOS+ Treg normally co-express co-inhibitory surface molecules important for their immune regulation such as CTLA-4, LAG3, PD-1, and T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT). Whether it is a matter of ICOS directly affecting this expression or indirectly contributing to the increased Treg functionality remains unclear (13).

CTLA-4 is a co-inhibitory surface molecule that is constitutively expressed in Treg. It is not a Treg-exclusive marker as it is also present in activated lymphocytes. Binding of CTLA-4 from activated lymphocytes to CD80 and CD86 present on the surface of DCs inhibits them, restoring immune homeostasis once they have completed their task. In this context, CTLA-4 acts as an immune checkpoint in order to prevent an overreactive immune system. However, the role of CTLA-4 in Treg is not completely straight forward. It is suggested that CTLA-4 from Treg binds to CD80/CD86 in DCs and downregulates their expression. Because this signal from DCs is necessary to complete T cell activation during antigen presentation, this downregulation would reduce T cell activation which, in turn, would favour regaining immune homeostasis (40).

PD-1 and its ligand PD-L1 are both highly expressed in Treg surface (7). Binding of PD-L1, on Treg surface, to PD-1, expressed on activated cells, triggers an inhibitory response that negatively affects T cell proliferation and cytotoxicity. This response induces a



state of anergy on the activated T cells and can promote the induction of pTreg, by enhancing FoxP3 expression and Treg suppressive activity. Moreover, interaction of PD-1 and DCs' PD-L1 also prompts pTreg generation (41). In turn, once pTreg are generated, their PD-1 binding to PD-L1 in DCs also generates tolerogenic DCs (7). Hence, PD-1 signalling is needed to directly and indirectly maintain immune homeostasis. PD-1/PD-L1 signalling mechanism is not exclusive to Treg, but, along with CTLA-4 and LAG-3, constitutes one of their cell-to-cell contact suppressive mechanisms (41). Constitutive PD-1 expression is related to T cell exhaustion and is usually used as a CD4+ and CD8+ T cell exhaustion marker (42).

TIGIT is another co-inhibitory receptor that is expressed in Treg but also in activated and memory T cells, NK cells, and some follicular helper T cells (Tfh). It has two ligands, CD155 (or PVR) and CD112 (or nicotine-2), although it binds with greater affinity to CD155. These molecules are expressed in APCs and T cells, among other non-hematopoietic cells (43). In the context of Treg, the effect of TIGIT binding to DCs prompts tolerogenic DCs which express IL-10 and, in turn, suppress T cell activation. Moreover, increased TIGIT expression induces *FOXP3* demethylation in Treg. It can also suppress T cell priming and block the CD226 activation pathway. Without the presence of TIGIT expression, CD226 acts as an activating receptor when binding to CD155. All of these mechanisms lead to reduced T cell activation (44).

LAG-3 is expressed in Treg, activated T cells (both CD4+ and CD8+), and a subset of NKs. This molecule binds to MHC-II due to its similarity with CD4 co-receptor among other receptors in CD8 T cells and NKs (43). Regarding Treg, LAG-3 is essential for immune homeostasis control by Treg, and is necessary for Treg cell-to-cell mediated suppressive mechanism, together with PD-1 and CTLA-4 (41). Similarly to these molecules, LAG-3 suppresses cell proliferation, cytokine secretion, and immune function, playing a role in immune homeostasis (42). Expression of LAG-3 confers CD4+ T cell suppressive activity, whilst its blockade on Treg prevents their suppressive functions (43). LAG-3 constitutive expression is associated with CD4+ and CD8+ T cell exhaustion (42). It is also worth noting that LAG-3 is also expressed on Tr1 (type 1 regulatory T cells) although it is not clear whether it is necessary for their suppressive function (43).

Helios is a member of the *IKAROS* transcriptional factor family gene, which has been shown to play an important role in Treg function. It is implicated in Treg maintenance as they ensure FoxP3 stable expression under inflammatory conditions, preventing Treg from becoming effector cells (45). Moreover, in Helios-deficient mice, Tregs fail to produce an appropriate cytokine response and may exhibit the expression of cytokines typically associated with other effector CD4 T cells. Development, function, and immune homeostasis in most CD4+ T cells are not affected. However, in the case of Treg, Helios deficiency, although not affecting development, translates into a late onset autoimmune disease, underlying the importance of this transcription factor in the functionality of Treg (46). The schematic representation of Treg mechanisms of action in humans is summarized in Figure 2.

## 2 IEI and Treg: the new kid on the block

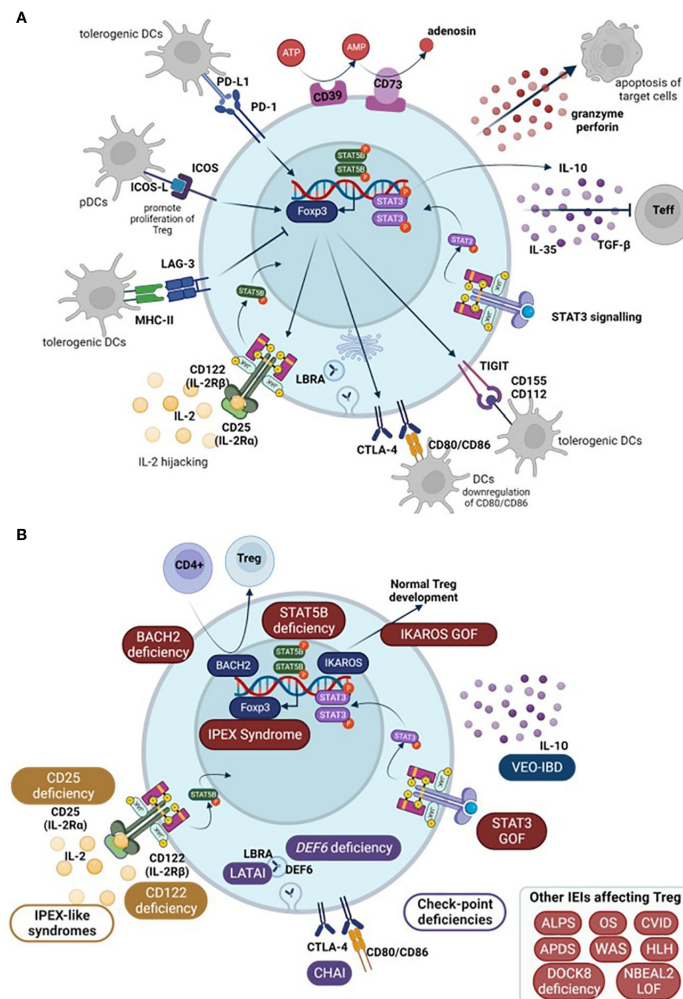
### 2.1 From primary immunodeficiencies to inborn errors of immunity to primary immune regulatory disorders

Bruton's agammaglobulinemia was first discovered seven decades ago. Since then, and thanks to technological advances in recent years such as next-generation sequencing (NGS), whose massive sequencing technology of the human exome and genome has been made affordable worldwide, we have seen a rapid increase in the rate of discovery of new genetic defects in primary immunodeficiency disorders (PIDs). This has allowed experts from the WHO's International Union of Immunological Societies (IUIS) to collect more than 485 genes causing PIDs by 2022 (47).

PIDs are a group of disorders that affect the proper functioning of the immune system, most of them of genetic origin. Since the immune system protects us against various pathogens, patients with PIDs suffer from a wide range of severe and/or recurrent infections. Although one of the mainstays of immunodeficiency is immunocompromise, which is characteristic of most patients with PIDs, their symptomatology is, nevertheless, increasingly diverse, ranging from autoimmunity, autoinflammation, and severe allergies to neoplastic syndromes (48). The presence of autoimmunity in the context of immunodeficiency suggests a paradox, with two opposite pathologies, where one offers an excess and the other a defect of response, respectively, coexisting in the same clinical entity (49). Due to this increasing phenotype and with the increasing number of genetic defects being discovered, some of them causing gain-of-functions and not only loss-of-functions, the IUIS proposed a paradigm shift in 2019. Since then and to this day, PIDs are known as Inborn Errors of Immunity (IEI), and the classification of these diseases is updated every other year (47, 50).

The latest update of the IUIS in 2022 classifies IEIs into the following 10 groups (47, 51): 1. Combined immunodeficiencies. 2. Combined immunodeficiencies with syndromic characteristics. 3. Predominant antibody deficiencies. 4. Diseases of immune dysregulation. 5. Congenital phagocyte defects. 6. Defects in the intrinsic and innate immunity. 7. Autoinflammatory diseases. 8. Complement deficiencies. 9. Bone marrow failure. 10. Phenocopies of inborn errors of immunity.

Inborn errors of immune dysregulation (group 4) are a heterogeneous group of disorders with clinical variability that affect genes involved in the regulation of the immune system. Those presenting with a phenotype caused by loss of tolerance mechanisms leading to autoimmunity, autoinflammation, lymphoproliferation, and/or severe atopy have come to be recognized as having Primary Immune Regulatory Disorders (PIRD) since 2020 (52, 53). PIRD encompass a diverse set of disorders due to failures in different immune regulatory pathways; hence, this enables a subgrouping into different categories.



**FIGURE 2**  
**(A)** Schematic representation of Treg mechanisms of action. **(B)** Main Tregopathies and the gene mutation responsible for the disruption of Treg function among other IELs that affect Treg (in box, down-right). Arrows show normal physiological processes. Tefr, effector T cells; DCs, dendritic cells; pDCs, plasmacytoid DCs; IEI, inborn errors of immunity; IPEX, immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome; LALAI, LRBA deficiency with autoantibodies, regulatory T (Treg) cell defects, autoimmune infiltration; CHAI, CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration; ALPS, Autoimmune lymphoproliferative syndrome; OS, Omenn Syndrome; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; CVID, Common variable immunodeficiency; VEO-IBD, very early onset inflammatory bowel disease; APS, Activated PI3K Delta Syndrome; WAS, Wiskott-Aldrich Syndrome; DOCK8, Dedicator of cytokinesis 8 deficiency; NBEAL2, Neurobechin-like 2.

## 2.2 From primary immune regulatory disorders to tregopathies: central role of Treg in the pathophysiology

In 2018, the term tregopathies (54) was first introduced: it referred to a group of IEI with a clinical phenotype later encompassed within PIRD, in which the affected regulatory target is the Treg cell itself. This group initially included mutations in *FOXP3*, *CD25*, *CTLA-4*, *LRBA*, *BACH2*, *IL10*, and gain of function (GOF) of *STAT3* (47, 55, 56). Since then, the IUIS expert committee

(EC) has added new genes to this category, including mutations in *FERMT1*, *CD122*, *DEF6*, and *IKAROS* GOF (47, 51) (Figure 2).

Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (known by the acronym IPEX) was first recognized in 1982 by *Powell et al.* and was the first disease associated with a defect in Treg. It presents with a wide variety of autoimmune manifestations in early life. IPEX is generated as a consequence of mutations in the transcription factor FoxP3, resulting in a quantitative reduction of protein expression or a loss of protein function (*57, 58*). However, several studies have

shown that the *FOXP3* gene is not essential for the establishment of the Treg cell lineage, but rather for its suppressive effector functions, as it controls the expression of different regulatory molecules such as TIGIT, CTLA-4, and the suppression of the IL-2 gene and different effector T-cell cytokines (59–61). Reported mutations causing IPEX are null or nonsense variants and small deletions or insertions in the reading frame (62–64) in the *FOXP3* gene that result in a residual expression of the protein, but lacking function. Therefore, Treg cells from these patients are dysfunctional, being unable to inhibit the proliferation and inflammatory functions of effector T cells (Teff) (62, 65, 66). Of the 70 mutations identified, 40% are located in the DNA-binding region (FKH), 23% in the proline-rich terminal region (PRR), 9% in the leucine helix (LZ), 14% in the LZ-FKH loop, and 6% in the non-coding region. In addition, human *FOXP3* gene has two main isoforms, a full-length isoform (*FOXP3 FL*) and an isoform lacking part of exon 2 (*FOXP3 ΔE2*) (67). A recent study shows that the lack of exon 2 of *FOXP3* in mice and patients with IPEX syndrome leads to severe immune disorders (67). Even though Treg with *FOXP3 ΔE2* can suppress T cells in culture, *in vivo* they lose their stability, suggesting that the presence or absence of exon 2 in *FOXP3* is critical for normal Treg function (67). Although these *FOXP3* mutations are linked to IPEX, there is an increasing number of patients who do not manifest with the classical triad of early-onset intractable diarrhea, type 1 diabetes (T1D), and eczema. Instead, these atypical cases of IPEX manifest with late-onset of symptoms, single-organ involvement, and mild disease phenotypes (68). Thus, a better understanding of the connection between the genotype and phenotype of this disease is needed.

A variety of tests have been developed to assess key molecules, signaling pathways, and cells implicated in IPEX or IPEX-like diseases for diagnostic purposes. Some are clinically available, while others are only available as research tests. On the one hand, Treg levels and FoxP3 expression can be assessed by flow cytometry. For this methodology, it is common to stain cells with CD4/CD25/CD127 to assess Treg cell frequency or numbers (69, 70). In the European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry, working definitions for the clinical diagnosis of IEI (71) are used only for patients with no genetic diagnosis. FoxP3 expression by CD4+CD25+ on flow analysis appears as a diagnostic criterion in IPEX and IPEX-like suspected disease. Nevertheless, patients with nonsense mutations have normal FoxP3 frequency but typically decreased median fluorescence intensity (MFI) because of reduced expression levels (55). Thus, the clinical utility of this technique is moderate (55). The suppressive capacity of Treg can also be measured *in vitro* through a T-cell coculture suppression assay, but this requires cell separation with a significant blood volume. In addition, there are no reference values for this assay yet, so the clinical utility is poor. A clinically useful test is the assessment of IL-2 signaling *in vitro* through T-cell proliferation in the presence of mitogens or IL-2. Mutations in either IL-2 receptor chains will lead to decreased proliferation.

It is also considered useful to measure IL-10 signaling through studies of STAT3 phosphorylation following IL-10 stimulation. Mutations in the IL-10 receptor lead to a loss of STAT3 phosphorylation (55). IL-10 enhances iTreg differentiation and

function probably through the STAT3 and Foxo1 signaling pathway (72). Inhibition of Foxo1 blocks the ability of IL-10 to enhance iTreg differentiation and function, suggesting that the effect of IL-10 is dependent on Foxo1 activation (72). This finding relates to the well-known role of Foxo1 as a contributing factor to Treg function and development (73, 74). In addition, IL-10-induced inhibition of STAT3 phosphorylation also reduces the ability of IL-10 itself to enhance iTreg differentiation, suggesting that STAT3-defective CD4+ T cells respond poorly to IL-10, contributing to immune dysregulation (72).

CD25 deficiency is an immune dysregulation disorder segregating in autosomal recessive form caused by biallelic variants in the *IL2RG* gene encoding IL-2R $\alpha$  also known as CD25 protein. CD25 is expressed at high levels by CD4+ CD25+FoxP3+ Treg cells and has a pivotal role in Treg since IL-2 (and CD25) is required for IL-10 production, as mentioned above (75). Patients with CD25 deficiency present with a clinical phenotype overlapping that of IPEX patients, thus being termed as having IPEX-like disease (75). CD25 expression on the T-cell surface is completely abolished in all patients described, enabling diagnosis by immunological phenotyping with flow cytometry. Decreased T-cell proliferative responses to non-specific or antigen-specific stimuli were observed in some patients, although this could be restored with high doses of IL-2 or IL-15 in some of them. In addition, patients tend to have normal or reduced counts of FoxP3+ regulatory T cells, which makes their isolation for functional studies difficult (75). However, recent studies have demonstrated an altered suppressive capacity in CD25-deficient regulatory T cells purified as CD4+TIGIT+CD127- T cells (76).

In humans, CTLA-4 haploinsufficiency causes a dominant immune dysfunction known as CTLA-4 haploinsufficient autoimmune infiltrative disease (CHAI). Patients with CHAI experience autoimmune cytopenia, hypogammaglobulinaemia, infectious and non-infectious lung disease, enteropathy, lymphoproliferation, skin conditions and neurological involvement, and increased infectious susceptibility. In addition, patients with CTLA-4 haploinsufficiency have decreased numbers of circulating B cells and memory B cells, as well as NK and T cells. In some cases, an increase in CD4+ helper T cells is observed. It is important to note that Treg analysis is made challenging by the low CD25 expression observed in many CVID patients (77). Thus, although the expression of Foxp3 and CD25 may be decreased in CTLA-4 and LRBA deficiencies, this may not necessarily indicate a low Treg count (78). CTLA-4 deficient Treg cells also show decreased suppressive capacity, as in patients with IPEX syndrome (79–81).

LRBA deficiency, either homozygous or compound heterozygous, causes CTLA-4 deficient expression on cell surface. It is also known as LRBA disease with autoantibodies, Treg cell defects, autoimmune infiltration, and enteropathy (LATAI disease), and it shares phenotypic and clinical features with CTLA-4 haploinsufficiency. The CTLA-4 protein is constantly recycled between the cell surface and the cell interior. LRBA facilitates the recycling of CTLA-4 from endosomes to the surface of T cells to prevent its degradation in lysosomes. As a result, LRBA-deficient Treg cells show reduced levels of CTLA-4 expression. Similar to



*CTLA-4* mutated patients, LRBA-deficient T cells are hyperproliferative upon *in vitro* activation and both Treg cell-mediated suppressor capacity and CD80 transendocytosis are impaired. Also, Treg cell counts are reduced (82, 83).

A very recent study has revealed the interaction of the Neurobeachin-like 2 (NBEAL2) protein with immune cells (84). Loss of function of NBEAL2 leads to grey platelet syndrome (GPS) and some patients develop autoimmune disorders (84). By mass spectrometry it was shown that one of the proteins associated with NBEAL2 is LRBA. Immunoprecipitation further confirmed that NBEAL2 and *CTLA-4* interact with each other (84). Interestingly, NBEAL2 deficiency leads to low *CTLA-4* expression in Tconv cells, while Treg cells appear to be unaffected (84). Therefore, further studies of this deficiency are needed to elucidate both phenotypic and functional involvement of Treg cells.

BACH2 is a transcription factor that plays a crucial role in B-cell class recombination, somatic hypermutation, T-cell differentiation and function, and alveolar macrophage function. Genetic variations at the *BACH2* locus are commonly associated with an increased risk of various autoimmune and inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, T1D, asthma, multiple sclerosis, vitiligo, Graves' disease, Crohn's disease, and celiac disease. In 2017, BACH2 haploinsufficiency was initially described in a patient with lymphocytic colitis, splenomegaly, and progressive humoral deficiency with sinopulmonary infections (85). With further cases reported, the disease is now named BACH2-related immunodeficiency and autoimmunity (BRIDA). Patients have been shown to exhibit decreased levels of Treg in the blood and colon (85), where FoxP3 expression levels decrease, compromising Treg (85). Further functional studies are needed to elucidate the role of Treg in this disease.

The STAT3 signaling cascade plays an important role in the regulation of Treg and Th17 cells. STAT3 gain-of-function (GOF) syndrome is a multi-organ primary immune regulatory disorder characterized by early onset autoimmunity. Early in life, patients present most commonly with lymphoproliferation, autoimmune cytopenias, and growth delay (86). STAT3 induction by IL-6, together with TGF- $\beta$ , is essential for Th17 cell differentiation. However, IL-6 also inhibits TGF- $\beta$ -induced upregulation of FoxP3 in naïve CD4<sup>+</sup> T cells, favoring polarization towards a potentially pathogenic Th17 phenotype (87). In addition, STAT3 activation increases the expression and secretion of SOCS3 (STAT5 inhibitory protein), a positive regulator of FoxP3 and CD25. STAT3 GOF disease may result from altered upregulation of both FoxP3 and imbalance in Treg/Th17 cell polarization, although it is unclear which factor has a dominant effect. Thus, Treg cell counts are usually reduced in STAT3 GOF (88). Because of the broad role of STAT3 in regulating various signaling, differentiation, growth, and regeneration cascades in different tissues and cell types, it is possible that other cell subsets and pathways also contribute to immune dysfunction in these patients (88).

The disturbances in Treg in Tregopathies are summarized in Table 2. Currently there are overlapping terms to refer to some PIRD disorders: some are based on physiopathology such as Tregopathies (53) or check-point deficiencies (81, 97), while others refer to the clinical phenotype of affected patients:

autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)-like (92) and IPEX-like (66).

## 2.3 Treg dysfunction in other IEI

The remaining categories of PIRD which are not recognized as Tregopathies include hyperinflammatory disorders, such as hemophagocytic lymphohistocytosis (HLH) with or without intrinsic susceptibility to Epstein-Barr virus, non-malignant lymphoproliferation with autoimmunity (ALPS), inflammatory bowel disease linked to IL-10 signaling (very early onset inflammatory bowel disease, VEO-IBD), and other disorders linked to monogenic autoimmunity but lacking a central role in Treg (51, 53). Although the genetics of these other PIRD do not impact directly on the biology and function of Treg, these cells can be markedly altered in a direct or indirect manner.

HLH is a hyperinflammatory disorder with excessive immune activation resulting from different genetic defects in *PRF1*, *UNC13D*, *STX11*, *STXBP2*, *SLC7A7*, *CDC42*, *FAAP24*, *RHOG*, *LYST*, *RAB27A*, *AP3B1*, *AP3D1*, *SAP*, *XIAP*, *CD27*, or *CD70* (51, 98) that impair granule-mediated cytotoxicity. This impedes the cytotoxic effector cells from achieving their goal: to kill infected and transformed cells, with the consequent release of cytokines that promote a state of hyperactivation of the immune response and hyperinflammation. It has been shown that in acute HLH CD8<sup>+</sup> T lymphocytes overexpresses CD25, so that by consuming IL-2 from the medium they compete against Treg for this very resource. This results in an indirect Treg cell malfunction and a collapse in Treg cell numbers (89). In the specific case of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), which causes X-linked Lymphoproliferative Disorder (XLP-2) and VEO-IBD, Treg cells are also affected. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) is one of the transcription factors involved in the maintenance of Treg inhibitory function. XIAP binds to SOCS1 promoting its stabilization (99). Mutations in XIAP lead to SOCS1 deficiency and trigger an overactivation of the transcription factors STAT1 and STAT3 with a consequent reduction of the suppressive capacity of Treg, reducing their cell numbers, reducing FoxP3 stability, and even predisposing to IFN $\gamma$  secretion, which diverts the response from a regulatory function to an inflammatory one (91).

In the case of ALPS, the underlying genetic defect involves the components of the apoptotic Fas-FasL pathway. There are a number of biomarkers linked to ALPS such as elevated levels of CD3<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double negative cells, as well as elevated plasma levels of IL-10, soluble FasL (sFasL), and vitamin B12 (92, 100). It has been shown that in ALPS patients the proportion of Treg defined as both CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup> and CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> was lower compared to healthy controls (90). In addition, patients also had a high proportion of naïve Treg (FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>) and a rare population defined as CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD15<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>. However, although the proportions of Treg were low, the suppressive capacity on T-cell proliferation was not affected. This study suggests that excessive T cell proliferation in ALPS may not be ascribed to a Treg defect or T cell sensitivity to suppression (90).



However, given the paucity of information on Treg in ALPS, further studies are needed.

Furthermore, in recent years and thanks to advances in NGS, novel gene defects outside the Fas-FasL apoptosis pathway with a phenotype and clinical mimicry to ALPS have been identified (ALPS-like). These include the above-mentioned check-point deficiencies (CTLA-4, LRBA and DEF6 deficiencies) but also the Activated PI3K Delta Syndrome (APDS). APDS results from the increased activity of the phosphoinositide-3-kinase  $\delta$  (PI3K $\delta$ ) pathway (101). This enzyme is predominantly expressed by leukocytes and plays a very important role in immune cell function. Animal models indicate that impaired PI3K $\delta$  in mice leads to colitis mostly due to compromised Treg function, suggesting PI3K $\delta$  plays a role in Treg function (102). However, it should be pointed out that the mouse model of PI3K $\delta$  does not recapitulate ALPS in humans. In most of these ALPS-like disorders, total Treg CD4+CD25+FoxP3+ levels are lower compared to healthy controls, as well as lower CTLA-4 expression levels and an expansion of circulating follicular CD4+CXCR5+CD45RA-(cTFH) T cells and polarization towards a Th1 phenotype (CCR6-CXCR3+) (92). Also, in most ALPS-like phenotypes there is a reduction in the T cell compartment, while senescent CD4+ T cells are increased.

Clinical phenotypes of lymphoproliferation and autoimmunity are found in other entities such as common variable immunodeficiency (CVID). In CVID, the involvement of Treg cells is still under study; recent studies have reported decreases in CD4 Treg in patients with CVID (103), while others have found conflicting results (104). For example, some researchers have observed that CD4 Treg (identified by markers such as CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3+) are decreased in CVID patients, especially those with associated autoimmune diseases (105). However, other studies have found no significant changes in CD4 Treg in relation to disease severity or the presence of autoimmunity (104). Some researchers have also explored the function of these cells and found that, despite differences in levels, the suppressive function of CD4 Treg appears to be maintained overall (106). However, in general, there is still a lack of consensus on how CD4 Treg relate to the pathophysiology of CVID and its association with autoimmunity (103, 107, 108). In addition, a recent study analyzed CD8 Treg (CD8+CD25<sup>hi</sup>CD183+Foxp3+) in patients with CVID, finding significant reductions in CD8 Treg ratios in these patients (109). However, no significant differences in CD8 Treg ratios were observed between patients with CVID with or without autoimmunity (109). Because CVID is an umbrella term for a probable heterogeneous group of diseases with different pathophysiological mechanisms (110), the study of Treg in this disease is challenging. Further research with larger series and more specific approaches are needed to fully understand the role of CD4 and CD8 Tregs in the pathogenesis and clinical manifestations of CVID and its relationship with autoimmunity. The disturbances in Treg in IEI other than Tregopathies are summarized in Table 2.

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is an X-linked IEI characterized by lymphocyte dysfunction leading to opportunistic viral and bacterial infections, thrombocytopenia, eczema, autoimmune disorders, and cancer (93, 111, 112). More than 200

mutations have been described in the gene encoding the WAS protein (WASp) (93, 111). Mutations resulting in loss of WASp expression correlate with a more severe disease phenotype (93). Its deficiency is mainly associated with defects in T-lymphocytes. In particular, lymphocytes are unable to reorganize the actin cytoskeleton in response to T-cell receptor (TCR) engagement, leading to incomplete cell activation, and decreased cell proliferation and survival. Although WASp has not been shown to play a crucial role in the production of Tregs in the thymus, it is required for Treg expansion and survival in the periphery (93, 111). WASp deficiency leads to a decrease in the percentage of peripheral Treg (although FoxP3 expression is maintained), with a strong impact on activated Treg as evidenced by a decrease in activation markers and migration receptors (93, 112). Despite this, WASp-deficient Treg show normal or slightly lower suppressor capacity against T cells, suggesting that the impact of WASp mainly affects the survival and expansion of peripheral Treg, but not their suppressor function (93). Notably, in a study of WASp-deficient mice, Tregs were defective in their suppressor function *in vitro*, but in WAS patients this defect in function was less clear (113). In terms of clinical implications, although alterations in Treg may correlate with the high frequency of autoimmunity in WAS patients, more research is needed to improve understanding of this correlation.

Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency is a rare IEI characterized by a constellation of symptoms including severe immunodeficiency, elevated IgE levels, allergies, and autoimmune disorders (94, 114). While the precise pathophysiology of immune dysregulation remains only partially understood, it is suggested that DOCK8 regulates the suppressive function of Tregs by promoting STAT5 phosphorylation in response to IL-2 signaling, which is essential for Treg maintenance (94). Furthermore, DOCK8 is involved in CD25 recycling (94). Patients with DOCK8 deficiency have been shown to exhibit reduced levels of Treg with impaired suppressive function (94). Remarkably, in a study using contact hypersensitivity (CHS) models, Treg lacking DOCK8 acquired a pathogenic phenotype expressing both FoxP3 and T-bet, along with IFN $\gamma$ , suggesting that Tregs polarized towards a potentially inflammatory phenotype rather than maintaining their suppressive function (94, 114).

Omenn syndrome (OS) is an severe recessive autosomal combined immunodeficiency, ascribed to hypomorphic mutations in the activating recombination genes (*RAG1* and *RAG2*), but also in other genes (*DCLRE1C*, *IL7R*, *RMRP*, *IL2-R $\gamma$* , *ZAP70*, *LIG4*, *ADA*) (115), and impairing, but not abolishing, the recombination process of the *V(D)J* genes. OS manifests with generalized erythroderma, alopecia, lymphadenopathy, hepatomegaly, and diarrhea, and the immunological phenotype is characterized by a reduced number of circulating B lymphocytes (95, 115). In one study, patients with OS were shown to have a variable number of circulating Treg with low FoxP3 expression and reduced or no T-cell suppressive capacity *in vitro*, together with a severe reduction of Treg cells in the thymus (95). These results provided the first evidence of a defect in Treg development and function in OS, implying that both central and peripheral tolerance are compromised in this disease.

STAT5b deficiency is a rare autosomal recessive disease involving both marked growth failure and severe

TABLE 2 Summary of published information on Treg numbers and function in IEI.

| Treg numbers and function in IEI |                                                                                                                                           |                                                                                           |                                |           |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------|
| Tregopathies                     |                                                                                                                                           |                                                                                           |                                |           |
| Disease                          | Gene                                                                                                                                      | Treg phenotype                                                                            | <i>In vitro</i> Treg function  | Reference |
| IPEX syndrome                    | FOXP3                                                                                                                                     | Normal or low circulating FoxP3+ Treg and FoxP3 expression level; high TSDR demethylation | Decreased suppressive capacity | (55)      |
| CD25 deficiency                  | IL2R $\alpha$                                                                                                                             | Normal or low circulating FoxP3+ Treg                                                     | Altered suppressive capacity   | (75)      |
| CTLA-4 deficiency                | CTLA-4                                                                                                                                    | Normal or high circulating FoxP3+ Treg and low in FoxP3 expression level                  | Decreased suppressive capacity | (80)      |
| LRBA deficiency                  | LRBA                                                                                                                                      | Normal or low circulating FoxP3+ Treg and FoxP3 expression level                          | Altered suppressive capacity   | (83)      |
| NBEAL2 deficiency                | NBEAL2                                                                                                                                    | NFS                                                                                       | NFS                            | (84)      |
| BACH-2 deficiency                | BACH-2                                                                                                                                    | Low FoxP3 expression level on Treg                                                        | NA                             | (85)      |
| IL-10/IL-10R deficiency          | IL10<br>IL10R $\alpha$<br>IL10R $\beta$                                                                                                   | NFS                                                                                       | NFS                            | NFS       |
| STAT3 GOF                        | STAT3                                                                                                                                     | Normal or low circulating FoxP3+ Treg                                                     | Altered suppressive capacity   | (86)      |
| FERMT1 deficiency                | FERMT1                                                                                                                                    | NA                                                                                        | NA                             | NFS       |
| CD122 deficiency                 | IL2R $\beta$                                                                                                                              | NA                                                                                        | NA                             | NFS       |
| DEF6 deficiency                  | DEF6                                                                                                                                      | NA                                                                                        | NA                             | NFS       |
| IKAROS GOF                       | IKZF1                                                                                                                                     | NA                                                                                        | NFS                            | NFS       |
| Other Inborn Errors of Immunity  |                                                                                                                                           |                                                                                           |                                |           |
| HLH                              | PRF1<br>UNC13D<br>STX11<br>STXBP2<br>SLC7A7<br>CDC42<br>FAAP24<br>RHOG<br>LYST<br>RAB27A<br>AP3B1<br>AP3D1<br>SAP<br>XIAP<br>CD27<br>CD70 | Low circulating FoxP3+ Treg                                                               | NFS                            | (89)      |
| ALPS                             | TNFRSF6<br>TNFSF6<br>CASP10                                                                                                               | Low circulating FoxP3+ Treg; high proportion of naïve Treg (FoxP3lowCD45RA+)              | Altered suppressive capacity   | (90)      |
| VEO-IBD                          | XIAP                                                                                                                                      | Normal or low circulating FoxP3+ Treg and                                                 | Altered suppressive capacity   | (91)      |

(Continued)

TABLE 2 Continued

| Treg numbers and function in IEI |                                                              |                                                                                              |                                               |           |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|
| Tregopathies                     |                                                              |                                                                                              |                                               |           |
| Disease                          | Gene                                                         | Treg phenotype                                                                               | <i>In vitro</i> Treg function                 | Reference |
|                                  |                                                              | FoxP3 expression level                                                                       |                                               |           |
| APDS                             | PIK3Cδ<br>PIK3R1                                             | Low circulating FoxP3+ Treg                                                                  | Altered suppressive capacity                  | (92)      |
| CVID                             | Unknown                                                      | NFS                                                                                          | NFS                                           | NFS       |
| WAS                              | WASp                                                         | Low circulating FoxP3+ Treg                                                                  | Normal or slightly lower suppressive capacity | (93)      |
| DOCK8                            | DOCK8                                                        | Low circulating FoxP3+ Treg                                                                  | Altered suppressive capacity                  | (94)      |
| OS                               | RAG1<br>RAG2<br>DCLRE1C/L7R RMRP IL2-Rγ<br>ZAP70 LIG4<br>ADA | Low circulating FoxP3+ Treg and FoxP3 expression level. Severe reduced FoxP3+ Treg in thymus | Reduced suppressive capacity                  | (95)      |
| STAT5b                           | STAT5b                                                       | Low circulating FoxP3+ Treg and FoxP3 expression level                                       | Altered suppressive capacity                  | (96)      |

NFS, need further studies; NA, not available.

immunodeficiency (116). Normal transcription of *IL-2Rα*, *FOXP3*, *Bcl-2* and growth hormone (GH) genes are controlled by STAT5b signaling (96, 116). Immunophenotypically, STAT5b-deficient patients have decreased Treg numbers, low expression of FoxP3 and CD25, and an impaired ability to suppress T-cell proliferation (96, 116). Patients present with severe eczema, arthritis, autoimmune thyroiditis, and thrombocytopenic purpura, which are thought to be associated with Treg dysfunction (96, 116), demonstrating that STAT5b plays a critical role in Treg maintenance and function. Interestingly, an overshadowed cytokine, IL-9, activates the transcription factors STAT3 and STAT5 whose cellular targets include Treg (117). In an IL-9Rα-deficient mouse model of autoimmune encephalomyelitis, Tregs have a reduced ability to suppress T-cell proliferation (117). In addition, *in vivo* and *in vitro* assays have shown that IL-9 promotes Treg suppressive function and survival through STAT3 and STAT5 signaling (117). This suggests that IL-9 has an important role in Treg function and maintenance. Therefore, it could be of interest to include the study of IL-9Rα or IL-9 function in Treg in patients with immune dysregulation immunodeficiencies.

### 3 Treg cell-based therapies

The diagnosis and management of IEIs pose challenges due to the confluence of overlapping and multisystemic manifestations and their variable underlying genetic etiologies (54). Also, there is a variety of treatment options for the management of immune dysregulation in IEIs depending on the specific type, severity, and pathway involved in the disorder. These include systemic

immunosuppressants, enzyme replacement therapy, small molecules, biological therapies (such as monoclonal antibodies), and adoptive cell therapies (ACT) such as hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), gene therapy (54, 118, 119) and, in the near future, cell-based therapies. The aim of this review is to ascertain available Treg cell-based therapies more comprehensively and, as such, the other therapies will be briefly summarized.

#### 3.1 Current therapeutic approaches for immune dysregulation in IEI

Systemic immunosuppressants, such as glucocorticoids and calcineurin inhibitors, exhibit non-specific effects and are typically employed in cases where specific diagnosis is still lacking, but there is a requirement to manage inflammation (54, 118). As for targeted therapies, there is a range of pharmaceutical agents with the ability to selectively counteract the aberrant pathways and/or molecules involved in specific diseases, thereby tailoring drug-based therapies to the precise needs of each individual patient. Within these possibilities, monoclonal antibodies are used as a more personalized approach to treat some IEIs. This is the case of alemtuzumab (anti-CD52) (56), emapalumab (anti-IFNγ) (120, 121) and anakinra (IL-1R agonist) (122) used to treat HLH. Other drugs include rituximab (anti-CD20) used for autoimmune and lymphoproliferative disorders (121) and tocilizumab (anti-IL6R) for GOF STAT3 (123, 124). Moreover, a recent clinical trial explored the efficacy and safety of tadekinig alpha (an IL-18 binding protein) in autoinflammatory conditions driven by IL-18 (Arnold)

such as *NLR4* GOF and XIAP deficiency (125). Regarding IL-10 related VEO-IBD, IL-1 inhibitors have been suggested based on the assumption that IL-10 LOF mutations can interact with activation through the inflammasome which would lead to increased IL-1 levels (126). Abatacept (CTLA-4 fusion protein) is used in CTLA-4 and LRBA deficiencies (127). Additionally, due to its mechanism of action inducing T cell anergy it has been tested in a mouse model for IPEX with very promising results and superior efficacy to sirolimus and anti-CD4 treatments (128). Teplizumab, a CD3-directed monoclonal antibody, has been approved to treat T1D and is being tested in pediatric patients with stage 2 of this disease (129). Considering the occurrence of T1D in IPEX patients, this therapeutic approach could be highly beneficial in effectively managing these patients (63). Besides monoclonals, other drugs targeting specific affected pathways are being used. For example, sirolimus (an mTor pathway inhibitor) has been used in LRBA biallelic mutations and CTLA-4 haploinsufficiency (56), as well as ALPS and APDS (120) and CVID (130). This is also the case for Jakinibs (direct JAK/STAT inhibitors) like ruxolitinib (JAK1 and JAK2 inhibitor) and tofacitinib (JAK1 and JAK3 inhibitor) that have been used in *STAT3* GOF mutations (56, 120) and HLH (131).

HSCT is a curative option for IEIs. Within the context of IEIs, the initial application of HSCT was documented in SCID cases as early as 1968 (120, 132). This procedure carries substantial risks, including graft-versus-host disease (GVHD) and the administration of conditioning agents that result in grave immunosuppression, thereby elevating the risk of severe infections (54). Furthermore, limitations encompass the availability of compatible donors, the age of patients, and the severity of the disease and/or end-organ damage (118). Due to the importance of conditioning regimes for survival, HSCT recommendation guidelines are established by the EBMT/ESID inborn errors working party guidelines (IEWP) (118, 126, 133). PIRD has particular challenges for HSCT. This approach becomes essential in patients that cannot be managed by immunosuppressive treatments (125). In this context, patients show an increased risk of alloreactivity to HSCT indicating a need for further research into the use of targeted treatment as a bridge for HSCT (134). Moreover, while this approach has demonstrated efficacy in resolving clinical symptoms for a subset of patients, the long-term survival rates remain relatively low compared to conventional IEIs. For PIRD, the survival rate at the 5-year mark is approximately 67% (135) whilst conventional IEIs exhibit a 90% (134). Regarding HSCT in PIRD, even when the donor is a close relative, genetic screening becomes necessary due to the disease's delayed and variable clinical onset or incomplete penetrance, which could also potentially impact other family members (134). Therefore, comprehensive research is imperative to render HSCT in PIRD a safer, more efficient and viable therapeutic approach.

Gene therapy was first used in SCID-ADA as early as 1993, followed by SCID-X1 (132). This strategy entails the modification of HSC and other immune cells involved in the disease process. Subsequent to its inception, significant advances have been made such as using self-inactivating lentiviruses, rendering this approach a promising and safer alternative compared to its earlier iterations (119, 120). Indeed, in 2016, Strimvelis<sup>TM</sup> was approved in Europe

for the treatment for ADA-SCID. It consists of autologous CD34+ cells (HSC) transduced with a gamma-retrovirus that encodes for the human ADA cDNA sequence. There are, however, important limitations for this gene-adding approach. Transduction can limit the success and number of cells available for treatment, and gene manipulation can generate insertional mutagenesis that can turn on oncogenes and lead to clonal expansion or leukemic proliferation. Moreover, preexisting mutations or availability of autologous cells for gene modification could rule out the patient for the procedure (136). A more pinpointed approach is gene editing where stable genetic modification is introduced at the specific targeted site that is mutated and responsible for the IEIs. This process employs engineered nucleases, with three primary types being utilized: Zinc-Finger Nucleases (ZFNs), Transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and CRISPR/Cas. These molecular tools enable researchers to precisely edit the genetic material, offering a more targeted and efficient approach to treating genetic-based immune disorders (119). This technique is still in preclinical phases but demonstrates remarkable promise. Regarding gene therapy in PIRD, it has been evaluated in IPEX syndrome and HLH. In IPEX, two primary gene therapy strategies are currently under development. The first consists in forcing ectopic and stable FoxP3 expression on CD4+ T cells, thereby transforming them into FoxP3 engineered Treg-like cells. This approach is already being tested in IPEX patients where a clinical trial (NCT05241444) is evaluating the feasibility and safety profile of these Treg-like cells, called CD4<sup>LVFoxP3</sup>. The second approach, which is still in preclinical studies, uses CRISPR-Cas to modify hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) for the development of long-lasting and functional Treg and Teff cells that can normally express FoxP3. This latter approach is capable of restoring FoxP3 levels independent of the specific mutation of the patient and it also enables cell marking for monitoring and purification purposes (137). In HLH, there is also a gene therapy approach under development for perforin deficiency (138). It consists in transducing autologous murine CD8+ T cells with a gammaretroviral vector with corrected perforin gene to generate fully functional CD8+ T cells, which are subsequently transferred back to the mouse. Indeed, this strategy has demonstrated success *in vivo* in an HLH murine model (139). These promising findings offer hope for the potential application of gene therapy in the treatment of IPEX and HLH in the future.

## 3.2 Adoptive cell therapy with Treg

With the first human treated with Treg in 2009, ACT using Treg is a rapidly expanding field that offers substantial advantages and holds great promise for medical applications (140). Numerous clinical trials are currently being carried out with Treg cell-based therapies to manage GVHD (39), T1D (141) and transplant rejection (142). As highlighted throughout this review, Tregs exhibit suppressive and immunoregulatory functions that render them ideal for addressing diseases characterized by immune activation. Nevertheless, care must be taken when employing Treg cell-based therapeutic approaches, which are summarized in Table 1. Firstly, Treg isolated from blood is a mix of pTreg and



tTreg, and tTregs have been shown to be more stable under lymphopenia conditions in mouse models. Secondly, Tregs possess the ability to modulate their local microenvironments, enabling them to convert their surroundings into a suppressive milieu regardless of their own persistence. This phenomenon is referred to as infectious tolerance. Consequently, infused Treg may not necessarily need to endure indefinitely, but rather, they can persist as long as it takes for the microenvironment to undergo transformation and establish a suppressive environment. Furthermore, it is important to consider that when Tregs for therapy are derived from Teff, they may exhibit different mechanisms of action compared to their natural counterpart (37). Numerous studies have demonstrated that antigen-specific Tregs are more efficient and safer than polyclonal Tregs as they migrate to the specific site where the antigen itself is expressed, reducing the risk of general immunosuppression. However, antigen-specific Tregs are present in very low numbers in blood, and the expansion protocol needed for their use as ACT is very challenging (38). Therefore, polyclonal Treg could be a more feasible approach although it could generate more side effects due to bystander suppression (143).

Taking all these aspects into account, various mechanisms are being explored to generate antigen-specific Treg. One method involves the use of an engineered T cell receptor (TCR), where an antigen-specific TCR is obtained from a Teff and introduced into Treg. These transduced cells gather in target tissues expressing the specific antigen, exerting their function directly or by bystander suppression. Importantly, they are MHC restricted so matching MHC between donor and recipient is needed (143). This technique has demonstrated remarkable potential in mouse models of multiple sclerosis and hemophilia, exhibiting promising results (37). Another approach involves chimeric antigen receptor (CAR) Treg cells, which are designed to recognize specific proteins. This strategy proves particularly useful for conditions involving tissue destruction. Compared to engineered TCR Treg, CAR Tregs require high antigen expression to activate but are MHC independent which makes them a more versatile option for widespread application in patients. In fact, engineered CAR Treg against HLA-A2, commonly mismatched in transplantation, have been proven to protect from GVHD in different mouse models (143). A third approach involved overexpressing FoxP3 in antigen-specific Teff. By transducing FoxP3 into CD4+ Teff, stable and heightened expression of this transcription factor is achieved, effectively converting effector T cells into functional Treg cells (37, 144). Similarly, the most frequently used approach in Treg based therapies comprises the obtaining of Treg cells from peripheral blood and stimulating them with anti CD3/CD28 beads along with high IL-2 concentration to achieve a significant expansion of polyclonal Treg. Although this expansion yields a large number of cells, the expanded Treg cells are less specific and potent than antigen-specific Treg (37). An important limitation in approaches that use peripheral blood as the Treg source is the low number of Treg cells that can be obtained, making it challenging to achieve sufficient cell numbers for therapy. Additionally, the expansion process

itself can lead to an exhausted phenotype of the Treg, potentially impacting functionality, stability, and efficacy (39).

An exceptionally innovative recent approach consists in generating effective Treg from pediatric thymus, which is routinely discarded in pediatric cardiac surgeries. Referred to as thyTreg, these cells are derived from fresh thymocytes and are induced to differentiate and expanded under controlled laboratory conditions. Notably, thyTreg show highly advantageous properties as they are immature with an undifferentiated phenotype, have greater suppressor capacity, and display increased stability of FoxP3 (39). Given the promising characteristics, thyTreg are currently being evaluated in a clinical trial to prevent rejection in heart transplant patients (NCT04924491). If this therapy succeeds, thyTreg could be further developed for allogenic use as a potentially promising therapy for some PIRD.

There are different methods for obtaining Treg for ACT, generally involving isolation of specific cells from elected source, expansion, characterization of the resulting cell product, reinfusion, and monitoring of the infused cells (38). Throughout this section, different sources for Treg obtention have been mentioned. These sources are continuously explored and allow the isolation of other immune cell types in addition to Treg. These include peripheral blood and umbilical cord blood, and, more recently, Treg cells directly derived from the thymus (where T cells are developed). Each source has its own advantages and challenges, and ongoing research aims to optimize the selection and utilization of these sources to enhance the efficacy and safety of Treg cell-based therapies (39).

### 3.3 Adoptive cell therapy with Treg in PIRD

IPEX syndrome, the benchmark for studying Treg function, highlights the potential benefits adoptive Treg cell therapy could have in IELs. Indeed, the treatment of the equivalent phenotype in mice, known as scurfy, has shown promising results, leading to an increased lifespan of diseased mice (144). CD4+ T cells were isolated from scurfy mice and transduced with a lentiviral vector containing the whole *FOXP3* transcript, as well as the transcript encoding a truncated surface-expressed protein (CD271), facilitating their selection and further detection *in vivo* (145). Resulting CD4<sup>L<sup>V</sup>FoxP3</sup> cells were expanded *in vitro*, resulting in a pool of CD4+ T cells with FoxP3 expression that showed both suppressive function and sustained stability of FoxP3 (137). Initially achieved in scurfy mice, this accomplishment was subsequently extended to encompass CD4+ T cells sourced from IPEX patients (63). This approach demonstrated the feasibility of appropriately transducing previously affected T cells from IPEX patients, characterized by a FoxP3 mutation, resulting in the conversion into CD4+ FoxP3+ T cells. Moreover, these CD4<sup>L<sup>V</sup>FoxP3</sup> exhibited the same functional traits as naturally occurring Treg, including suppressive functions and expression of CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup> CTLA-4+ ICOS+ Helios+ (137). Indeed, upon infusion of CD4<sup>L<sup>V</sup>FoxP3</sup> cells into scurfy mice, notable immunomodulatory effects were observed, leading to symptom improvement (146).

These findings offer valuable insights into the potential therapeutic applications of Treg cell-based interventions for immune dysregulation disorders such as IPEX syndrome (144). To our knowledge, IPEX syndrome remains the only IEI subject with comprehensive investigation aimed at the development of a Treg cell-based therapeutic approach aimed at curing the disorder.

## 4 Discussion

### 4.1 Changes and controversies in the phenotypical definition of Treg

Treg cells have a unique phenotypic molecular signature characterized by high expression of CD25 and FoxP3, both in tTreg or pTreg (14). Although in mice the expression of Helios and low expression of Neuropilin 1 (Nrp-1) are good molecular discriminants between tTreg and pTreg cells (30, 147), in humans this discrimination is problematic and somewhat unclear. In human tTreg, Helios expression is not universal and, similar to FoxP3, its expression has been reported in activated T cells (148, 149). FoxP3 and Helios provide information about the stability and suppressive power of the cell (150) with Helios+ Treg having been reported to be more stable and with a greater suppressive capacity (151). In mice, Nrp-1 expression indicates greater Treg stability; however, in humans, this protein is virtually undetectable in peripheral Treg (152). Because of this, the use of Helios as a differentiating marker between tTreg and pTreg is a matter of ongoing debate. Nevertheless, because of the information it provides, measuring Helios along with FoxP3 should be included as a routine marker in laboratories whenever possible (153).

Characterization of Treg by flow cytometry may not be so simple. Firstly, and as mentioned earlier, there is no specific unique marker for Treg. Secondly, the relatively low expression of FoxP3 requires the use of fluorochrome-labelled monoclonal antibodies of sufficient intensity to detect it. Within Treg, the degree of FoxP3 expression shows a dynamic range from naïve or resting Treg cells, with low expression, to activated Treg with higher expression (154, 155). Therefore, separate identification among Tconv, resting Treg (rTreg), naïve Treg, and activated Treg would be achieved by the relatively high expression of FoxP3 and by additional markers such as CD45RA, thus defining rTreg as CD45RA+FoxP3<sup>low</sup> activated Treg cells with suppressive activity (aTreg) as CD45RA-FoxP3<sup>hi</sup> and T cells without inhibitory capacity as CD45RA-FoxP3<sup>low/-</sup> (155).

Further complicating the matter, intracellular staining requires a fixation process. Although some molecules, such as formaldehyde, largely preserve the native conformation of proteins, they can also generate cross-linking between proteins, polysaccharides, and lipids that may hide the reactive epitopes for fluorochrome-labelled antibodies (150). Transcription factors are not suitable for the isolation of viable cells, and they require more sample handling, time, and resources, reinforcing the clear need to identify unique surface markers for Treg characterization. One possible solution found through omics analysis is a transmembrane protein known as GPA33 that is expressed by a set of Treg with tTreg-like

characteristics (156–158). Additionally, TIGIT appears to inhibit the activation of the mammalian mTORC1 target of rapamycin signaling pathway, maintaining the stability and expression of FoxP3 in Treg (159). Also, elevated TIGIT expression in tTreg (CD4+FoxP3+Helios+) has been reported to be associated with cell lineage stability and suppressive capacity (160). In conclusion, a possible alternative to the use of Helios and FoxP3 as markers of lineage, cell stability, and suppressive force would be the replacement of these markers with GPA33 and TIGIT, respectively. However, further studies are needed to clarify their validity for the identification of stable human Treg.

Given all this information, a crucial question is how human Treg should be defined. Concerning CD4+ cells, there are several ways to define them, either as CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>, CD25<sup>hi</sup>FoxP3+, FoxP3+, CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3+ or CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>CCR4+ (69, 70). At present, Treg cells are characterized in the literature as any of the above definitions, therefore emphasizing the need for a consensual and unified characterization to study this cell type. Based on current knowledge, the most rigorous way to define them is as CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3+Helios+, which ensures the selection of tTreg with stable FoxP3 expression. However, as discussed above, the use of FoxP3 and Helios is not possible when working with viable cells, and sometimes all four markers cannot be used together due to instrumentation limitations. If this is the case, at least two of them should be used, either as CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup> or CD25<sup>hi</sup>FoxP3+ (69, 70). Using each marker separately is not a valid option, as Tconv cells may overexpress CD25, FoxP3, and Helios, and reduce CD127 expression under stimulation conditions (154, 161, 162). CCR4 is currently recognized as a Treg effector cell marker, and therefore can be used to complete the phenotypic definition of Treg when used alongside the markers already mentioned (29).

The complexity of characterizing Treg increases if CD8+ regulatory cells are to be studied, given their recent role in viral infections and tumorigenesis (22). CD8+ Treg can be divided into different groups, including CD8+CD103+, CD8+CD122+, CD8+CD28-, and CD8 $\alpha\alpha$ +HLA-E+TCR $\alpha\beta$ + cells (163). CD8+CD103+ Treg have been implicated in studies of kidney transplantation rejection and intestinal graft-versus-host disease (164). TGF $\beta$  is directly related to the level of CD103 ( $\alpha$ E7 $\beta$  integrin) expression, and it is thought that its suppressive mechanism is through cell-cell contact. However, other studies show that, under inflammatory conditions, CD8 Treg releases TGF- $\beta$  conferring a protective effect (31, 165, 166). Although these cells are CD28+ and do not express FoxP3, CTLA-4, GITR, LAG-3, or CD25, a stable human CD8+ regulatory type (hCD8+) can be induced by adding TGF- $\beta$  and Rapamycin (RAPA) together with  $\alpha$ CD3/CD28 and IL-2 *in vitro* expressing FoxP3, CD103, and PD-1 (167). Nevertheless, further studies are needed to determine the differences among these cell types.

CD8+CD122+ Treg cells have been shown to exert suppressive function in transplantation and autoimmunity settings (32, 168), especially within the memory compartment (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>CCR7+CD127-). However, CD8+CD122+ cells do not express FoxP3, suggesting that they are part of a different group from CD8+FoxP3+ (hCD8 Treg) induced CD8+ cells (169–171). A comparative study showed that a subgroup of CD8+CD122+ Treg cells expressing PD1

(CD8+CD122+PD-1+) versus CD4+FoxP3+ Treg cells are more effective in the context of allograft rejection, with this protein being mainly responsible for the inhibitory effects (33, 170). In spite of this, PD-1 is a marker of T-cell exhaustion and functional impairment, so PD-1 expression on CD8+ Treg requires additional research (172).

Other populations have also been recognized as regulatory cells. These include CD8+CD28- cells which have been associated with different clinical conditions such as pregnancy, infectious diseases, cancer, and organ transplantation. Several studies have shown that their suppressive capacity is dependent on IL-10 or TGF- $\beta$  (34, 173). Although some research groups have demonstrated FoxP3 expression in this cell type (174, 175), other groups have not confirmed this (176, 177). Similarly, loss of FoxP3 and CD28 in this cell type correlates with the expression of CD56, granzyme A, and perforin exhibiting cytotoxic activity (178). In addition, a unique phenotype of CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ +Qa-1 restricted Treg cells (in mice) and HLA-E in humans, expressing surface molecules typical of NK cells, has been demonstrated (35), as well as the recent discovery of a CD8+KIR+ Treg cell subpopulation, which appears to play an important role in the maintenance of peripheral tolerance in the context of antigen-specific viral infections and its relationship to autoimmunity (179). All these findings are of significant importance for understanding the regulatory mechanism of CD8+ cells, but significant further work is needed to clarify precise phenotypic identification, and the possible relationship with CD4+FoxP3+Helios+ Treg.

Currently, the reliable identification of Treg requires a panel with different surface markers, together with function analyses. Taking into account the major problems discussed here, dedicated research is needed to improve our understanding of Treg cells biology and the phenotypic plasticity of the cells in different biological and pathological contexts. These phenotypic controversies are summarized in Table 1.

## 4.2 Changes and controversies in the functional studies of Treg

Because phenotypic characterization of human Treg is challenging, measuring the suppressive capacity of Treg in artificial *in vitro* systems can additionally be used for Treg characterization. Nevertheless, this functional assay may or may not accurately represent their functionality *in vivo*, and the assays currently used may be misinterpreted. Despite these limitations, if assays are rigorous and carefully controlled, the data obtained provide a reliable indication of the regulatory potential of Treg.

Traditionally, what has been considered the gold standard to date is the measurement of the suppressive capacity of Treg, particularly in relation to inhibition of proliferation of conventional CD4+ and CD8+ T cells. Previously, cell proliferation measurements had certain limitations given the use of radioactive isotopes (3H-tritylated) and the lack of precision in identifying the proliferating cells. Although it is very sensitive and requires a small number of cells, this technique lacks suppression of proliferation and cannot confirm Treg regulatory function (92,

180–182). Consequently, it is useful to measure inflammatory cytokine production in the supernatant in this type of assay because 1) the analysis of cytokines is independent of Treg activity, and 2) Tregs suppress the action of inflammatory cytokines (183). However, a quicker solution is to replace the suppression assay with the measurement of IL-2 or IFN $\gamma$  mRNA expression, as well as flow cytometric expression of CD69 and CD154 on Tconv cells, as these alternatives can be performed in 5–7h after co-culture with Treg cells (183, 184). Indeed, commercial companies such as Becton Dickinson (BD) already offer kits to determine Treg suppression based on these two surface markers on Tconv cells after culture at the clinical level (185).

Current flow cytometry-optimized assays using fluorescent reactive amines such as CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) are more efficient and accurate. CFSE labelling of Tef allows independent analysis of Treg from effector cells, as well as proliferation-parallel analysis of surface marker expression and cytokine secretion (186). Although to date this technique is widely used, it should be noted that by analyzing cells that have divided at least once, there will be cells with variable numbers of divisions, so this may underestimate the suppressive capacity of Treg. Therefore, a more accurate approach is the use of cytometry analysis software such as FlowJO (TreeStar) as it provides parameters such as proliferation index (average number of divisions), percentage of divided cells (percentage of cells in the initial population that have divided at least once), and division index (average number of divisions a cell has undergone in the initial population). By basing it on cell divisions rather than the total number of cells, the calculation of the division index allows for a more accurate assessment (36).

Although the *in vitro* suppression assay is a powerful tool, the co-culture system is risky and can lead to misleading data or misinterpretation. Hence, the need for rigorous controls. First, titration of cells in the co-culture is essential. Whilst some studies show that high titers of 1:1 or 1:2 (Treg : Tef) are unlikely to occur under physiological conditions, suppression should be detected at ratios as low as 1 Treg:16 Tef (181, 187). It is essential, however, to have a co-culture control of non-Treg : Tef cells under the same conditions to confirm that the suppression is specifically due to Treg. An additional consideration is that Treg cells have cytotoxic function (Treg CD8+) as one of the mechanisms of suppression; hence, a granzyme/perforin study of the cell culture is desirable (59, 188).

Second, it is also crucial to confirm cell viability. As Tregs are prone to cell death and can be exposed to prolonged purification processes, it is necessary to confirm their viability throughout the suppression assay (189). To this end, good control should include the presence and absence of IL-2 in the assay.

Finally, in order to obtain correct titers of Treg, they need to be purified. Different purification methods exist, but this is a major challenge given the lack of well-defined markers. Therefore, it is not advisable to purify Treg solely based on the use of CD4- and CD25- labelled magnetic beads. Methods to check for Treg cell purity include 1) phenotypic assessment in resting Treg cells at least 10 days after TCR activation to allow decrease of FoxP3 expression on T cells after activation (190) and 2) evaluation of the TSDR region from the *FOXP3* promoter. Females inactivate one of their X chromosomes by methylation; since *FOXP3* is located on the X



chromosome this test may be more feasible in male patients (191, 192), which constitutes a major limitation in human studies.

Ultimately, since Treg cells exert their effects beyond the classical inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation, it would be interesting to also include other Treg-cellular targets, such as antigen-presenting cells (APCs). An interesting proposal would be to measure inhibitory cytokines such as IL-10, IL-35, or TGF- $\beta$ , although special care must be taken with the available antibody conjugates and with the release kinetics of these cytokines if they are measured with flow cytometry; new strategies to measure cell activation through the ATP/ADP ratio may even be tried. The functional controversies are summarized in Table 1.

### 4.3 Concerns regarding Treg cell-based therapies

Treg cell-based therapies present certain concerns that need to be carefully considered. As live cells, Tregs possess the inherent risk of becoming unstable, potentially leading to the generation of undesirable inflammatory responses or exhibiting effector cell properties. Notably, destabilization of FoxP3 and the consequent transformation of Treg into an effector phenotype could trigger tissue destruction. Furthermore, the plasticity of Treg cells allow them to express transcriptional factors that characterize other T cell lineages such as T-bet, GATA-3, and ROR $\gamma$ t that can activate transcriptional programs that allow them to migrate and counteract the effect of the cell whose transcriptional factor is matching. This plasticity is a double-edged sword, as in this context, it makes Treg quite reactive and liable to lose suppressive capacity, secreting inflammatory cytokines under certain circumstances (37, 38). Addressing these issues is crucial to ensure the safety and efficacy of these therapies. The addition of molecules like DNA methyltransferase could help reduce the risk of FoxP3 destabilization. Another factor of concern is the potential risk of oncogene activation subsequent to cell transduction, analogous to occurrences observed in other gene therapy methodologies (37). Moreover, some patients have shown increased susceptibility to opportunistic infections due to the immunosuppressive nature of (38).

To address these issues, strategies to eliminate infused Treg cells if they become overly active or unstable are being thoroughly examined. Among the most advanced approaches are the insertion of suicide casquets or integration sites into the Treg cell, allowing for its inhibition or elimination if necessary (37).

These concerns highlight the importance of ongoing research and vigilance in the development and application of Treg cell-based therapies. Addressing these challenges will be crucial to ensure the safety and effectiveness of these innovative treatments for a wide range of medical conditions. The controversies in Treg cell-based therapies are summarized in Table 1.

## 5 Conclusions

The field of Treg has come a long way recently, with its definition and its function-dysfunction studies correlating with

pathology and cell-based therapies. Yet some controversies remain. Therefore, continuous update and integration of recent information is needed to offer a response to clinical needs, which arise in patients with PIRD, but also in other immunodeficiencies, allergy, and neoplastic syndromes, in order to develop future therapies aimed at restoring Treg functionality.

## Author contributions

RK-B: Conceptualization, Investigation, Software, Writing – original draft, Writing – review & editing. DA: Conceptualization, Investigation, Software, Writing – original draft, Writing – review & editing. YL: Writing – review & editing. AE-S: Writing – review & editing. AV: Writing – review & editing. RC-R: Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing – review & editing. ES-R: Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing. LA: Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study was supported by the projects PI18/00223, FI19/00208, and PI21/00211 to LA, integrated in the Plan Nacional de I+D+I and cofinanced by the ISCIII -Subdirección General de Evaluación y Formento de la Investigación Sanitaria -and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), by Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut (PERIS), Departament de Salut, Generalitat de Catalunya (SLT006/17/00199 to LA), by a 2017 Leonardo Grant for Researchers and Cultural Creators, BBVA Foundation [IN(17)\_BBM\_CLI\_0357] to LA, by a 2017 Beca de Investigación de la Sociedad Española De Inmunología Clínica Alergología y Asma Pediátrica to LA, by a 2022 Convocatòria de Beques de Recerca IRSJD -Carmen de Torres 2022 (2022AR-IRSJD-CdTorres) and CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. It was also supported by grants from “Fundación Familia Alonso” (FFA-2019), from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) co-financed by FEDER funds (ICI20/00063; PI21/00189) granted to RCR. RKB is supported by research funds from IISGM. Project PI21/01325 was granted to ES-R and also supported this study.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Ohkura N, Sakaguchi S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases. *Cell Res* (2020) 30:465–74. doi: 10.1038/s41422-020-0324-7
- Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T cells: Differentiation and function. *Cancer Immunol Res* (2016) 4:721–5. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0193
- Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* (1969) 166:753–5. doi: 10.1126/science.166.3906.753
- Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* (2018) 19:665–73. doi: 10.1038/s41590-018-0120-4
- Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front Immunol* (2019) 31:43(10). doi: 10.3389/fimmu.2019.00043
- Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Annual review of immunology regulatory T cells and human disease. *Annu Rev Immunol* (2020) 26(38):541–66. doi: 10.1146/annurev-immunol-042718
- Shevryev D, Tereshchenko V. Treg heterogeneity, function, and homeostasis. *Front Immunol* (2020) 10:3100. doi: 10.3389/fimmu.2019.03100
- Lucca LE, Dominguez-Villar M. Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:680–93. doi: 10.1038/s41577-020-0296-3
- Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and yet-unanswered questions. *Autoimmun Rev* (2015) 14:105–16. doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.012
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *J Immunol* (2017) 198:981–5. doi: 10.1126/science.1079490
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* (2006) 203:1701–11. doi: 10.1084/jem.20060772
- Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3+ Regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* (2008) 28:870–80. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.018
- Li DY, Xiong XZ. ICOS+ Tregs: A functional subset of tregs in immune diseases. *Front Immunol* (2020) 28:2104. doi: 10.3389/fimmu.2020.02104
- Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* (2013) 14:307–8. doi: 10.1038/ni.2554
- Klein L, Robey EA, Hsieh CS. Central CD4+ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* (2019) 19:7–18. doi: 10.1038/s41577-018-0083-6
- Pellerin L, Jenks JA, Bégin P, Bacchetta R, Nadeau KC. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol Res* (2014) 58:358–68. doi: 10.1007/s12026-014-8512-5
- Morina L, Jones ME, Oguz C, Kaplan MJ, Gangaplara A, Fitzhugh CD, et al. Co-expression of Foxp3 and Helios facilitates the identification of human T regulatory cells in health and disease. *Front Immunol* (2023) 7:1114780(14). doi: 10.3389/fimmu.2023.1114780
- Cheru N, Hafler DA, Sumida TS. Regulatory T cells in peripheral tissue tolerance and diseases. *Front Immunol* (2023) 1:1154575(14). doi: 10.3389/fimmu.2023.1154575
- Vieyra-Lobato MR, Vela-Ojeda J, Montiel-Cervantes L, López-Santiago R, Moreno-Lafont MC. Description of CD8+ regulatory T lymphocytes and their specific intervention in Graft-versus-Host and infectious diseases, autoimmunity, and cancer. *J Immunol Res* (2018) 5(2018):3758713. doi: 10.1155/2018/3758713
- Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* (1970) 18(5):723–37.
- Mishra S. CD8+ Regulatory T cell – A mystery to be revealed. *Front Immunol* (2021) 18:708874(12). doi: 10.3389/fimmu.2021.708874
- Guillonneau C, Hill M, Hubert FX, Chiffolleau E, Hervé C, Li XL, et al. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8+CD45RClow T cells, IFN- $\gamma$ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* (2007) 117:1096–106. doi: 10.1172/JCI28801
- Li J, Zaslavsky M, Su Y, Guo J, Sikora MJ, van Unen V, et al. KIR+CD8+ T cells suppress pathogenic T cells and are active in autoimmune diseases and COVID-19. *Science* (2022) 376(6590):eab9591. doi: 10.1126/science.abi9591
- Sakowska J, Glasner P, Dukat-Mazurek A, Rydz A, Zieliński M, Pellowska I, et al. Local T cell infiltrates are predominantly associated with corneal allograft rejection. *Transpl Immunol* (2023) 79:101852. doi: 10.1016/j.trim.2023.101852
- Bolivar-Wagers S, Larson JH, Jin S, Blazar BR. Cytolytic CD4+ and CD8+ Regulatory T-cells and implications for developing immunotherapies to combat graft-versus-host disease. *Front Immunol* (2022) 13:864748. doi: 10.3389/fimmu.2022.864748
- Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4(+) CD25(+) CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation* (2012) 35(6):1773–80. doi: 10.1007/s10753-012-9496-8
- Chatenoud L. Natural and induced T CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Methods Mol Biol* (2011) 677:3–13. doi: 10.1007/978-1-60761-869-0\_1
- Aly MG, Ibrahim EH, Karakizlis H, Weimer R, Opelz G, Morath C, et al. CD4+CD25+CD127-foxp3+ and CD8+CD28- tregs in renal transplant recipients: phenotypic patterns, association with immunosuppressive drugs, and interaction with effector CD8+ T cells and CD19+IL-10+ Bregs. *Front Immunol* (2021) 12:716559. doi: 10.3389/fimmu.2021.716559
- Baatar D, Olkhanud P, Sumitomo K, Taub D, Gress R, Biragyn A. Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4- tregs, regulate effector T cells using fasL. *J Immunol* (2007) 178:4891–900. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.4891
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* (2010) 184(7):3433–41. doi: 10.4049/jimmunol.0904028
- Lu L, Yu Y, Li G, Pu L, Zhang F, Zheng S, et al. CD8+CD103+ regulatory T cells in spontaneous tolerance of liver allografts. *Int Immunopharmacol* (2009) 9:546–8. doi: 10.1016/j.intimp.2009.01.021
- Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential roles of CD8+CD122+ Regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* (2004) 200:1123–34. doi: 10.1084/JEM.20040395
- Bai Z, Zhang S, Xie Q, Wu S, Su J, Li S, et al. Natural CD8+CD122+ T cells are more potent in suppression of allograft rejection than CD4+CD25+ regulatory T cells. *Am J Transplant* (2014) 14:39–48. doi: 10.1111/ajt.12515
- Fenoglio D, Ferrera F, Fravega M, Balestra P, Battaglia F, Proietti M, et al. Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8+CD28- regulatory T cells. *Hum Immunol* (2008) 69:745–50. doi: 10.1016/j.humimm.2008.08.282
- Fanchiang SS, Cococar R, Othman M, Khanna R, Brooks MJ, Smith T, et al. Global expression profiling of peripheral Qa-1-restricted CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\beta\beta$  regulatory T cells reveals innate-like features: Implications for immune-regulatory repertoire. *Hum Immunol* (2012) 73:214–22. doi: 10.1016/j.humimm.2011.07.306
- Memmurchy AN, Levings MK. Suppression assays with human T regulatory cells: A technical guide. *Eur J Immunol* (2012) 42:27–34. doi: 10.1002/eji.201141651
- Raffin C, Vo LT, Bluestone JA. Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:158–72. doi: 10.1038/s41577-019-0232-6
- Baeten P, Van Zeebroeck L, Kleinewietfeld M, Hellings N, Broux B. Improving the efficacy of regulatory T cell therapy. *Clin Rev Allergy Immunol* (2022) 62:363–81. doi: 10.1007/s12016-021-08866-1
- Bernaldo-de-Quirós E, Pion M, Martínez-Bonet M, Correa-Rocha R. A new generation of cell therapies employing regulatory T cells (Treg) to induce immune tolerance in pediatric transplantation. *Front Pediatr* (2022) 10:862807. doi: 10.3389/fped.2022.862807
- Liu Y, Zheng P. Preserving the CTLA-4 checkpoint for safer and more effective cancer immunotherapy. *Trends Pharmacol Sci* (2020) 41:4–12. doi: 10.1016/j.tips.2019.11.003
- Giancchetti E, Fierabracci A. Inhibitory receptors and pathways of lymphocytes: The role of PD-1 in Treg development and their involvement in autoimmunity onset and cancer progression. *Front Immunol* (2018) 9:2374. doi: 10.3389/fimmu.2018.02374
- Chocarro L, Blanco E, Zuazo M, Arasanz H, Bocanegra A, Fernández-Rubio L, et al. Understanding lag-3 signaling. *Int J Mol Sci* (2021) 22(10):5282. doi: 10.3390/ijms22105282
- Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity* (2016) 44:989–1004. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.001



44. Lee DJ. The relationship between TIGIT+ regulatory T cells and autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* (2020) 83:106378. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106378
45. Polak K, Marchal P, Taroni C, Ebel C, Kirstetter P, Kastner P, et al. CD4+ regulatory T cells lacking Helios and Eos. *Biochem Biophys Res Commun* (2023) 674:83–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.06.087
46. Chougnat C, Hildeman D. Helios-controller of Treg stability and function. *Transl Cancer Res* (2016) 5:S338–41. doi: 10.21037/tcr.2016.07.37
47. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, et al. *Human inborn errors of immunity: 2022 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee* Vol. 42. New York City, USA: Springer US (2022) p. 1473–507. doi: 10.1007/s10875-022-01289-3
48. Yamashita M, Inoue K, Okano T, Morio T. Inborn errors of immunity—recent advances in research on the pathogenesis. *Inflammation Regener* (2021) 41(1):9. doi: 10.1186/s41232-021-00159-6
49. Schmidt RE, Grimbacher B, Witte T. Autoimmunity and primary immunodeficiency: Two sides of the same coin? *Nat Rev Rheumatol* (2018) 14:7–18. doi: 10.1038/nrrheum.2017.198
50. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee. *J Clin Immunol* (2020) 40:24–64. doi: 10.1007/s10875-019-00737-x
51. Bousfiha A, Mounir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, et al. The 2022 update of IUIS phenotypical classification for human inborn errors of immunity. *J Clin Immunol* (2022) 42:1508–20. doi: 10.1007/s10875-022-01352-z
52. Flinn AM, Gennery AR. Primary immune regulatory disorders: Undiagnosed needles in the haystack? *Orphanet J Rare Dis* (2022) 17:1–9. doi: 10.1186/s13023-022-02249-1
53. Chan AY, Torgerson TR. Primary immune regulatory disorders: A growing universe of immune dysregulation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2020) 20:582–90. doi: 10.1097/ACI.0000000000000689
54. Cepika AM, Sato Y, Liu JMH, Uyeda MJ, Bacchetta R, Roncarolo MG. Tregopathies: Monogenic diseases resulting in regulatory T-cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2018) 142:1679–95. doi: 10.1016/j.jaci.2018.10.026
55. Torgerson TR. IPEX and IPEX-like disorders. In: *Stiehm's immune deficiencies: inborn errors of immunity*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier (2020). p. 617–32. doi: 10.1016/B978-0-12-816768-7.00026-0
56. Kolukisa B, Barış S. Primary immune regulatory disorders and targeted therapies. *Turkish J Hematol* (2021) 38:1–14. doi: 10.4274/tjh.galenos.2021.2020.0724
57. Chatila TA, Blaese F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* (2000) 106(12):R75–81. doi: 10.1172/JCI11679
58. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* (2001) 27:20–1. doi: 10.1038/83713
59. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* (2009) 30:636–45. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.010
60. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* (2006) 108:1571–9. doi: 10.1182/blood-2006-02-004747
61. Borsellino G, Kleinschewitz M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* (2007) 110:1225–32. doi: 10.1182/blood-2006-12-064527
62. Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: A lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci* (2016) 1417:5–22. doi: 10.1111/nyas.13011
63. Ben-skowronek I. Ipe syndrome: Genetics and treatment options. *Genes (Basel)* (2021) 12:1–13. doi: 10.3390/genes12030323
64. Kirchner A, Sanchez IM, Zalan A, Bhat G, Bain M. Identification of a novel variant of FOXP3 resulting in severe immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome highlights potential pitfalls of molecular testing. *Pediatr Dermatol* (2022) 39:483–5. doi: 10.1111/PDE.14936
65. Ochs HD, Gambineri E, Torgerson TR. IPEX. FOXP3 and regulatory T-cells: A model for autoimmunity. *Immunol Res* (2007) 38:112–21. doi: 10.1007/s12026-007-0022-2
66. Gambineri E, Mannurita SC, Hagin D, Vignoli M, Anover-Sombke S, DeBoer S, et al. Patients with the phenotype of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome. *Front Immunol* (2018) 9:2411/BIBTEX. doi: 10.3389/FIMMU.2018.02411/BIBTEX
67. Du J, Wang Q, Yang S, Chen S, Fu Y, Spath S, et al. FOXP3 exon 2 controls Treg stability and autoimmunity. *Sci Immunol* (2022) 7(72):eabo5407. doi: 10.1126/sciimmunol.abo5407
68. Consonni F, Ciullini Mannurita S, Gambineri E. Atypical presentations of IPEX: expect the unexpected. *Front Pediatr* (2021) 9:643094/BIBTEX. doi: 10.3389/FPED.2021.643094/BIBTEX
69. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:191–200. doi: 10.1038/nri3158
70. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abgrinani S, Addo R, Akdis M, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol* (2021) 51:2708–3145. doi: 10.1002/eji.202170126
71. Brodski N, Frazer-Abel A, Grumach AS, Kirschfink M, Litzman J, Perez E, et al. European society for immunodeficiencies (ESID) and european reference network on rare primary immunodeficiency, autoinflammatory and autoimmune diseases (ERN RITA) complement guideline: deficiencies, diagnosis, and management. *J Clin Immunol* (2020) 40:576–91. doi: 10.1007/s10875-020-00754-1
72. Hsu P, Santner-Nanan B, Hu M, Skarratt K, Lee CH, Stormon M, et al. IL-10 potentiates differentiation of human induced regulatory T cells via STAT3 and foxo1. *J Immunol* (2015) 195:3665–74. doi: 10.4049/jimmunol.1402898
73. Ren H, Chen Y, Zhu Z, Xia J, Liu S, Hu Y, et al. FOXO1 regulates Th17 cell-mediated hepatocellular carcinoma recurrence after hepatic ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis* (2023) 14:367. doi: 10.1038/s41419-023-05879-w
74. Graves DT, Milovanova TN. Mucosal immunity and the FOXO1 transcription factors. *Front Immunol* (2019) 10:2530. doi: 10.3389/fimmu.2019.02530
75. Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* (2007) 119:482–7. doi: 10.1016/j.jaci.2006.10.007
76. Roth TL, Puig-Saus C, Yu R, Shifrut E, Carnevale J, Li PJ, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature* (2018) 559:405–9. doi: 10.1038/s41586-018-0326-5
77. Verma N, Burns SO, Walker LSK, Sansom DM. Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations. *Clin Exp Immunol* (2017) 190:1–7. doi: 10.1111/cei.12997
78. Hou TZ, Verma N, Wanders J, Kennedy A, Soskic B, Janman D, et al. Identifying functional defects in patients with immune dysregulation due to LRBA and CTLA-4 mutations. *Blood* (2017) 129(11):156–1468. doi: 10.1182/blood-2016-10-745174
79. Schubert D, Bode C, Kenefick R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* (2014) 20:1410–6. doi: 10.1038/nm.3746
80. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* (2014) 345:1623–7. doi: 10.1126/science.1255904
81. Gámez-Díaz L, Grimbacher B. Immune checkpoint deficiencies and autoimmune lymphoproliferative syndromes. *BioMed J* (2021) 44:400–11. doi: 10.1016/j.bj.2021.04.005
82. Charbonnier LM, Janssen E, Chou J, Ohsumi TK, Keles S, Hsu JT, et al. Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. *J Allergy Clin Immunol* (2015) 135:217–227.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.019
83. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. Autoimmune disease. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* (2015) 243(4962):436–40. doi: 10.1126/science.aaa1663
84. Delage L, Carbone F, Riller Q, Zachary JL, Kerbellec E, Buzy A, et al. NBEAL2 deficiency in humans leads to low CTLA-4 expression in activated conventional T cells. *Nat Commun* (2023) 14:3728. doi: 10.1038/s41467-023-39295-7
85. Afzali B, Grönholm J, Vandrovicova J, O'Brien C, Sun HW, Vanderleyden I, et al. BACH2 immunodeficiency illustrates an association between super-enhancers and haploinsufficiency. *Nat Immunol* (2017) 18:813–23. doi: 10.1038/ni.3753
86. Vogel TP, Leiding JW, Cooper MA, Forbes Satter LR. STAT3 gain-of-function syndrome. *Front Pediatr* (2023) 10:770077. doi: 10.3389/fped.2022.770077
87. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* (2006) 441:235–8. doi: 10.1038/nature04753
88. Pillemer BBL, Xu H, Oriss TB, Qi Z, Ray A. Deficient SOCS3 expression in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and SOCS3-mediated suppression of Treg function. *Eur J Immunol* (2007) 37:1622082–2089. doi: 10.1002/EJL.200737193
89. Humblet-Baron S, Franckaert D, Dooley J, Bornschein S, Cauwe B, Schönefeldt S, et al. IL-2 consumption by highly activated CD8 T cells induces regulatory T-cell dysfunction in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 138:200–209.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1314
90. Mazerolles F, Stolzenberg MC, Pelle O, Picard C, Neven B, Fischer A, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-fas patients have an abnormal regulatory T cell (Treg) phenotype but display normal natural Treg-suppressive function on T cell proliferation. *Front Immunol* (2018) 9:718. doi: 10.3389/fimmu.2018.00718
91. Hsieh WC, Hsu TS, Chang YJ, Lai MZ. IL-6 receptor blockade corrects defects of XIAP-deficient regulatory T cells. *Nat Commun* (2018) 9(1):463. doi: 10.1038/s41467-018-02862-4
92. López-Nevado M, González-Granado LI, Ruiz-García R, Pleguezuelo D, Cabrera-Marante O, Salmón N, et al. Primary immune regulatory disorders with an autoimmune lymphoproliferative syndrome-like phenotype: immunologic evaluation, early diagnosis and management. *Front Immunol* (2021) 12:671755. doi: 10.3389/fimmu.2021.671755

93. Humblet-Baron S, Sather B, Anover S, Becker-Herman S, Kasprzowicz DJ, Khim S, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest* (2007) 117:407–18. doi: 10.1172/JCI29539
94. Singh AK, Eken A, Hagin D, Komal K, Bhise G, Shaji A, et al. DOCK8 regulates fitness and function of regulatory T cells through modulation of IL-2 signaling. *JCI Insight* (2017) 2(19):e94275. doi: 10.1172/jci.insight.94275
95. Cassani B, Poliani PL, Moratto D, Sobacchi C, Marrella V, Imperatori L, et al. Defect of regulatory T cells in patients with Omenn syndrome. *J Allergy Clin Immunol* (2010) 125:209–16. doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.023
96. Cohen AC, Nadeau KC, Tu W, Hwa V, Dionis K, Bezrodnik L, et al. Cutting edge: decreased accumulation and regulatory function of CD4+CD25high T cells in human STAT5b deficiency. *J Immunol* (2006) 177:2770–4. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.2770
97. Lo B, Fritz JM, Su HC, Uzel G, Jordan MB, Lenardo MJ, CHAI and LATAIE: new genetic diseases of CTLA-4 checkpoint insufficiency. *Blood* (2016) 128:1037. doi: 10.1182/BLOOD-2016-04-712612
98. Canna SW, Marsh RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* (2020) 135(16):1332–43. doi: 10.1182/blood.2019000936
99. Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, et al. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- $\gamma$  and IL-17A production. *J Exp Med* (2011) 208:2055–67. doi: 10.1084/JEM.20110428
100. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): Report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* (2010) 116(14):e35–40. doi: 10.1182/blood-2010-04-280347
101. Michalovich D, Nejentsev S. Activated PI3 kinase delta syndrome: From genetics to therapy. *Front Immunol* (2018) 9:369. doi: 10.3389/fimmu.2018.00369
102. Luo Y, Xia Y, Wang W, Li Z, Jin Y, Gong Y, et al. Identification of a novel *de novo* gain-of-function mutation of PIK3CD in a patient with activated phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  syndrome. *Clin Immunol* (2018) 197:60–7. doi: 10.1016/j.clim.2018.08.007
103. Więsik-Szewczyk E, Rutkowska E, Kwiecień I, Korzeniowska M, Słodacki D, Jahnz-Różyk K. Patients with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune phenomena have lymphopenia and reduced treg, Th17, and NK cells. *J Clin Med* (2021) 10:3356. doi: 10.3390/jcm10153356
104. Kutukuler N, Azarsiz E, Aksu G, Karaca NE. CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells, Th1 (CCR5, IL-2, IFN- $\gamma$ ) and Th2 (CCR4, IL-4, IL-13) type chemokine receptors and intracellular cytokines in children with common variable immunodeficiency. *Int J Immunopathol Pharmacol* (2016) 29:241–51. doi: 10.1177/0394632015617064
105. Arandi N, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M, Abolhassani H, Sadeghi B, Mirminachi B, et al. Evaluation of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells function in patients with common variable immunodeficiency. *Cell Immunol* (2013) 281:129–33. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.03.003
106. Cunill V, Clemente A, Llanio N, Barceló C, Andreu V, Pons J, et al. Follicular T cells from smB- common variable immunodeficiency patients are skewed toward a Th1 phenotype. *Front Immunol* (2017) 8:174. doi: 10.3389/fimmu.2017.00174
107. Gupta S, Demirdag Y, Gupta AA. Members of the regulatory lymphocyte club in common variable immunodeficiency. *Front Immunol* (2022) 13:864307. doi: 10.3389/fimmu.2022.864307
108. Azizi G, Mirshafiey A, Abolhassani H, Yazdani R, Jafarnejad-Ansariha F, Shaghghi M, et al. Circulating helper T-cell subsets and regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency without known monogenic disease. *J Invest Allergol Clin Immunol* (2018) 28:172–81. doi: 10.18176/jiaci.0231
109. Yesillik S, Agrawal S, Gollapudi SV, Gupta S. Phenotypic analysis of CD4+ Treg, CD8+ Treg, and breg cells in adult common variable immunodeficiency patients. *Int Arch Allergy Immunol* (2019) 180:150–8. doi: 10.1159/000501457
110. Tessarin G, Baronio M, Lougaris V. Monogenic forms of common variable immunodeficiency and implications on target therapeutic approaches. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2023) 23(6):461–6. doi: 10.1097/ACI.0000000000000947
111. Hsu AP. Not too little, not too much: the impact of mutation types in Wiskott-Aldrich syndrome and RAC2 patients. *Clin Exp Immunol* (2023) 212:137–46. doi: 10.1093/cei/uxad001
112. Lexmond WS, Goettel JA, Lyons JJ, Jacobse J, Deken MM, Lawrence MG, et al. FOXP3+ Tregs require WASP to restrain Th2-mediated food allergy. *J Clin Invest* (2016) 126:4030–44. doi: 10.1172/JCI85129
113. Adriani M, Aoki J, Horai R, Thornton AM, Konno A, Kirby M, et al. Impaired *in vitro* regulatory T cell function associated with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol* (2007) 124(1):41–8. doi: 10.1016/j.clim.2007.02.001
114. Wilkie H, Janssen E, Leyva-Castillo JM, Geha RS. DOCK8 expression in regulatory T cells maintains their stability and limits contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* (2021) 141:1503–1511.e3. doi: 10.1016/j.jid.2020.09.027
115. Villa A, Notarangelo LD, Rofman CM. Omenn syndrome: Inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2008) 122:1082–6. doi: 10.1016/j.jaci.2008.09.037
116. Nadeau K, Hwa V, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: An unsuspected cause of growth failure, immunodeficiency, and severe pulmonary disease. *J Pediatr* (2011) 158:701–8. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.12.042
117. Elyaman W, Bradshaw EM, Uytendhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2009) 106:12885–90. doi: 10.1073/PNAS.0812530106
118. Castiello MC, Ferrari S, Villa A. Correcting inborn errors of immunity: From viral mediated gene addition to gene editing. *Semin Immunol* (2023) 66:101731. doi: 10.1016/j.smim.2023.101731
119. Liu X, Li G, Liu Y, Zhou F, Huang X, Li K. Advances in CRISPR/Cas gene therapy for inborn errors of immunity. *Front Immunol* (2023) 14:1111777. doi: 10.3389/fimmu.2023.1111777
120. Slatter M, Lum SH. Personalized hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity. *Front Immunol* (2023) 14:1162605. doi: 10.3389/fimmu.2023.1162605
121. Buccioli G, Meyts I. Recent advances in primary immunodeficiency: From molecular diagnosis to treatment. *F1000Res* (2020) 9:F1000. doi: 10.12688/f1000research.21553.1
122. Eloseily EM, Weiser P, Crayne CB, Haines H, Mannion ML, Stoll ML, et al. Benefit of anakinra in treating pediatric secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Arthritis Rheumatol* (2020) 72:326–34. doi: 10.1002/art.41103
123. Forbes LR, Vogel TP, Cooper MA, Castro-Wagner J, Schussler E, Weinacht KG, et al. Jakinibs for the treatment of immune dysregulation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) or STAT3 mutations. *J Allergy Clin Immunol* (2018) 142:1665–9. doi: 10.1016/j.jaci.2018.07.020
124. Wang W, Liu L, Hui X, Wang Y, Ying W, Zhou Q, et al. Efficacy of tocilizumab therapy in a patient with severe pancytopenia associated with a STAT3 gain-of-function mutation. *BMC Immunol* (2021) 22(1):19. doi: 10.1186/s12865-021-00411-1
125. Arnold DE, Chellapandian D, Leiding JW. The use of biologic modifiers as a bridge to hematopoietic cell transplantation in primary immune regulatory disorders. *Front Immunol* (2021) 12:692219. doi: 10.3389/fimmu.2021.692219
126. Pinto MV, Neves JF. Precision medicine: The use of tailored therapy in primary immunodeficiencies. *Front Immunol* (2022) 13:1029560. doi: 10.3389/fimmu.2022.1029560
127. Krausz M, Uhlmann A, Rump IC, Ihorst G, Goldacker S, Sogkas G, et al. The ABACHAI clinical trial protocol: Safety and efficacy of abatacept (s.c.) in patients with CTLA-4 insufficiency or LRBA deficiency: A non controlled phase 2 clinical trial. *Contemp Clin Trials Commun* (2022) 30:101008. doi: 10.1016/j.conctc.2022.101008
128. Gerbaux M, Roos E, Willemsen M, Staels F, Neumann J, Bücken L, et al. CTLA4-ig effectively controls clinical deterioration and immune condition in a murine model of foxp3 deficiency. *J Clin Immunol* (2023) 43(6):1393–402. doi: 10.1007/s10875-023-01462-2
129. Kean SJ, Deyà-Martínez A, Esteve-Solé A, Vélez-Tirado N, Celis V, Costa J, et al. Teplizumab: first approval Sirolimus as an alternative treatment in patients with granulomatous-lymphocytic lung disease and humoral immunodeficiency with impaired regulatory T cells. *Drugs Pediatr Allergy Immunol* (2023) 8329:439–45425–32. doi: 10.1111/pai.12890
130. Deyà-Martínez A, Esteve-Solé A, Vélez-Tirado N, Celis V, Costa J, Cols M, et al. Sirolimus as an alternative treatment in patients with granulomatous-lymphocytic lung disease and humoral immunodeficiency with impaired regulatory T cells. *Pediatr Allergy Immunol* (2018) 29:425–32. doi: 10.1111/pai.12890
131. Keenan C, Nichols KE, Albeituni S. Use of the JAK inhibitor ruxolitinib in the treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Front Immunol* (2021) 12:614704. doi: 10.3389/fimmu.2021.614704
132. Fischer A. Gene therapy for inborn errors of immunity: past, present and future. *Nat Rev Immunol* (2023) 23:397–408. doi: 10.1038/s41577-022-00800-6
133. Lankester AC, Albert MH, Booth C, Gennery AR, Güngör T, Hönl M, et al. EBMT/ESID inborn errors working party guidelines for hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity. *Bone Marrow Transplant* (2021) 56:2052–62. doi: 10.1038/s41409-021-01378-8
134. Margarit-Soler A, Deyà-Martínez À, Canizales JT, Vlaga A, García-García A, Marsal J, et al. Case report: Challenges in immune reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation for CTLA-4 insufficiency-like primary immune regulatory disorders. *Front Immunol* (2022) 13:1070068. doi: 10.3389/fimmu.2022.1070068
135. Chan AY, Leiding JW, Liu X, Logan BR, Burroughs LM, Allenspach EJ, et al. Hematopoietic cell transplantation in patients with primary immune regulatory disorders (PIRD): A primary immune deficiency treatment consortium (PIDTC) survey. *Front Immunol* (2020) 11:239. doi: 10.3389/fimmu.2020.00239
136. Ferrua F, Aiuti A. Twenty-five years of gene therapy for ADA-SCID: from bubble babies to an approved drug. *Hum Gene Ther* (2017) 28:972–81. doi: 10.1089/hum.2017.175
137. Borna S, Lee E, Sato Y, Bacchetta R. Towards gene therapy for IPEX syndrome. *Eur J Immunol* (2022) 52:705–16. doi: 10.1002/eji.202149210
138. Panchal N, Ghosh S, Booth C. T cell gene therapy to treat immunodeficiency. *Br J Haematol* (2021) 192:433–43. doi: 10.1111/bjh.17070
139. Ghosh S, Carmo M, Calero-García M, Ricciardelli I, Bustamante Ogando JC, Blundell MP, et al. T-cell gene therapy for perforin deficiency corrects cytotoxicity defects and prevents hemophagocytic lymphohistiocytosis manifestations. *J Allergy Clin Immunol* (2018) 142:904–913.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2017.11.050



140. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszuk A, Krzystyniak A, Marek N, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol* (2009) 133:22–6. doi: 10.1016/j.clim.2009.06.001
141. Serr I, Drost F, Schubert B, Daniel C. Antigen-specific treg therapy in type 1 diabetes – challenges and opportunities. *Front Immunol* (2021) 12:712870. doi: 10.3389/fimmu.2021.712870
142. Bernaldo-de-Quirós E, Cózar B, López-Esteban R, Clemente M, Gil-Jaurena JM, Pardo C, et al. A novel GMP protocol to produce high-quality treg cells from the pediatric thymic tissue to be employed as cellular therapy. *Front Immunol* (2022) 13:893576. doi: 10.3389/fimmu.2022.893576
143. Steiner N, Pilat N. The potential for Treg-enhancing therapies in transplantation. *Clin Exp Immunol* (2023) 211:122–37. doi: 10.1093/cei/uxac118
144. Passerini L, Bacchetta R. Forkhead-Box-P3 gene transfer in human CD4+ T conventional cells for the generation of stable and efficient regulatory T cells, suitable for immune modulatory therapy. *Front Immunol* (2017) 8:1282. doi: 10.3389/fimmu.2017.01282
145. Delville M, Bellier F, Leon J, Klifa R, Lizot S, H' Eie Vinçon, et al. A combination of cyclophosphamide and interleukin-2 allows CD4 T cells converted to Tregs to control scurfy syndrome. *Blood* (2021) 137(17):2326–36. doi: 10.1182/blood.202009187
146. Sato Y, Passerini L, Piening BD, Uyeda MJ, Goodwin M, Gregori S, et al. Human-engineered Treg-like cells suppress FOXP3-deficient T cells but preserve adaptive immune responses in vivo. *Clin Transl Immunol* (2020) 9(11):e1214. doi: 10.1002/cti2.1214
147. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, de Lafaille MAC, Parkhurst CN, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosagenerated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* (2012) 209:1723–42. doi: 10.1084/jem.20120914
148. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol* (2013) 190(5):2001–8. doi: 10.4049/jimmunol.1201379
149. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* (2011) 6(8):e24226. doi: 10.1371/journal.pone.0024226
150. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* (2019) 49:1457–973. doi: 10.1002/eji.201970107
151. Bin Dhuban K, d'Hennezel E, Nashi E, Bar-Or A, Rieder S, Shevach EM, et al. Coexpression of TIGIT and FCRL3 identifies helios+ Human memory regulatory T cells. *J Immunol* (2015) 194(8):3687–96. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1401803
152. Milpied P, Renand A, Bruneau J, Mendes-Da-Cruz DA, Jacquelin S, Asnafi V, et al. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* (2009) 39:1466–71. doi: 10.1002/eji.200839040
153. Lam AJ, Lin DTS, Gillies JK, Uday P, Pesenacker AM, Kobor MS, et al. Optimized CRISPR-mediated gene knockin reveals FOXP3-independent maintenance of human Treg identity. *Cell Rep* (2021) 33(6):109494. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109494
154. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* (2007) 19:345–54. doi: 10.1093/INTIMM/DXM014
155. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the foxp3 transcription factor. *Immunity* (2009) 30:899–911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
156. Heath JK, White SJ, Johnstone CN, Catimel B, Simpson RJ, Moritz RL, et al. The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1997) 21:94(2):469–74. doi: 10.1073/pnas.94.2.469
157. Opstelten R, de Kivit S, Slot MC, van den Biggelaar M, Iwaszkiewicz-Grzes J, Gliwinski M, et al. GPA33: A marker to identify stable human regulatory T cells. *J Immunol* (2020) 204:3139–48. doi: 10.4049/jimmunol.1901250
158. Cuadrado E, van den Biggelaar M, de Kivit S, yen CY, Slot M, Doulal I, et al. Proteomic analyses of human regulatory T cells reveal adaptations in signaling pathways that protect cellular identity. *Immunity* (2018) 48:1046–1059.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.008
159. Sato K, Yamashita-Kanamaru Y, Abe F, Murata R, Nakamura-Shinya Y, Kanamaru K, et al. DNAM-1 regulates Foxp3 expression in regulatory T cells by interfering with TIGIT under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2021) 25:118(21):e2021309118. doi: 10.1073/pnas.2021309118
160. Fuhrman CA, Yeh W-I, Seay HR, Saikumar Lakshmi P, Chopra G, Zhang L, et al. Divergent phenotypes of human regulatory T cells expressing the receptors TIGIT and CD226. *J Immunol* (2015) 195:145–55. doi: 10.4049/jimmunol.1402381
161. Ziegler SF. FOXP3: Not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* (2007) 37:21–3. doi: 10.1002/eji.200636929
162. Lam AJ, Uday P, Gillies JK, Levings MK. Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability. *Eur J Immunol* (2022) 52:75–84. doi: 10.1002/eji.202149318
163. Crusio WE, Dong H, Radeke H, Rezaei N, Steinlein O, Xiao J. T regulatory cells in human health and diseases, advances in experimental medicine and biology. Amsterdam, Netherlands: Springer (2022). Available at: <http://www.springer.com/series/5584>.
164. El-Asady R, Yuan R, Liu K, Wang D, Gress RE, Lucas PJ, et al. TGF- $\beta$ -dependent CD103 expression by CD8+ T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med* (2005) 201:1647–57. doi: 10.1084/JEM.20041044
165. Myers L, Croft M, Kwon BS, Mittler RS, Vella AT. Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN- $\gamma$  to elaborate TGF- $\beta$ -based suppression. *J Immunol* (2005) 174:7625–32. doi: 10.4049/JIMMUNOL.174.12.7625
166. Ho J, Kurtz CC, Naganuma M, Ernst PB, Cominelli F, Rivera-Nieves J. A CD8 +/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol* (2008) 180:2573–80. doi: 10.4049/JIMMUNOL.180.4.2573
167. Sun J, Yang Y, Huo X, Zhu B, Li Z, Jiang X, et al. Efficient therapeutic function and mechanisms of human polyclonal CD8 + CD103 + Foxp3 + Regulatory T cells on collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol Res* (2019) 2019:8575407. doi: 10.1155/2019/8575407
168. Suciu-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol* (2003) 11:235–44. doi: 10.1016/S0966-3274(03)00052-2
169. Suzuki H, Shi Z, Okuno Y, Isobe K. Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells. *Hum Immunol* (2008) 69:751–4. doi: 10.1016/j.humimm.2008.08.285
170. Dai H, Wan N, Zhang S, Moore Y, Wan F, Dai Z. Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. *J Immunol* (2010) 185:803–7. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1000661
171. Lerret NM, Houlihan JL, Kheradmand T, Pothoven KL, Zhang ZJ, Luo X. Donor-specific CD8+Foxp3+ T cells protect skin allografts and facilitate induction of conventional CD4+Foxp3 + regulatory T cells. *Am J Transplant* (2012) 12:2335–47. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04120.x
172. Simon S, Labarriere N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology* (2017) 7(1):e1364828. doi: 10.1080/2162402X.2017.1364828
173. Miller WP, Srinivasan S, Panoskaltis-Mortari A, Singh K, Sen S, Hamby K, et al. GVHD after haploidentical transplantation: a novel, MHC-defined rhesus macaque model identifies CD28- CD8+ T cells as a reservoir of breakthrough T-cell proliferation during costimulation blockade and sirolimus-based immunosuppression. *Blood* (2010) 116:5403–18. doi: 10.1182/BLOOD-2010-06-289272
174. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Plantone D, Patanella AK, Tonalì PA, et al. CD8 +Foxp3+ T cells in peripheral blood of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Hum Immunol* (2010) 71:437–41. doi: 10.1016/j.humimm.2010.01.024
175. Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, et al. Alloantigen specific CD8+ CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* (2004) 16:1055–68. doi: 10.1093/intimm/dxh107
176. Korecka-Polak A, Duszota A, Wierzbicki P, Niemczyk M, Bocian K, Kłosowska D, et al. Human peripheral blood CD8+CD28-t cells of renal allograft recipients do not express FOXP3 protein. *Transplant Proc* (2011) 43(8):2917–21. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.08.016
177. Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, Rossi P, Manavalan JS, Kim-Schulze S, et al. Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4 +CD25 + regulatory T cells and antigen specific CD4 +CD25 + and CD8 +CD28 - T suppressor cells. *Hum Immunol* (2004) 65:1297–306. doi: 10.1016/j.humimm.2004.09.004
178. Baeten D, Louis S, Braud C, Braudeau C, Ballet C, Moizant F, et al. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* (2006) 17(1):294–304. doi: 10.1681/ASN.2005020178
179. Li J, Zaslavsky M, Su Y, Guo J, Sikora MJ, van Unen V, et al. KIR+CD8+ T cells suppress pathogenic T cells and are active in autoimmune diseases and COVID-19. *Science* (2022) 376(6590):eabi9591. doi: 10.1126/science.abi9591
180. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ Immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* (1998) 188:287–96. doi: 10.1084/JEM.188.2.287
181. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* (2005) 175:8051–9. doi: 10.4049/JIMMUNOL.175.12.8051
182. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clin Immunol* (2005) 115:10–8. doi: 10.1016/J.CLIM.2005.02.018
183. Allan SE, Alstad AN, Merindol N, Crellin NK, Amendola M, Bacchetta R, et al. Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3. *Mol Ther* (2008) 16:194–202. doi: 10.1038/sj.mt.6300341
184. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25- T cells by CD4+Foxp3+ Regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF- $\beta$ , and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* (2007) 179:3578–87. doi: 10.4049/JIMMUNOL.179.6.3578
185. BD Life Sciences. *Sorting and Downstream Functional Assessment of Regulatory T Cells Isolating live cells with the BD FACSMelody TM cell sorter*. Available at: <https://>

[www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD-FACSMelody-Sorting-Downstream-Assessment-Regulatory-TCells-DS.pdf](https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD-FACSMelody-Sorting-Downstream-Assessment-Regulatory-TCells-DS.pdf).

186. Crome SQ, Clive B, Wang AY, Kang CY, Chow V, Yu J, et al. Inflammatory effects of ex vivo human th17 cells are suppressed by regulatory T cells. *J Immunol* (2010) 185:3199–208. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1000557
187. Walker JM. *Methods in molecular biology*. New York City, USA: Springer (2013).
188. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* (2009) 21:1105–11. doi: 10.1093/INTIMM/DXP095
189. Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4 + CD25 + T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* (2001) 31(4):1122–31. doi: 10.1002/1521-4141(200104)31:4<1122::aid-immu1122>3.0.co;2-p
190. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* (2001) 167:1245–53. doi: 10.4049/JIMMUNOL.167.3.1245
191. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* (2007) 5(2):e38. doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0050038
192. Janson PCJ, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One* (2008) 3:e1612. doi: 10.1371/journal.pone.0001612

## Publicaciones en revistas científicas

1. Kennedy-Batalla R\*, **Acevedo D\***, Luo Y, Esteve-Solé A, Vlagea A, Correa-Rocha R, Seoane-Reula ME\*, Alsina L\*. "**Treg in inborn errors of immunity: gaps, knowns and future perspectives**", *Front Immunol.* 2024 Jan 8;14:1278759. doi: 10.3389/fimmu.2023.1278759. eCollection 2023. \*Misma contribución.

Contribución: Primer autor, conceptualización, investigación, software, metodología, escritura del manuscrito original, edición y revisión.

2. Luo Y, **Acevedo D**, Vlagea A, Codina A, García-García A, Deyà-Martínez A, Martí-Castellote C, Esteve-Solé A\*, Alsina L\*. "**Changes in Treg and Breg cells in a healthy pediatric population**". *Front Immunol.* 2023 Nov 21;14:1283981. doi:10.3389/fimmu.2023.1283981. \*Misma contribución.

Contribución: Segundo autor, redacción del borrador original, análisis formal, metodología, visualización.

3. Luo Y, **Acevedo D**, Baños N, Pluma A, Castellanos-Moreira R, Moreno E, Rodríguez-García S, Deyà-Martínez A, García-García A, Quesada-Masachs E, Torres M, Casellas M, Grados D, Martí-Castellote C, Antón J, Vlagea A, Juan M, Esteve-Solé A\*, Alsina L\*. "**Expected impact of immunomodulatory agents during pregnancy: A newborn's perspective**". *Pediatr Allergy Immunol.* 2023 Feb;34(2):e13911. doi: 10.1111/pai.13911. \*Misma contribución.

Contribución: Segundo autor, redacción del borrador original, visualización.

## Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales

1. **Acevedo D**, Coloma J, Luo Y, Vlagea A, Martí-Castellote C, Esteve-Solé A\*, Alsina L\*. *Impact of commonly used immunosuppressants on Treg phenotype and function.*

Congreso: 21th Biennial Meeting of European Society For Immunodeficiencies (ESID) (Marsella, 2024).

2. **Acevedo D**, Coloma J, Luo Y, Vlagea A, Martí-Castellote C, Esteve-Solé A\*, Alsina L\*. *Impact of commonly used immunosuppressants on Treg phenotype and function.*

Congreso: 7th European Congress of Immunology (Dublin, 2024).

3. **Acevedo D**, Luo Y, Vlagea A, Esteve-Solé A\*, Alsina L\*. *Effects of Cyclosporin A on regulatory function of Treg cells in vitro.*

Congreso: XVII Congress SCI (Cataluña, 2023).