



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

REPORTE FINAL DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE CELULAS T 1
(TCF1) EN EL SÍNDROME DE SJOGREN PRIMARIO
(SSp) Y SECUNDARIO (SSs)**

SEDE:

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**

MEDICO PASANTE DE SERVICIO SOCIAL:

ABRAHAM ROMERO BELTRÁN

ASESOR EXTERNO:

DRA. GABRIELA COLUMBA FONSECA CAMARILLO

ASESOR INTERNO:

DR. RAFAEL BOJALIL PARRA

PERIODO:

01 FEBRERO 2024 – 31 ENERO 2025

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE CELULAS T 1 (TCF1) EN EL SÍNDROME DE SJOGREN PRIMARIO (SSp) Y SECUNDARIO (SSs)

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades inflamatorias inmunomediadas son un conjunto de entidades altamente discapacitantes que comparten patrones inflamatorios y desregulación del sistema inmune. Son enfermedades crónicas cuya causa aún es desconocida, se caracterizan por ser potencialmente graves y con una elevada morbilidad que afecta mayoritariamente a adultos jóvenes, provocando un alto grado de discapacidad, y reduciendo la calidad de vida de quien las padece. (1)

Cambios en la respuesta inflamatoria de corta a larga duración pueden causar un colapso de la tolerancia inmunológica y provocar importantes alteraciones en todos los tejidos y órganos (2). Los linfocitos T CD4+ autorreactivos son fundamentales en el desarrollo y progresión de las enfermedades autoinmunes. La pérdida de la tolerancia inmunológica es un componente central dentro de los mecanismos que llevan al desarrollo de autoinmunidad. Los mecanismos de tolerancia central y periférica eliminan o inactivan clonas de linfocitos T autorreactivos. Estos mecanismos son imperfectos y, en nuestro medio, se ha detectado un aumento en la incidencia y prevalencia de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple (EM), psoriasis, diabetes tipo 1 (T1D), artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome de Sjögren (SS), miopatías inflamatorias, etc. [3]. Por lo tanto, la comprensión de los factores que regulan la respuesta inflamatoria mediada por las células T es cada vez más importante.

Estudios recientes han demostrado el papel del gen TCF7/TCF1 en el desarrollo de autoinmunidad, esto a través de estudios de asociación del genoma completo (GWAS), donde se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) C883A en la región codificante del gen TCF7/TCF1 y múltiples SNPs dentro de la región no codificante del locus del gen TCF7 asociadas con riesgo incrementado de desarrollar T1D y EM [4,5]

El factor de células T1, TCF1 (TCF es codificado por el gen Tcf7) es un factor de transcripción clave en la vía de señalización WNT canónica. En linfocitos T, se sabe que juega un papel crucial en el inicio de un programa de transcripción de genes de la vía de

señalización NOTCH corriente abajo [6]. En consecuencia, la eliminación de la línea germinal del gen *Tcf7* en ratones (KO) muestran un desarrollo deteriorado de linfocitos T.

En linfocitos T activados se sabe que TCF1 es fundamental para la generación de la respuesta de memoria de células T CD8⁺ (5). Estudios recientes han reportado nuevas funciones de TCF1 en la activación de linfocitos T periféricos en procesos autoinmunes, cáncer e infección viral crónica.

En linajes de linfocitos T CD8⁺, se requiere del factor de transcripción TCF1 para la autorrenovación de linajes *stem* y para la diferenciación de las células T foliculares y células T foliculares reguladoras. Recientemente, se ha identificado a TCF1 como el primer factor de transcripción que modifica directamente la acetilación de histonas, con la capacidad de unir la regulación transcripcional y epigenética.

El síndrome de Sjögren (SS) es una patología reumática inmunomediada compleja que se caracteriza por la inflamación crónica de las glándulas exocrinas y la presencia de autoanticuerpos contra las partículas de ribonucleoproteína SSA/Ro y SSB/La.1 Las principales dianas de infiltrado inflamatorio son las glándulas lagrimales y salivales mediada por células T, con una disfunción glandular resultante. (6)

El SS se caracteriza por queratoconjuntivitis seca, xerostomía comúnmente asociada con agrandamiento de las glándulas salivales. Se lo conoce como síndrome de Sjögren primario cuando no existe asociación a otra enfermedad autoinmune, por el contrario, el síndrome de Sjögren secundario se presenta en pacientes con enfermedades del tejido conectivo, como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, poliartritis nodosa, polimiositis y esclerosis sistémica. El SS también se ha asociado con la enfermedad de injerto contra huésped crónica después del trasplante alogénico de médula ósea, el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), la infección por hepatitis C (VHC), la cirrosis biliar crónica, los síndromes neoplásicos y mieloplásicos, la fibromialgia y el síndrome de fatiga crónica. (7)

Actualmente, la biopsia de la glándula salival menor sigue siendo el método preferido para diagnosticar el componente glandular y explorar la actividad de la enfermedad autoinmune dentro del órgano diana. (8) La biopsia es esencial en la clasificación del síndrome de Sjögren y en la estratificación de pacientes para el diagnóstico y realización de ensayos clínicos.

Basados en el análisis de tejido de pacientes con SS se ha propuesto que el daño tisular de las glándulas exocrinas en el SS se debe a una respuesta de inmunidad innata seguida de una respuesta inmunitaria adaptativa. (7) Aunque la composición del infiltrado inflamatorio es complejo y difícil de describir con precisión, un gran número de estudios han caracterizado esta infiltración focal de las glándulas exocrinas y consiste en una infiltración de células mononucleares principalmente. La proporción de células T reguladoras foliculares (Trf) con respecto a las células T auxiliares foliculares (Thf) marca la formación de estructuras linfoides ectópicas y las Tfh⁺ indican actividad de la enfermedad. (10)

El presente protocolo busca identificar la expresión del TCF1 en el síndrome de Sjogren primario y secundario mediante su expresión en células mononucleares y linfocitos T CD8⁺ en glándulas de sujetos con SSp y SSs y controles, lo que permitirá abrir una nueva vertiente en la comprensión del fenómeno inflamatorio y auto-reactivo en estas patologías.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

TCF1 tiene el potencial de convertirse en un importante biomarcador clínico para evaluar el pronóstico de la inmunoterapia tumoral y el curso clínico en diversas enfermedades autoinmunes. Actualmente se desconoce si los polimorfismos previamente descritos afectan a la expresión y función de TCF7/TCF1 y su papel en otras enfermedades autoinmunes.

En enfermedades autoinmunes como el SS, que se caracteriza por infiltración linfocitaria de las glándulas salivales y lagrimales, se ha descrito la presencia de células T CD4⁺ (45-50%), células T CD8⁺ (15-20%), células B (10-20%) y, en menor proporción, células plasmáticas y macrófagos en los infiltrados de glándulas salivales. La proporción de células T, células B, macrófagos y células dendríticas varía según la gravedad de la lesión. Así, las células T predominan en las lesiones leves, mientras que las células B predominan en las graves (1), se desconoce el papel del factor TCF1 en la regulación de la respuesta Th1 y Th2 en el inicio, perpetuación y progresión de la enfermedad (2-4)

Este factor TCF1 puede representar una nueva estrategia en el tratamiento del SS y conocer cuál es la participación conjunta es fundamental para la investigación relacionada con el esclarecimiento del origen y desarrollo de enfermedades inmunomediadas.

HIPÓTESIS

La regulación de la síntesis tisular de TCF1 está disminuida en pacientes con SS, lo cual favorece la diferenciación de linajes de células CD8+, mayor respuesta inflamatoria y la expansión de clonas autorreactivas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del Factor de células T1 (TCF1) en biopsias de glándulas salivales menores de pacientes con Síndrome de Sjögren primario (pSS) y secundario (sSS) y su co-localización con la presencia de subpoblaciones de células T efectoras, CD4+, CD8+ en comparación con tejido de pacientes con enfermedades del tejido conectivo sin SS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detección *in situ* por IHQ de TCF1 en subpoblaciones inmunes en tejido de glándula salival de pacientes y controles.
- Analizar la correlación de aquellas variables asociadas al curso clínico del Síndrome de Sjögren y fenotipo de la enfermedad que sean de relevancia clínica y biológica.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio: Retrospectivo

Tipo de investigación: Descriptivo y experimental

Tipo de estudio: Casos y controles

Diseño del estudio

Se realizará un estudio de casos y controles que incluirá un total de 40 pacientes con SS (20 pacientes con SS primario y 20 pacientes con SS secundario), los cuales se compararán con un grupo control de 40 pacientes sin SS. Se emplearán bloques de parafina de biopsias de glándula salival menor que serán obtenidas del departamento de patología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. El diagnóstico y evaluación de la actividad de la enfermedad en tejido glandular se basará y confirmará por criterios histopatológicos.

No se requiere la solicitud de estudios de laboratorio o gabinete.

El departamento de Inmunología es el patrocinador del estudio.

Descripción de la población

Población objetivo: Bloques de parafina con muestras de tejido de glándula salival menor de pacientes con Síndrome de Sjögren primario y secundario.

Población elegible: Pacientes con diagnóstico confirmado por histopatología de SSp o SSs, de cualquier edad y cualquier género.

Criterios de inclusión: Pacientes con diagnóstico confirmado por histopatología de SSp o SSs, de cualquier edad y cualquier género.

Criterios de exclusión: Pacientes con diagnóstico de algún tipo de cáncer o de infección crónica por VHB y VHC.

Criterios de eliminación: Bloques de parafina con tejido no viable dañado o quemado.

Tamaño Muestral

Tomando en consideración que la expresión génica de TCF1 en glándula salival es de RPKM 0.357 ± 0.175 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6932>) y los pacientes con SS deberían tener una expresión menor o igual al 60% (de la media de expresión en tejido glandular sano), y estimando un poder estadístico para el cálculo de la muestra, se tomaron las frecuencias de los dos grupos, considerando un poder del 80% y un valor de alfa de 0.05.

Fórmula:

$$n = \left[\frac{Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2 p_2 (1-p_2)} + Z_{1-\beta} \sqrt{p_1 (1-p_1) + p_2 (1-p_2)}}{(p_1 - p_2)^2} \right]^2$$

Nivel de significancia estadística alfa= 0.05

Poder= 0.80

RM= 1.0

p1= .60

p2= .30

Z $1-\alpha/2$ = 1.96

$$Z_{1-\beta} = .8$$

Después de realizar los procedimientos aritméticos correspondientes, se consideró un total de 42 pacientes con SS para demostrar o refutar nuestras hipótesis.

Por lo que se estudiarán un total de 40 pacientes con SS (20 pacientes con SS primario y 20 pacientes con SS secundario), los cuales se compararán con un grupo control de 40 pacientes sin SS.

Sin embargo, es importante mencionar que, en nuestro medio, no se cuenta con registros de una población total que fundamenten el número de muestra requerido.

Instrumentos, medición, validez y confianza, codificación y archivo de datos.

La recopilación de los datos clínicos (Historia familiar de alguna enfermedad autoinmune, enfermedades concomitantes, amigdalectomía, antecedente de dermatitis atópica, rinitis alérgica o asma, tratamiento crónico con año de inicio y término y presencia de anticuerpos: antinucleares, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB y factor reumatoide) se realizará a partir del número de la biopsia y el número de registro del paciente.

A fin de identificar las células que expresan TCF1, se realizarán cortes de tejido embebido en parafina de 4- μ m de espesor, los cuales se colocarán en un portaobjetos electrocargados. Las laminillas se desparafinarán durante 45 min a 54°C. Esta técnica de desparafinado ya ha sido previamente estandarizada y asegura que se eliminen los restos de cera que con temperaturas bajas se cristalizan y forman sedimentos y se ha demostrado que este método funciona mejor, no sólo para amplificación por PCR de fragmentos de tamaños hasta 500 pb sino es un método rápido, simple y económico, ideal para ser utilizado en el manejo de gran cantidad de muestras (11-14).

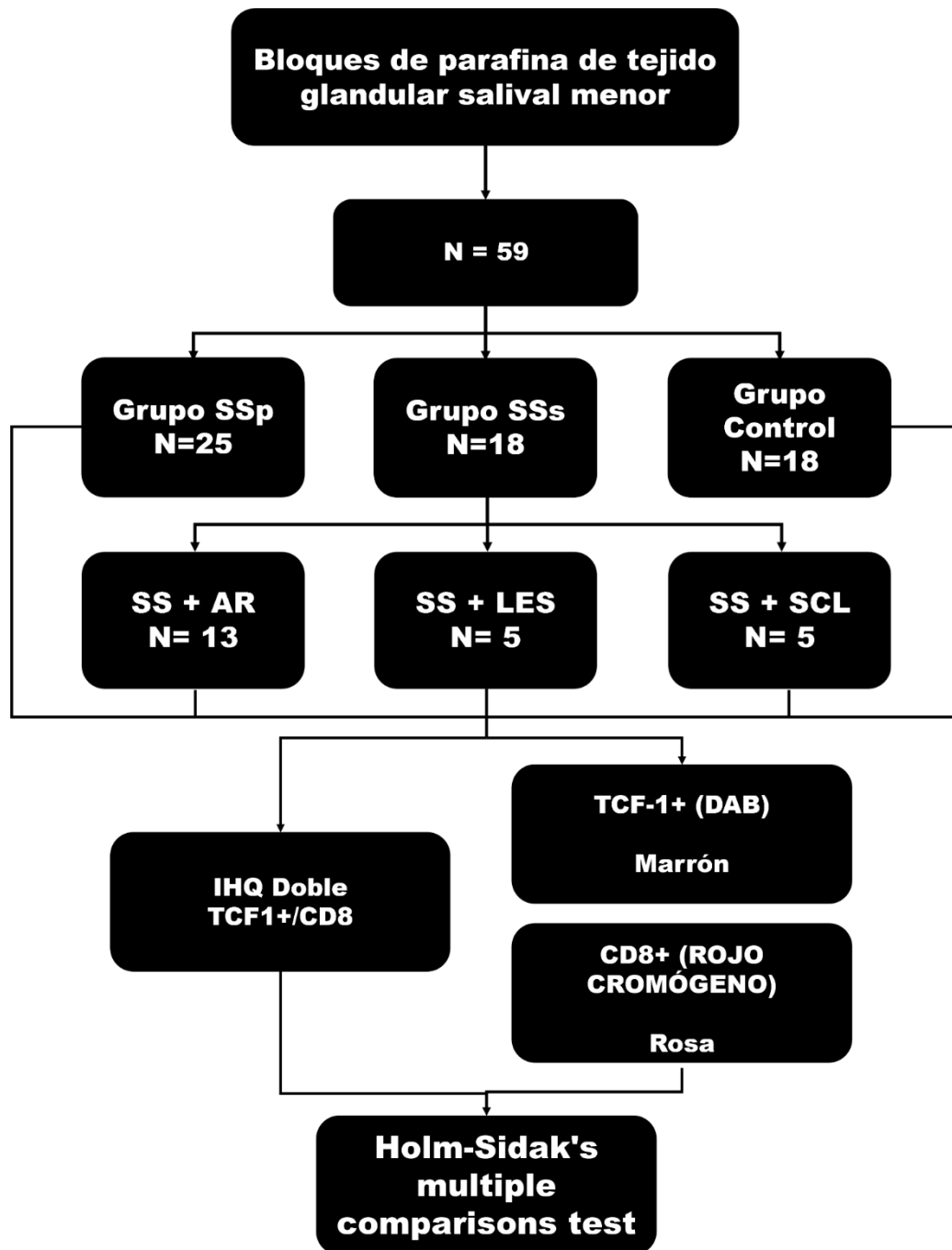
El tejido se hidratará con xileno, alcoholes al 100%, 96% y 50% y agua destilada. Se realizará una recuperación antigénica enzimática durante 1.5-5 min (antigen retrieval ADI-950-280-0015 EnzoLife Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA). Posteriormente, las laminillas se incuban con una solución de H₂O₂ al 3 % en metanol absoluto (1:9 vol/vol) durante 20 min, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena, la pseudoperoxidasa y la fosfatasa alcalina. La tinción inespecífica se evitará incubando los tejidos con el bloqueador de fondo IHC (Enzo Life Sciences) por 20 min. Los tejidos se incubarán durante 10 min a temperatura

ambiente con un anticuerpo policlonal de cabra anti-CD4+ humano, anti-CD8+ humano, anti-CD16 de ratón, anti-CD123 de conejo, anti- TCF1 de humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,

EE.UU.) a una concentración de 10 µg/ml. La unión del anticuerpo al antígeno se identificará mediante la incubación por 10 min con un polímero biotinado anti-IgG de cabra, ratón o conejo (LSAB System-HRP, Dako) y después con estreptavidina-peroxidasa por 10 min más. Posteriormente, la reacción se revelará con 3,3'-diaminobencidina (DAB) (SIGMA-Aldrich) durante 10 min.

Las secciones se contra teñirán con hematoxilina, y contrastarán con una solución de hidróxido de amonio 37 mmol/L, se dejarán secar a temperatura ambiente y se montarán en resina. Todas las células teñidas independientemente de la intensidad de la tinción se evaluarán mediante la estimación del porcentaje relativo en relación con las negativas en cuatro campos al azar ($\times 320$) en cada tejido. Los resultados se expresarán como la media \pm error estándar de la media (SEM) de las células. Las tinciones de control negativo se realizarán con suero humano normal diluido 1: 100, en lugar del anticuerpo primario, y el reactivo de control universal negativo diseñado específicamente para funcionar con anticuerpos de conejo, ratón y cabra (reactivo de control negativo universal IHC, Enzo Life Sciences). El blanco reactivo se incubará con solución salina de fosfato y albúmina de huevo (SIGMA-Aldrich) en lugar del anticuerpo primario. Todos los controles excluirán la tinción inespecífica o las actividades enzimáticas endógenas.

FIGURA 1. Resumen de los grupos poblacionales estudiados



RESULTADOS

La proporción de sexo femenino en la población estudiada fue mayor en comparación con el sexo masculino, representados por el 93.22% y 6.78% respectivamente. Esta mayoría de sexo femenino se presentaron en los distintos grupos estudiados. La edad media de la población

fue de 48.1 años y encontrándose en un intervalo de 37 a 54 años. El grupo con población mas joven fue el grupo de SS + Lupus Eritematoso Sistémico y el de población mas grande el de SSp.

Los síntomas orales fueron más frecuentes que los síntomas oculares en todos los grupos a excepción del grupo de SS + AR donde ambas sintomatologías las presentaron el 75% del grupo. El grupo con mayor sintomatología ocular fue el grupo de SS + AR con síntomas en el 84% de esta población. Así mismo, el grupo con Artritis Reumatoide también presentó más síntomas oculares en comparación con los otros grupos en este estudio.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de la población en estudio.

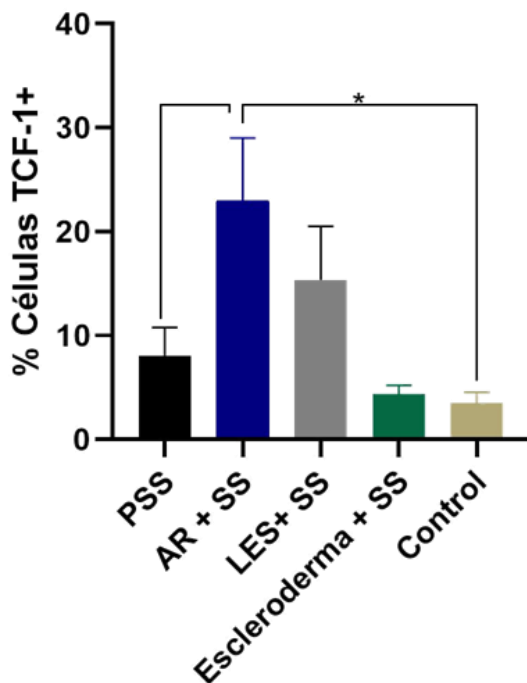
Variable	N=59	Síndrome de Sjogren primario (SSp) N=25	Síndrome de Sjogren secundario (SSs)			Grupo control N=16
			SS+ AR N=8	SS + LES N=5	SS + SCL N=5	
Sexo						
Femenino	55 (93.2%)	22 (88%)	8 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	15 (93.7%)
Masculino	4 (6.8%)	3 (22%)	0	0	0	1 (6.3%)
Edad (media)	48.1	53.4	45.7	37.9	46.4	44.6
Sintomatología						
Síntomas oculares	41 (69.4%)	21 (84%)	6 (75%)	3 (60%)	3 (60%)	5 (31.2%)
Síntomas orales	43 (72.8%)	23 (92%)	6 (75%)	4 (80%)	3 (60%)	7 (43.7%)
Prueba de Schimer (+)	30 (50.8%)	17 (68%)	3 (37.5%)	2 (40%)	2 (40%)	6 (37.5%)
Tinción fluoresceína (+)	33 (55.9)	14 (56%)	6 (75%)	0	4 (80%)	9 (56.2%)
Anticuerpos						
Anti Ro	46 (77.9%)	13 (52%)	2 (25%)	3 (60%)	2 (40%)	6 (37.5%)
Anti La	23 (39.9%)	15 (60%)	1 (12.5%)	2 (40%)	1 (20%)	4 (25%)

En la población total estudiada se registró un mayor número de resultados positivos a la producción de anticuerpos Anti-Ro que Anti-La con un 77.9% y 38.9% respectivamente. Esta misma tendencia se presentó en la mayoría de los grupos. En el caso del grupo de Síndrome de Sjogren primario, se presentaron más resultados de Anti-La positivos con un 60% en

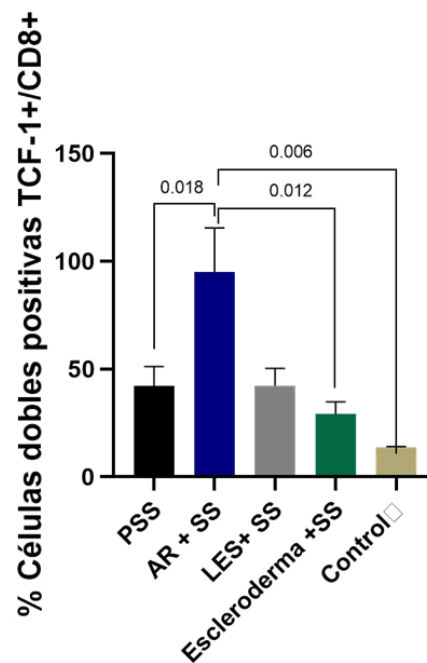
comparación con los Anti-Ro los cuales fueron positivos en el 52% de este grupo. Las características demográficas y clínicas de la población en estudio se desglosan en la Tabla 1.

Los resultados porcentuales de las células positivas a TCF1+ se muestran en la gráfica 1. Se demostró una mayor expresión de TCF1+ en el grupo de SSs asociado a artritis reumatoide, mostrando diferencias significativas al compararlos con el grupo de SSp ($p=0.006$) y controles ($p=0.001$). Las células representativas de estos resultados son células mononucleares que expresaban TCF1+.

Gráfica 1. Porcentajes de células positivas a TCF1+.



Gráfica 2. Porcentajes de células doble positivas a CD8+/TCF1+.



Similar a la tendencia que mostraron las células TCF1+, la mostraron las células doble positivas a CD8+/TCF1+. Las células representativas de estas tinciones fueron linfocitos CD8+. El grupo con mayor número de células CD8+/TCF1+ fue el grupo de SSs con artritis reumatoide, seguidos por el grupo de SSp y SSs+LES mostrando significancia estadística (0.018). Al comparar los bloques de parafina y conteos del grupo de SSs+AR con controles

y SSs+SCL fue aún mas evidente el menor número de células doble positivos en estos últimos dos grupos (Figura 2) mostrando diferencias significativas ($p=0.006$; $p=0.012$).

DISCUSIÓN

De acuerdo a la epidemiología actual del síndrome de Sjogren, el sexo con mayor afección es el femenino; esto se mantiene en nuestro estudio, al comprender un 93.2% de la población estudiada. La frecuencia de los síntomas oculares y orales varían según diversos estudios, sin embargo, al igual que en la población de este estudio se mantienen por encima del 50% de los casos y alcanzan hasta el 90%. (16)

La deficiencia en la expresión de TCF1 en células T reguladoras promueven vías de señalización alternas, mostrando activación y adquisición de células Th17, lo que afecta la regulación de la inflamación y propicia la polarización de las células T cooperativas. (17) Se ha demostrado que la expresión del TCF1 promueve la autorenovación de linajes específicos de linfocitos T, como los CD8+ similares a *stem* y los CD4+. Los linfocitos T CD4+ ajustan la expresión de TCF1+ para mantener su función y aumentar su vida media ante la exposición antigénica lo que promueve la supervivencia de células T auto-reactivas y preservan su función a largo plazo (18).

Experimentos en tejidos de enfermedades de carácter autoinmune como diabetes tipo 1, encefalomiелitis autoinmune y CUCI muestran mayor expresión de TCF-1 en células CD8+ y CD4+ en tejido con mayor inflamación en comparación con tejido sin inflamación. (17)

Existe mayor mayor expresión de TCF1 en células mononucleares en los pacientes con síndrome de Sjogren asociado a artritis reumatoide. Esta misma tendencia se muestra en células TCF1+/CD8+, denotando mayor expresión en pacientes con mayor grado de inflamación. Los pacientes con SSs asociado a AR presentan cuadros mas severos con inflamación más exacerbada. El proceso inflamatorio en el que se involucra TCF1 puede estar desregulado. Por un lado, su baja expresión o inhibición promueve aberraciones en la función inmunosupresora de las células Th17 aumentando su potencial inflamatorio mientras que una expresión aumentada en células T CD8+ auto-reactivas preserva la reacción ,inflamatoria autoinmune. (17,18)

CONCLUSION

La comprensión de los componentes involucrados en el desarrollo de autoinmunidad es imprescindible para el esclarecimiento de la fisiopatologías de diversas enfermedades inflamatorias inmunomediada de las cuales no se conocen con exactitud, tal el caso del síndrome de Sjogren. Conocer cuál es la participación de TCF-1 es fundamental para la investigación relacionada con el esclarecimiento del origen y desarrollo de este síndrome. Como se mostró en este estudio, la asociación de artritis reumatoide con promueve mayor infiltrado inflamatorio con altas expresiones de TCF1. La asociación entre la gravedad de la enfermedad y la histopatología brindaría mayor comprensión sobre el patrón de expresión de TCF1. Las perspectivas a futuro de esta investigación permitirá asociar la gravedad de los distintos casos con la expresión en suero de TCF1 y correlacionar estos datos con los vistos en los cortes histopatológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Panaccione R, Aletaha D, Davis M, Johnson S, Skup M, Garg V. «The risk of developing subsequent immune mediated inflammatory diseases: a retrospective matched cohort study.» 12th ECCO Congress. Barcelona, 2017.
2. Gabriela Fonseca-Camarillo. Immunoregulation: a new therapeutic paradigm in chronic inflammatory diseases. *Rev Mex Enferm Inflam Immunomed.* 2023;3(1):1-7 DOI: 10.24875/IMIDS.M23000029
3. Escobar G, Mangani D, Anderson AC. T cell factor 1: A master regulator of the T cell response in disease. *Sci Immunol.* 2020;5(53):eabb9726. doi:10.1126/sciimmunol.abb9726
4. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013;45(11):1353-1360. doi:10.1038/ng.2770
5. Noble JA, White AM, Lazzeroni LC, et al. A polymorphism in the TCF7 gene, C883A, is associated with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(6):1579-1582. doi:10.2337/diabetes.52.6.1579
6. Brito-Zerón P, Baldini C, Bootsma H, et al. Sjögren syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 7(2): 16047.
7. Jonsson, R. (2022). Disease mechanisms in Sjögren's syndrome: What do we know? *Scandinavian Journal of Immunology*, 95(3), e13145. <https://doi.org/10.1111/sji.13145>
8. Balint, G., Watson Buchanan, W., Kean, C.A. et al. Sjögren's syndrome. *Inflammopharmacol* 32, 37–43 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01222-z>
9. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(1): 9-16.
10. Fonseca VR, Romão VC, Agua-Doce A, et al. The ratio of blood T follicular regulatory cells to T follicular helper cells marks ectopic lymphoid structure formation while activated follicular helper T cells indicate disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70(5): 774-784.
11. Zhao X, Shan Q, Xue HH. TCF1 in T cell immunity: a broadened frontier. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(3):147-157. doi:10.1038/s41577-021-00563-6
12. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Priego-Ranero AA, Zúñiga RB, Martínez-Benítez B, Yamamoto-Furusho JK. AKAP12/Gravin is over-expressed in patients with ulcerative colitis. *Immunol Res.* 2021 Oct;69(5):429-435. doi: 10.1007/s12026-021-09214-3. Epub 2021 Jul 30. PMID: 34327631.
13. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Priego-Ranero AA, Martínez-Benítez B, Barreto-Zúñiga R, Yamamoto-Furusho JK. Expression of TOB/BTG family members in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol.* 2021 Apr;93(4):e13004. doi: 10.1111/sji.13004. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33247598.

14. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Razo-López N, Barreto-Zúñiga R, Martínez-Benítez B, Yamamoto-Furusho JK. Intestinal production of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in patients with ulcerative colitis. *Immunobiology*. 2021 May;226(3):152095. doi: 10.1016/j.imbio.2021.152095. Epub 2021 May 8. PMID: 34000572.
15. Zafra Sierra G, Flórez Vargas O, Onzález Rugeles C. Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo; *UIS* 2004;36:73-79
16. Li, Y., Ramírez-Suástegui, C., Harris, R. *et al.* Stem-like T cells are associated with the pathogenesis of ulcerative colitis in humans. *Nat Immunol* **25**, 1231–1244 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41590-024-01860-7>
17. Aljobaily N, Allard D, Perkins B, Raugh A, Galland T, Jing Y, Stephens WZ, Bettini ML, Hale JS, Bettini M. Autoimmune CD4⁺ T cells fine-tune TCF1 expression to maintain function and survive persistent antigen exposure during diabetes. *Immunity*. 2024 Nov 12;57(11):2583-2596.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2024.09.016.
18. Kratchmarov R, Magun AM, Reiner SL. TCF1 expression marks self-renewing human CD8⁺ T cells. *Blood Adv*. 2018 Jul 24;2(14):1685-1690. doi: 10.1182/bloodadvances.2018016279.