



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE
PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN SOBRENADANTES DE
CULTIVO DE LINFOCITOS T CD8⁺ DE NEONATOS Y
ADULTOS HUMANOS.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
MEDICINA MOLECULAR**

QUE PRESENTA:

L.C XIMENA PÉREZ PACHECO

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MA. ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN

DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

EN COLABORACIÓN:

DRA. MARÍA EUGENIA NUÑEZ VALDÉZ

CUERNAVACA, MORELOS JUNIO DE 2022

Miembros comité tutorial

Dra. Ma. Angélica Santana Calderón

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Dra. María Eugenia Núñez Valdéz

Dr. Joaquín Sánchez Castillo

Dr. Iván Martínez Duncker

Directores de tesis:

Dra. Ma. Angélica Santana Calderón

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Agradecimientos

Este gran logro va dedicado a mi familia, especialmente a mi mamá Verónica y mi hermano Sebastián, por darme siempre todo su amor y apoyo incondicional, por aconsejarme y estar para mí cada que lo necesitaba y en cada paso que doy. A mi abuelo Arturo y mi abuela Luisa, por criarme, educarme y quererme desde que era una niña. A mis tíos y primos, por ser parte de mi crecimiento personal. A mi novio Pavel, por apoyarme, aconsejarme y enseñarme a madurar como persona. A mis perritos, Tommy y Molly, por ser unos miembros más de mi familia, y alegrarme todos los días.

A la Doctora Angélica Santana, porque una vez más me abrió las puertas de su laboratorio, por todas sus enseñanzas, consejos, por guiarme y apoyarme en mi crecimiento profesional y personal. Una vez más, gracias por ser la mejor tutora que pude tener.

A la Doctora Maru, por brindarme todo su apoyo, y una vez más abrirme las puertas de su laboratorio, sus enseñanzas y la confianza de trabajar con su equipo de trabajo.

A mis sinodales y revisores de tesis, Dr. Joaquín, Dr. Duncker, Dra. Maru, Dr. Esquivel, Dra. Santana, Dra. Gaby y Dr. Santa-Olalla, por todo su tiempo invertido en la revisión de mi tesis, por todos sus consejos y enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio, Darely, Linda, Carlos, Ale y Oscar, por toda su ayuda, consejos y por ser unos excelentes compañeros de laboratorio.

A CONACYT, por haber financiado este proyecto. A la facultad de Medicina y al CIDC, a todo el personal académico y administrativo por todo su apoyo.

Índice

Resumen.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Inmunidad innata.....	7
Péptidos Antimicrobianos.....	8
Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.....	9
1.2 Inmunidad Adaptativa.....	10
Linfocitos T Citotóxicos.....	11
Activación de los Linfocitos T.....	13
1.3 TLR 5.....	14
2. Planteamiento del problema.....	15
3. Antecedentes.....	17
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	19
Objetivos particulares.....	20
6. Metodología.....	20
6.1 Purificación de linfocitos T CD8+ vírgenes.....	20
6.2 Estimulación de Linfocitos CD8 vírgenes para la obtención de sobrenadantes.....	21
6.3 Inmunodepleción con perlas magnéticas.....	21
6.4 Cuantificación de proteína.....	22
6.5 Medición de crecimiento bacteriano en presencia de péptidos antimicrobianos.....	22
7. Resultados.....	23
7.1 Purificación de linfocitos T CD8+ de adultos vírgenes.....	23
7.2 Obtención de linfocitos T CD8+ virgenes.....	25
7.3 Purificación de linfocitos T CD8+ de neonatos.....	26
7.4 Estimulación de sobrenadantes de linfocitos T CD8+.....	31
7.5 Inmunodepleción con perlas magneticas.....	31
7.6 Cuantificación de proteína.....	31
7.7 Evaluación del crecimiento de <i>Serratia marcescens</i> en medio RPMI.....	33
7.7 Evaluación del crecimiento de <i>Serratia marcescens</i> con 90 ug/uL de kanamicina.....	34

7.8 Evaluación de la actividad microbica de sobrenadantes depletados de Defensina A y Catepsina G en neonatos y adultos humanos por densidad óptica	37
7.9 Evaluación de la actividad microbica de sobrenadantes depletados de Defensina A y Catepsina G en neonatos y adultos humanos cuenta viable	39
7.10 Expresión de Defensina A y Catepsina G en linfocitos T CD8+ estimulados y no estimulados en neonatos y adultos.	45
8. Discusión	48
9. Conclusión.....	52
10. Referencias.	53

Resumen

El presente trabajo se centra en la evaluación de la actividad microbicida de un péptido antimicrobiano (defensina A) y una proteína (catepsina G) secretadas por los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos.

Es bien sabido las células del sistema inmune innato producen péptidos antimicrobianos, sin embargo, se ha reportado que pueden ser producidos también por los linfocitos. En nuestro laboratorio observamos que genes asociados a péptidos antimicrobianos como defensina A, y una proteasa catepsina G, están expresados en células del sistema inmune adaptativo, y se encuentran sobreexpresados en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos [7].

Trabajos preliminares por la Dra. Darely Gutiérrez y mi propio trabajo de licenciatura, mostraron que efectivamente los sobrenadantes de cultivo de células T CD8⁺ tienen actividad antimicrobiana y que esta actividad se incrementa al activar las células. También observamos que al depletar los sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ de catepsina G y de defensina A, incrementaba el crecimiento bacteriano, aunque no se tuvieron las réplicas necesarias para demostrarlo [tesis licenciatura, Ximena Pérez Pacheco, 2019].

En el presente trabajo, comprobamos una vez mas que los sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ tienen actividad microbicida, ya que retardan el crecimiento de *S. Marcescens*, y esta acción se ve inhibida al depletar las proteínas de interés: Catepsina G y Defensina A. Estos resultados se observaron por medio de D.O y cuenta viable.

Observamos también por citimetría de flujo que la estimulación con CD3-flagelina indujeron la expresión de Catepsina G y Defensina A, en células de adulto. Sin embargo, las células de neonato presentan estas proteínas desde nivel basal.

1. INTRODUCCIÓN

Nuestro organismo diariamente está expuesto a patógenos que pueden infectarlo, sin embargo, el sistema inmune es el encargado de la defensa contra los patógenos y células dañadas en organismos multicelulares. Dicha respuesta se divide en dos, la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune está mediada por las respuestas tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa. Ambas respuestas son encargadas de la defensa contra patógenos en organismos multicelulares. Las respuestas inmunitarias innatas actúan de manera inmediata y están conectadas con las respuestas especializadas de la inmunidad adaptativa, que son capaces de eliminar a los patógenos que se resisten a los mecanismos de la inmunidad innata.

1.1 Inmunidad innata

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos, y está mediada por barreras físicas y químicas y distintos tipos celulares. Las principales células encargadas son los fagocitos: macrófagos, neutrófilos, monocitos y además células linfoides innatas, entre ellas las células Natural Killer, células endoteliales y epiteliales y células dendríticas. Los fagocitos y células NK contienen en su citoplasma gránulos que contienen, entre otros, péptidos antimicrobianos y otras sustancias microbicidas. Los péptidos antimicrobianos tienen un rol importante en la protección contra infecciones

bacterianas y fúngicas [2] y serán mencionados a continuación, ya que son relevantes en esta investigación.

Péptidos Antimicrobianos

La función antimicrobiana de la inmunidad innata está mediada, en parte, por péptidos antimicrobianos, proteínas generadoras de poros e inhibidores de función intracelular con potente actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos, parásitos y algunos virus [3][4].

Existen dos grandes familias de péptidos antimicrobianos, las defensinas y las catelicidinas. Las defensinas, son péptidos típicamente de 18 a 45 aminoácidos de tamaño y son moléculas catiónicas, anfipáticas que son ricas en cisteína. En humanos existen dos tipos de defensinas: α -defensinas, β -defensinas. Las defensinas α 1-4 son producidas principalmente por neutrófilos, sin embargo, las células NK y los macrófagos también pueden producirlas [27].

Las catelicidinas son péptidos lineales de 23 a 27 residuos de aminoácidos y se pliegan en α -hélices anfipáticas [19]. Pertenecen a la familia de péptidos catiónicos que tienen la capacidad de matar bacterias, virus y hongos por medio de la desintegración de la membrana celular de los microorganismos [17]. Son producidas por una enzima llamada elastasa, mediante escisión en un residuo de valina específico [18]. Son atraídos por las cargas negativas de las membranas bacterianas, a diferencia de las membranas humanas que tienen cargas neutras. Al hacer contacto con bicapas lipídicas hidrofóbicas, adoptan

estructuras anfipáticas para que de esta manera puedan interactuar con la membrana de las bacterias.

Por otra parte, no solo los péptidos antimicrobianos tienen actividad microbicida, como se reportó (Perez X., 2019) que existe una proteasa llamada catepsina G que tiene actividad microbicida. Es una serina proteasa que se describió en los granúlos azurofilos de neutrófilos. Además, induce la agregación plaquetaria, la liberación de serotonina y la movilización de calcio [29,30]. La catepsina G tiene actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram⁺ y Gram⁻ [31]. Participa en la destrucción intracelular directa de bacterias fagocitadas en fagolisosomas en combinación con mieloperoxidasa y especies reactivas de oxígeno generadas por el complejo NADPH oxidasa [28].

Además de los inhibidores de crecimiento citados, creemos que existen diferentes proteínas con actividad microbicida en neonatos y adultos humanos que no se han reportado.

Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

La habilidad que tienen algunos péptidos para matar bacterias depende de su capacidad de interactuar con membranas o paredes celulares bacterianas. Al tener una carga neta positiva y una alta proporción de aminoácidos hidrófobos, les permite unirse a las membranas cargadas negativamente de las bacterias.

Al unirse a las superficies polianiónicas de las paredes bacterianas, ya sea por los ácidos teicóicos y lipoteicóicos en los Gram positivos o los lipopolisacáridos en los Gram negativos, entran a la bacteria para romper la membrana o inhibir su función intracelular (Figura 1).

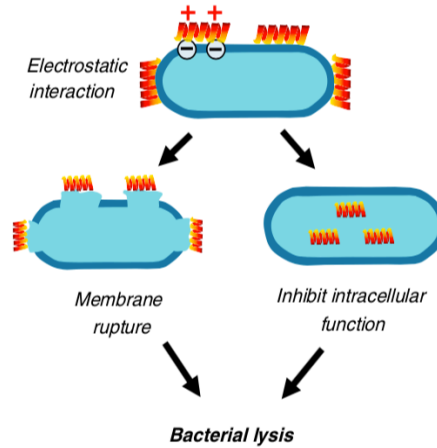


Figura 1. Mecanismos de lisis bacteriana por péptidos antimicrobianos. Los péptidos antimicrobianos se unen a la pared celular de las bacterias por interacciones electrostáticas que provocan la lisis de la bacteria, por medio de la ruptura de la membrana o inhibiendo su función celular.

En el Anexo 1 presentamos una revisión de péptidos antimicrobianos en vertebrados.

1.2 Inmunidad Adaptativa

En ocasiones la inmunidad innata no es suficiente para eliminar al patógeno, y cuando esto sucede, la inmunidad adaptativa se hace presente por medio del reconocimiento de los antígenos del patógeno, con ayuda de las células dendríticas, que son responsables de presentar el antígeno a células del sistema inmune adaptativo.

El sistema inmune adaptativo está conformado por linfocitos B y linfocitos T, es antígeno específico y al reconocer el antígeno genera memoria para incrementar su respuesta en una subsecuente exposición al mismo.

Los linfocitos B son responsables de la producción de anticuerpos, y los linfocitos T se subdividen en dos poblaciones: los linfocitos T cooperadores (CD4+) y los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Existen otras subpoblaciones de linfocitos T, pero las dos poblaciones antes mencionadas son las más abundantes en circulación.

Los linfocitos CD4+ efectores son los encargados de coordinar la respuesta inmune adaptativa a través de su interacción con los macrófagos, linfocitos B, células NK y linfocitos T CD8+, células dendríticas y células inflamatorias por medio de la secreción de citocinas.

Linfocitos T Citotóxicos

Los linfocitos T CD8+ son los encargados de matar a células infectadas por patógenos intracelulares y células tumorales.

Para que estos linfocitos CD8+ lleven a cabo sus mecanismos de citotoxicidad necesitan ser activados por medio del reconocimiento del antígeno por una célula presentadora de antígenos en los nodos linfáticos. Los linfocitos activados salen de los nodos y se dirigen a los sitios de infección, donde su interacción con las células diana, que expresan el mismo antígeno con el que se activaron, lleva a la muerte de las mismas.

Los linfocitos CD8+ matan a células infectadas intracelularmente por medio de dos mecanismos: la muerte celular mediada por las proteínas granzima y perforina, que se encuentran dentro de los gránulos de los linfocitos CD8+, y la muerte celular dependiente del ligando de FAS.

La muerte celular mediada de las proteínas granzima y perforina se lleva a cabo cuando el linfocito T CD8+ interactúa con la célula diana generando una sinapsis inmunológica.

Esto permite que el citoesqueleto del linfocito se reorganice para que los microtúbulos se desplacen hacia la membrana, cerca de la célula diana. De esta manera, con ayuda de los microtúbulos se liberan los gránulos que contienen a granzima y perforina entre ambas células [1].

La perforina se une a los fosfolípidos de la membrana de la célula diana, por medio de un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , se polimeriza y forma poros en la membrana de la célula diana [23]. La granzima es capaz de entrar al citosol de la célula diana a través de los poros formados por la perforina, que además de permitir el paso de granzimas, generan un intercambio de iones provocando un desbalance osmótico en la célula blanco. Una vez que las granzimas se encuentran en el citosol escinden a las caspasas para iniciar la muerte apoptótica de la célula diana [1].

El mecanismo independiente de los gránulos, es por el reconocimiento de complejos protéicos de membrana, entre la célula diana y el linfocito citotóxico. El ligando Fas (FasL), que se encuentra en las células T CD8^+ , y Fas que está expresado en las células blanco. Al interactuar FasL/Fas se activa la vía extrínseca de la apoptosis a través de las caspasas, que darán inicio a la apoptosis.

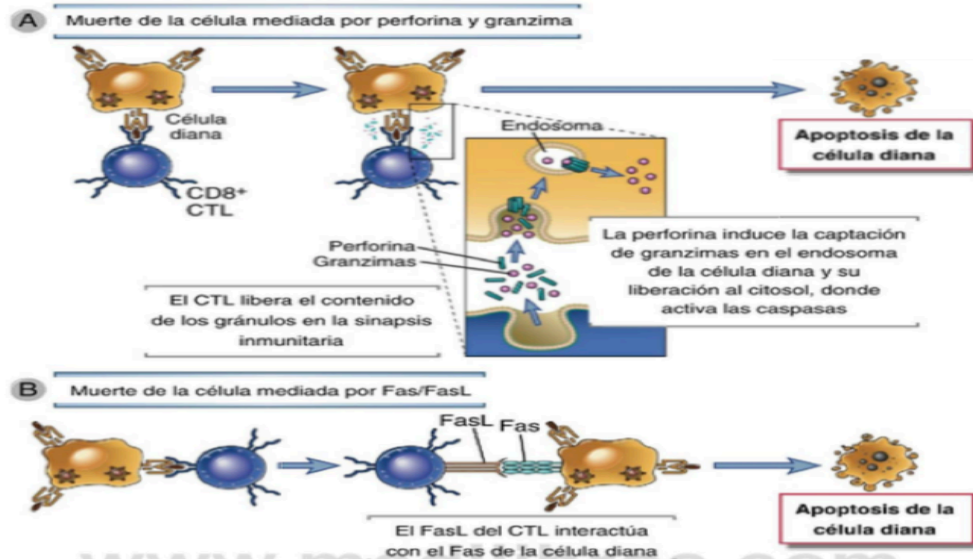


Figura 2. Mecanismos de citotoxicidad de los linfocitos T CD8⁺.

Activación de los Linfocitos T.

Para que las funciones efectoras de los linfocitos sean llevadas a cabo, es necesaria la activación de los mismos.

Los linfocitos T vírgenes se encuentran circulando libremente por los ganglios linfáticos, hasta que reconocen un antígeno al cual son afines, por las células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas.

El reconocimiento del antígeno es la primera señal responsable de la activación de los linfocitos T. Dicho reconocimiento se genera mediante la interacción del receptor de células T (TCR) con el MHC-péptido que se encuentra en la célula presentadora de antígeno [1]. Sin embargo, se requiere más de una señal para activar a los linfocitos T, esta señal la desencadenan los coestimuladores. La vía coestimuladora mejor caracterizada es

aquella donde participan el receptor CD28 que se encuentra en la superficie de los linfocitos T con los coestimuladores B7.1 y B7.2 (o CD80/CD86) que se encuentra en las células presentadoras de antígeno.

Otra señal coestimuladora puede ser generada también por un grupo de receptores de la inmunidad innata llamados Receptores Tipo Toll (TLR), que reconocen ligandos microbianos y activan señales que inducen la energización celular, la entrada a ciclo celular y la transcripción de genes importantes para la estimulación de los linfocitos T directamente o indirectamente a través de las células presentadoras, en las cuales se induce la expresión de moléculas coestimuladoras como B7 [1].

1.3 TLR 5

Algunos TLR se expresan en la superficie celular y reconocen Patrones Moleculares relacionados a Patógenos (PAMPs) que se encuentran extracelularmente, como el caso de TLR5. Otros TLRs se encuentran en las membranas endosómicas para reconocer ácidos nucleicos de antígenos fagocitados.

TLR5 reconoce a flagelina, que es una molécula que se encuentra en los flagelos de las bacterias móviles. La flagelina es un potente activador de la respuesta inmune, su señalización mediante el TLR5 activa la vía de MyD88 para activar respuestas proinflamatorias [11]. Asimismo, se ha reportado el tratamiento de células NK con flagelina, dependiente de TLR5, aumentan la expresión de α -defensinas. Por lo tanto, las células NK reconocen y responden directamente a los componentes patógenos a través de los TLR y secretan α -defensinas como una ruta microbicida de protección contra los microorganismos (Chalifour *et al.*, 2004).

2. Planteamiento del problema

Los neonatos son muy susceptibles a la infección por patógenos intracelulares [21] . Según los datos de la UNICEF en el 2020 la mortalidad neonatal fue de 2,4 millones (Figura 3). Por otra parte, según los datos de la UNICEF en el 2019 una de las razones de muertes en los neonatos es debida a infecciones (Figura 4).

Los neonatos tienen una exposición limitada a antígenos en el útero de la madre y no cuentan con células de memoria, además de que se encuentran en un estado tolerante que los prepara para el paso a un mundo repleto de antígenos [22]. Por esta razón, los neonatos adquieren protección de los organismos por anticuerpos de la madre. Estos anticuerpos ayudan al recién nacido a protegerse contra infecciones con las cuales la madre ha generado una memoria inmunológica. A pesar de que el sistema inmune de un neonato ofrece protección contra enfermedades infecciosas, resultan ser inmunológicamente más susceptibles a éstas en comparación con los adultos.

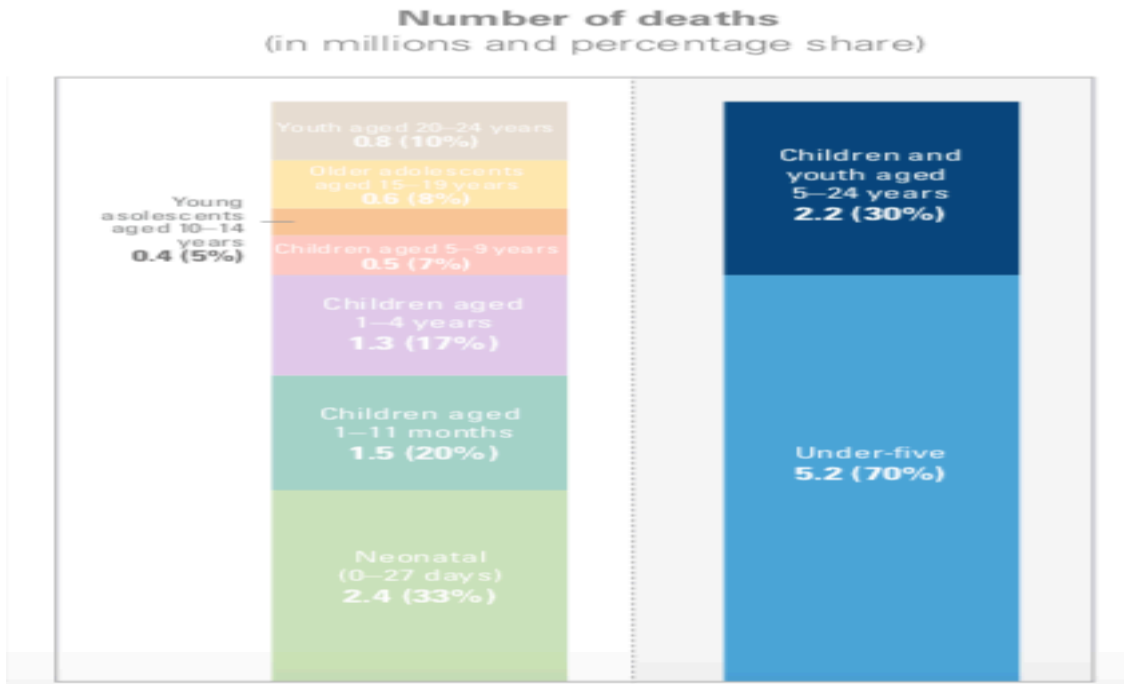


Figura 3. Mortalidad mundial neonatal. UNICEF 2020.
Se ha reportado al rededor de 2.4 millones de muertes neonatales (del día 0 al día 27 de nacidos) en el 2020.

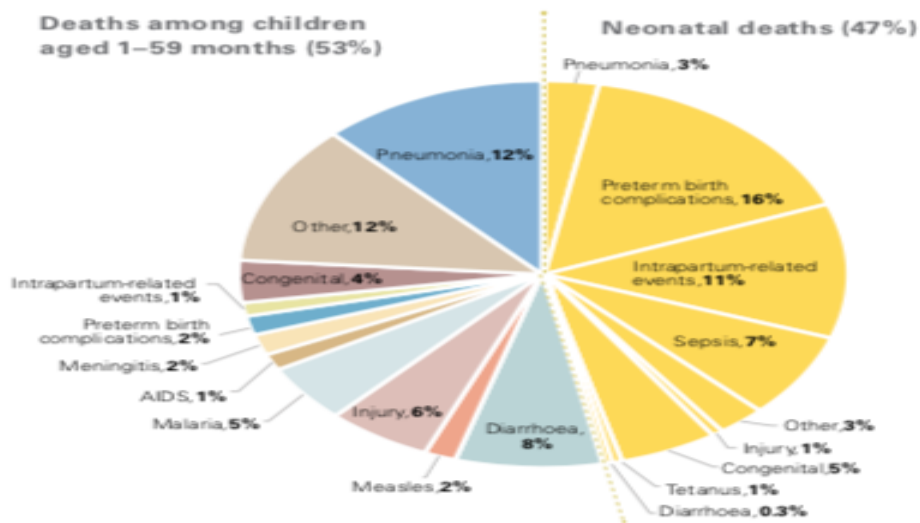


Figura 4. Causas de muerte en niños menores 5 años y neonatos.
El 47% de las muertes en niños menores de 5 años ocurren en la etapa neonatal, siendo las infecciones una de las principales causas de muertes en los neonatos.

3. Antecedentes

En las células T CD8⁺ de neonatos, se encontraron sobre-expresados dos grupos de péptidos/proteína antimicrobianos, DEFA y CTSG [7], lo cual es de suma importancia dado que, hasta antes de este estudio, la literatura solamente había establecido a células del sistema inmune innato como orígenes de dichos péptidos, salvo en algunas condiciones infecciosas en que se han reportado en linfocitos T (ref); lo que indica que los linfocitos T CD8⁺ y, en particular, en neonatos pudieran tener actividad microbicida, directamente.

Para evaluar la actividad microbicida de Defensina A y Catepsina G, se realizaron ensayos de crecimiento microbiano en presencia y ausencia de estas proteínas, donde observamos que los sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ depletados de defensina A muestran una menor actividad antimicrobiana ligeramente más importante en los sobrenadantes de las células neonatos que en las de adultos, lo que sugiere que defensina A es un péptido crucial en la inhibición del crecimiento bacteriano. En el caso de los sobrenadantes depletados de catepsina G se mostró una menor actividad antimicrobiana sólo en los sobrenadantes de adultos [Tesis de Licenciatura. L.C Ximena Pérez Pacheco. 2019] (Figura 4). Sin embargo, esto se hizo sólo una vez, por lo que decidimos extender este reporte a un mayor número de muestras y reportar también el crecimiento microbiano por la evaluación de cuenta viable. También evaluamos la presencia de Defensina A y CTCG en las células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos antes y después de la activación.

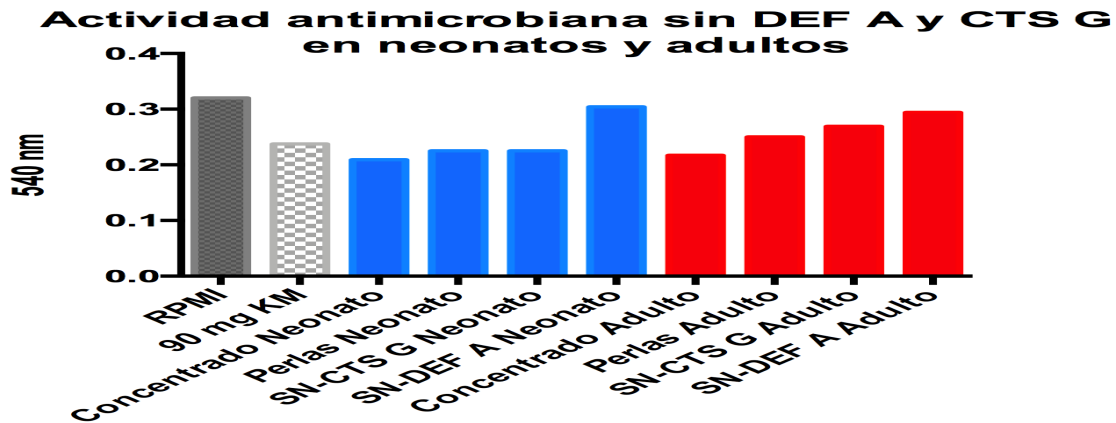


Figura 4. La actividad antimicrobiana disminuye cuando se elimina Defensina A en neonatos y en adultos.

Se evaluó la actividad microbicida de los sobrenadantes depletados y no depletados en neonatos (azul) y adultos (rojo), como control negativo se uso medio RPMI y como control positivo 90 u/uL de kanamicina.

Recientemente se reportó que tres proteínas citotóxicas: granzima B, perforina 1 y granulicina, tienen actividad microbicida. Estas proteínas actúan en conjunto para matar a bacterias intracelulares como *M. Lepae* y *L. Monocytogenes*. Perforina altera la membrana de la célula eucariótica permitiendo la salida que granzima y granulicina. Esta última se une a la membrana bacteriana y la altera para así producir su lisis [26].

Para que se lleven a cabo los mecanismos efectorios de los linfocitos T CD8⁺ son necesarias dos señales: la presentación del antígeno por medio del MHC y las señales coestimuladoras. Como se mencionó anteriormente, una señal coestimuladora puede ser llevada a cabo por la flagelina. Se ha demostrado que la activación en presencia de CD3 y la coestimulación con flagelina en linfocitos T CD4⁺ incrementa la producción de citocinas proinflamatorias a nivel de mRNA y proteína y estas estimulaciones a su vez desencadenan la activación de factores transcripcionales como lo son CREB, AP-1, NFκB [21]. Estas

señales llevan a la activación de los linfocitos y síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Tesis de Maestría. D. C Labastida.C.R.2013). También en el laboratorio se estableció un modelo lógico, validado experimentalmente en el cual se evidencian las interacciones entre las vías de señalización del TCR y la Flagelina (ref)

4. Hipótesis

Los sobrenadantes de cultivo de células T CD8⁺ de neonatos y adultos retardan el crecimiento de *Serratia marcescens* las células T, en particular las células neonatales, expresan Catepsina G y a Defensina A. Debido a esto, esperamos que Catepsina G y Defensina A serán responsables de la actividad antibiótica o bacteriostática de dichos sobrenadantes

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la participación de la Catepsina G y la Defensina A en la actividad microbicida de sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Objetivos particulares

1. Evaluar el papel de la catepsina G en la actividad microbicida de los sobrenadanres de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.
2. Evaluar el papel de la defensina A en la actividad microbicida de los sobrenadanres de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

6. Metodología

6.1 Purificación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes

Se obtuvo sangre periférica de adultos humanos sanos y de cordón umbilical de neonatos por un convenio con el Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea y el Hospital Parres en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Se separaron las células mononucleares por medio un gradiente de ficoll. A continuación, se eliminarán los monocitos por adherencia a plástico. Se utilizará el kit RossetteStep CD8 para purificar a las células T CD8⁺ por selección negativa. Con perlas magnéticas y usando un coctel de anticuerpos anti-CD5RO y anti-CD44, se eliminaron las células de memoria que se encuentran en los linfocitos T CD8⁺ totales de la sangre de adultos. Para mejorar la pureza, en el caso de la sangre de neonatos, se eliminaron células contaminantes usando los anticuerpos B220 y CD11B, mediante esferas magnéticas unidas a proteína A/G. Finalmente, para comprobar la pureza de nuestras células, se analizaron rutinariamente por citometría de flujo.

6.2 Estimulación de Linfocitos CD8 vírgenes para la obtención de sobrenadantes.

Se estimularon células T CD8⁺ vírgenes con un entrecruzamiento de anticuerpos, anti-humanCD3 clona OKT3 a una concentración final de de 1 μ g/ml y flagelina 50 ng/ml. Para realizar el entrecruzamiento de los anticuerpos, se agregó el anticuerpo IgG goat anti-mouse 1 μ g/ml. Cultivaremos las células a 37°C con 5% de CO₂ por 6 horas sin suero ni proteínas. Se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo, que fueron depletados de células por centrifugación. De esta manera se obtuvieron los sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ vírgenes que se mantuvieron congelados a -70°C hasta su uso.

6.3 Inmunodepleción con perlas magnéticas

Se retiraron las proteínas de interés de los sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos, para evaluar se efecto por medio de inmunodepleción con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo. Se utilizaron anticuerpos anti-DefensinaA y anti-catepsinaG.

6.4 Cuantificación de proteína

Para cuantificar la concentración de proteínas en los sobrenadantes obtenidos de los linfocitos T CD8⁺ usamos el kit Qubit ® Protein Assay (de acuerdo con las indicaciones del fabricante).

6.5 Medición de crecimiento bacteriano en presencia de péptidos antimicrobianos

Se incubó a 30°C en agitación una colonia aislada de la cepa sm81 de *S. marcescens* en medio estéril LB por 24 h, para obtener la pastilla con bacterias por medio de centrifugación y agregar 1 mL de medio LB. A continuación, se agregarán los diferentes sobrenadantes de los infocitos T CD8⁺ depletados de las proteínas de interés a las bacterias *S. marcescens* y se incubarán a 30°C por 4 horas, tomando alícuotas cada hora.

Como control de inhibición de crecimiento, se utilizaran diferentes concentraciones de Kanamicina: 50 µg/µL, 70 µg/µL y 90 µg/µL y como control de crecimiento sólo se agregará RMPI estéril.

Se evaluó el crecimiento microbiano por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm en una placa de ELISA estéril.

7. Resultados

7.1 Purificación de linfocitos T CD8+ de adultos vírgenes

Se obtuvo sangre periférica de 9 adultos sanos de 20 y 30 años, de los cuales fueron seleccionados 7 de ellos (Tabla1). Se purificó la sangre periférica para obtener células vírgenes, y usando anticuerpos monoclonales, anti-CD3-PE y anti-CD8-FITC, evaluamos la pureza de la población y se obtuvieron linfocitos T CD8+ totales. En la figura 6 se muestra un ejemplo representativo de las purezas obtenidas en células de adultos.

	Sexo	# linfocitos T CD8+ Totales	Pureza %
Adulto 1	Masculino	28.4 millones	91
Adulto 2	Masculino	32 millones	94.6
Adulto 3	Masculino	29 millones	96.8
Adulto 4	Masculino	21 millones	97.7
Adulto 5	Masculino	30 millones	93.8
Adulto 6	Masculino	30 millones	92.6
Adulto 7	Femenino	11 millones	90.3

Tabla 1. Características de las muestras de adulto.

Se obtuvo un total de 7 muestras de sangre periférica de adulto, de los cuales el número de células iba entre los 11 a 32 millones. El porcentaje de linfocitos T CD8+ totales iba entre 90.3 a 97.7%.

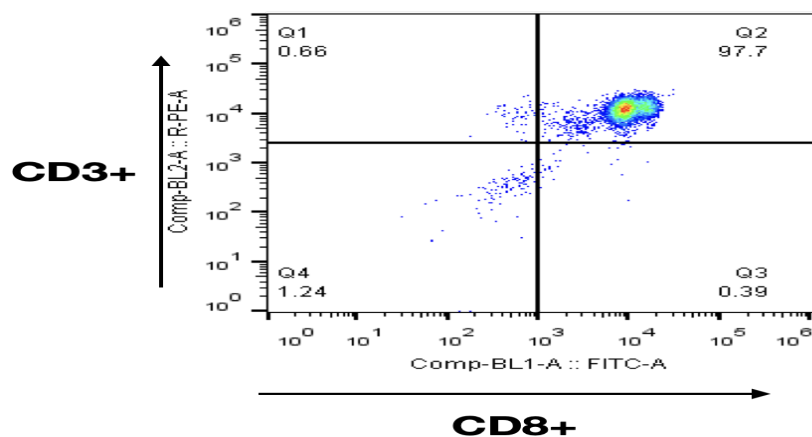


Figura 6. Gate representativo de la pureza de linfocitos T CD8+ de adultos.

En el eje X se muestra el porcentaje de células positivas para la molécula CD3 (PE). En el eje Y se muestran las células positivas para la molécula CD8 (FITC). El porcentaje de pureza se obtiene de las células que expresan ambas moléculas. El resultado fue la obtención de células con una pureza arriba del 97.7%.

7.2 Obtención de linfocitos T CD8+ virgenes

Después de obtener la población de linfocitos T CD8⁺ totales, se eliminaron los linfocitos de memoria mediante el uso de perlas magnéticas acopladas a CD45RO y CD44. Para evaluar la depleción de las células de memoria, se hizo la tinción con anticuerpos anti-CD45RO-FITC. CD45RO es una molécula característica de los linfocitos de memoria. Las células vírgenes fueron teñidas con para medir la eficiencia con la que se eliminaron los linfocitos de memoria.

En la figura 7 se teñió a las células positivas para CD45RO, la concentración usada fue 5 uL de anticuerpo a 1µg/µL, y se puede observar que las células si fueron teñidas

correctamente. De color azul se muestran las poblaciones celulares vírgenes y de color rojo las poblaciones celulares totales.

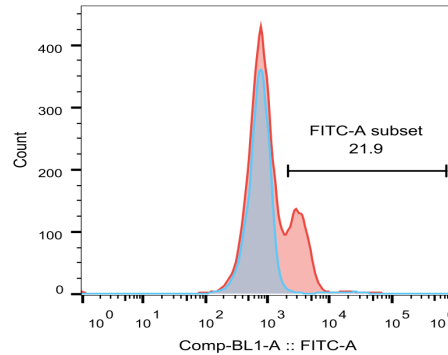


Figura 7. **Expresión de CD45RO**

En la figura de la izquierda se muestra que no se tiñeron las células positivas para CD45RO, sin embargo, en la figura de la derecha se observa la tinción de CD45RO. De color rojo se observa las células totales y de color azul las vírgenes.

7.3 Purificación de linfocitos T CD8⁺ de neonatos.

Se obtuvo sangre de cordón umbilical de 4 neonatos en el Hospital General de Temixco, Morelos. La sangre fue purificada eliminando las células B con anticuerpos anti-B220 y anti-CD11b. Para poder obtener poblaciones más puras, igualmente se usó un anticuerpo anti-CD4.

Se realizó por inmunodeplección con perlas magnéticas acopladas a anticuerpo la eliminación de posibles células de memoria, (Figura 8), en donde se comprueba que, como se esperaba, las células neonatales son negativas a CD45RO.

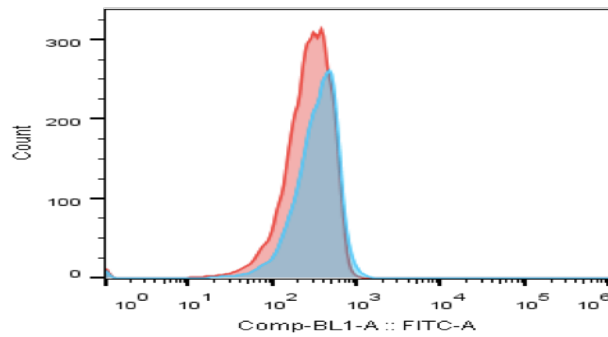


Figura 8. **CD45RO+** en células neonatales.

No se observaron poblaciones positivas para CD45RO. Células sin teñir (azul), células teñidas (rojo).

Para validar que durante el proceso de purificación las células no hayan sido activadas las células, se teñeron con anti-CD69, un marcador de activación de células T (Figura 9). Como se puede observar en el histograma, no hay células positivas para CD69.

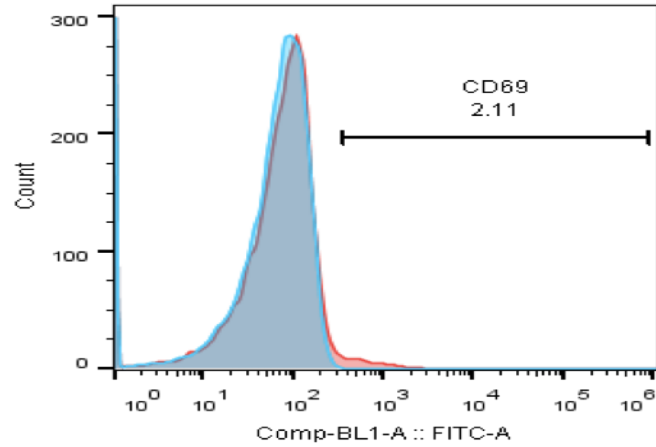


Figura 9. **Expresión de CD69+**

Las células neonatales no expresaron CD69. De color azul se encuentran las células sin teñir y de color rojo las células teñidas.

Se obtuvieron poblaciones de linfocitos T CD8+ de neonatos aproximadamente de 90% de pureza (Figura 10). Los datos de cada neonato se muestran en la tabla numero 2.

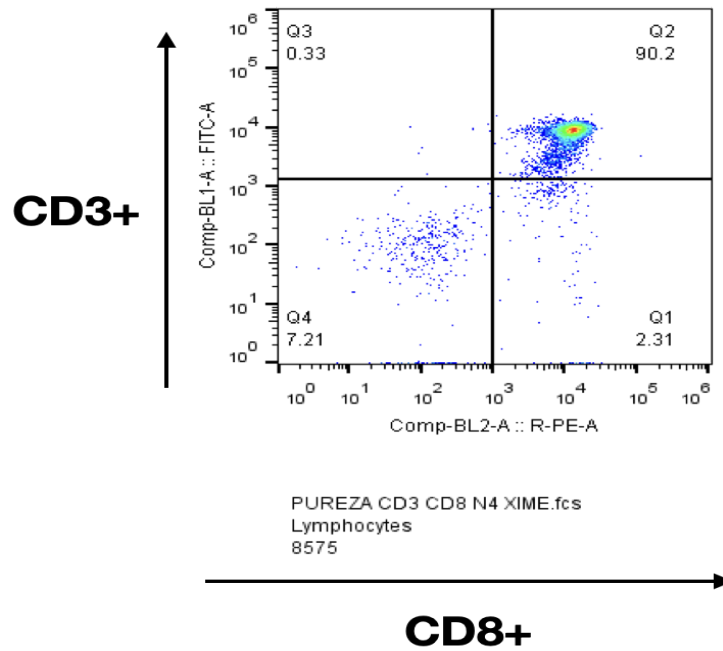


Figura 10. Pureza neonatos

En el eje Y se muestra el porcentaje de células positivas para la molécula CD3 (PE). En el eje X se muestran las células positivas para la molécula CD8 (FITC). El porcentaje de pureza se obtiene de las células que expresan ambas moléculas. El resultado fue la obtención de células con una pureza arriba del 90%.

	Sexo	Capurro (SDG)	APGAR	# células virgenes	Pureza %
Neonato 1	Masculino	39	9/9	3 millones	88.5
Neonato 2	Masculino	40	8/9	15 millones	82.3
Neonato 3	Masculino	40	9/9	25 millones	82.2
Neonato 4	Masculino	41	9/9	10 millones	90.2

Tabla 2. Características de las muestras de neonato

Se muestra el Capurro (semanas de gestación), APGAR, numero de células obtenidas y pureza, de un total de 4 neonatos.

7.4 Estimulación de sobrenadantes de linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8+ vírgenes de adultos y neonatos fueron estimulados con anti-CD3 y Flagelina por 6 horas a 37°C y 2% de CO₂. Una vez de que las células fueron estimuladas, se obtuvieron sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la proteína obtenida.

7.5 Inmunodepleción con perlas magnéticas

La Catepsina G y Defensina A, fueron depletados por medio de anticuerpos anti-Defensina A y anti-Catepsina G, que reconocieron específicamente a los péptidos mencionados y que estaban acoplados a perlas magnéticas con la proteína A/G. Por medio de un magneto se depletaron estos productos de interés de los sobrenadantes. Como control de pegado inespecífico, se utilizaron sobrenadantes que se trataron con las perlas magnéticas sin anticuerpos (perlas).

7.6 Cuantificación de proteína

Una vez realizada la inmunodepleción de péptidos, se cuantificaron nuevamente las proteínas en el sobrenadante, en 5 adultos y 4 neonatos (Tabla 3).

	Concentra do (mg/mL)	Perlas (mg/mL)	SN-DEF (mg/mL)	SN-CTG (mg/mL)
Adulto 2	0.492	0.470	0.444	0.363
Adulto 3	0.70	0.31	0.2	0.22
Adulto 4	0.479	0.28	0.2	0.2
Adulto 5	0.402	0.32	0.23	0.21
Adulto 6	0.410	0.3	0.2	0.2
Neonato 1	0.334	0.338	0.302	0.306
Neonato 2	0.344	0.30	0.3	0.3
Neonato 3	0.408	0.32	0.22	0.2
Neonato 4	0.443	0.34	0.2	0.2

Tabla 3. Concentraciones de proteína.

Se evaluó la concentración de proteína de los sobrenadantes de cinco adultos y cuatro neonatos depletados y no depletados de Defensina A y Catepsina G por medio de el kit Qubit® Protein Assay.

Se partió de una concentración final de proteína de 0.05 ug/uL en cada pozo a partir de los sobrenadantes, para hacer diluciones seriadas,. La concentración elegida fue del doble de la cocentración mínima de proteína para observar un efecto microbicida, que se evaluó previamente [tesis licenciatura, Ximena Pérez Pacheco, 2019].

7.7 Evaluación del crecimiento de *Serratia marcescens* en medio RPMI

Se evaluó el crecimiento de la cepa Sm81 de *Serratia marcescens* en medio LB para conocer el crecimiento óptimo de la bacteria. *S. marcescens* fue incubada a 30°C durante 5 horas. Su crecimiento fue analizado cada hora por medio de un espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda: 540 nm, 600 nm y 660, en un mismo cultivo.

El tiempo de incubación óptimo para *S. marcescens* es de 4 horas [tesis licenciatura, Ximena Pérez Pacheco, 2019], debido a que se puede observar que en las primeras 3 horas la bacteria crece, siendo está su fase de crecimiento exponencial, alcanzando la fase estacionaria a las 4 horas, como se puede observar también en la figura 11. Así mismo, el óptimo crecimiento de *S. marcescens* se observa de mejor manera a 540 nm.

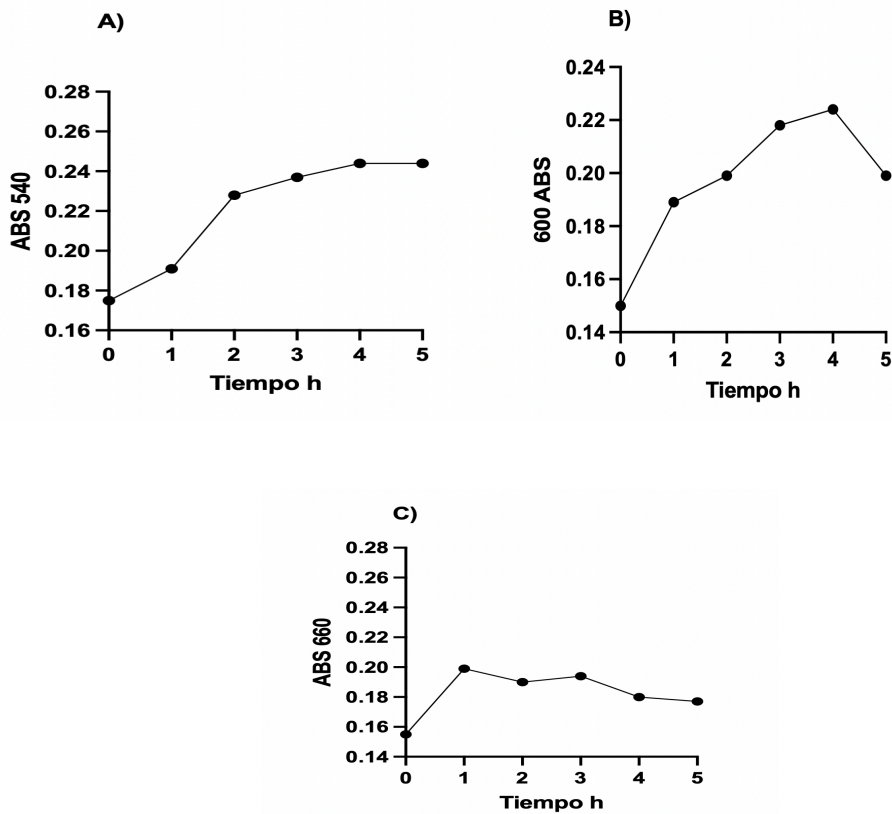


Figura 11. Crecimiento de *S. marcescens*

Crecimiento de *S. marcescens* que fue incubada por 5 horas a 30°C a diferentes longitudes de onda: 540, 600 y 660 nm en un mismo cultivo. Se evaluó por un espectrofotómetro el crecimiento a partir de la hora 0 hasta la hora 5. En el eje de las Y se muestra la absorbancia y en el eje de la X el tiempo de incubación en horas.

7.7 Evaluación del crecimiento de *Serratia marcescens* con 90 ug/uL de kanamicina.

El crecimiento de *S. marcescens* fue igualmente evaluado en presencia de kanamicina a 90 ug/uL por medio de un espectrofotómetro. La bacteria mostraba una inhibición de crecimiento a diferentes concentraciones de kanamicina: 50 ug/uL, 70 ug/uL y 90 ug/uL,

comprobando que es susceptible a este antibiótico. Se muestra en la figura 12 la inhibición de su crecimiento al ser incubada por 4 horas a 30°C, midiendo la absorbancia a diferentes longitudes de onda: 540 nm, 600 nm y 660 nm.

La kanamicina es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteína debido a la unión al sitio A conservado del ARN ribosomal 16S. Al usar la concentración 90 ug/uL de kanamicina podemos observar una inhibición significativa en la curva de crecimiento de la bacteria, sin embargo, dadas las tres diferentes longitudes de onda a las que se midió, se observa de mejor manera la inhibición de crecimiento por kanamicina a 540 nm (Figura 12)

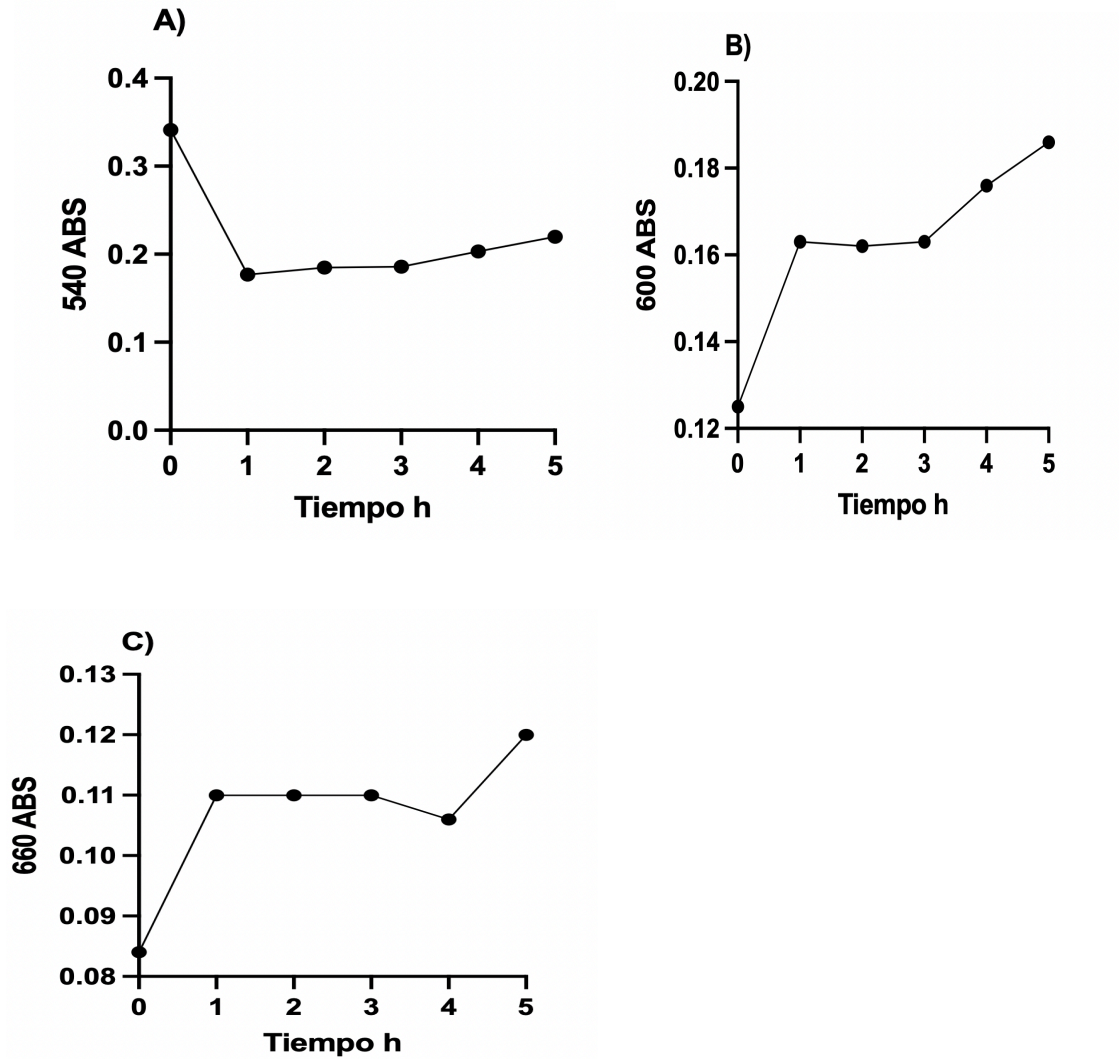


Figura 11. Crecimiento de *S. marcescens* en presencia de kanamicina.

Se evaluó en crecimiento de *S. marcescens* de un mismo cultivo en presencia de 90 µg/ul de kanamicina cada hora, durante 5 horas a 30°C a diferentes longitudes de onda: 540 nm (A), 600 nm (B) y 660 nm (C).

7.8 Evaluación de la actividad microbicida de sobrenadantes depletados de Defensina A y Cathepsina G en neonatos y adultos humanos por densidad óptica

Para evaluar el efecto de la Defensina A y la Cathepsina G en la acción microbicida de los sobrenadantes de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos, se depletaron estos productos de los sobrenadantes de cultivo de células estimuladas. Las células se estimularon con el anticuerpo anti-CD3, entrecruzado con un segundo anticuerpo anti ratón y flagelina por 4 horas. Posterior a la depleción, se evaluó el crecimiento de *S. Marcescens* en presencia de los sobrenadantes de cultivo depletados y no depletados. Se utilizaron los sobrenadantes de 3 células de adultos y 3 de neonatos. El crecimiento se analizó por espectrofotometría y por cuenta viable.

En la figura 12, se muestran el promedio y desviación estándar de las evaluaciones hechas por espectrometría. Se puede ver que el crecimiento de la bacteria disminuye tanto con Kanamicina como con los sobrenadantes de cultivo sin depletar de manera significativa tanto en las células neonatales como de adulto. Al eliminar a Cathepsina G, la densidad óptica aumentó muy ligeramente. En cambio, al eliminar la Defensina A, se observó una mayor recuperación del crecimiento bacteriano, aunque no alcanzó significancia estadística. Esta recuperación se observó tanto para los sobrenadantes de las células neonatales como las de adulto, lo cual fue sorprendente, dado que en las células de adulto sin estimular, este péptido prácticamente no se expresa. Por esta razón se realizaron los experimentos que se muestran en la sección 5.10

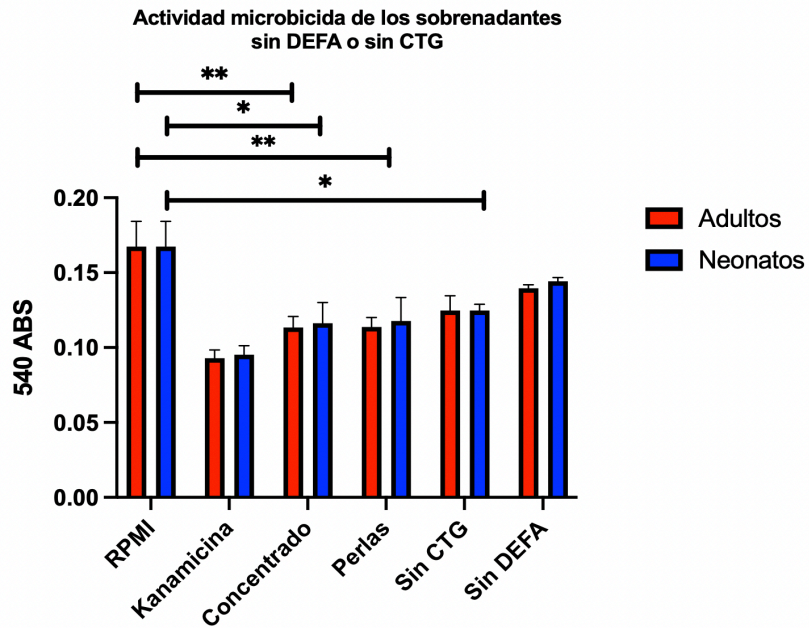


Figura 12. La actividad microbicida disminuye en los sobrenadantes sin Catepsina G o sin Defensina A.

Se analizó el crecimiento bacteriano de sobrenadantes de cultivo de cinco adultos y cuatro neonatos y se muestra la media y desviación estándar a 540 nm por medio de un espectrofotómetro. En el eje de las X se observa de izquierda a derecha como control negativo RPMI, control positivo kanamicina, sobrenadante concentrado, sobrenadante con perlas no acopladas a anticuerpo, sobrenadante sin catepsina y sobrenadante sin defensina. De color rojo se muestran las muestras de adulto y de azul las de neonato. Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para analizar la significancia.

En resumen, estos datos nos sugieren que los sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos humanos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, particularmente de *S. Marcescens* y que al menos parte de esta actividad se debe a la presencia de defensina A y en menor grado Catepsina G.

7.9 Evaluación de la actividad microbicida de sobrenadantes depletados de Defensina A y Catepsina G en neonatos y adultos humanos cuenta viable

El crecimiento bacteriano también fue analizado por medio de cuenta viable, en el cual se cultivó *S. marcescens* por 4 horas a 30°C. Se procedió a hacer diluciones seriadas para evaluar el crecimiento en medio LB después de 24 horas de incubación. Las diluciones seriadas fueron realizadas de la siguiente manera, en el caso de RPMI el tubo 1 fue el concentrado, el tubo 2 fue una dilución 1/100, en tubo 3 1/1,000, el tubo 4 1/10,000 y el tubo 5 1/100,000. En el caso los tubos con kanamicina y muestras que contenía sobrenadantes de cultivo de linfocitos, el tubo 1 fue el concentrado, el tubo 2 fue una dilución 1/10, en tubo 3 1/100, el tubo 4 1/1000, y el tubo 5 10,000.

Se evaluó el crecimiento de la bacteria en presencia o ausencia de Catepsina G y Defensina A en 3 neonatos y de 3 adultos. En la figura 13 se muestran las placas de cultivo. Las placas de la izquierda representan a los adultos y las de la derecha a los neonatos. Se agregó una gota de 10 uL por triplicado en cada una de las 5 diluciones, considerando la dilución número 1 como el concentrado de la bacteria con el sobrenadante. Como control positivo se usó kanamicina a 90 ug/mL y como control negativo se utilizó RPMI.

En el caso de las bacterias control, que sólo fueron expuestas a RPMI, se observa un fuerte crecimiento de colonias, en comparación con las bacterias que fueron expuestas a kanamicina, o retadas con los sobrenadantes concentrados se observa una inhibición de

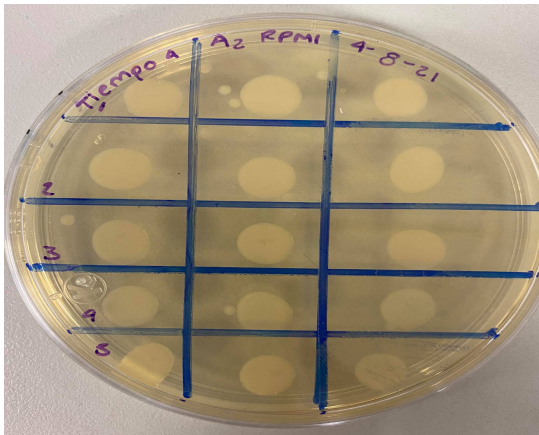
colonias bacterianas, lo que nos diría que los sobrenadantes sin depletar estarían inhibiendo el crecimiento bacteriano, como se observó con los experimentos de evaluación de D.O.

En el caso de los que fueron depletados de Catepsina G o de Defensina A, se mostró un aumento de crecimiento de colonias de *S. marcescens*.

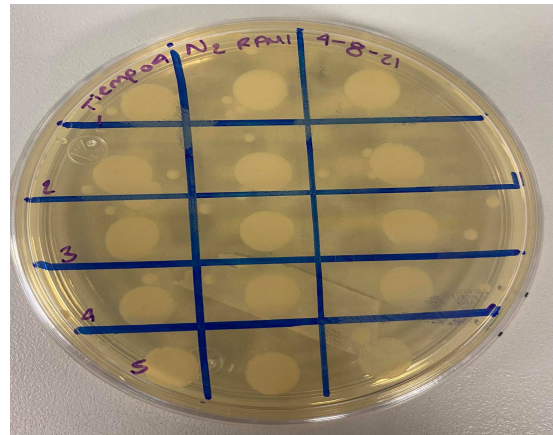
Adulto y Neonato

A) RPMI

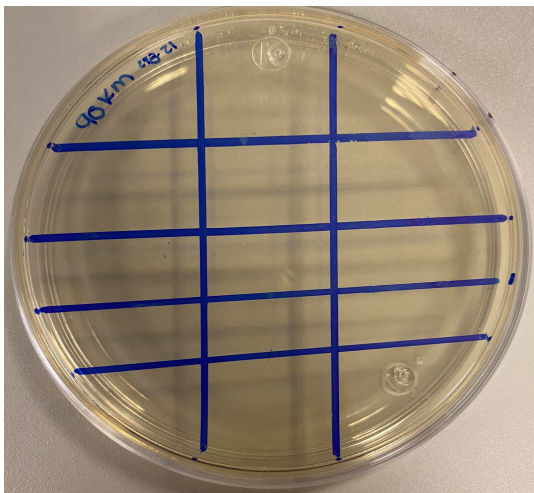
ADULTO



NEONATO

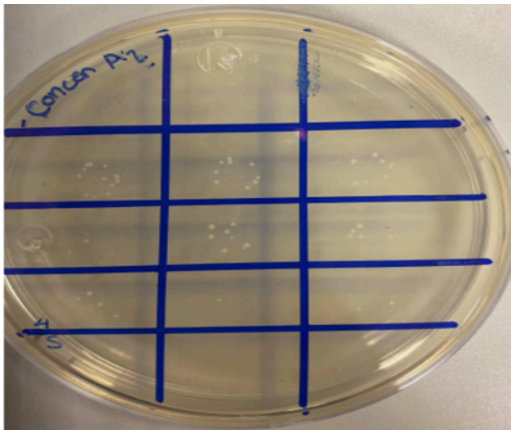


B) 90 ug/mL de kanamicina

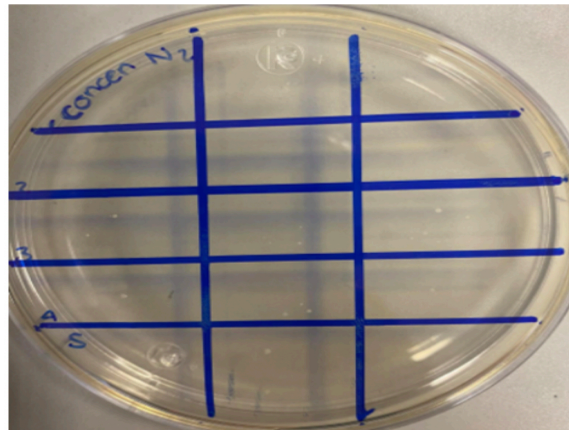


C) Concentrado

ADULTO

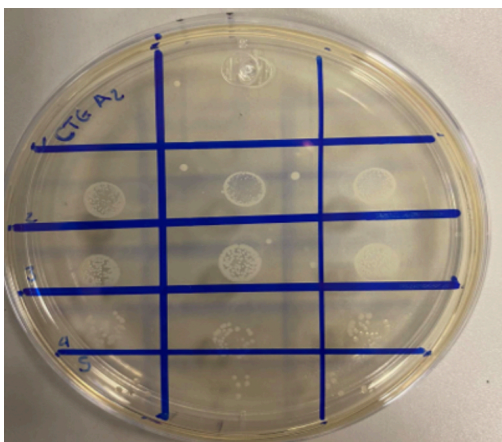


NEONATO

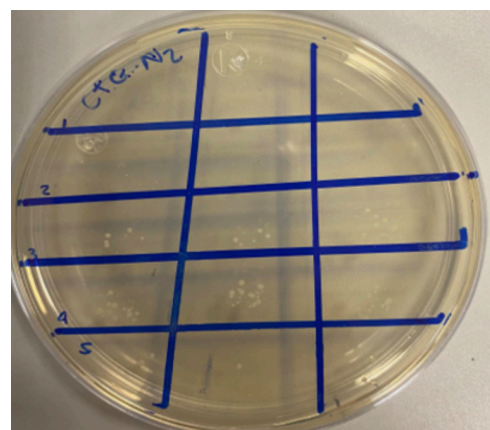


D) Sin Catepsina

ADULTO



NEONATO



E) Sin Defensina

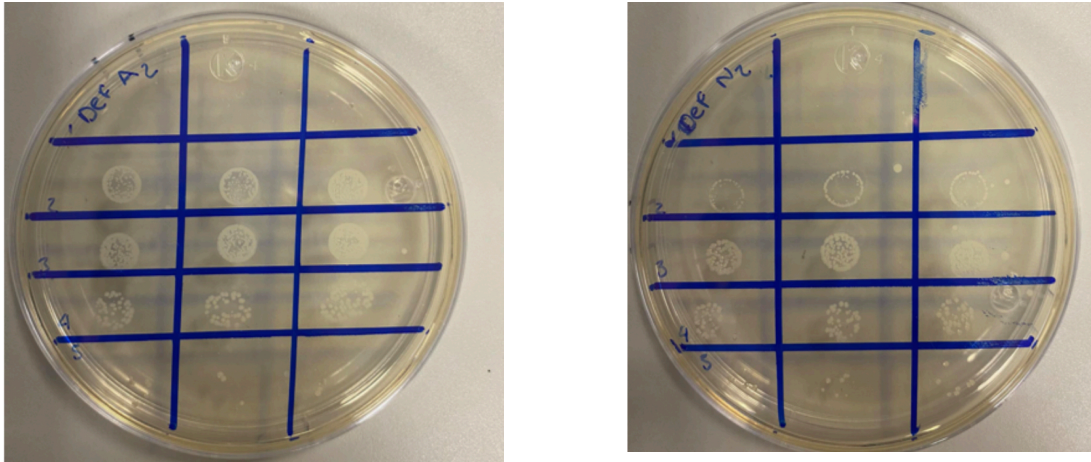


Figura 13. Crecimiento de *S. marcescens* en placa en presencia y ausencia de Catepsina G y Defensina A de adulto 1 y neonato 1.

Los sobrenadantes depletados y no depletados de Catepsina G y Defensina A fueron retados para evaluar el crecimiento de *S. marcescens*. Como control positivo kanamicina y como control negativo RPMI.

Así mismo, estos resultados fueron graficados como se muestra en la figura 16, donde se realizó un conteo de las colonias que se observan en la figura 13. El promedio de las colonias contadas se multiplicó acorde a su factor de dilución y este a su vez fue dividido por 10, ya que este fue el volumen que se sembró, y de esta manera se obtenían el número de colonias por μL . Los resultados fueron analizados en el programa Prism GraphPad, y se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para analizar la significancia. La grafica muestra el número de colonias de los ensayos microbicidas que no tenían Catepsina G ó que no tenían Defensina A. En las muestras control con RPMI se encontraban alrededor de 60,000

bacterias/ μL , mientras que en el caso de las muestras con kanamicina, sobrenadante concentrado y sobrenadante acoplado a perlas magnéticas, no crecieron bacterias, o crecieron muy pocas (datos en la gráfica no mostrados). Los resultados en la cuenta viable nos arrojaron que en el caso de las células de adultos, al eliminar Catepsina G y Defensina A las bacterias crecían ligeramente más que las que contenían sobrenadantes de células neonatales, pero debido a la gran variabilidad de las evaluaciones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

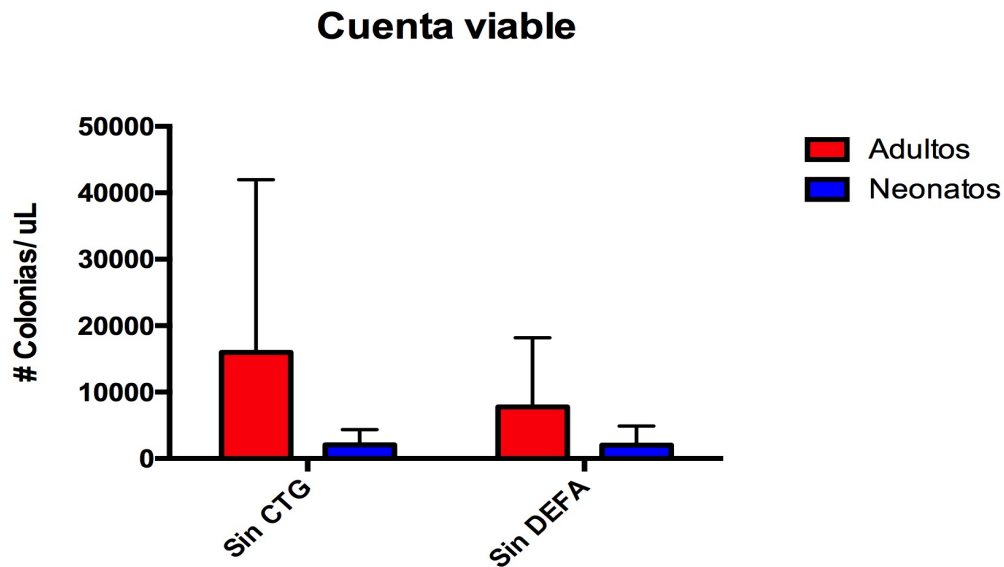


Figura 14. Cuenta viable

En el eje de las Y se muestra el crecimiento de *S. marcescens* por número de colonias por μL . En el eje de las X se muestran los sobrenadantes eliminados de Catepsina G y de Defensina A, respectivamente. De color rojo se muestran los adultos y de color azul los neonatos. Los resultados fueron analizados por medio del programa Prism GraphPad. La prueba estadística usada fue prueba Kruskal-Wallis ($p\text{-value} \leq 0.05$).

Estos resultados nos sugieren que Catepsina G y Defensina A tienen acciones microbicidas y que tanto en células neonatales como en las de adulto, estas proteínas parecen estar presentes en los sobrenadantes de cultivos activados con CD3 y Flagelina. Esto nos hizo preguntarnos si en las células de adulto, que inicialmente tienen una expresión mucho menor que las células de neonato, se induce la expresión de CTCg t DefA, por lo que decidimos evaluar su expresión por citometría de flujo.

7.10 Expresión de Defensina A y Catepsina G en linfocitos T CD8+ estimulados y no estimulados en neonatos y adultos.

Dado que tanto en células estimuladas de adulto como de neonato se observó un aumento del crecimiento bacteriano al depletar cathepsina G y Defensina A, decidimos evaluar la expresión de las mismas en células TCD8+ estimuladas por 6 horas a través de - CD3/flagelina y no estimuladas.

Se utilizaron células mononucleares y se marcó a las células positivas para CD8 y para las células para defensina A o catepsina G, esto se realizó en células tanto de adultos como de neonatos.

Se muestra en la figura 17 la expresión de la proteína y péptido de interés: Catepsina G y Defensina A, en células adulto. Es claro que las células que fueron estimuladas tuvieron

una mucho mayor expresión de Catepsina y de Defensina, en comparación con las células no estimuladas.

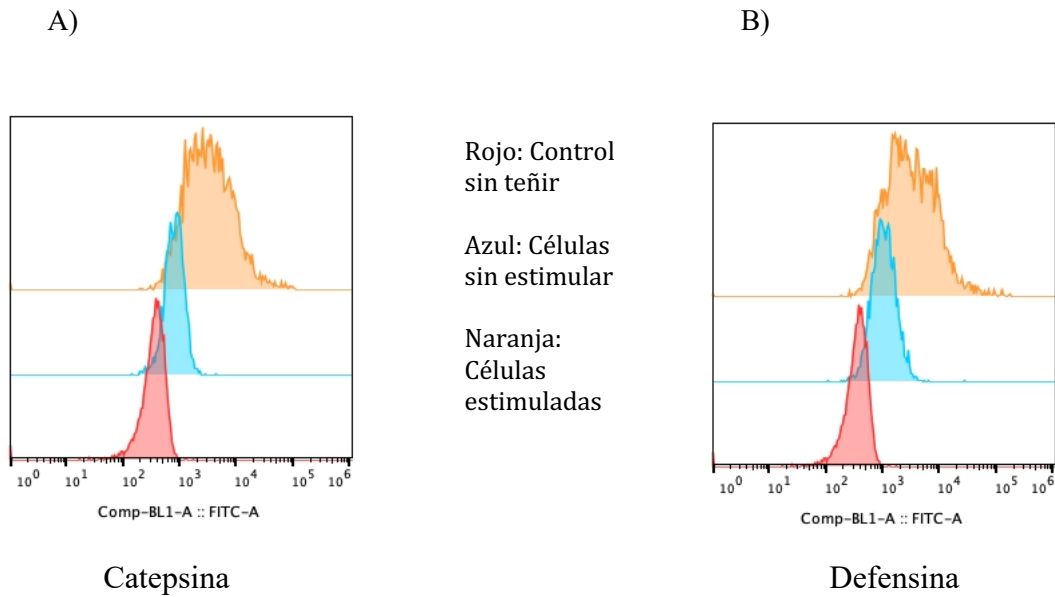


Figura 17. **Expresión de Defensina A y Catepsina G en linfocitos T CD8+ en adulto.**

En el eje de las X se muestra una escala logarítmica donde a partir de 10^3 se considera positivo la población celular. En la figura A se presenta la expresión para Catepsina G, mientras que en la figura B se presenta la expresión de Defensina A, ambos de adulto. De color rojo se muestra la población celular control (sin teñir), de color azul son células que no fueron estimuladas, mientras que de color naranja son células estimuladas con CD3 y flagelina durante 6 horas.

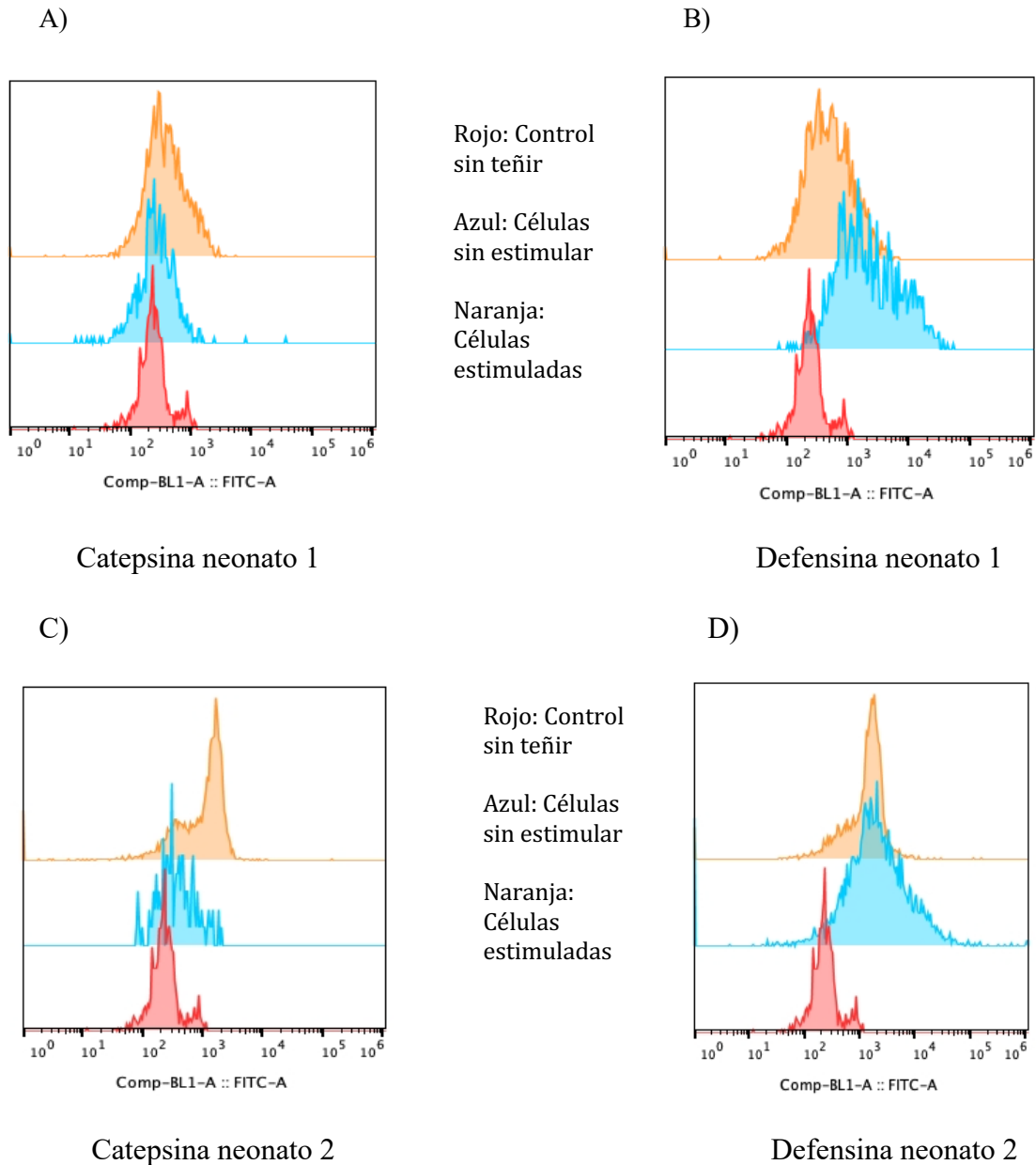


Figura 18. Expresión de Defensina A y Catepsina G en linfocitos T CD8+ en neonatos.

En el eje de las X se muestra una escala logarítmica donde a partir de 10^3 se considera positivo la población celular. (A) se muestra la expresión de Catepsina G en el neonato 1, (B) la expresión de Defensina en el neonato 1. (C) expresión de Catepsina G en el neonato 2, (D) expresión de Defensina A en neonato 2. De color rojo se muestra la

población celular control (sin teñir), de color azul son células que no fueron estimuladas, mientras que de color naranja son células estimuladas con CD3 y flagelina durante 6 horas.

Así mismo, la expresión de defensina y de catepsina fue media en linfocitos T CD8+ de dos neonatos, en células estimuladas con CD3 y flagelina y en células no estimuladas. Como se muestra en la figura 18 Catepsina G se expresaba aún mas en células estimuladas en comparación con células no estimuladas, sin embargo, para el caso de Defensina A, se mostró una mayor expresión en células no estimuladas comparandolas con las no estimuladas.

8. Discusión

El tema principal de este proyecto fue la evaluación de la participación de Cathepsina G y Defensina A en inhibición del crecimiento de *Serratia Marcensis*. Encontramos que ambas participan en la actividad microbicida o bacteriostática de la bacteria, pudiendo demostrar que las células T CD8+ on capaces de esta actividad, además de su mecanismo clásico de citotoxicidad.

Surgieron varios retos técnicos y ajenos al laboratorio para la realización de los experimentos, sin embargo, los resultados fueron prometedores, aunque faltaron algunas repeticiones para alcanzar significancias estadísticas.

Logramos purificar células de cordón umbilical y células vírgenes de sangre periférica de adultos, y obtener sobrenadantes de cultivo con cantidades reproducibles de proteína.

Valoramos que las células de cordón umbilical no estuvieran contaminadas con sangre de la madre, mediante la tinción con CD45RO, que marca células de memoria. Asimismo, nuestras células fueron negativas para la expresión de CD69, un marcador de activación.

Las condiciones de crecimiento de *S. marcescens* fueron evaluadas previo a los experimentos y además que se evaluó el crecimiento a diferentes longitudes de onda para probar con cual se aprecia mejor el crecimiento de la bacteria, a sugerencia de mi comité tutorial. Los resultados obtenidos mostraron que la bacteria alcanzó su fase exponencial a las 4 horas de incubación. De la misma manera, se realizó una curva de crecimiento de *S. marcescens* en presencia de 90 ug/uL de kanamicina a diferentes longitudes de onda, donde se observa una mejor apreciación de la inhibición a una densidad óptica de 540 nm, en donde, a la 1 hora de incubación la densidad óptica empieza a disminuir, lo que nos diría que se está inhibiendo el crecimiento.

Se evaluó la concentración de proteína en los sobrenadantes depletados y no depletados de Catepsina G y de Defensina A en las células de neonatos y adultos para utilizar la misma concentración de proteína en todos los experimentos. Se partió de una concentración final de proteína de 0.05 ug/uL en los cultivos bacterianos y diluciones seriadas a partir de la misma. Esta concentración fue reportada en mi tesis de licenciatura como el doble de concentración mínima para poder observar la inhibición del crecimiento bacteriano.

Tres muestras de sobrenadantes depletados y no depletados de Catepsina G y de Defensina A de adultos y neonatos humanos fueron analizados por medio de densidad óptica a 540

nm, donde se observa que al depletar esta proteína y péptido aumentó la densidad óptica, en comparación con el control de kanamicina, y contrariamente a los sobrenadantes que no fueron depletados de ninguna proteína. Esto indica que las depleciones fueron efectivas en eliminar estas proteínas y que participan en la actividad microbicida o bacteriostática sobre la bacteria. En particular Defensina A parece ser importante en la actividad microbicida de los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos T CD8+, tanto de neonatos como de adultos.

No encontramos una diferencia significativa en sobrenadantes depletados de Cathepsina G o de Defensina A entre neonatos y adultos, lo cual nos podría decir que ambas proteínas podrían tener un papel importante en la defensa contra patógenos como *S. marcescens* que aún no ha sido descrita.

Para corroborar el efecto de la depleción de Cathepsina y Defensina A sobre el crecimiento de *Serratia marcescens*, se midió la cuenta viable en placa, que se logró estandarizar finalmente. Tuvimos un problema con las concentraciones más altas de los sobrenadantes de cultivo, pudiendo establecer el crecimiento en las concentraciones más diluidas. Esto habla de que había un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en placa en estos sobrenadantes. Sin embargo, logramos observar de manera repetitiva que la depleción tanto de Defensina A como de Cathepsina A lograban recuperar el crecimiento bacteriano, por lo que se corroboró por otro método el resultado obtenido al evaluar el crecimiento por D.O.

Un resultado sorprendente fue que no hubo diferencia en el efecto de las depleciones de Cathepsina G y Defensina A en linfocitos T CD8+ estimulados de neonatos y adultos. Fue sorprendente porque las células de adulto a nivel basal no expresan estos productos. Por esto,

decidimos evaluar si la estimulación en presencia de flagelina inducen la expresión de Catepsina G y Defensina A.

Observamos que efectivamente la estimulación a través de CD3+ y Flagelina indujeron la expresión de Catepsina G y Defensina A en las células del adulto, lo cual no se ha reportado. Sólo logramos hacerlo en una muestra de adulto pero el resultado es muy claro en esta muestras. En las células neonatales hay una expresión basal de estos productos y la estimulación aumentó ligeramente la expresión de Catepsina G pero disminuyó la de Defensina A. La repetición de estas evaluaciones es necesaria para concluir de manera contundente.

Hubo retrasos en esta tesis debido al COVID, ya que tuvimos que parar por casi dos meses las evaluaciones de crecimiento bacteriano, ya que hubo contagios en el laboratorio. Además, ya no hubo pudimos comprobar por Inmunoblot la depleción de Cathepsina y Defensina A. Esto se debió al tiempo y a que se tenían que concentrar los sobrenadantes para alcanzar concentraciones que pudieran ser evaluadas por esta técnica.

9. Conclusión

1. Una vez más se comprobó que los sobrenadantes de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos tienen actividad microbicida ante la bacteria *S. marcescens*.
2. Se recuperó el crecimiento bacteriano al depletar Defensina A (comprobado por D:O: y por cuenta viable) y Cathepsina (sólo observado por cuenta viable, el efecto por D.O. fue muy leve) tanto en sobrenadantes de células T CD8⁺ de adulto como de neonato
3. La expresión de Cathepsina G y de Defensina A aumentó en células de adulto estimuladas con anti-CD3 y flagelina. Las células neonatales tienen una expresión basal alta de esta proteína y péptido.

10. Referencias.

- [1] Inmunología Celular y Molecular 8ª edición Abel K.abbas
- [2] Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo
- [3] Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends Biotechnol 1998;16:82– 88. [PubMed: 9487736]
- [4] Brogden KA, Ackermann M, McCray PB Jr, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. Int J Antimicrob Agents 2003;22:465–478. [PubMed: 14602364]
- [5] Prashant Kumar 1,2, Jayachandran N. Kizhakkedathu 1,2,* and Suzana K. Straus 1,* . (19 January 2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. Biomolecules, 8, 1-24.
- [6] Antimicrobial peptides Ling-juan Zhang and Richard L. Gallo
- [7] Ariel O. Galindo-Albarrán, Oscar H. López Portales, Darely Y. Gutiérrez Reyna, Alfonso Valencia, Salcatore Spicuglia, M. Angélica Santana. (November 15, 2016). CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. Cell Reports, 17, 2151–2160
- [8] Gastmeier P, Loui A, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Zuschneid I, Sohr D, et al. Outbreaks in neonatal intensive care units-They are not like others. Am J Infect Control.2007; 35: 172-176.
- [9] Brady M. Health care-associated infections in the neonatal intensive care unit. Am J Infect Control. 2005; 33: 268-275.
- [10] Smith PJ, Brookfield DS, Shaw DA, Gray J. An outbreak of Serratia marcescens infections in a neonatal unit. Lancet 1984;1:151—153. [SEP]
- [11] Ken J. Ishii, Shizuo Akira, en Inmunología Clínica (Tercera Edición), 2008
- [12] Current Biology 26, R1–R21, January 11, 2016 ©2016 Elsevier
- [13] Germán Alberto Téllez1, Jhon Carlos Castaño1. (25/01/2010). Péptidos antimicrobianos. Elsevier, 14, 55-67. 07/06/2018, De NCBI Base de datos.
- [14] William C. Wimley. (August 10, 2010). Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. ACS CHEMICAL BIOLOGY, 5, 905-917. 7 junio 2018, De ncbi Base de datos.
- [15] Ganz, T. *et al.* Defensins. Natural peptide antibiotics of 13. human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**, 1427–1435 (1985). [SEP]
- [16] Ganz, T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear

leukocytes. *Infect. Immun.* **55**, 568–571 (1987).

[17] Kościuczuk E.M, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, Krzyżewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Cathelicidins: Family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39:10957–10970

[18] Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: A novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1995;374:1–5.

[19] Zanetti M (January 2004). “Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity”. *Journal of Leukocyte Biology.* 75 (1): 39-48. Doi:10.1189/jlb.0403147. PMID 12960280

[20] Tesis de licenciatura D.C Otoniel Rodríguez Jorge. 2010

[21] Tesis maestría D.C Otoniel Rodríguez Jorge. 2013

[22] Mercy PrabhuDas, Becky Adkins, Hayley Gans, Christopher King, Ofer Levy, Octavio Ramilo & Claire-Anne Siegrist. (2011). Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nature*, 12, 189-194. mayo, 2018, De NCBI Base de datos.

[23] O. Susanto¹, J. A. Trapani^{1,2} & D. Brasacchio¹. (2012). Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens*, 80, 477-487. Mayo, 2018, De NCBI Base de datos.

[24] Tesis maestría M.C Darely Gutiérrez

[25] Brock Biología de microorganismos 10ª edición

[26] S. J. Balin, M. Pellegrini, E. Klechevsky, S. T. Won, D. I. Weiss, A. W. Choi, J. Hakimian, J. Lu, M. T. Ochoa, B. R. Bloom, L. L. Lanier, S. Stenger, R. L. Modlin, Human antimicrobial cytotoxic T lymphocytes, defined by NK receptors and antimicrobial proteins, kill intracellular bacteria. *Sci. Immunol.* 3, eaat7668 (2018).

[27] Fern Findlay, Lorna Proudfoot, Craig Stevens & Peter G. Barlow (2016) Cationic host defense peptides; novel antimicrobial therapeutics against Category A pathogens and emerging infections, *Pathogens and Global Health*, 110:4-5, 137-147, DOI: [10.1080/20477724.2016.1195036](https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1195036)

[28] [32] Kobayashi et al., 2005

[29] [34] Selak, M. A., Chignard, M., Smith, J. R (1988) Cathepsin C is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem. J.* 251, 293-299.

[30] [35] Molino. M., Di, L. M., de Gaetano, G., Cerletti, C. (1992) Intracellular Ca²⁺ rise in human platelets induced by polymorphonuclear-leucocytederived cathepsin C. *Biochem. I.* 288, 741-745.

[31] Shafer WM, et al "Human lysosomal cathepsin G and granzyme B share a functionally conserved broad spectrum antibacterial peptide". The Journal of Biological Chemistry. 266 (1): 112-6

[32] Tesis de Licenciatura L.C Ximena Pérez Pacheco



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 06 de junio de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Estudio de la actividad microbicida de péptidos y proteínas en sobrenadantes de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Ximena Pérez Pacheco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. María Angélica Santana Calderón

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-06-06 11:21:44 | Firmante
EZVHtLhTufzKWrGbLgQtdLfal+NWDvV1qaW2pQ5uj6cq3jFi9yOXYBnWXRkaNef3j33udpseVAtO3BySLILVasYQuwVTQF64d4jZiF+6njoKzcnQspejJRqkhpjKMY2wiaXAmboFt
4+7RhXtQoGv6QuIBkaum8Kx+ZglqdyF7uAtJ/Kyoi5a8TZy8jK3zrLU96gqgkH4TJRwnzzyVgxZaNzWJy+JYDNsjOWilePTUD9s7X3Rx74ATCLsvdlehJoXbjFaSwiEEN8sUs75eM
0TnJRFkVPc+p0r/qLMRkNDeBhsvL3QAAAYT4fKBI//KhkzlhMGLAH9HCWb27eMpA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FUzYD4gT8

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MJ2FwrLY1Rak243kfjCtMF9kFsjEkvj9>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 06 de junio de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la actividad microbicida de péptidos y proteínas en sobrenadantes de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Ximena Pérez Pacheco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2022-06-06 14:34:24 | Firmante
a4UAjVonuSXehL1BgjAUyFEj0QxleJZVxihF58NRpVnBA2LmL2ziNVdjzR/zHTzWLuFuU1SxqrEdEsiCcl/ga6G+XNTnoLvuUzauJfDimETSo3Jcgl+r/9ex+rjKbgJaKrlNkb57Z8l
AzjBEywyYHe3VQglQOzZzQj9HmePSYRrKJhcu0Nqo1z0R/r52lPSUir8DpZZtkaUrBErH0Eaca+3kRjhesmwt62iCr4Jpi7aFtMyNahsO16C40td2UBMjH/27An+Gn9c4VJrgvp
31crHnemy+aUEp1T9uwYKf3CYM2NDpjShWh365CjY/yVrCznf20kpbTBQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QIZa3zKtJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Q3aMQXjbxD1FBB32HCvI2t3ThYOfpAgV>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 06 de junio de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la actividad microbicida de péptidos y proteínas en sobrenadantes de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Ximena Pérez Pacheco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA EUGENIA NÚÑEZ VALDEZ | Fecha:2022-06-06 14:00:25 | Firmante
S1BZ0/NvV7yye6LV+RmVDbZ40xjF/CTzr19Fc+kk7DfzRCscgVJpkJTyvLLgKgWKNyjpKLLYmifLTLpR3f5YR9IEE/6obFL7Bhi4dEJQYR6DDGlsrPJQKpIjzKCYqRRxbJxxQmto/a9I6
CpgoFdxWQlISo3QRJysxiNjD7Au2GCRQDLedodzXXcL10EFAIlg8g+MUI9p7XYc5+yRHY+PsVYUHF0ISxbZXoJt9i+D/g3IYQ9rMj12vGRUzKglotGidMC68sl7MRaA44dB2bBwE9
DBQJBOzvX1Udo6qdeUWWhlcv25PC6PrHL/hTNEvINfyMo7RIArTYWobAtVQd2g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[m6XaU5Ooz](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zvk03rD9BvwQPllp1coAzALHFfaSn89p7>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 06 de junio de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la actividad microbicida de péptidos y proteínas en sobrenadantes de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Ximena Pérez Pacheco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Joaquín Sánchez Castillo

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOAQUIN SANCHEZ CASTILLO | Fecha: 2022-06-06 11:42:13 | Firmante
LcSrSUCggnrXmJZ/WiunegwrDgLoS0HWOUUERiy2E51hPFsl7owPsuYlmBqRdbJOfh4SE4Y1HZqqx36Zpl28C9Pbr3iO6rOSxs7urBq4/FOyN3wk2IQ0BVzS97dUmnOs854ZrU
Mn13x3Ht4bgjK+hVguJUSdTrbpLX9Ps6nRjMPaknXuJB9E0H1BjJFaYWSQ0OdUsVWPkQ3M7NcC7Qmdn7Cu+H81Uzwr/Kv4fpTrC+WNwDC+Rd2Zi99VN7tjN7atv/fvcj8yypGo
ZVwW7Hd317G2G3z/sn6AEIOx915Y4oNT6h9GyyDIEVWX4tCyaYOUK9mQM+sFUyCqAVp4hfw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



vYGI25JQu

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wEGxFq8tBUbie8tSL7jdEozh7Main50s>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 06 de junio de 2022.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la actividad microbicida de péptidos y proteínas en sobrenadantes de cultivo de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Ximena Pérez Pacheco. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2022-06-06 14:15:47 | Firmante
riRQZX7Db1KudqxTsoeMbuK7gEiJ4uTJZW+XLyePNh+9SKOqFoLR2gDiYs2kldP5fdrCc37DG/GYD/37CSpkvP5+OqIPvgs0CV2vNpnpGpJ5OuKqUexJIRXJEV7aYK7o4GT4Ph
uV4PylLcjmAZeBEBib2E8UG19KV4loYkPDj7fNzapiYJ7vsdTMswmWLXeJMw7QbJxw9OuV+RjdP9rKAogTYpG/BV0TrCSSIBYLMP0t04i25SAozILHr5YY23/+loyWHg1QoA2
GsP3Thinj4XEeB+ChFiuYH3fK3gepDKm54hTylNxyG9cHFJUsfJTtk5MirRjN/dGxia3+Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



TzGD4CQxl

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GDeH9BcRdRBYEZubsmIFmecJxz6rOzHn>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023