



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y
Aplicadas
Centro de Investigación en Dinámica Celular**

**Caracterización de gangliósidos en linfocitos T CD8 +
humanos**

T E S I S

QUE PRESENTA:

Brenda Ingrid Velázquez Dodge

**Para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS**

Director de la Tesis:

Dr. Iván Martínez- Duncker R.

Sinodales:

**Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Revich
Dra. María Angélica Santana Calderón
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva
Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama
Dr. Iván Martínez- Duncker Ramírez**

INDICE

Índice de Tablas:	II
Índice de Figuras:	II
Siglas, símbolos y abreviaturas:.....	V
Resumen	- 7 -
1. Introducción	- 8 -
2. Fundamento Teórico.....	- 10 -
2.1. El sistema inmune.	- 10 -
2.2. Linfocitos T.	- 12 -
2.2.1. Activación de Linfocitos T.	- 14 -
2.2.2. Señales para la activación de Linfocitos T	- 17 -
2.2.3. Activación de los linfocitos T CD8 +.....	- 22 -
2.3. Glicolípidos	- 25 -
2.3.1. Gangliósidos.....	- 26 -
2.3.2. Biosíntesis de los gangliósidos	- 29 -
2.3.3. Los gangliósidos en las balsas lipídicas pueden controlar la señalización	- 31
-	-
2.3.4. Participación de los gangliósidos en la activación de los linfocitos.....	- 33 -
3. Hipótesis:.....	- 38 -
3.1. Objetivos Generales:	- 38 -
3.2. Objetivos Particulares:.....	- 38 -
4. METODOLOGÍA	- 39 -
4.1. Estrategia metodológica	- 39 -
4.1.2. Anticuerpos.....	- 40 -
4.2. Purificación de PBMC´s	- 41 -
4.3. Purificación de Linfocitos T CD8 +	- 41 -
4.4. Activación de Linfocitos T CD8 +	- 42 -
4.5. Citometría de Flujo de los gangliósidos	- 43 -
4.6. Análisis de la β Gal41T sintasa mediante PCR-Tiempo Real.....	- 44 -
4.7. Análisis de inmunofluorescencia mediante microscopia confocal	- 44 -
5. RESULTADOS	- 46 -
5.1. Verificación de pureza y activación de los linfocitos T CD8 + humanos totales	- 46
-	-

5.2. Caracterización de gangliósidos post-activación.....	- 48 -
5.3. Sobre expresión de la sintasa β -Gal41T a las 6h post-activación.....	- 51 -
5.7. Localización del gangliósido GD2 en los linfocitos T CD8 + humanos totales....	- 53 -
6. Discusión y conclusiones.....	- 55 -
7. BIBLIOGRAFÍA.....	- 59 -
8. Anexos	- 64 -
8.1 Análisis de activación de los linfocitos T CD8 + humanos totales	- 64 -
8.2 Caracterización de gangliósidos 12h	- 66 -
8.3 Caracterización de gangliósidos 24h	- 67 -
8.4 Dot-Plot Caracterización de gangliósidos 48h	- 68 -
8.5 Caracterización de gangliósidos 72h post-activación.....	- 69 -

Índice de Tablas:

TABLA 1. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4 + ¹⁷	- 16 -
TABLA 2. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD8 + ^{18,19,20}	- 16 -
TABLA 3: SINTASAS PARTICIPANTES EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS GANGLIÓSIDOS ³⁵	- 31 -
TABLA 4. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA INMUNOTINCIÓN DE CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCOPÍA CONFOCAL.	- 40 -

Índice de Figuras:

FIGURA 1. RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO Y ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T	- 13 -
FIGURA 2. PAPEL DEL CD28 Y DE LOS COESTIMULADORES EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T.	- 20 -
FIGURA 3. RUTA DE SÍNTESIS DE LOS GANGLIÓSIDOS	- 28 -
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA POSIBLE FUNCIÓN DE LAS BALSAS LIPÍDICAS EN LOS	- 33 -
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA POSIBLE FUNCIÓN DE LAS BALSAS LIPÍDICAS EN LOS LINFOCITOS T AL MOMENTO DE ACTIVARSE	- 33 -

FIGURA 5. ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4 + Y CD8 +, TRAS LA ESTIMULACIÓN MEDIADA POR TCR.	- 36 -
FIGURA 6. EXPRESIÓN DE LOS GANGLIÓSIDOS GD3 Y GD2 EN DIFERENTES TIEMPOS POST-ACTIVACIÓN EN LINFOCITOS T CD4 + VÍRGENES.....	- 37 -
FIGURA 7. COMPROBACIÓN DE LA PUREZA Y ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8 +.....	- 47 -
FIGURA 8. CARACTERIZACIÓN DE LA SERIE “B” DE GANGLIÓSIDOS EN LINFOCITOS T CD8 +.	- 50 -
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LA GM2/GD2 SINTASA ANALIZADA MEDIANTE QPCR.	- 52 -
FIGURA 10. CARACTERIZACIÓN DEL GANGLIÓSIDO GD2 CON RESPECTO AL TCR MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL.....	- 54 -
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE LA GM2/GD2 SINTASA EN LOS LINFOCITOS T CD4 + VÍRGENES HUMANAS VS LOS LINFOCITOS T CD8 + TOTALES HUMANOS.....	- 57 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 1:COMPROBACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y PUREZA DE LOS LINFOCITOS T CD8 + HUMANOS TOTALES.....	- 65 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 2. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 12 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 66 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 2. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 12 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 66 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 3. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 24 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 67 -

FIGURA SUPLEMENTARÍA 3. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 24 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 67 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 4. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 48 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 68 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 4. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 48 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 68 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 5. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 72 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 69 -
FIGURA SUPLEMENTARÍA 5. DOT-PLOT E HISTOGRAMA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ TEÑIDOS PARA LOS DIFERENTES GANGLIÓSIDOS DE LA SERIE “B” A 72 H POST- ACTIVACIÓN Y EN REPOSO.....	- 69 -

Siglas, símbolos y abreviaturas:

- APC: célula presentadora de antígeno
- Bcl-2: célula B de linfoma 2
- Cer: ceramida
- CTL: linfocito T citotóxico
- DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
- EGFR: receptor de factor de crecimiento epidermal
- Gal: galactosa
- GalCer: galactosilceramida
- GEM: microdominios ricos en glicolípidos
- GGs: gangliósidos
- Glc: glucosa
- GlcCer: glucosilceramida
- GSL: glicosfingo lípido
- IFN: interferón
- IL-2: interleucina 2
- JNK: cinasa c-jun N-terminal
- KO: Knockeado, del inglés *knockout*
- Lac: lactosa
- LacCer: lactosilceramida
- MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

- GalNAc: N-acetil galactosamida
- Neu5Ac: ácido neuramínico
- NK: célula asesina natural
- PBMC's: células mononucleares de sangre periférica
- PCR: reacción en cadena de polimerasa
- PHSC: célula madre hematopoyética pluripotente
- PLC γ 1: fosfolipasa C1 γ
- RTK's: receptores tirosín-cinasa
- Sia: ácido siálico
- SMAC: agrupamiento supramolecular
- TNF: factor de necrosis tumoral
- TNFR: receptor de factor de necrosis tumoral

Resumen

Los gangliósidos (GG's) son glicoesfingolípidos (GLS) que contienen ácido siálico (Sia). Un papel importante de los GG's es participar en la formación de balsas lipídicas y microdominios, que ayudan a formar cascadas de señalización, involucradas en diferentes funciones celulares, como la proliferación, diferenciación y supervivencia.

El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de expresión de los GG's de la serie b (GD3, GD2, GD1b y GT1b) en linfocitos T CD8 + humanos.

Se midió la expresión de los gangliósidos de la serie "b" mediante citometría de flujo a las (12, 24, 48 y 72 h), encontrando que ocurre una neoexpresión del gangliósido GD2. Mediante una qPCR de la GM2/GD2 sintasa se encontró que se encuentra de manera basal en los linfocitos T CD8 + humanos totales. Se realizó una microscopia confocal donde se observó una polarización del TCR junto con el gangliósido GD2, aunque estos no colocalizaron.

Esta observación sugiere que el gangliósido GD2 podría ser importante para la agrupación de TCR y, por lo tanto, para una activación eficiente como lo que se ha reportado con las células T CD4 +.

1. Introducción

Los glicosfingolípidos (GSL) juegan un papel importante como moduladores fisiológicos del crecimiento y como factores mediadores de la proliferación. Además, están involucrados en diversos procesos celulares que incluyen, regulación y estabilidad en la membrana celular, regulación de cascadas de señalización, formación de microdominios dentro de las balsas lipídicas, adhesión, diferenciación celular y morfogénesis^{1,2}.

Los gangliósidos (GGs) GSL de membrana los cuales presentan cargas negativas debido a que contienen ácido siálico (Sia), también conocido como ácido neuramínico (Neu5Ac), el cual es un monosacárido compuesto por nueve carbonos y un grupo N-acetil³.

A su vez, su expresión se encuentra incrementada en diversas enfermedades (ej. cáncer, diabetes tipo 1, enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, entre otras)^{2,4,5,6}. Debido a su relevancia biológica se ha realizado la caracterización del perfil de expresión de los gangliósidos y su función en diferentes tipos celulares y especies de mamíferos^{7,8}.

Se ha reportado que el perfil de expresión de los gangliósidos se modifica durante el desarrollo embrionario, en alteraciones metabólicas y más recientemente en la activación de los linfocitos T CD4 + y CD8 + en ratones knockeados (KO), donde se

ha demostrado que algunos gangliósidos son necesarios para una activación eficiente en las células T^{6,7,9,10}.

Los linfocitos T requieren de diferentes GGs, dependiendo de si son linfocitos T CD4 + o T CD8 +, esto se demostró mediante experimentos utilizando ratones knockeados de la ST3Gal5 (GM3 sintasa), en donde se activaron los linfocitos T CD4 + mediante anticuerpos anti-CD3/CD28, posteriormente midieron la proliferación mediante citometría de flujo de estos linfocitos T CD4 + y los compararon con los linfocitos sin activar, observando que los linfocitos T CD4 + no presentan una correcta activación, ya que no se observó un incremento en su proliferación. Mientras que en los linfocitos CD8 + vírgenes *de los ratones KO* no necesitan de esta sintasa para activarse correctamente⁷.

En contraste los ratones *KO* de la B4GALNT1 (GM2/GD2 sintasa) presentaron una activación normal de los linfocitos T CD4 + vírgenes, mientras que la activación de los linfocitos T CD8 + fue deficiente⁷.

En el caso del ser humano, Villanueva et al. 2016 reportaron que durante la activación de los linfocitos T CD4 + vírgenes humanos existe un incremento en la expresión del gangliósido GD3 y una neoexpresión del gangliósido GD2, y que este último presenta una colocalización con el receptor de célula T (TCR). Una observación adicional fue que el silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa, afecta la agrupación del TCR (*clustering*) y reduce la señalización río abajo con efectos

negativos sobre la proliferación celular⁸. Comparando estos resultados con los observados en ratones se puede observar que en el caso de los linfocitos T CD4+ humanos vírgenes si necesitan de la GM2/GD2 sintasa para una correcta activación, sin embargo, los linfocitos T CD4 + de ratón no. Esto nos demuestra que a pesar de ser el mismo tipo celular, este reacciona diferente dependiendo la especie.

Debido a la importancia que tiene la activación los linfocitos T CD8 + en un contexto inmunológico, patológico y como los GG's podrian estar involucrados en dicho proceso de activación, en este trabajo describimos la expresión de estos GGs en los linfocitos T CD8 + humanos totales, en condiciones de reposo y activación, ya que todos los estudios hasta ahora con respecto a la participación de los GG's en la activación de estos linfocitos se ha realizado en otras especies, como lo son ratones y ratas.

2. Fundamento Teórico

2.1. El sistema inmune.

El término inmunidad hace referencia a la protección frente a enfermedades infecciosas. Sin embargo, sustancias extrañas no infecciosas o células que presentan un patrón de moléculas anormales pueden desencadenar una respuesta inmune. Las células y moléculas responsables de dicha inmunidad constituyen el sistema inmunitario¹¹.

Las principales funciones del sistema inmune son: la neutralización de patógenos como bacterias, virus, parásitos u hongos que han entrado al organismo, así como reconocimiento y neutralización de sustancias nocivas del medio ambiente y la eliminación de células propias que se pueden reconocer como dañinas para el hospedero, como son las células cancerígenas¹².

Existen dos tipos de respuesta en el sistema inmune en los mamíferos. La primera respuesta es mediada por el sistema inmune innato, evolutivamente el más antiguo y presente en todos los organismos vivos. Proporciona una defensa general a los agentes patógenos, por la cual también es conocido como sistema inmune inespecífico¹³.

La respuesta innata usa células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células que liberan mediadores inflamatorios (basófilos, mastocitos y eosinófilos) y células asesinas naturales (*NK's*). Sus componentes moleculares incluyen al complemento, proteínas de fase aguda y citocinas como los interferones¹³.

El segundo tipo de respuesta en el sistema inmune se le conoce como respuesta inmune adaptativa o específica, debido a que agentes particulares conocidos como anticuerpos se unen a patógenos específicos con los que el organismo ya ha tenido contacto, estos anticuerpos son producidos por un grupo de células llamados linfocitos B. En la respuesta inmune adaptativa también se encuentran involucrados

los linfocitos T los cuales sufren un proceso de activación mediante la presentación de antígeno, la cual esta mediada por la inmunidad innata¹¹.

Evolutivamente solo los organismos vertebrados cuentan con este sistema adaptativo, y aunque los dos sistemas no trabajan independientemente del otro en este escrito únicamente nos basaremos en los linfocitos T CD8 +, células del sistema inmune adaptativo¹¹.

2.2. Linfocitos T.

Los linfocitos T son reguladores críticos de la respuesta inmune adaptativa hacia el reconocimiento de patógenos y células tumorales, también son importantes efectores en alergias, rechazo de trasplantes y autoinmunidad¹⁴.

Para que un linfocito T pueda efectuar su función necesita de la interacción con moléculas específicas. Estas moléculas son reconocidas por los receptores de los linfocitos T (TCR) y se denominan genéricamente antígenos, pueden variar desde pequeñas estructuras químicas a moléculas altamente complejas. Sin embargo, el TCR únicamente tiene sitios de unión de 600 a 1700 Å², por lo que estos receptores reconocen solo una pequeña parte de un antígeno complejo, denominado epítipo¹⁵.

Antes de que estos antígenos sean reconocidos por el TCR tienen que ser procesados por unas células especializadas llamadas células presentadoras de

antígeno (APC), las células APC por excelencia son las células dendríticas. Después de su procesamiento los antígenos son presentados por las APC mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (Figura 1)¹¹.

Las funciones del MHC es el de unir los fragmentos del péptido antígeno y mostrarlos en la superficie de las APC, para que las células T los puedan reconocer apropiadamente. Existen 2 tipos de MHC, el MHC clase I, el cual se encuentra presente en todas las células nucleadas del organismo, estas moléculas presentan péptidos provenientes de proteínas citosólicas y son reconocidos por los linfocitos T CD8 +¹⁶.

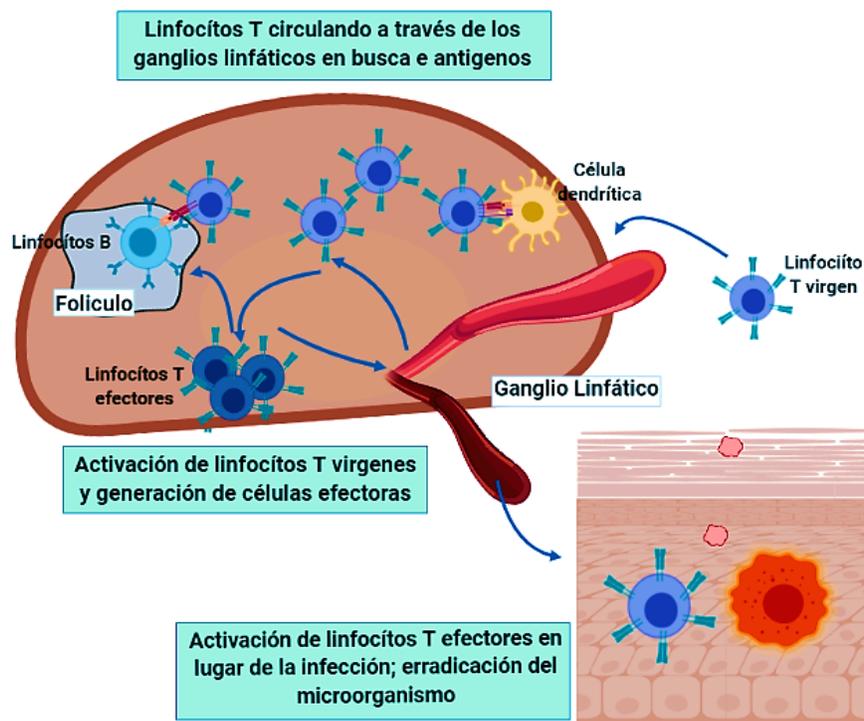


Figura 1. Reconocimiento del antígeno y activación de los Linfocitos T

Mientras que el MHC clase II se encuentra presente únicamente en las células especializadas para la presentación de antígeno (células dendríticas, macrófagos, células endoteliales, epiteliales del timo y linfocitos B), los péptidos presentados por estas moléculas del MHC clase II derivan de proteínas extra celulares y son reconocidos por los linfocitos T CD4 +¹⁶.

Existen diversos tipos de linfocitos T, los cuales responden a diferentes antígenos microbianos en distintos compartimentos celulares y cada uno de estos actúa mediante un MHC distinto. Entre estos se encuentran los linfocitos T CD4 + cooperadores, los cuales maximizan la eficiencia del sistema inmune reclutando y activando a otras células mediante la secreción de citocinas para que estas ataquen al patógeno. Otro subtipo de linfocito es el linfocito T CD8 + también conocido como Linfocito T citotóxico (CTL), el cual se encarga de contener las infecciones de células tisulares donde el anticuerpo no puede acceder, matando células infectadas y eliminando el reservorio de la infección¹¹.

2.2.1. Activación de Linfocitos T.

El inicio de la activación de los linfocitos T vírgenes y las fases efectoras de las respuestas inmunes adaptativas medidas por estas células las desencadena el reconocimiento de antígeno, el cual se da por unos receptores específicos, los cuales se encuentran en la superficie de la membrana de los linfocitos T. Entre estos receptores se encuentra el TCR, el CD3 y el CD28, de los cuales se hablará más adelante¹¹.

En el timo se generan clones de linfocitos T, cada uno con una especificidad diferente, antes de la exposición del antígeno. Los linfocitos T vírgenes, es decir que no han tenido contacto con algún antígeno, circulan por el cuerpo en un estado de reposo y al activarse adquieren nuevas capacidades específicas que le permiten combatir contra una infección¹¹.

La activación de los linfocitos T vírgenes se produce en los órganos linfáticos especializados, como son el bazo y los ganglios, en donde los linfocitos T vírgenes interactúan con las APC de manera antígeno-dependiente^{11,16}.

El reconocimiento del antígeno junto con otros estímulos activadores, induce varias respuestas en los linfocitos T, como la secreción de citocinas, la proliferación, y la diferenciación de células vírgenes en linfocitos T efectoras y de memoria¹¹. Mientras que las células vírgenes se activan sobre todo en los órganos linfáticos, las células efectoras diferenciadas pueden responder a los antígenos y actuar en cualquier tejido¹³.

Los linfocitos T de la línea CD4 + secretan citocinas y expresan moléculas en la superficie para activar a otras células del sistema inmune, los linfocitos T CD4 + se clasifican en subpoblaciones de acuerdo con su perfil de citocinas y función (Tabla 1) ¹¹.

Tabla 1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4 +¹⁷

Tipo celular	Combaten	Factor de diferenciación	Citocinas secretadas
TH1	Bacterias intracelulares y virus	IL-12	IL-2 IFN- γ
TH2	Helminetos	IL-4	IL-4, IL-5, IL-13
TH17	Bacterias extracelulares y hongos	TGF- β , IL-6	IL-17, IL-6

Los linfocitos T CD8 + virgenes se activan cuando se les presenta un antígeno a través del MHC I y reciben las señales de citocinas provenientes de los linfocitos T CD4 + cooperadores y CD4 + *reg*, estas últimas también se conocen como linfocitos T supresores debido a que se encargan de suprimir la activación del sistema inmune y así mantener una homeostasis dentro del individuo¹⁷.

Las citocinas secretadas por estos linfocitos T CD4 + generan que el linfocito T CD8 + virgen se diferencie, ya sea a linfocito T CD8 + efector citotóxico (CTL) o de memoria (Tabla 2)^{11,18,19}.

Tabla 2. Subpoblaciones de linfocitos T CD8 +^{18,19,20}

Tipo celular	Marcador	Factor de diferenciación	Factores secretados
CTL	CD8 +/CD3 +/CD25+/CD28-/CD27-	IL-2, IL, 12, INF- γ	Perforina, granzima, INF- γ
Memoria	CD8 +/CD45RO+/ CD45Ra-/CD127+	IL-7, IL-15	Bcl-2, Bcl-X L, CD95

Virgen	CD8 +/CD45RA+/CD45RO-/CD28 +/CD27+	IL-2, IL21	IL-2, IL-4
--------	---------------------------------------	------------	------------

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8 + reconocen y lisan células portadoras de epítomos no autoseguros, como células infectadas por virus, tejidos injertados o células tumorales. Sin embargo, también producen citocinas para activar a otras células y generar una respuesta de inflamación^{11,19,21}.

Mientras que los linfocitos T CD8 + de memoria son de vida larga y se generan tras la infección primaria, estas se encuentran circulando en el torrente sanguíneo (3.75 – 22.80% células totales circulantes), para mediar infecciones sucesivas^{11,19,21}.

Aunque se han realizado estudios genéticos, fenotípicos y funcionales para evaluar las vías de diferenciación de los T CD8 + estos no se han entendido completamente¹⁹.

2.2.2. Señales para la activación de Linfocitos T

Los linfocitos T reconocen complejos péptido-MHC mostrados por las APC mediante el TCR, sin embargo, existen otras proteínas de superficie que también participan en la activación de los linfocitos T conocidos como coestimuladores. El complejo formado por todas estas moeculas de superficie da inicio al proceso de activación y producen una cascada de señalización rio abajo^{11,22}.

La vía coestimuladora más conocida en la activación de los linfocitos T es aquella en donde interviene el receptor de superficie de los linfocitos T CD28, el CD28 es una proteína transmembranal homodimérica de tipo I glicosilada inida a un disulfuro, su eso es de 44kDa y se expresa en el 95% de los linfocitos CD4 y aproximadamente en el 50% de los linfocitos CD8 y sus ligandos naturales pertenecen a la familia B7 (B7-1 (CD80); B7-2 (CD86)), los cuales se expresan en la superficie de las APC (Figura 2)²².

El CD28, además de su papel en el proceso de adhesión, también participa transmitiendo señales de activación¹¹. Todas las propiedades de señalización de CD28 se basan en motivos distintos dentro de sus colas citoplasmáticas cortas que inician interacciones específicas proteína-proteína, activando así rio abajo cascadas de señalización esenciales para las funciones coestimuladoras de CD28 del TCR²³.

En ausencia de señales CD28, los linfocitos T vírgenes no se pueden activar y caen en un estado de falta de respuesta, conocido como anergia, que se caracteriza por la incapacidad de producir interleucina IL-2, ocasionando que no proliferen²⁴.

Por el contrario, el CD28 inducido por los anticuerpos agonistas o sus ligandos naturales B7.1 / B7.2 reduce el umbral de activación de las células T y conduce al aumento de los eventos de señalización de TCR necesarios para la producción eficiente de citocinas (a través de la actividad transcripcional aumentada y la

estabilización del ARN mensajero), ciclo celular progresión, supervivencia, regulación del metabolismo y respuestas de células T²⁴.

Las señales coestimuladoras a través del CD28 amplifican las vías de señal que se inducen a continuación en el receptor del linfocito T y pueden generar señales adicionales que cooperan con las señales inducidas por el complejo TCR/CD3. La PI3-quinasa se recluta en la cola citoplásmica del CD28, y este activa a su vez la quinasa prosupervivencia Akt, así como itk y PLC- γ , que pueden desencadenar señales de calcio (Figura 2B)²⁴.

El CD28 también puede contribuir a la activación de la quinasa JNK MAP a través de la proteína Rac y puede activar Ap-1 y amplificar la activación de la vía del NF- κ B (Figura 2B)^{11,22,25}.

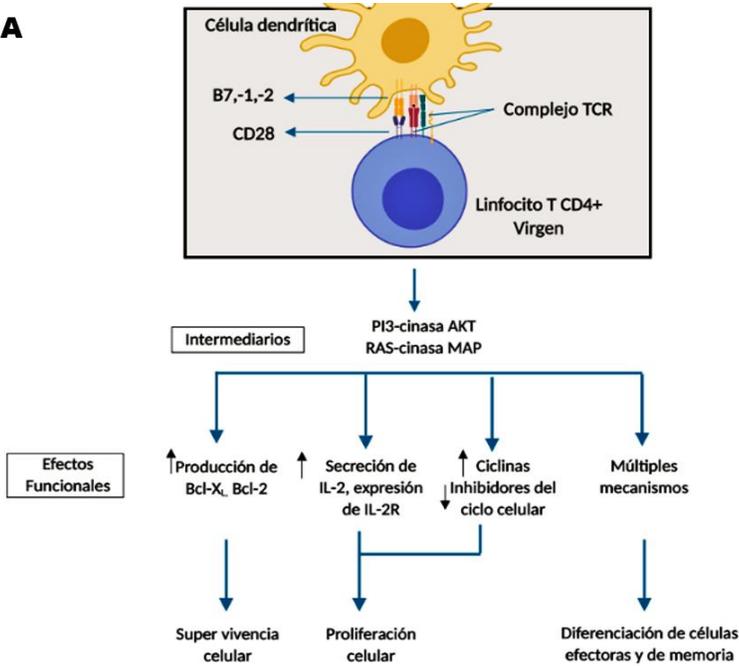
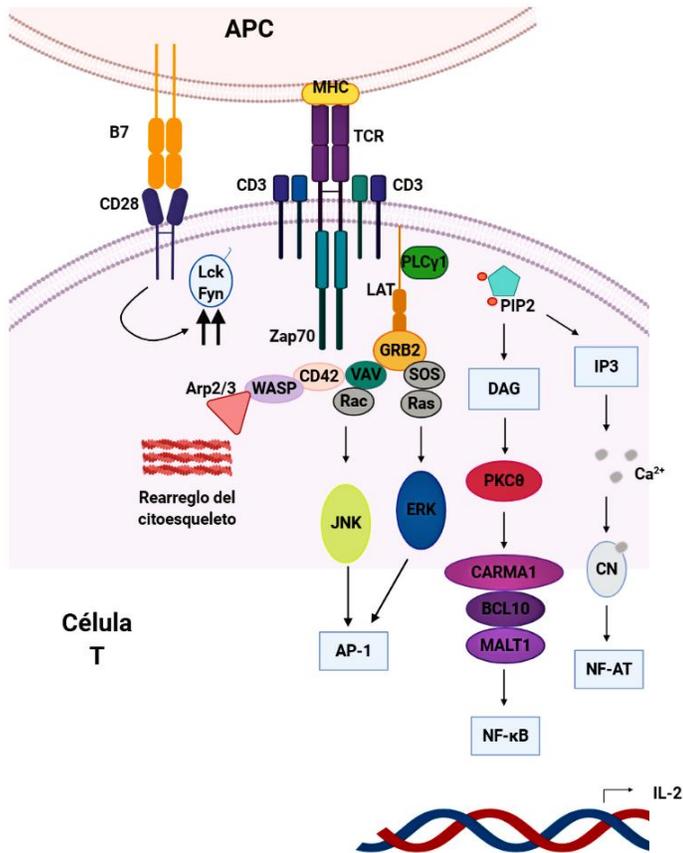
A**B**

Figura 3. Papel del CD28 y de los coestimuladores en la activación de los linfocitos T. A) El CD28 junto con el complejo formado por el TCR son indispensables para una activación eficiente de los linfocitos T, generando así la secreción de citocinas necesarias para su actividad efectora. B) CD28 amplifica las vías de señalización temprana y ayuda a desencadenar una cascada de señalización río abajo junto con el TCR. Tras el reconocimiento de los péptidos-complejos MHC por el TCR presentados en la superficie por la APC, Lck y Fyn fosforilan a CD3, y a las cadenas ζ que están unidas a Zap-70. Zap-70 fosforila a LAT que se une a PLC γ 1, lo que induce la activación de Ca²⁺/Calcineurina (CN), esta activa a NF-AT, así como a PKC θ , el cual activa a CARMA1, seguido de BCL10 y MALT1, el cual induce la activación de NF- κ B; GRB2 que al estar unido a SOS y a VAV1 activa a Ras/ERK y Rac/JNK, los cuales activan a AP-1; GRB2 y VAV1 activan CD42/WASp/Arp2/3 generando la remodelación del citoesqueleto necesaria para formar las balsas lipídicas. AP-1, NF- κ B y NF-AT trabajan en conjunto para transactivar el promotor del gen de IL-2.

El resultado final de estas vías de transmisión de señales es la mayor expresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-XI, que promueven la supervivencia de los linfocitos T; la mayor actividad metabólica de los linfocitos T; la mayor proliferación de los linfocitos T; la producción de citocinas como la IL-2; y la activación de linfocitos T *virgenes* en células efectoras y de memoria (Figura 2)¹¹.

El CTL-4 que, a diferencia del CD28, se expresa sólo de manera transitoria después de la activación de las células T, tiene la propiedad de bloquear la unión del CD28 con su receptor, la consecuencia es una inhibición de las células T al no recibir señales del CD28. La presencia diferencial de CD28 o CTL-4 favorece que el linfocito se active o se inhiba^{11,23}.

Se ha demostrado que otros receptores que pertenecen a la gran superfamilia del receptor para el factor de necrosis tumoral (TNFR) y sus ligandos, que son homólogos al factor de necrosis tumoral (TNF), estimulan e inhiben a los linfocitos T en diversas condiciones experimentales. Muchos de los receptores se expresan en los linfocitos T activados y se cree que participan en el desarrollo, mantenimiento y funciones de los linfocitos efectoras²³.

El ligando para el CD40 (CD40L o CD154) es una proteína de membrana de la superfamilia del TNF que se expresa sobre todo en los linfocitos T activados, y el CD40 es un miembro de la superfamilia del TNFR expresado en los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas. Las funciones del CD40 es el de captar

citocinas humorales para la activación de los macrófagos y mediar la presentación del antígeno ²³.

Los linfocitos T cooperadores activados expresan el CD40L, que se une al CD40 en la APC y la activa para hacerla más potente, al aumentar su expresión de moléculas B7 y la secreción de citocinas como la IL-12, que promueven la diferenciación del linfocito T^{11,23}.

Aunque en un principio las señales que actúan en la activación de los linfocitos T CD4 + y T CD8 + son las mismas, como lo es la participación del CD28, la fosforilación de Zap-70, el reconocimiento TCR al complejos del MHC, etc. Existen diferencias significativas que distinguen a ambos, a continuación nos enfocaremos a revisar la vía de activación de los linfocitos T CD8 + y los productos generados tras esta activación²³.

2.2.3. Activación de los linfocitos T CD8 +

Para que la activación de las células T CD8 + *virgenes* pueda ocurrir estas tienen que encontrarse con las APC en los órganos linfoides secundarios para efectuar la presentación de antígenos mediante el MHC I²⁶.

La vía del MHC clase I para presentar el antígeno a los linfocitos T CD8 + requiere que los antígenos proteicos estén presentes en el citosol de las células infectadas de modo que estas proteínas puedan degradarse en los proteasomas y puedan

entrar en el retículo endoplásmico a través del transportador TAP, además de que la activación completa de los linfocitos T CD8 + vírgenes y su diferenciación en CTL funcionales y linfocitos de memoria requiere de la participación de los linfocitos T cooperadores CD4 +, ya que estos proporcionan segundas señales a los linfocitos T CD8 + vírgenes¹¹.

La importancia de los linfocitos T cooperadores se observó mediante experimentos con ratones CD4 + KO que carecían de linfocitos T cooperadores. En estos ratones algunas infecciones víricas no generaban CTL eficaces ni linfocitos T CD8 + de memoria, por lo que se vio que los linfocitos T cooperadores y la producción de IL-21 y la señalización río abajo de las citocinas como IL-10 y TGF- β podían estimular la activación de los linfocitos T CD8 + efectores mediante varios mecanismos²⁷.

Estos mecanismos incluyen la expresión de diferentes citocinas para estimular a los CD8 + y la expresión del ligando de CD40 (CD40L), que puede unirse al CD40 en las células dendríticas cargadas con el antígeno. Esta interacción activa a las APC para que sean más eficientes estimulando la diferenciación de los linfocitos T CD8 +, induciendo la expresión de coestimuladores, lo cual se conoce como concesión de licencia a las APC¹¹.

Existen diferentes tipos de citocinas que son fundamentales para la activación, diferenciación y mantenimiento de los linfocitos T CD8 +, entre ellas se encuentran, la IL-2 que promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8 + en

CTL y linfocitos memoria. La IL-2 junto con la familia de los IFN de tipo I son necesarias para la diferenciación de los CTL²⁸.

Otra citocina importante es la IL-15 que promueve la supervivencia de los linfocitos T CD8 + de memoria, y se ha visto que IL-21 que es producida por los linfocitos T cooperadores, promueve la inducción de los linfocitos T de memoria y evita que ocurra el fenómeno de anergia en los CTL^{11,28}.

Muchos miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) como 4-1BB, CD27 y OX-40 son importantes señales coestimuladoras para las células T CD8 +. Otro miembro de la familia de los TNFR, la proteína relacionada con el TNFR inducida por glucocorticoides (GITR), induce una señal pro-supervivencia a las células T CD8 + efectoras para promover la expansión de las células T CD8 +.

Por otra parte, MyD88, una molécula la cual es esencial para la mayoría de las señales de TLR e IL-1 e IL-18, tiene un papel intrínseco en la expansión y supervivencia en las células T CD8 +. La señalización de TLR2 en las células T CD8 + induce la activación de la rapamicina (mTOR) en los mamíferos, lo que a su vez promueve la transcripción de T-bet y de genes citolíticos efectoros²⁶.

Además de la participación de proteínas de membrana y moléculas coestimuladoras para que los linfocitos T tengan una correcta activación se necesita de la

reorganización de la membrana celular de estos y el recambio de glicolípidos dentro de la membrana para la formación de balsas lipídicas, las cuales ayudaran a una activación eficaz y adecuada^{7,9,29,30}.

2.3. Glicolípidos

Los glicolípidos son lípidos unidos covalentemente a carbohidratos, dependiendo del glicolípido la cadena glúcida puede contener de 1 a 7 monómeros de monosacáridos diferentes, carecen de grupos fosfato y se encuentran embebidos en la membrana celular. Los glicolípidos más abundantes en los mamíferos son los GSL³.

Los GSL se localizan en las membranas celulares de los organismos desde las bacterias hasta los seres humanos, y son los principales glicanos de cerebro de los vertebrados, donde más de 80% de los glicoconjugados son glicolípidos. Los glicoesfingolípidos de inositol (GPI), forman parte de una familia distinta de glicolípidos que pueden unirse covalentemente a las proteínas y funcionan como anclas de membrana. Otra clase de glicolípidos animales son los glicoglicerolípidos, que se caracterizan por tener glicanos ligados hidroxilo del C-3 del diacilglicerol³.

El primer GSL que se caracterizó estructuralmente fue la galactosil-ceramida (GalCer), que es el más simple de los glicolípidos y también una de las moléculas más abundantes en el cerebro. Se compone de un único residuo de galactosa con

un enlace glicosídico al grupo hidroxilo localizado en el C-1 de un residuo lipídico de ceramida. Sin embargo, las variaciones de uniones a la ceramida añaden diversidad a las estructuras de glicosfingolípidos³.

Los primeros carbohidratos ligados a ceramida en los animales superiores son galactosa para generar galactosilceramida (GalCer) o glucosa para generar glucosilceramida (GlcCer) ³.

Los glicosfingolípidos se subclasifican como neutros (sin carbohidratos cargados o grupos iónicos), sialilados (que tiene uno o más residuos de ácido siálico), o sulfatados. Los glicosfingolípidos sialilados son conocidos como gangliósidos¹.

2.3.1. Gangliósidos

Los GGs son GSL sialilados que se expresan mayoritariamente en el sistema nervioso, sin embargo, también se encuentran en el exterior de la membrana plasmática de diversas células de vertebrados, incluyendo los linfocitos³¹.

Los niveles de expresión de los gangliósidos cerebrales son conocidos por cambiar drásticamente durante el desarrollo y se podría inferir que lo mismo ocurre con otros tipos celulares³¹.

En las células, los GGs se encuentran principalmente, pero no exclusivamente, en la parte exterior de la membrana plasmática. Los GGs, junto con la esfingomielina

y el colesterol son componentes integrales de microdominios de la superficie celular, que participan en el reconocimiento célula-célula, adhesión, y transducción de señales³².

Estudios recientes se han demostrado que los gangliósidos están presentes en las membranas nucleares, y ha propuesto que juegan un papel importante en la modulación de la homeostasis de calcio intracelular e intranuclear y la consiguiente función celular^{32, 33}.

Hasta ahora, se han identificado 188 gangliósidos con diferentes estructuras de carbohidratos en vertebrados. La complejidad estructural molecular aumenta de forma múltiple si se considera la heterogeneidad en los componentes lipofílicos. Esta complejidad se puede lograr gracias a la adición de cadenas de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) y Sia, lo que da como resultado varias series de gangliósidos (Figura 3) ³³.

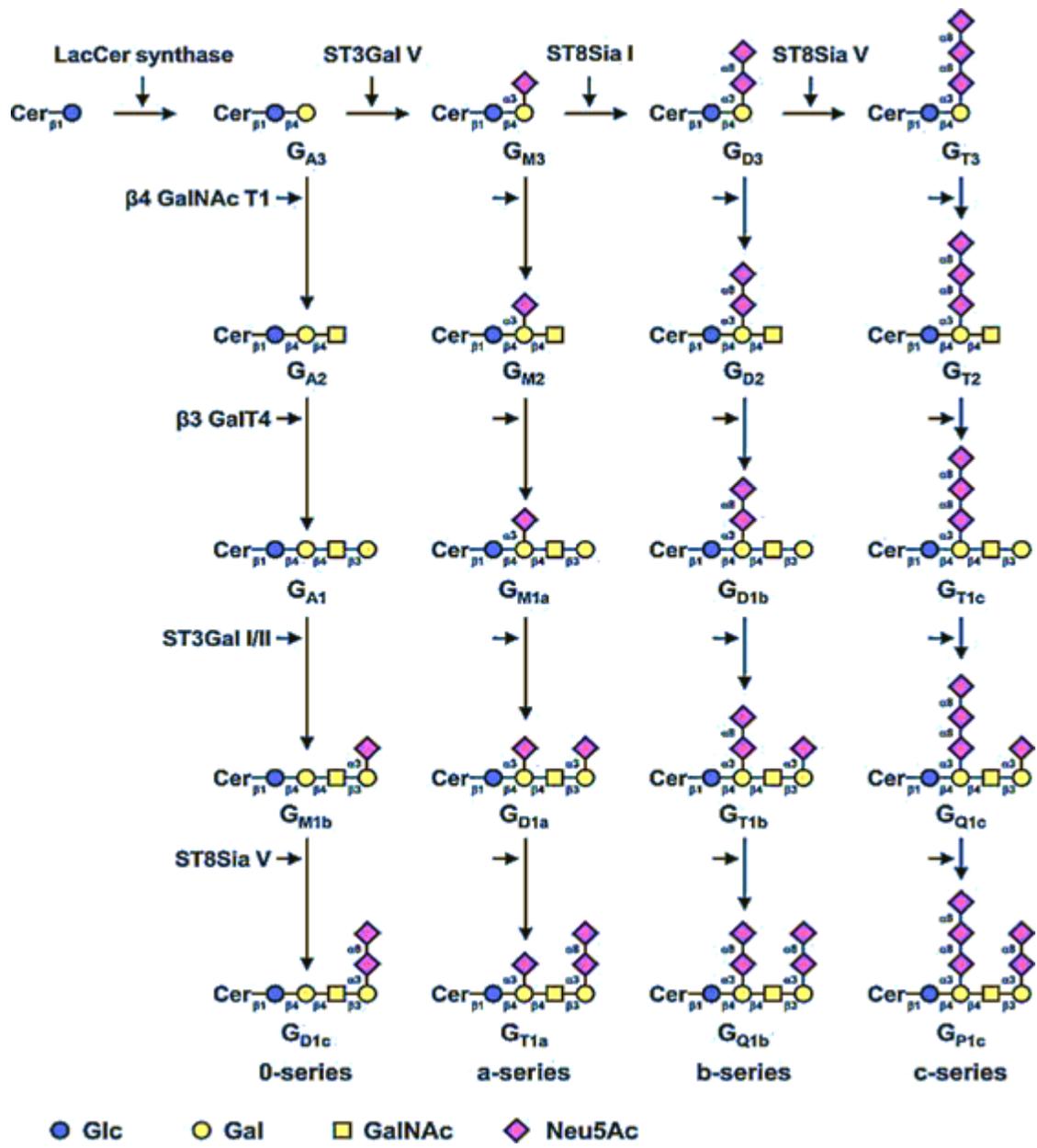


Figura 5. Ruta de síntesis de los gangliósidos La serie va desde la o- hasta la c-, dependiendo del número de residuos de ácido siálico que contenga la estructura de LacCer, siendo la 0- la que contiene menos residuos³³.

2.3.2. Biosíntesis de los gangliósidos

Los glicoesfingolípidos de los cuales están formados estos gangliósidos se sintetizan principalmente en el retículo endoplásmico y se terminan de modificar en el aparato de Golgi mediante la adición secuencial de carbohidratos adicionales a la molécula lipídica aceptora existente³¹.

La reacción es catalizada por una serie de glicosiltransferasas específicas. Con la excepción de GM4, que se deriva de galactosilceramida (GalCer), la mayoría de los gangliósidos se sintetizan a partir de lactosilceramida (LacCer). En este trabajo solo se explicará la serie de gangliósidos sintetizados a partir de este último precursor³¹.

El primer paso para la biosíntesis de los gangliósidos es la transferencia de un residuo de glucosa en una ceramida (Cer) por la β -glucosiltransferasa (GlcCer sintasa), el siguiente paso es la conversión de la glucosilceramida (GlcCer) en LacCer mediante la GlcCer β 1,4-galactosil transferasa (LacCer sintasa) que incorpora un residuo de Gal proveniente de una UDP-Gal, este paso genera el primer gangliósido de la serie "o" ³¹.

Posteriormente, se realiza la transferencia del primer residuo de ácido siálico donado por el CMP-Sia a la LacCer, esta transferencia está catalizada por la ST3Gal V (GM3 sintasa), sintetizando así el GM3, a continuación, se realiza una adición de Sia, la cual es catalizada por la ST8Sia I (GD3 sintasa) y la ST8Sia V (GT3 sintasa), para así sintetizar los GGs GD3 y GT3 respectivamente ³¹.

Estas transferasas pertenecen a una familia de sialiltransferasas específicas cada una de estas tiene alta especificidad por sustratos de glicolípidos específicos, dependiendo de la sialiltransferasa que catalice la adición del ácido siálico se van a formar los siguientes gangliósidos involucrados en la serie “a”, “b” y “c” respectivamente. Se conoce que la ST3Gal V únicamente se activa cuando reconoce a LacCer (Figura 3)^{31,34}.

Durante la biosíntesis de los gangliósidos no solo se añade el ácido siálico a las distintas series, también se agregan otro tipo de carbohidratos como es la N-acetil galactosamina (GalNAc) orquestado por la β 1,4 N-acetilgalactosamida transferasa I (GM2/GD2 Sintasa) o la galactosa (Gal) mediada por la β 1,3 galactosiltransferasa IV (GM1a/GD1b sintasa). En la tabla 3 se muestran todas las sintasas involucradas en la biosíntesis de los gangliósidos^{35,36,37}.

Tabla 3: Sintetasas participantes en la biosíntesis de los gangliósidos³⁵

GEN	NOMBRE COMÚN	PRINCIPAL ACEPTOR	ESTRUCTURA SINTETIZADA
UGCG	GlcCer sintasa	Ceramida	GlcCer
B4GALT6	LacCer sintasa	Glucosilceramida	LacCer
ST3GAL5	GM3 sintasa	Lactosilceramida	GM3
ST8SIA1	GD3 sintasa	GM3, GD3	GD3, GD2, GD1 _b , GT1 _b , GQ1 _c
ST8SIA5	GT3 sintasa	GD3, GM1 _b , GD1 _a , GT1 _b	GT3, GT2, GT1 _c , GQ1 _c , GP1 _c
B4GALNACT1	GM2/GD2 sintasa	Ga3, GM3, GD3, GT3	GM2, GD2, GT2
ST3GAL2	ST3GAL II	Galβ1-3GalNAcc-R	GM1 _b , GD1 _a , GT1 _b , GQ1 _c
ST6GAINAc3	ST6GalNac III	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNac-R	GD1 _α , GT1 _{αα} , GQ1 _{βα}
ST6GALNAC5	ST6GalNac V	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNac-R	GD1 _α , GT1 _{αα} , GQ1 _{βα}

2.3.3. Los gangliósidos en las balsas lipídicas pueden controlar la señalización

Se sabe que los gangliósidos se encuentran mayoritariamente en el exterior de la membrana plasmática, esencialmente formando parte de micro dominios enriquecidos con glucolípidos (GEM). Estos dominios se caracterizan por ser resistentes a detergentes. Junto con el colesterol, los esfingolípidos y fosfolípidos, los gangliósidos le proporcionan una estructura determinada a la membrana y el cambio cuantitativo y de calidad de los gangliósidos pueden dar modificaciones a la estructura y plasticidad de la membrana, pero más significativamente puede afectar la estructura y función de los GEM's³⁸.

Dentro de estos GEM's se han localizado gran variedad de receptores en diversas líneas celulares, por lo que se ha reportado que el rol de los GEM's asociados a los gangliósidos es la regulación de las cascadas de señalización dependiendo el estadio de la célula³⁹.

En los linfocitos T se sabe que para que ocurra una correcta activación se debe de orquestrar un gran conjunto de moléculas alrededor del TCR, formando un complejo supramolecular (SMAC's), y estudios recientes han demostrado que las balsas lipídicas están involucradas en la reorganización de este complejo SMAC formando micro dominios específicos³⁰.

En las células T en reposos los micro dominios estas enriquecidos en la zona donde se encuentran las cinasas Src, Lyn, Fyn y LAT, el co-receptor CD4 se observa en una fracción de balsa lipídica menos extendida y CD3 y las cadenas ζ se encuentran asociadas en una mínima parte a un micro dominio (Figura4) ³⁰.

La activación del linfocito T genera la activación de la cinasa Src y que cerca de la balsa se acumulen una nueva serie de substratos de tirosín-cinasa fosforilados, incluyendo las moléculas hiperfosforiladas p22 y CD3 ζ , la forma activa de ZAP 70 y la fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1) (Figura 4) ³⁰.

Aun es controversial si estos SMAC's son ricos en glicolípidos como lo son los GEM's y si en realidad son esenciales para la correcta activación de las células T, y si esto ocurre de igual manera en las células T CD4 + que en las T CD8 +³⁰.

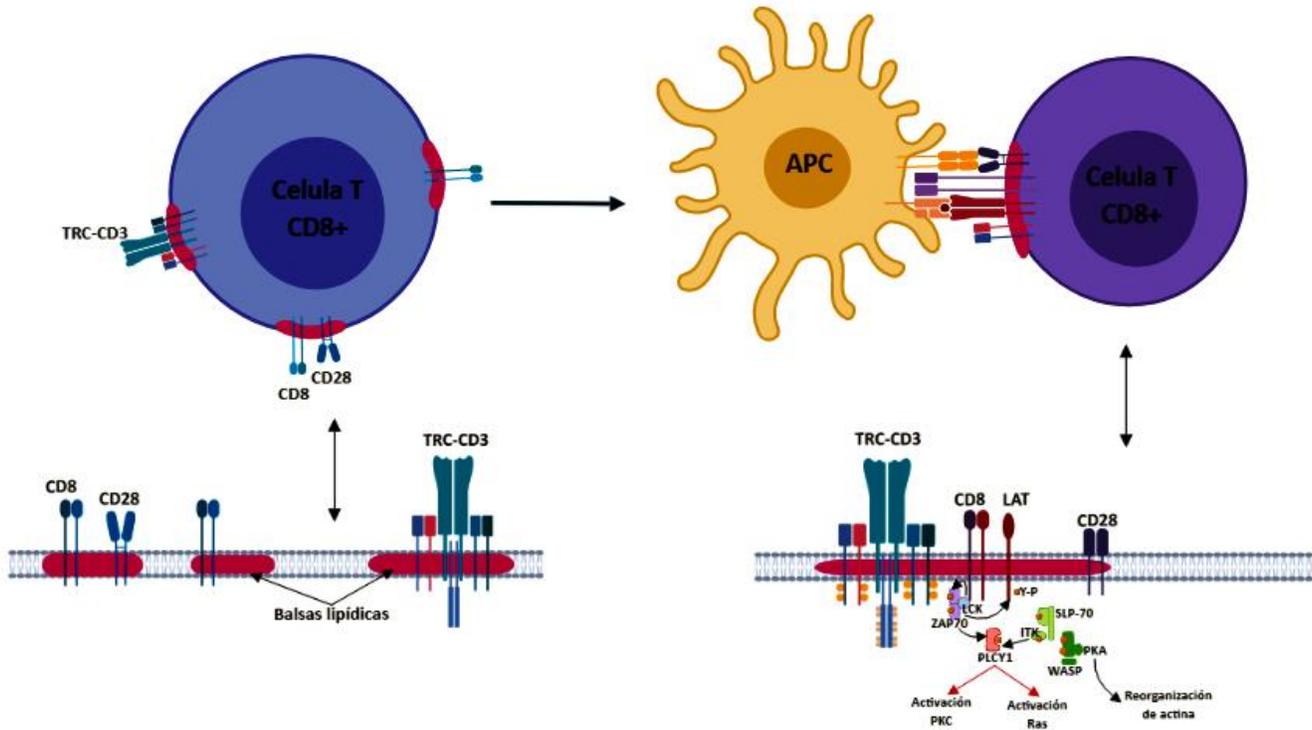


Figura 6. Esquema de la posible función de las balsas lipídicas en los linfocitos T al momento de activarse

2.3.4. Participación de los gangliósidos en la activación de los linfocitos

Como ya se ha venido diciendo a lo largo de este escrito la diferenciación y activación del linfocito está acompañada de la remodelación programada de glicanos de superficie celular, glicoproteínas y glicolípidos³⁰.

Se sabe que uno de los principales eventos que ocurren para que se pueda generar la activación de los linfocitos T es la formación de micro dominios especializados en la membrana celular o balsas lipídicas³⁰.

En los linfocitos T, las balsas lipídicas están implicadas en la señalización del receptor del antígeno de las células T (TCR) y en la localización y función de las proteínas que se encuentran próximas al receptor, tales como los correceptores CD4 y CD8, las cinasas de la familia Src Lck y Fyn, el adaptador transmembrana para la activación de las células T (LAT) y la proteína quinasa C θ ^{40,41,42}.

Se cree que la heterogeneidad de los GSL contribuye a la compartimentalización de las proteínas de la membrana en las células T en reposo y activadas, dentro de estos GSL están los gangliósidos.^{40,43}.

Se sabe que los gangliósidos participan en la remodelación de la membrana celular formando *clusters* o microdominios, pero esta remodelación de estos GSL sialilados no ocurre igual en linfocitos T CD4 + y CD8 +. Por ejemplo el *clustering* del TCR inducido por los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 necesita de la polarización del gangliósido GM1 en linfocitos T CD4 + de ratón, pero no es necesario en los linfocitos T CD8 + de ratón⁴⁰.

Esto se sabe debido a un experimento que se realizó en ratones KO, donde se inactivaron los genes de las sintasas GM3 sintasa y GM2/GD2 sintasas, y

posteriormente se midió la proliferación de los linfocitos T CD4 + y T CD8 + durante su activación, mostrando que los linfocitos T CD4 + bajaban su proliferación en ausencia de la GM3 sintasa, mientras que los linfocitos T CD8 + no se veían afectados. En contraste los linfocitos T CD8 + disminuían su proliferación cuando la GM2/GD2 sintasa no estaba presente ⁴⁰.

Adicional a esto se realizó un experimento de rescate en donde se agregaron diferentes GG's de la serie-a para observar si se podía recuperar la proliferación en los linfocitos deficientes de dicha serie. Se observó que al agregar el gangliósido GM1a se recuperaba la proliferación en los linfocitos T CD4 + de ratón, mientras que al agregar el gangliósido GM1b se observaba un rescate de la proliferación de los linfocitos T CD8 + de ratón (Figura 5) ⁴⁰.

Con esto se puede concluir que en los linfocitos T CD4 + de ratón la GM3 sintasa es importante para que estos tengan una correcta activación y que el gangliósido GM1a puede estar jugando un papel importante. Mientras que en los linfocitos T CD8 + de ratón la GM2/GD2 sintasa es importante en el proceso de activación y que el gangliósido GM1b podría estar involucrado en dicho proceso.

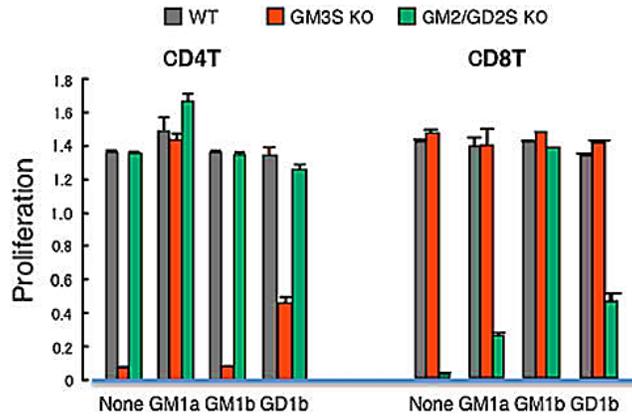


Figura 8. Activación de las células T CD4 + y CD8 +, tras la estimulación mediada por TCR. Los linfocitos T CD4 + y CD8 + WT (gris), GM3S inactivados (rojo) y GM2/GD2S inactivados (verde) de ratón fueron estimulados con anticuerpo anti-CD3 más anticuerpo anti CD28 en presencia o ausencia del gangliósido indicado y se midió su proliferación⁴⁵.

Por otra parte, se ha observado que los linfocitos T CD4 + vírgenes humanos tienen una expresión basal del gangliósido GD3, y cuando estos son activados comienza una expresión de novo de GD2 (Figura 6A, B), el cual se encuentra colocalizando con el TCR⁸.

El silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa, mostró una reducción en la proliferación post-activación y una baja expresión de IL-2, lo que se considera como una activación ineficiente (Figura 6C) ⁸.

Este hecho aún no ha sido estudiado en los T CD8 + humanos. Sin embargo, se puede plantear que el gangliósido GD2 podría influenciar en la activación de dichos linfocitos. Ya que se ha reportado que el silenciamiento de la GM2/GD2 sintasa causa el mismo efecto en los linfocitos T CD8 + de ratón.

Indirectamente se puede asumir que este es un efecto de la disminución de la expresión de GD2 aunque no se puede descartar la influencia de otros gangliósidos cuya síntesis está determinada por la GD2 sintasa^{8,44}.

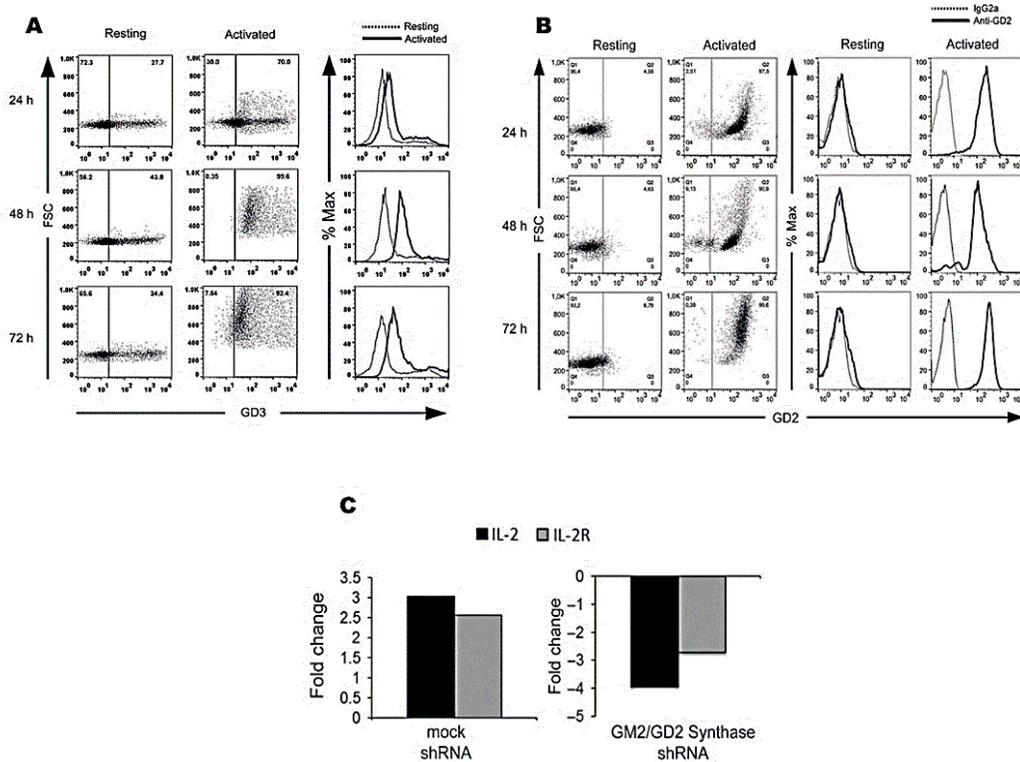


Figura 10. Expresión de los gangliósidos GD3 y GD2 en diferentes tiempos post-activación en linfocitos T CD4 + vírgenes. A) Muestra la expresión del gangliósido GD3 a 24,48 y 72h de activación en los linfocitos T CD4 + vírgenes. B) Ocurre una neoexpresión del gangliósido GD2 después 24h de activación en los linfocitos T CD4 + vírgenes. C) Se realizó un inactivados de la GM2/GD2 sintasa y se midió la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R) junto con la expresión de IL-2 para observar la proliferación celular una vez que se activaron los linfocitos T CD4+ virgenes⁸.

3. Hipótesis:

La activación del linfocito T CD8 + humano incrementa la expresión de los gangliósidos GD2 y GD3.

3.1. Objetivos Generales:

Determinar el perfil de expresión de la serie-b de gangliósidos en linfocitos T CD8 + humanos, en condiciones de reposo y activación.

3.2. Objetivos Particulares:

- Lograr estandarizar las condiciones de cultivo y de activación mediante los anticuerpos anti-CD3 + y CD28 + en los linfocitos T CD8 + humanos.
- Evaluar la expresión en membrana del gangliósido GD3 y GD2 mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos.
- Evaluar la expresión de la glicosiltransferasa GM2/GD2 sintasa, responsable de la síntesis del gangliósido GD2.
- Identificar la localización de los gangliósidos expresados y su colocalización con el TCR.

4. METODOLOGÍA

4.1. Estrategia metodológica

Purificación	<ul style="list-style-type: none">•Estandarización de la purificación y aislamiento de linfocitos T CD8 + mediante un selección negativa
Activación	<ul style="list-style-type: none">•Activación de linfocitos T CD8 + humanos totales mediante el uso de anticuerpos CD3/CD28
Citometría de flujo	<ul style="list-style-type: none">•Medición de la expresión de los gangliósidos GD3, GD2, GD1b y GT1b en los linfocitos T CD8+ humanos en reposo y activados mediante una cinetica de tiempo
PCR - Tiempo Real	<ul style="list-style-type: none">•Análisis de PCR - Tiempo real de la GM2/GD2 sintasa, responsable de la síntesis del gangliósido GD2 hadiferentes tiempos de ativación
Microscopía Confocal	<ul style="list-style-type: none">•Observar la localización del gangliósido GD2 expresado por los linfocitos T CD8 + humanos en reposo y pot-activacion mediante una cinetica de tiempo

4.1.2. Anticuerpos

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Inmunotinción de citometría de flujo y microscopía confocal.

AB PRIMARIO	DETECCIÓN	CONCENTRACIÓN	AB SECUNDARIO	CONCENTRACIÓN
Anti-GD3 humano – (R24 abcam)	GD3	5µg/mL	FITC	1ug/ml
Anti-GD2 humano (14G2a abcam)	GD2	5µg/mL	Alexa 647	0.5ug/ml
Anti-GD1b humano (A2508 TCI)	GD1b	0.5µg/mL	Alexa 647	0.5ug/ml
Anti-GT1b humano (MAB5608 Millipore)	GT1b	0.5µg/mL	FITC	1ug/ml
Anti-CD8 humano (sk1 biolegend)	CD8 +	2µg/mL	PE	N/A
Anti-CD8 humano (Hit3a)	CD8 +	N/A	PE	N/A
Anti-CD69 humano (FN50)	CD69	0.5 µg/mL	PE	N/A
Anti-TCR Alpha (ab18861 abcam)	TCR	20 µg/mL	Texas Red	0.5 µg/mL

4.2. Purificación de PMBC's

Se toman 4ml de sangre proveniente de un paquete leucocitario de un individuo sano masculino de entre 20 y 40 años y se diluyen en una concentración 1:1 en solución salina PBS 1- EDTA 2mM (PH: 7.4) estéril, posteriormente se usa una solución de sucrosa Histopaque®-1077 (*Sigma Aldrich*) para generar un gradiente de densidad centrifugando 30 min a 1500rpm a una temperatura de 22°C, después de la centrifugación de 30 min se toma el anillo de células mononucleares de sangre periférica (PMBC's) que se formó y se lava X3 con la solución salina PBS 1- EDTA 2mM durante 10 min a 250G's y por ultimo las PMBC's lavadas se resuspenden en 10 ml de medio RPMI Advance 1640 con 3% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico estreptomina y se ponen en una caja de cultivo T-75 (Corning Costal™) en la incubadora a 37°C con un 5% de CO2.

4.3. Purificación de Linfocitos T CD8 +

A partir de las PMBC's se sigue el protocolo del Kit MACS de aislamiento mediante selección negativa de linfocitos T CD8 + totales (Miltenyi™) , donde se incuban las PMBC's con anticuerpos específicos (10 µL por cada 10⁷ células) los cuales se unen a todo el grupo de células mononucleares, exceptuando a los linfocitos T CD8 + y se deja incubando 5 min a 4°C, posteriormente las PMBC's se incuban por 10 min a 4°C con perlas de separación magnéticas (20 µL por cada 10⁷ células) las cuales se uniran a los anticuerpos del primer paso.

Se realizó un lavado con buffer MAC's después de la incubación de las perlas magnéticas de separación, llevando a las células a un volumen final de 500 μ L y centrifugando a 250 G's por 10 min a 4°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de buffer MAC's, para después pasar las células por una columna de separación previamente lavada.

Para el análisis de pureza de la población aislada, se realizó una incubación con anticuerpos anti-CD8 humano conjugado a fluorescencia (sk1 biolegend™) con las concentraciones que se muestra en la tabla 2, la muestra se preparó como se comenta en el apartado 3.5 para realizar una citometría de flujo.

4.4. Activación de Linfocitos T CD8 +

La activación de los linfocitos T CD8 + se realizó mediante el uso de anticuerpos anti CD3/CD28 humano. En una placa de 24 pozos se lavó X3 con PBS, posteriormente se agregó en cada pozo 500 μ L de PBS y 1 μ g/mL de anticuerpo anti-CD3 humano OKt3 (biolegend™) y se dejó incubando a 38°C con 5% de CO₂ durante 2 h, posteriormente se retira el PBS con el anticuerpo y se lava X3. Se agregan 500 μ L de medio con linfocitos T en una concentración aproximada de 2×10^5 células/mL, después se agrega 0.5 μ g/mL del anticuerpo anti-CD28 humano CD28.2 (eBioscience™) y se deja incubando según la cinética de activación a utilizar (1,3,6 y 12h o 24,48 y 72h).

4.5. Citometría de Flujo de los gangliósidos

Los linfocitos T CD8 + totales y fueron lavadas 2 veces con 150 μ L de PBS 1(NaCl 138mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM en 1L de agua destilada) a una centrifugación de 1500rpm durante 5 min a una temperatura de 4°C y fijadas con paraformaldehido (PFA) 4% durante 20 min.

Las células fueron distribuidas para su tinción en una placa de fondo redondo de 96 pozos (Corning Costal™). Posteriormente las células fueron lavadas 2X con 150 μ L de PBS, posteriormente se les coloco 50 μ L del anticuerpo primario en las concentraciones que se muestra en la tabla 2 y se dejaron incubando a 4°C durante una hora, en caso de que el anticuerpo primario estuviera acoplado a un fluoroforo solo se incubo por 40 min. Las células volvieron a ser lavadas 2X con 150 μ L de PBS, para después agregarles 50 μ L del anticuerpo secundario en las concentraciones que se ve en la tabla 2 y se dejaron incubando a 4°C durante media hora. Se realizaron otros 2 lavados de 150 μ L con PBS para posteriormente pasar cada una de las muestras que contenían los pozos a tubos de citometría para hacer el análisis en un citómetro de flujo FACScannto II™, donde se pasaron cinco mil eventos por muestra.

4.6. Análisis de la β Gal41T sintasa mediante PCR-Tiempo Real

Los linfocitos T CD8 + humanos totales con diferentes tiempos de activación (3,6,12 y 24h) fueron procesados mediante el protocolo de TRIzol[®] reagent (*ambient by technology*), para la extracción de RNA y posteriormente ser procesado para generar cDNA mediante el protocolo del kit Maxima H Minus Reverse Transcriptase[®] (Thermo Scientific), a continuación, se realizó una qPCR siguiendo el protocolo de kit SYBR green qPCR master mixes (Thermo Scientific) utilizando los oligos: 5'AGTGGTGGACTTGCCCGAAT 3' sentido y 5'GCCAGAACACAGGTGTCGTGAA 3' antisentido para el gen *housekeeping* EF1- α y 5' GGTCAGGAGGTATACCAG GT 3' sentido y 5' GCTGACAAGGGTGAGATC TG 3' anisentido para el gen β Gal41T, utilizando 1 μ L de cDNA para la reacción. Los ciclos de reacción se realizaron bajo los siguientes parámetros: 1) desnaturalización inicial de 95 ° C durante 10 min, 2) desnaturalización 95 ° C durante 15 s y 3) apareamiento a 60 °C durante 60 s. Los resultados fueron analizados mediante el método $\Delta\Delta Cq$. Las determinaciones se realizaron por triplicado para confirmar la reproducibilidad.

4.7. Análisis de inmunofluorescencia mediante microscopia confocal

Los linfocitos T CD8 + totales con diferentes condiciones experimentales (3,6,12 h post activación) fueron teñidos con el anticuerpo anti-GD2 14G2a y anti-TCR Alpha para observar la localización del gangliósido GD2 y TCR, respectivamente, en las células con las diferentes condiciones.

Después de la purificación y de la activación de los linfocitos T CD8 + humanos, las células fueron colectadas de cultivo y lavadas con PBS, posteriormente fueron fijadas con PFA 4% por 20 min y se dejaron incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-GD2 14G2a.

Posteriormente las células fueron lavadas 3X con PBS y se dejaron incubando 2 h a 4°C con el anticuerpo secundario Alexa 647. Se volvieron a hacer 3 lavados con PBS y se realizó una incubación de 2 h con el anticuerpo anti-TCR Alpha a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó el anticuerpo secundario Texas Red durante 1hr a 4°C y por último se realizaron otros 3 lavados con PBS y se incubó 15 min el anticuerpo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 4°C, finalmente se hacen 3 lavados con PBS y se montó la muestra en un porta objetos con 5% de glicerol. Posteriormente esta muestra se analizó en el microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico y las imágenes fueron procesadas con el software Fiji.

5. RESULTADOS

5.1. Verificación de pureza y activación de los linfocitos T CD8 + humanos totales

Se realizó una purificación de sangre para obtener PMBC's siguiendo el protocolo de sucrosa Histopaque®-1077 (*Sigma Aldrich*), y posteriormente una purificación de PMBC's para obtener linfocitos T CD8 + totales, los cuales fueron sembrados en placas de 24 pozos. A continuación, fueron sometidos a condiciones de reposo (control) y activación mediante la adición de 1µg/mL de anticuerpo anti-CD3 humano OKT3 y 0.5µg/mL del anticuerpo anti-CD28 humano clona CD28.2 (*eBioscience™*) y se dejaron incubando a diferentes tiempos (12,24,48 y 72 h).

A continuación, las células fueron teñidas con el anticuerpo anti-CD8 + clona SK1 (*biolegend*) para corroborar mediante citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T CD8 + humanos totales. Se observa en la figura 7A que se obtuvo una pureza máxima de 90% (inmediatamente después de la purificación).

Posteriormente, en la gráfica de la Figura 7B se muestran las células 12 h en cultivo y se observa un decremento en la pureza de las células activadas, esto es debido a que el receptor CD8 + se endocita después de la activación. Esas mismas células fueron teñidas con el anticuerpo anti-CD69 (FN50), el cual es un marcador de activación temprana, y que nos ayuda a determinar el porcentaje de células que se activaron después de la incubación con los anticuerpos anti CD3 + clona OKT3 y

anti CD28 + clona CD28.2. En la figura 7B, se puede observar que se alcanzó a las 12 h post-activación un 60% de células positivas para CD69+, también se comprobaron las agregaciones de las células activadas mediante microscopia (Figura suplementaria 1).

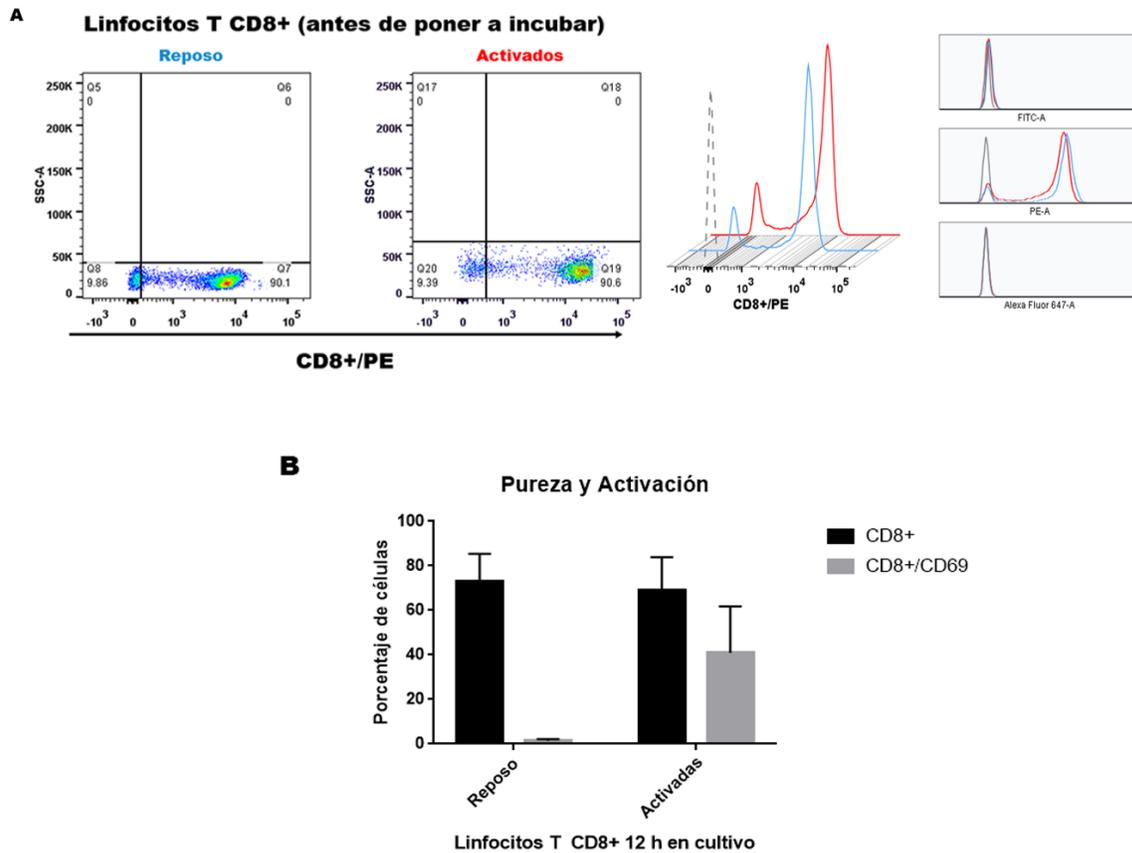


Figura 12. Comprobación de la pureza y activación de los linfocitos T CD8 +. A) Citometría de flujo de los linfocitos T CD8 + después de la purificación, muestra un 90% de pureza, la cual se midió mediante la tinción del anticuerpo anti-CD8+ (SK1). B) Grafica de los linfocitos T CD8 + en reposo y activados después de 12 h en cultivo. La pureza se midió con un anticuerpo anti-CD8+ y la activación con un anti cuerpo anti-CD69 (activación temprana). Los datos son la media \pm S.D. de 6 experimentos independientes.

5.2. Caracterización de gangliósidos post-activación

Una vez comprobada la pureza de los linfocitos T CD8 + totales humanos, estos fueron sembrados en cajas de 24 pozos en donde fueron inducidos en condiciones de reposo o de activación.

Una vez cumplido el tiempo de activación los linfocitos T CD8 + totales (12, 24, 48 y 72 h) fueron teñidos conforme a la metodología del apartado de 4.5, en donde se utilizaron los anticuerpos anti-GD3 (R24), anti-GD2 (14G2a), anti-GD1b (A2508) y anti-GT1b (MAB5608). Posteriormente, fueron analizados mediante citometría de flujo (BD FACSCanto™) observando lo siguiente:

- Ocurrió, en comparación de las células en reposo una disminución del porcentaje de células positivas para el gangliósido GD3 en los linfocitos T CD8 + humanos totales activadas 12, 24 y 72 (Figura 8A).
- Con respecto al gangliósido GD2, en los linfocitos T CD8 + 12 h post-activación se observa una neoxpresión de este gangliósido en un 50% del total de las células, en comparación con los linfocitos T CD8 + en reposo (dato significativo, $p < 0.05$) (Figura 8A). Sin embargo, conforme pasa el tiempo la expresión del gangliósido GD2 va disminuyendo.
- En las células teñidas para el gangliósido GD1b no se observa en ningún tiempo alguna diferencia significativa entre las células activadas y en reposo.

- Para linfocitos T CD8 + humanos totales teñidos para el gangliósido GT1b se observa un incremento significativo a las 24 horas post-activación en las células activadas en comparación con las células en reposo (Figura 8A). En los tiempo posteriores no se logró realizar una replica del experimento, por lo que no se realizó una estadística para observar significancia .

Para analizar la Intensidad media de fluorescencia (IMF) se realizó un análisis de valor relativo del estímulo (células estimuladas/células en reposo) para eliminar el error de medición entre cada replica, por lo que si el valor es igual a 1 significa que no hubo cambio en la expresión del gangliósido, >1 la IMF de las células activadas aumentó con respecto a las células en reposo, y <1 en la IMF de las células activadas disminuyó con respecto a las activadas (Figura 8B).

Siguiendo este análisis no se observa algún cambio significativo en la IMF de las células activadas con respecto a los linfocitos T CD8 + humanos totales en el gangliósido GD3. Sin embargo, en los linfocitos T CD8 + humanos totales activados se ve un aumento significativo de la IMF en el gangliósido GD2 en comparación con las células en reposo, a las 12, 24 y 48 h (Figura 8B).

En la IMF del gangliósido GD1b en los linfocitos T CD8 + humanos no se ve alguna diferencia significativa, mientras que en la IMF de las células teñidas para GT1b se

observa un aumento a las 12 y 72 h post-activación en los linfocitos T CD8 + humanos totales en comparación con los linfocitos en reposo (Figura 8B).

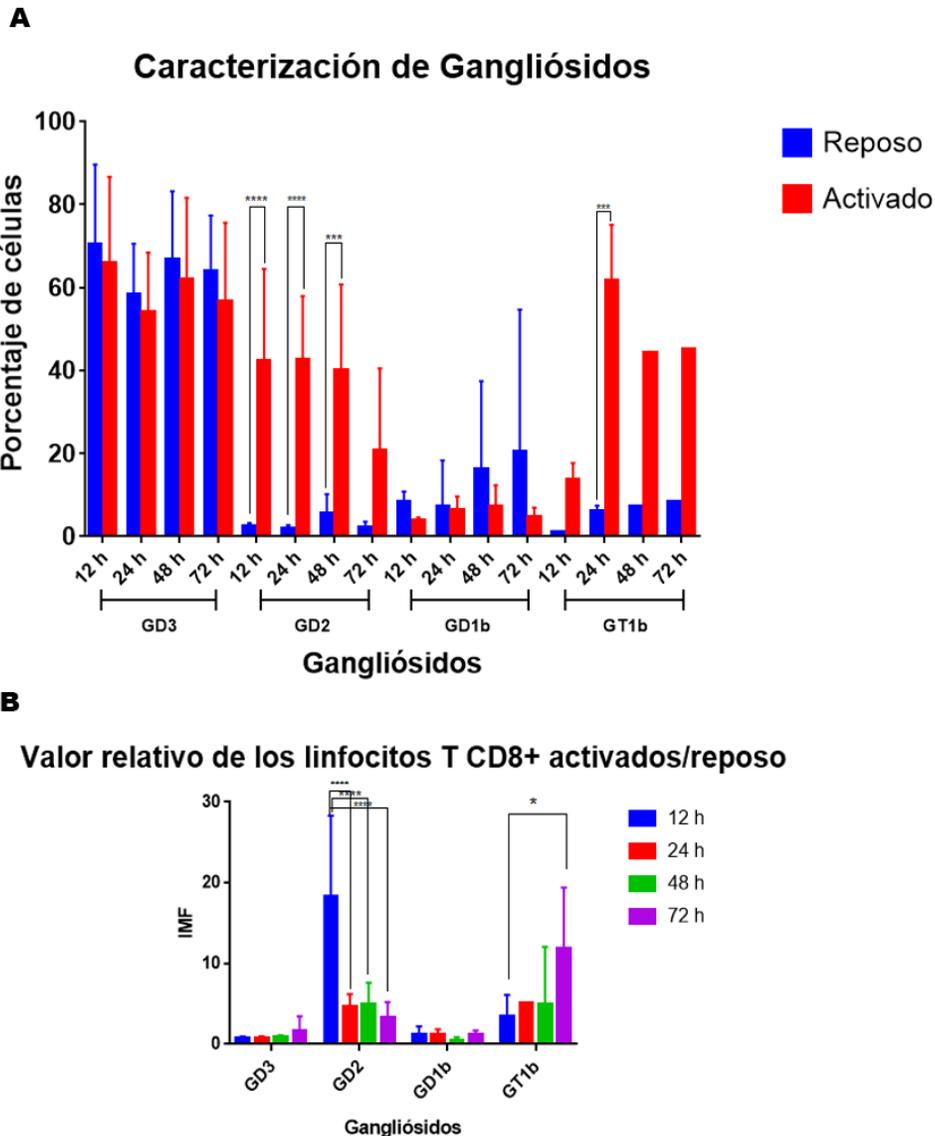


Figura 14. Caracterización de la serie “b” de gangliósidos en linfocitos T CD8 +. A) Porcentaje de células positivas para los diferentes gangliósidos de la serie “b” a 12, 24, 48 y 72 h en reposo y post-activación. El análisis se realizó mediante el método de ANOVA de 2 vías con una $p < 0.05$, los datos son la media \pm D.S. de 6 experimentos independientes B) Valor relativo del estímulo (células activadas/ células en reposo) de la IMF de los diferentes gangliósidos de la serie “b” a 12, 24, 48 y 77 h en reposo y post-activación. El análisis de la gráfica se realizó mediante la prueba de ANOVA de 2 vías con una $p < 0.05$, los datos son la media \pm S.D. de 6 experimentos independientes

5.3. Sobre expresión de la sintasa β -Gal41T a las 6h post-activación

Posteriormente, se quiso analizar la expresión de la sintasa encargada de sintetizar el gangliósido GD2 en horas tempranas de activación, para así saber si esta se encontraba expresada de manera basal en los linfocitos T CD8 + humanos totales y si su expresión aumentaba con la activación como ocurre con los linfocitos T CD4 + humanos⁸.

Se aislaron PMBC's a partir de sangre periférica humana (Buffy Coat de individuo masculino sano) y posteriormente se procedió a la purificación con el Kit MACS de aislamiento de linfocitos T CD8 + totales (Miltenyi™) para adquirir linfocitos T CD8 +, los cuales, posteriormente fueron activados con el protocolo antes mencionado y colectados a 3, 6, 12 y 24 h post-activación.

Al finalizar cada uno de los tiempos de activación, los linfocitos fueron procesados mediante el protocolo de extracción de RNA de TRIzol® Reagent, posteriormente se usó el Kit Maxima H Minus Reverse Transcriptase® para la obtención de cDNA de los linfocitos T CD8 + totales humanos a los cuales se les realizó una qPCR para medir la expresión del gen codificante para la enzima β 1,4-N-acetil-galactosil-transferasa (GM2/GD2 sintasa), encargada de sintetizar el gangliósido GD2 mediante la metodología de SYBR-green.

Se observó que la expresión de *B4GALT1* se encuentra de forma basal en las células en reposo y permanece de esa forma durante las primeras 3 h post-

activación. Sin embargo, a las 6 h la expresión disminuye por la mitad aproximadamente.

Posteriormente, a las 12 h post-activación esta expresión incrementa al doble en comparación con el nivel basal y se mantiene así durante las 24 h post-activación (Figura 9).

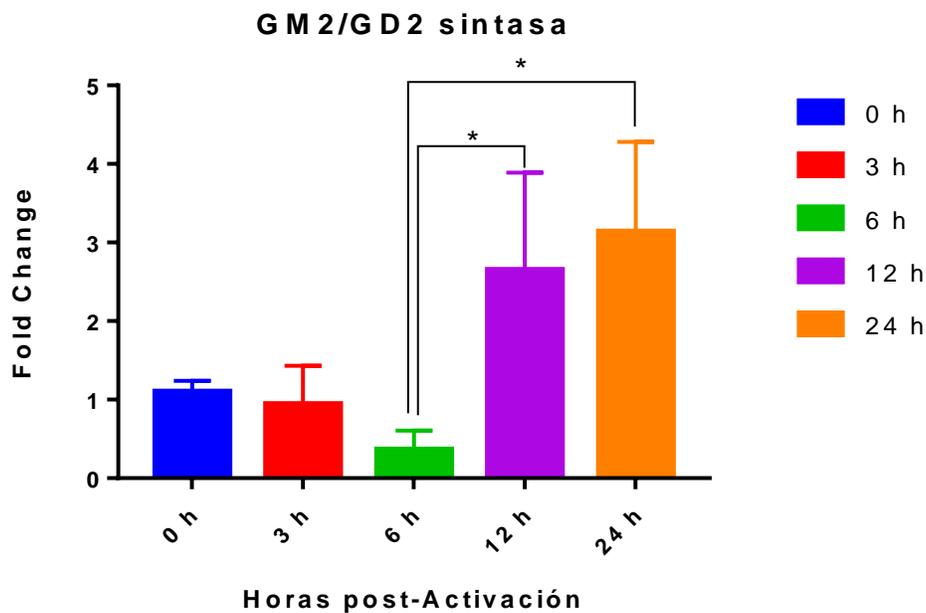


Figura 16. Expresión de la GM2/GD2 sintasa analizada mediante qPCR, la expresión de B4GALT1 en los linfocitos T CD8+ humanos totales se ve disminuida a las 6 h post-activación (verde), este dato es significativo al compararlo con las 12 y 24 h post-activación (morado y naranja respectivamente), debido a que es cuando se ve un mayor incremento en la expresión de la B4GALT1. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con múltiple comparación con una $N=3 \pm S.D$ y un $p<0.05$.

5.7. Localización del gangliósido GD2 en los linfocitos T CD8 + humanos totales

Para observar si existe una colocalización entre el TCR y el gangliósido GD2 cuando los linfocitos T CD8 + se activan al igual que con los linfocitos T CD4 + vírgenes se realizó una inmunotinción en los linfocitos T CD8 + humanos totales en estado de reposo a 3, 6, 12 y 24 h post-activación, en donde se utilizó Dapi (4',6-diamidino-2-fenilindol), para observar el núcleo de la célula, el anticuerpo anti-GD2 clona 14g2a para observar el gangliósido GD2 y el anticuerpo anti-TCR Alpha para observar el TCR.

Se encontró que en las células T CD8 + en reposo el TCR se ubica en la periferia de la célula y que, no tenían la presencia de GD2 (Figura 10A). En los linfocitos activados el TCR se encuentra polarizado en la célula formando un *cluster*, mientras que se observa la presencia del gangliósido GD2 distribuido por toda la célula (Figura 10A).

A las 6h en cultivo las células en reposo muestran el TCR distribuido por toda la célula, mientras que no se observa presencia de GD2, en las células 6 h post-activación se sigue observando la polarización del TCR en la célula activada formando *clusters* más disgregados y el gangliósido GD2 comienza una polarización hacia el TCR (Figura 10B).

Posteriormente podemos observar a 12 h en las células en reposo el mismo patrón mostrado en las células de 3 y 6 h en reposo, mientras que en las células 12 h post-activación se observa la polarización total del GD2 con el cluster del TCR, sin embargo, estos no llegan a colocalizar como se había observado en los linfocitos T CD4 + vírgenes humanos (Figura 10C).

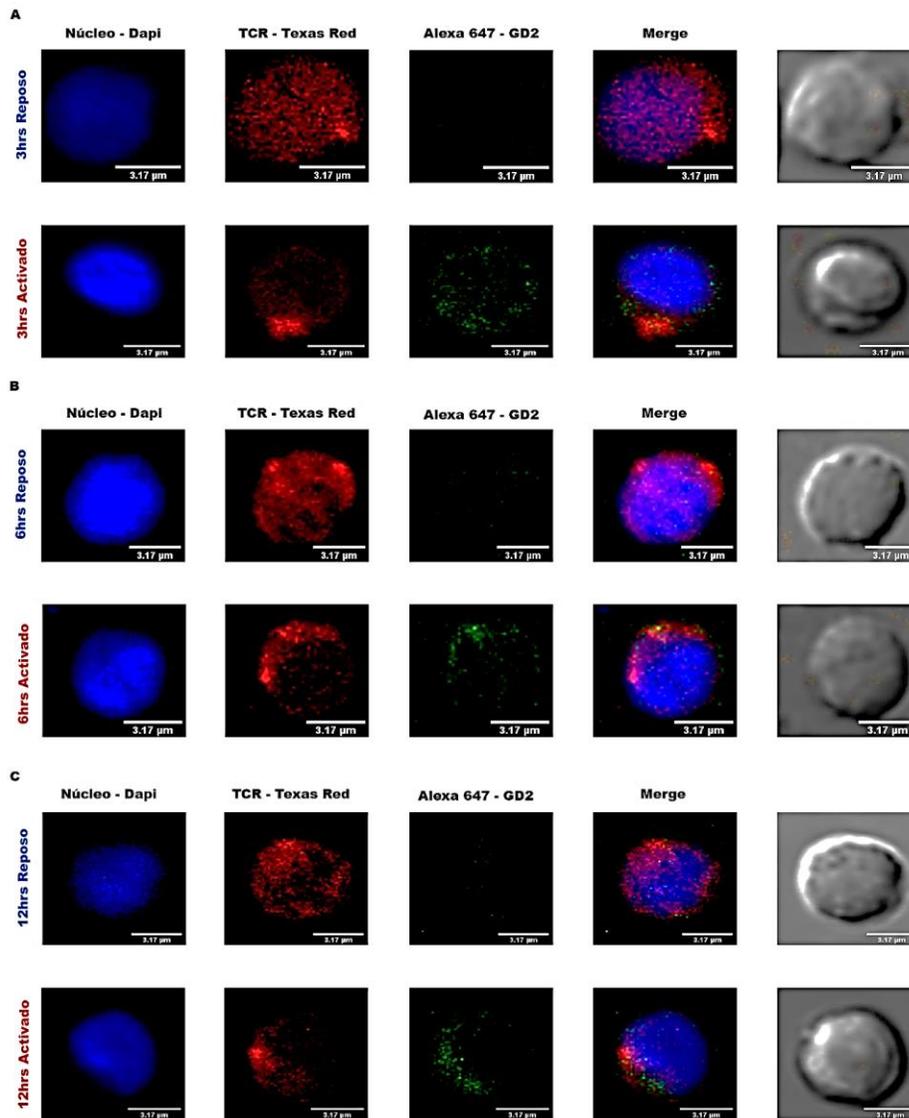


Figura 18. Caracterización del gangliósido GD2 con respecto al TCR mediante microscopía confocal, Se observa teñido de rojo el TCR, verde el gangliósido GD2 y azul el núcleo en los diferentes tiempos (3,6,12 h) de las células en reposo y activadas

6. Discusión y conclusiones

El estudio de la activación de los linfocitos T es importante debido a que son un componente importante dentro del sistema inmune, ayudan a combatir agentes extraños patógenos, células cancerígenas y en el caso de que hubiera una activación desregulada o ineficiente el organismo podría presentar enfermedades autoinmunes. En este trabajo nos enfocamos a estudiar la participación de los gangliósidos en dicha activación.

Se observó el perfil de expresión de los gangliósidos en los linfocitos T CD8 + humanos totales en donde encontramos ocurre un decremento del gangliósido GD3 en las células activadas a partir de las 12 h. a diferencia de los linfocitos T CD4 + humanos, ya que en estos el gangliósido GD3 aumenta⁸. Sin embargo, la disminución del GD3 en los linfocitos T CD8 + signifique que este este dejando de ser sintetizado, la disminución se podía deber a que está siendo procesado más rápido de lo que se sintetiza.

La hipótesis anterior se diseñó basándonos en que en los linfocitos T CD8 + activados a las 12 h se observa una neoexpresión del gangliósido GD2, el cual es el sucesor del GD3. Sin embargo, no todos los linfocitos T CD8 + logran expresar GD2 (solo un 60-70% de las células) y después de las 48 h post- activación se observa un decremento del gangliósido GD2, en comparación con los linfocitos T CD4 + humanos, ya que en estos el GD2 se encuentra incrementando hasta las 72

h que se midió y casi un 100% de las células llegan a ser positivas para este gangliósido⁸.

Podemos pensar que la disminución del gangliósido GD2 se debe a la misma razón por la que el GD3 está disminuyendo, este está siendo procesado más rápido de lo que es sintetizado, ya que cuando se mide el gangliósido GD1b (sucesor del GD2) este no muestra ninguna neo-expresión y se mantiene como en las células en reposo, sin embargo, en su sucesor el GT1b si muestra una neo-expresión a desde las 48 h de en las células activas e incrementa a las 72. Por lo que nos ayuda a confirmar que el gangliósido GD1b si se esta sintetizando, pero se procesa inmediatamente a GT1b, por lo que no lo podemos observar mediante las citometrías en los tiempos de la cinética.

Mediante un experimento de qPCR se encontró que la GM2/GD2 sintasa se encuentra expresada de manera basal en los linfocitos T CD8 + humanos totales. Sin embargo, el gangliósido GD2 no se encuentra presente en estas células, lo que nos podría llevar a pensar que la sintasa se encuentra inactivada mediante algún factor de regulación, como podría ser la fosforilación. Recordemos que esto mismo se reportó en los linfocitos T CD4 + vírgenes, por lo que se podría suponer que esta sintasa esta siendo inhibida de la misma forma en ambos modelos⁸.

En los linfocitos T CD8 + humanos totales activados se observa un decremento de la GM2/GD2 sintasa a las 6 h post-activación y posteriormente esta expresión

incrementa a las 12 y 24 h post-activación. Si se compra el análisis de la expresión de la GM2/GD2 sintasa de los linfocitos T CD8 + humanos totales con los linfocitos T CD4 + vírgenes humanos el patron de expresión es muy similar (Figura 11).

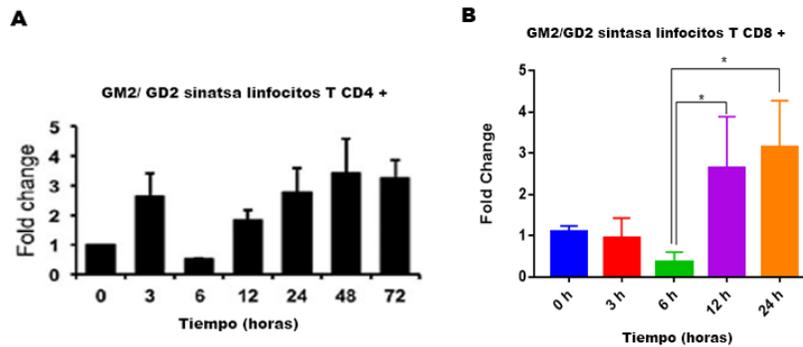


Figura 20. Comparación de la GM2/GD2 sintasa en los linfocitos T CD4 + vírgenes humanas vs los linfocitos T CD8 + totales humanos. A) Gráfica de la qPCR reportada por Villanueva C. et.al. 2016. B) Gráfica de la medición de la GM2/GD2 sintasa mediante qPCR realizando una cinética a 0,3,6,12 y 24 h post-activación.

El incremento de la GM2/GD2 sintasa a las 12 h se podría deber a que esta sintasa también es la encargada de sintetizar otros gangliósidos de la serie-o, a y c además del GD2. Esto nos podría explicar por qué a pesar de que a las 24 h por citometría de flujo se ve un decremento del gangliósido GD2 en los linfocitos T CD8 + humanos totales la sintasa se ve aumentada.

Otra explicación podría ser que el gangliósido GD2 esta siendo sintetizado en mayor cantidad. Sin embargo, este se encuentra siendo procesado de una forma mas eficaz para formar los GGs subsecuentes de su serie como es el caso de GT1b a partir de las 12h post-activación como ya se haber mencionado con anterioridad.

Con los resultados que se obtuvieron sobre la neo-expresión del gangliósido GD2 que se observó en los linfocitos T CD8 + humanos totales, no podríamos deducir si esta neo-expresión hace la misma función que en los linfocitos T CD4 + vírgenes. Sin embargo por microscopía confocal desde las 6 h post-activación se observa una polarización del gangliósido GD2 hacia el *cluster* del TCR, lo que nos podría llevar a inferir que el gangliósido GD2 tienen un papel importante en la activación mediante el TCR, aunque no colocaliza.

De este trabajo se podría concluir que el gangliósido GD2 parece ser importante para que los linfocitos T CD8 + humanos tengan una correcta activación.

Como perspectivas a futuro para este trabajo se considera el estudio de la GM2/GD2 sintasa para encontrar el factor de porque el gangliósido GD2 no se encuentra presente en los linfocitos T CD8 + humanos totales en reposo a pesar de que la sintasa está presente, también determinar la función del gangliósido GD2 dentro de la activación de los linfocitos T CD8 + humanos totales mediada por TCR.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Taylor, K. D. *Introduction to Glycobiology*.
2. Kwak, D. H. *et al.* Dynamic changes of gangliosides expression during the differentiation of embryonic and mesenchymal stem cells into neural cells. *Exp. Mol. Med.* (2006). doi:10.1038/emm.2006.79
3. Ferguson, M. A., Kinoshita, T. & Hart, G. W. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 11. Figure 11.6* (2009). doi:10.1016/S0962-8924(00)01855-9
4. Yanagisawa, K. Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 1943–1951 (2007).
5. Misasi, R. *et al.* Gangliosides and autoimmune diabetes. *Diabetes. Metab. Rev.* **13**, 163–79 (1997).
6. full-text.
7. Comelli, E. M. *et al.* Activation of Murine CD4+ and CD8+ T Lymphocytes Leads to Dramatic Remodeling of N-Linked Glycans. *J. Immunol.* **177**, 2431–2440 (2006).
8. Villanueva-Cabello, T. M., Mollicone, R., Cruz-Muñoz, M. E., López-Guerrero, D. V & Martínez-Duncker, I. Activation of human naïve Th cells increases surface expression of GD3 and induces neoexpression of GD2 that colocalize with TCR clusters. *Glycobiology* **25**, 1454–1464 (2015).
9. Swamy, M. *et al.* A Cholesterol-Based Allosteric Model of T Cell Receptor

- Phosphorylation. *Immunity* **44**, 1091–1101 (2016).
10. Inokuchi, J. I., Nagafuku, M., Ohno, I. & Suzuki, A. Distinct selectivity of gangliosides required for CD4 + T and CD8 + T cell activation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* (2015). doi:10.1016/j.bbali.2014.07.013
 11. Lichtman, A. A. K. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier **8^a ed.**, (2005).
 12. Mutschler, E., Schaible, H.-G. & Vaupel, P. Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* **6.Auflage**, 677–689 (2015).
 13. Delves, P. J. & Roitt, I. M. The Immune System. *N. Engl. J. Med.* **343**, 37–49 (2000).
 14. Kuo, C. T. & Leiden, J. M. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 149–187 (1999).
 15. Garcia, K. C., Teyton, L. & Wilson, I. A. STRUCTURAL BASIS OF T CELL RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 369–397 (1999).
 16. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. The major histocompatibility complex and its functions. (2001).
 17. Guzmán-Flores, J. M. & Portales-Pérez, D. P. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Gac. Med. Mex.* **149**, 630–638 (2013).
 18. Araki, K. *et al.* mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**, 108–112 (2009).
 19. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Flores-Vergara, H., Mandoki, J. J. & Lopez-Gonzalez, J. S. Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*

- 47**, 361–371 (2005).
20. Hamann, D. *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1407–18 (1997).
 21. Berard, M. & Tough, D. F. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology* (2002). doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01447.x
 22. Alegre, M.-L., Thompson, C. B. & Gajewski, T. F. Second Signals for Lymphocyte Activation. in *Encyclopedia of Immunology* 2145–2151 (Elsevier, 1998). doi:10.1006/rwei.1999.0542
 23. Porciello, N. & Tuosto, L. CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **28**, 11–19 (2016).
 24. Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: A quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology* **3**, 939–951 (2003).
 25. Simon-Molas, H. *et al.* PI3K–Akt signaling controls PFKFB3 expression during human T-lymphocyte activation. *Mol. Cell. Biochem.* **448**, 187–197 (2018).
 26. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**, 161–8 (2011).
 27. Wang, C., Singer, M. & Anderson, A. C. Molecular Dissection of CD8+ T-Cell Dysfunction. *Trends Immunol.* **38**, 567–576 (2017).
 28. Bedoui, S., Heath, W. R. & Mueller, S. N. CD4 + T-cell help amplifies innate signals for primary CD8 + T-cell immunity. *Immunol. Rev.* **272**, 52–64 (2016).
 29. Chyu, K.-Y. *et al.* Cholesterol Lowering Modulates T Cell Function In Vivo and In Vitro. *PLoS One* **9**, e92095 (2014).

30. Alonso, M. A. & Millán, J. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* **114**, 3957–65 (2001).
31. Yu, R. K., Tsai, Y.-T., Ariga, T. & Yanagisawa, M. Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *J. Oleo Sci.* **60**, 537–544 (2011).
32. Ledeen, R. W. & Wu, G. *Thematic Review Series: Sphingolipids*. Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *J. Lipid Res.* **49**, 1176–1186 (2008).
33. Hakomori, S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr. Opin. Hematol.* **10**, 16–24 (2003).
34. Hakomori, S. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 325–46 (2008).
35. Ajit Varki Jeffrey Esko, Hudson Freeze, Gerald Hart, Jamey Marth, R. C. *Essentials of Glycobiology*. *Essentials of Glycobiology* **1**, (1999).
36. Cazet, A. *et al.* The ganglioside GD2 induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the GD3 synthase. *Glycobiology* **22**, 806–16 (2012).
37. Nakayama, J. *et al.* Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme. *J. Biol. Chem.* **271**, 3684–3691 (1996).
38. Miljan, E. a & Bremer, E. G. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci. STKE* **2002**, re15 (2002).
39. Birklé, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R. K. & Aubry, J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* **85**, 455–463 (2003).
40. Suzuki, A. Distinct selectivity of gangliosides required for CD4 + T and CD8 +

T cell activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 98–106 (2015).

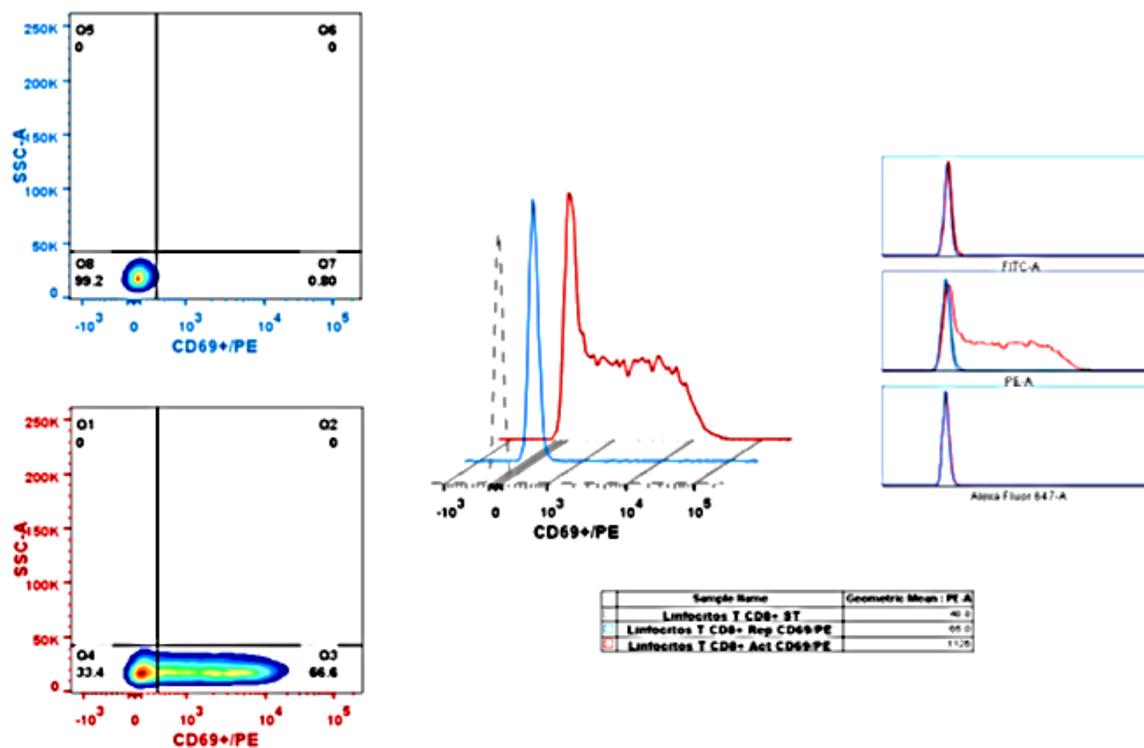
41. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
42. Beck-García, K. *et al.* Nanoclusters of the resting T cell antigen receptor (TCR) localize to non-raft domains. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 802–809 (2015).
43. Julien, S., Bobowski, M., Steenackers, A., Le Bourhis, X. & Delannoy, P. How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling? *Cells* **2**, 751–767 (2013).
44. Nagafuku, M. *et al.* PNAS Plus: CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E336–E342 (2012).
45. Inokuchi, J. I., Nagafuku, M., Ohno, I. & Suzuki, A. Heterogeneity of gangliosides among T cell subsets. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3067–3075 (2013).

8. Anexos

8.1 Análisis de activación de los linfocitos T CD8 + humanos totales



B



C

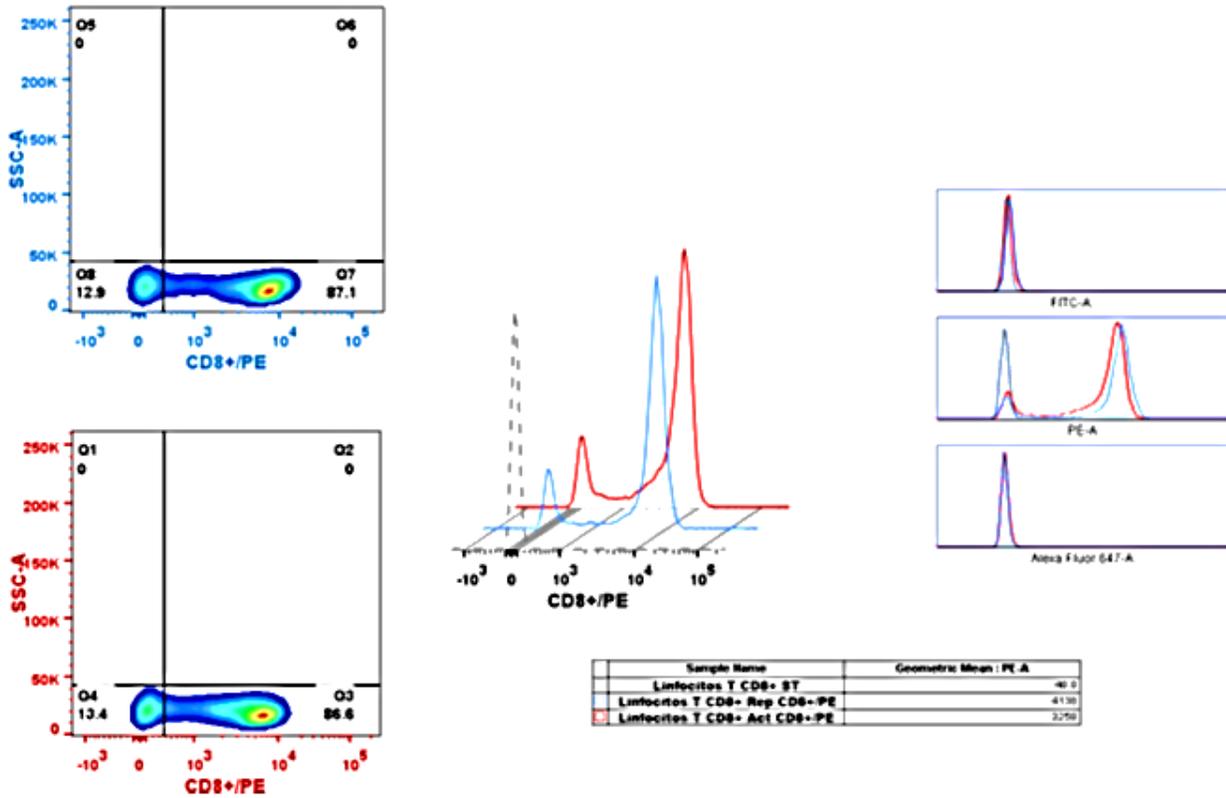


Figura suplementaria 1: A) Linfocitos T CD8+ humanos totales observados dese un microscopio de contraste de faces, células en reposo (izquierda) no forman clusters, células activadas (derecha) forman clusters entre ellas. B) citometría de flujo donde se utilizó el anticuerpo anti-CD69, donde solo los linfocitos T CD8+ activados (rojo) fueron positivos para este. C) Dot-plot e histograma de la citometría de flujo para corroborar la pureza de los linfocitos T CD8+, donde alrededor de un 86% fueron positivos para el anticuerpo anti-CD8+.

8.2 Caracterización de gangliósidos 12h

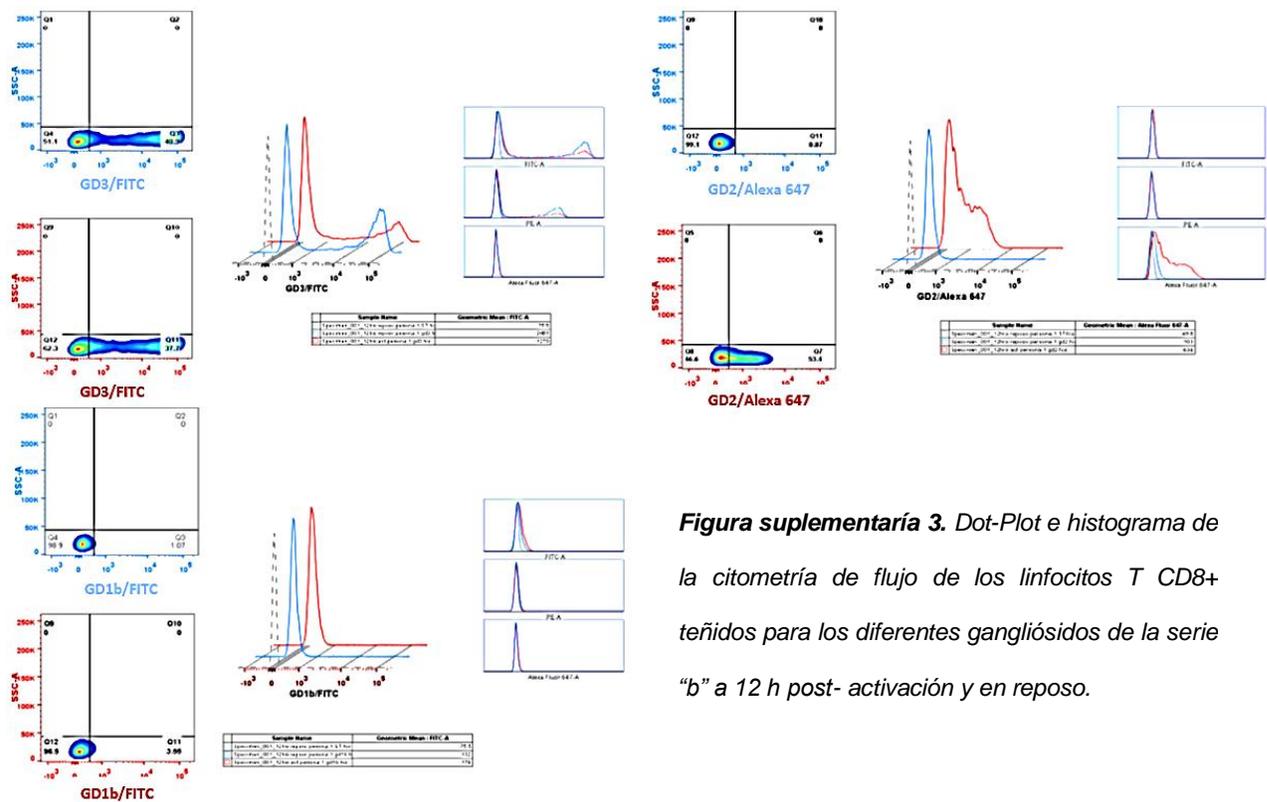
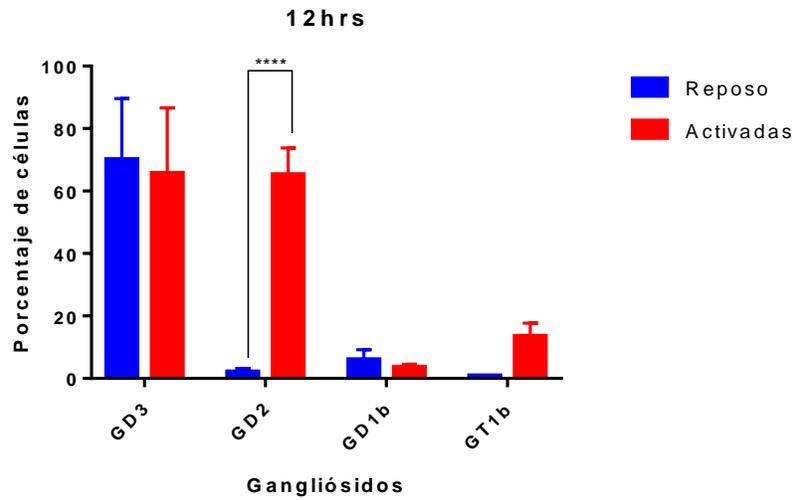


Figura suplementaria 3. Dot-Plot e histograma de la citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ teñidos para los diferentes gangliósidos de la serie “b” a 12 h post- activación y en reposo.

8.3 Caracterización de gangliósidos 24h

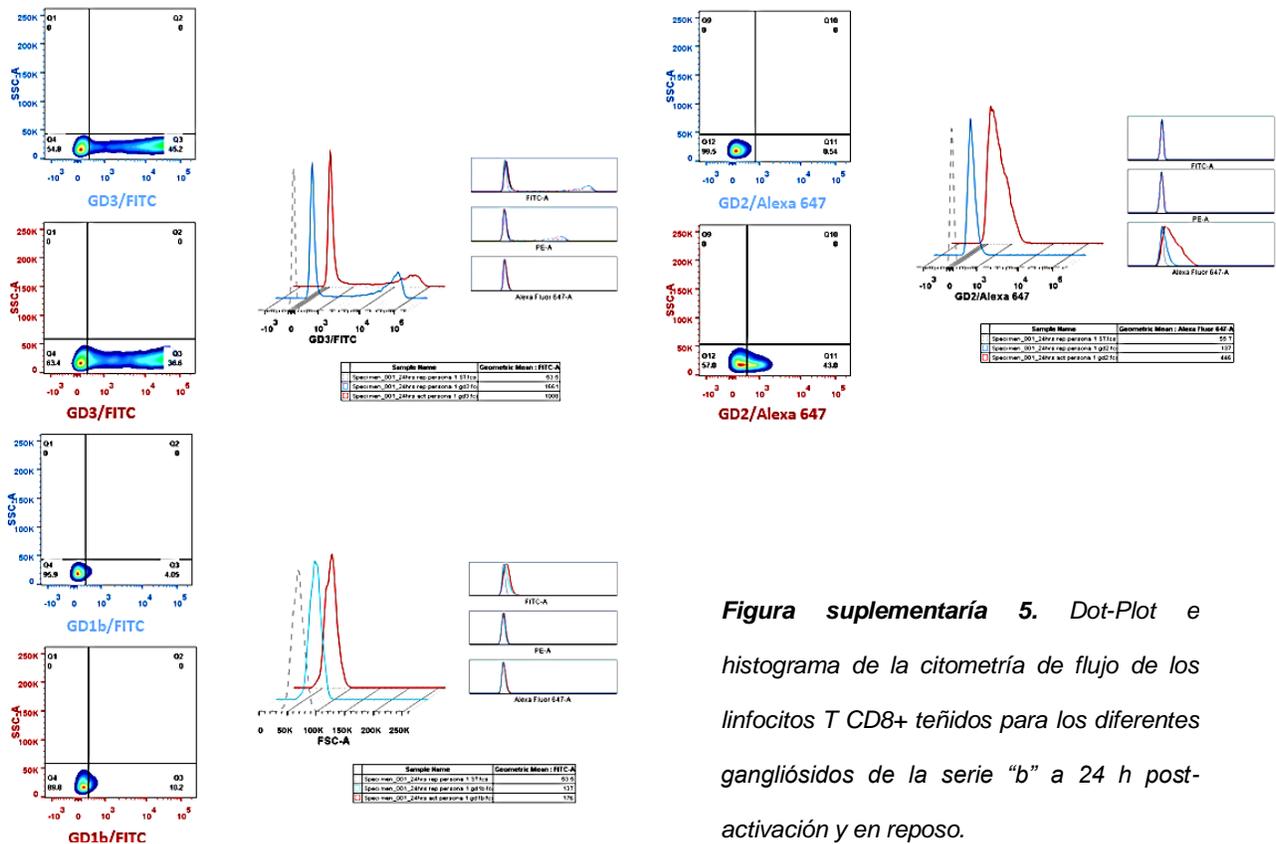
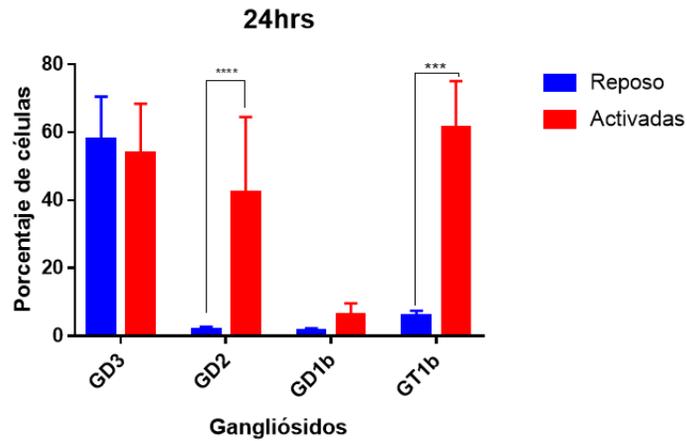


Figura suplementaria 5. Dot-Plot e histograma de la citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ teñidos para los diferentes gangliósidos de la serie "b" a 24 h post-activación y en reposo.

8.4 Dot-Plot Caracterización de gangliósidos 48h

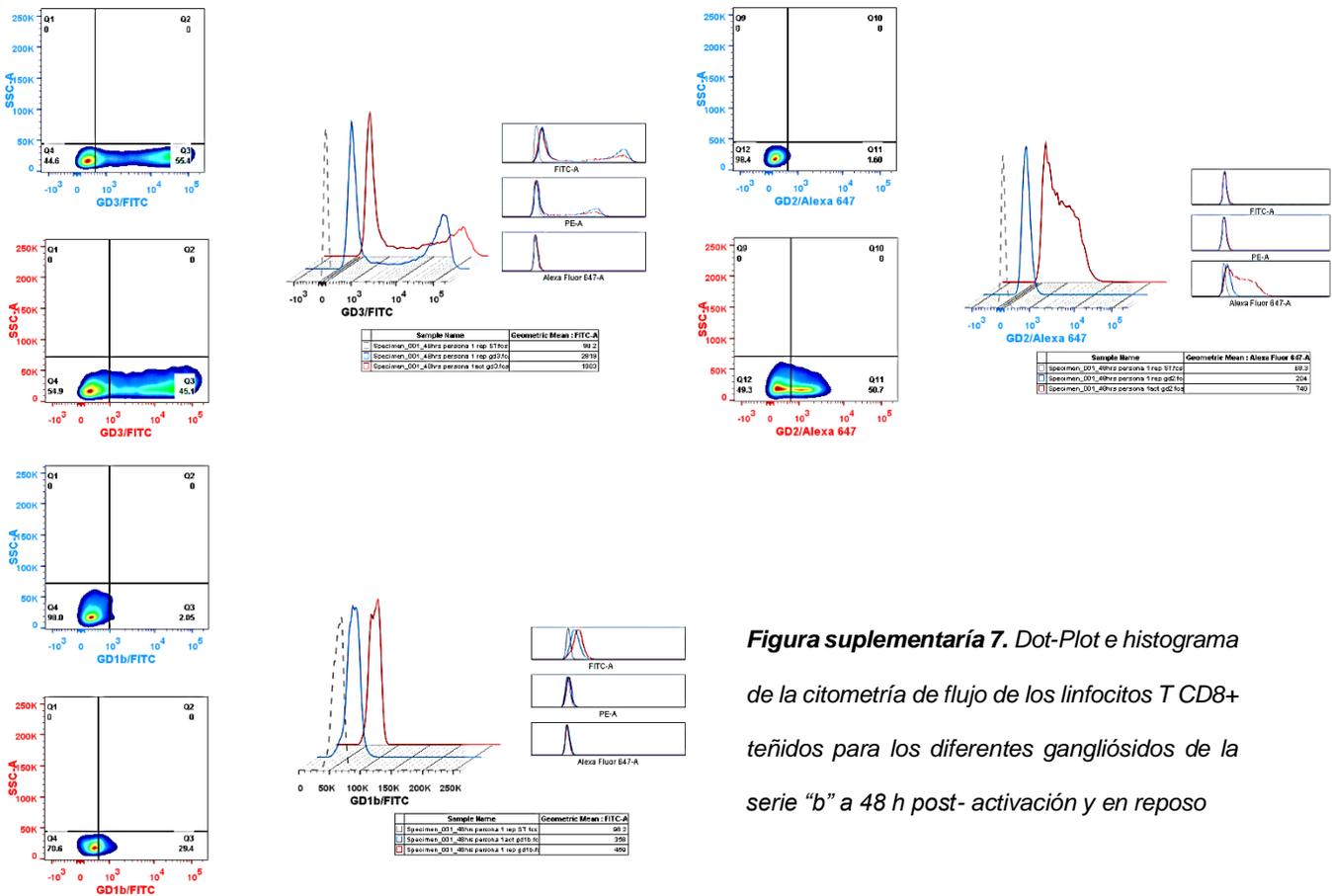
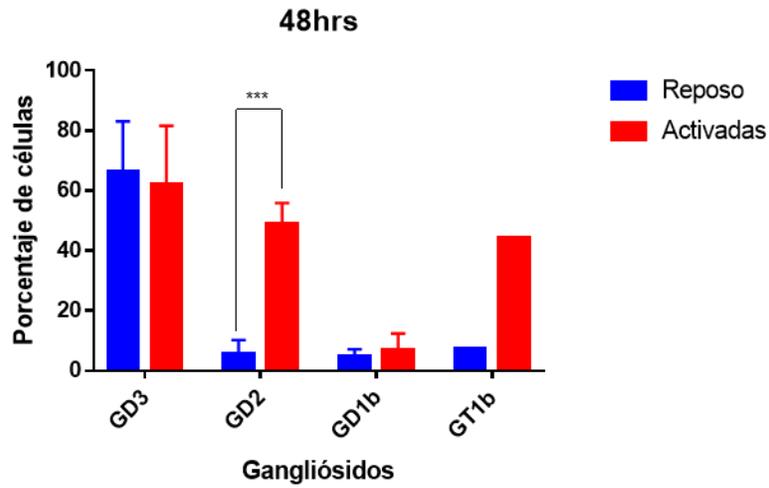


Figura suplementaria 7. Dot-Plot e histograma de la citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ teñidos para los diferentes gangliósidos de la serie "b" a 48 h post-activación y en reposo

8.5 Caracterización de gangliósidos 72h post-activación

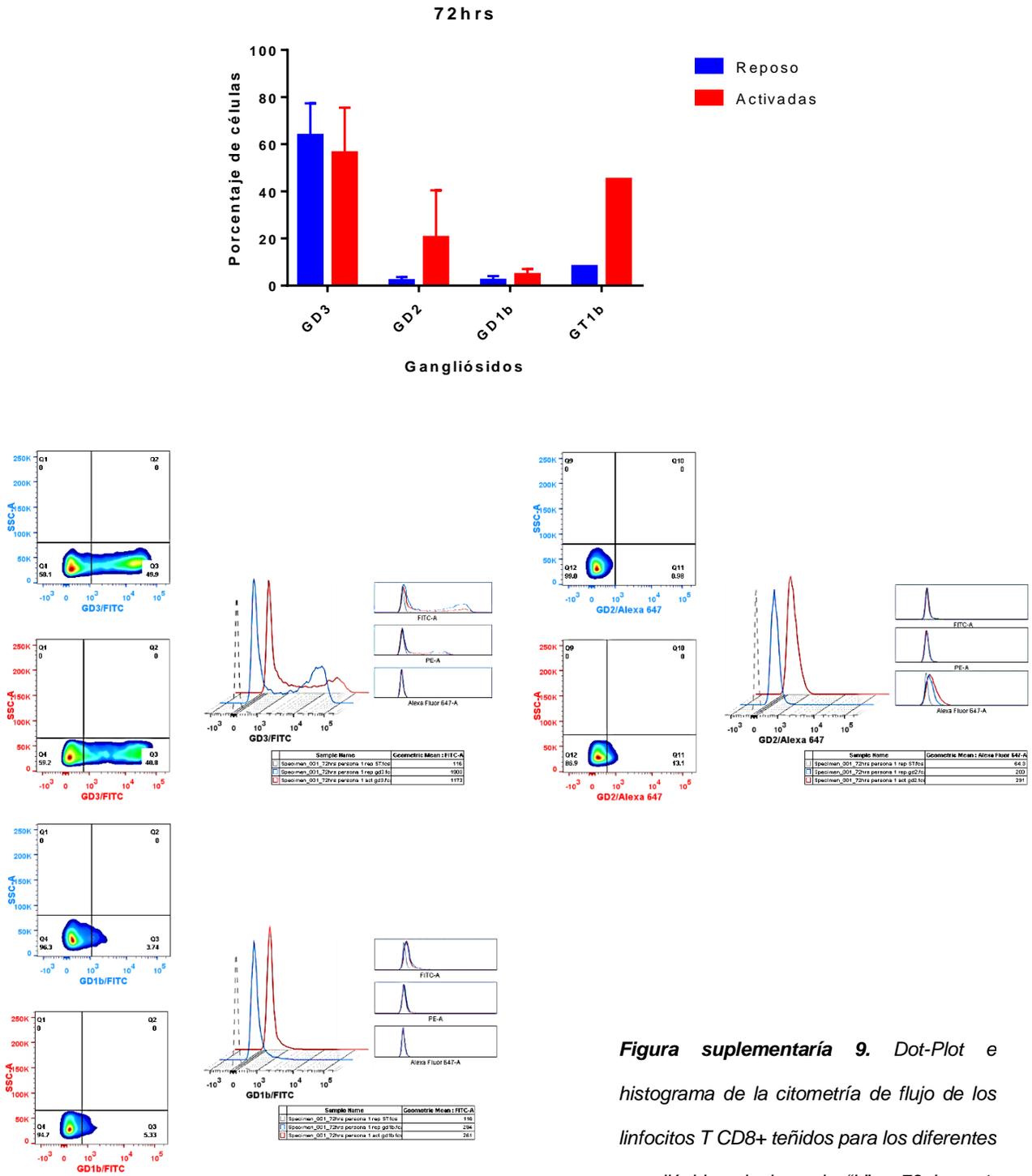


Figura suplementaria 9. Dot-Plot e histograma de la citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ teñidos para los diferentes gangliósidos de la serie “b” a 72 h post-activación y en reposo



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Caracterización de gangliósidos en linfocitos T CD8+ humanos" que presenta la alumna Brenda Ingrid Velázquez Dodge (10009575) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Octavio Tonatiuh Ramirez Reivich UNAM	Aprobado	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	Aprobado	
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva UNAM	Aprobado	
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM-UAEM	Aprobado	
Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez CIDC-UAEM	APROBADO	