

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
Centro de Investigación en Dinámica Celular

“Evaluación de las especies reactivas de oxígeno y genes  
relacionados con el metabolismo de linfocitos T CD4+ de neonatos  
y adultos”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Licenciado **EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Francisco Castañeda Gómez**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. María Angélica Santana Calderón**  
Supervisión experimental M. en C. Linda Kempis Calanis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CASTAÑEDA GOMEZ FRANCISCO** con número de matrícula **20154001213** cuyo título es:

**“Evaluación de las especies reactivas de oxígeno y genes relacionados con el metabolismo de linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS CON AREA TERMINAL BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 20 de febrero del 2023

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA	<b>PRESIDENTE</b>
DRA. DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO	<b>SECRETARIO</b>
DRA. MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON	<b>VOCAL</b>
DRA. VERONICA MERCEDEZ NARVAEZ PADILLA	<b>PRIMER SUPLENTE</b>
DRA. OTONIEL RODRIGUEZ JORGE	<b>SEGUNDO SUPLENTE</b>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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:2023-02-20 18:14:26 | Firmante

SkRGzNY6FWWh8mKLb7aWYfOVlmeUJqV5/jNSb8q6NqyKUqspFWlx8mOccZVO7AWXLxghEUF8Wclfr+fgn3AAMqolE8ECT4TestAcFMe9vy2KEF2UCKXj3bIIOCIE OoWN1zTo mELjOW3tn7p78BPRx7YsOw8cyOAPOCbGssZtN6N1jtY3gEbBmw0wsxAPI2fLap4GUJWfFviviublXsFLS0fvKejERoSaiHTZD44J+Q5hCas9ohEv79S4EII Xr7ssMaciHNvm18V hTkz5B9BLirceuiGOXgyP9rjrUNSDucFRiPqwV+MND04SOuvMkd7SVtjOe3knmiC9MqfQHw==

**ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA** | Fecha:2023-02-21 11:52:52 | Firmante

hMAR2fL3R6PkcZ6xUir3ZXzJ/+NstJZzWQ0C09ZZoRjilBWOmizGvGtlpdXLLAdXe7AM534+tIKIAIDdXPMwJpFrWA+pKpLjFYUlsUJ4gD4pn4hFsachScAdf27YqEBJckJiqzBj3B CZNzo7SFNWzXhRCeJ8awws4Y0xkgH1dhzvnbo8reAlqrbEFggGAnNw8+83I4i17Bj9tfppeEqXaRypIH48HoLjPggYERwE3splcKM4RUybc/7225Fd0seOvbZhon G3Ssq3a/sz1IW AAaWESdTyALIEtdDkeRZrv2jAZo2p0uKb6r7IAQVJg7Rp8+QKZvyaJsd5nHgA1Y39w==

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO** | Fecha:2023-02-22 14:12:15 | Firmante

JHHfaHXg/FYyOxLGduLSwFdUihDk8H5rll/N/DzNGUSTxv4zB9o50sGXvKC7zO8fq6rzz5Up8yOy5gA71JfgufhpGt6lCxCxUdG7GSZ+MDuPvVJCY3QwO5HCWSq8Rqh1YGFsJm YH6bddgCv61Qlln7wlvBd1hpsG4F11umyZiVSf727HUAjM3i7lwL3rhhTxZvFu8abRyECMjesguOsz0qM0FSBX7dCSAPNi22ESKEHvQq6C1rnRAqHup5NwRSa1/ZUHWBKK02 B9r13h86N19Q927aEhPWh+UrZaNyfqDEQ3FVQAZcJZTfRThX8RZmKqRpuvwn+3BDzSxsgEI9Jg==

**OTONIEL RODRIGUEZ JORGE** | Fecha:2023-03-01 12:58:56 | Firmante

JYiVylg0GSm/aEJh6rr54I6IGDsASCeKZa54eEsJeoXDhsNfa+6BazZj8j7C3a2oWVhhaPHLh25bD6hKkwvajjXKUaC4RZ3XYXAdrDnUER3rMkZjUNEVUdBZAJdimVk/Jlgr566 xBh01xAuKZQD35mPX/Ywk2Kq9wWpDnn0YkRr6OHldolJhkd/y+L2rE78qbFS10zskEiyGJVogGrw+T5E0bziFZi4rBa8YJHCxjHTT4HWXwwpvkk+silhFuA2yXuSTAi mdRjiWNpPk2 CYK5cF2lYum7ikTNkkTiAsKv1D0xz4mDmQ6DIOEnly82sJh2ES294BqkMhfm/x+/iQ==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA** | Fecha:2023-03-02 10:51:44 | Firmante

cahPXrdJkyb6J2HN0+vli79zvcL2/e8zgjul/N8TNVXZ30QHIL6TdigS9ygrkVnZ8RJ/34ZYuMbJL9+AkIJTp9QOmuH3eELMFO6w6n7w+M2lkWBqcVfaWp2oyMtW0BRHG9CteoVPJ h/xblGJFTmJA5Whd+0aDqvszAy9IX2kLZiwdkV7zgm+h5OwY/Y0VCKvySeC/Jn9PJY7SekO58CybbjLm/AzuWSlorLa6yF14iWkkoii+QTLkWy60X5UAmBCrljf+4Q33i2aD5EtQue wwcVGLsFHfOoSm09iHooTJSiBaQUqk/WY3Bp/hcn/Wjwp27Gdiw4PvdXs4Y8fA52w==

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



ivBTGVzJY

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dHsFtB8FDilqqUa19zHCP6JIN7Q5Zvp7>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART  
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Generación de un método de selección clonal específico de antígeno y su aplicación para la identificación de anticuerpos monoclonales contra el SARS-CoV-2**, que presenta el alumno **Rocio Quinto Manzanarez (10046083)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC – UAEM	APROBADO	
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC – UAEM	APROBADO	
Dr. Victor Hugo Bermúdez Morales INSP	APROBADO	
Dr. Ramón Antonio González García- Conde CIDC – UAEM	APROBADO	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC – UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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:2023-02-24 11:46:11 | Firmante

1gCFtVdERxmsvlzs0l3WwPYKqA8q2VZ4qKi8X9+piSTy/Sqoii/wrhjLldhwlgHeN4pHlcYWYPyiNZEPIf1CmJr95JXdjqNo3YWo8DjJHgYBaQp7z+bZy2KEm7yKgs/qKcQz6l4384bg6  
Pl+DdeUh82YCGmZZ5z3aA5M//aiWMMY8lTYE++rJTkkwKqveP1Afd3LkbrASZJ0FkNjNpBJkfJjy8zBTKuJZV689ybGeBYjGxBh4kBmCf9+fslXd/d+LDgwcpcwcv4idU+dlzQepuiqa  
uNGPGxSqE10m2uCrhCBxm9uSSPWkBa0QdBkBeG0u2Dv4OzM3AnlN5cQHIBjvQ==

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



[v9iPd8Kbq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pXmFruAUcUk60c49z8lPa2ybiFU4E6l0>



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María Angélica Santana Calderón por haberme permitido formar parte de este gran laboratorio, por toda su confianza, por todo su apoyo, por todos los buenos consejos que me ha dado para mejorar en mi formación académica y como persona. Por ser un modelo a seguir.

A las autoridades y personal de Servicios de Salud de Morelos, de las unidades: Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, Hospital General de Cuernavaca, Hospital General de Temixco y la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación por las facilidades otorgadas para la realización de muestreo en campo.

A los proyectos CONACyT Ciencia Básica 257188 y Fronteras de la Ciencia 1690 por financiar el trabajo y otorgarme una beca.

A mis sinodales, a la Dra. Vanessa López, al Dr. Armando Hernández Mendoza, a la Dra. Verónica Narváez y especialmente al Dr. Raúl Peralta que aunque ya no está con nosotros me guió, enseñó y ayudó a resolver todas mis dudas en la parte metabólica de mi investigación.

A la M. en C. Linda Kempis Calanis, por siempre brindarme todo su apoyo, por preocuparse por mí más allá de lo académico, por sus buenos consejos, por toda su paciencia al realizar mis experimentos. Por ser la mejor mentora experimental.

A todos mis compañeros de laboratorio, a Carlos y Alejandra por su paciencia y siempre brindarme ayuda cuando la necesito.

Al Biól. Óscar Ramírez Pliego por toda su ayuda que brinda al laboratorio.

A toda mi familia que me quiere y me apoya, a mi papá, a mis abuelitos, a todos mis tíos que se preocupan por mí. Especialmente dedico esta tesis a mi mamá y a mi hermana que fue mi segunda madre en esta cuarentena y siempre me cuidó, por todas las noches de desvelo en las que ellas me acompañaron y se preocuparon por mí durante todo este proceso académico. Por ser lo que más amo en esta vida.

A mis mejores amigas Andrea y Catalina, que siempre están conmigo cuando más lo necesito, por apoyarme en todo momento, por todas esas videollamadas durante la cuarentena, por toda su confianza, por lo mucho que significan para mí, por todo su amor y cariño.

A mis mascotas: Puchis, Kyra y Lambda por hacerme muy feliz.

## RESUMEN

La alta incidencia de morbilidad y mortalidad en recién nacidos se debe a una baja respuesta de linfocitos T neonatales frente a las infecciones. En este trabajo de tesis se evaluaron los niveles de las especies reactivas de oxígeno mitocondriales y citoplasmáticas de las células CD4+ de donadores adultos y neonatos en estado basal y estimulados a través del receptor de células T. Encontramos que las células T CD4+ neonatales presentaron más especies reactivas de oxígeno que las correspondientes de adulto. Para determinar si un metabolismo más basado en glucólisis pudiera ser responsable de la mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno, evaluamos la expresión de un gen de una enzima que participa en la vía de la glucólisis, encontrando que se sobreexpresa en las células neonatales en estado basal. Para evaluar si las especies reactivas de oxígeno tienen una implicación en la activación de las células T CD4+ neonatales, evaluamos simultáneamente la expresión del marcador de activación CD69 en estado basal y en estado estimulado y los niveles de ROS mitocondrial y citoplasmático. Encontramos que las células que expresan más ROS citoplasmático expresaron una menor cantidad de CD69. En conjunto, estos resultados sugieren que altos niveles de ROS contribuyen a una activación más baja en las células CD4+ tras la estimulación del TCR

## Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1 Sistema inmune innato .....	8
1.2 Sistema inmune adaptativo .....	9
1.2.1 Linfocitos T CD4+ .....	10
1.2.2 Linfocitos T CD4+ neonatales .....	12
1.3 Activación de células T CD4+ .....	12
1.4 La proteína mTOR .....	14
1.5 Metabolismo .....	17
1.5.1 Glucólisis .....	18
1.5.2 Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico .....	19
1.5.3 Cadena transportadora de electrones .....	22
1.5.4 Metabolismo en la activación de linfocitos T .....	23
1.6 Especies reactivas de Oxígeno .....	25
1.6.1 Antioxidantes .....	27
1.6.2 Ejemplos de antioxidantes .....	27
2. ANTECEDENTES .....	29
3. HIPÓTESIS .....	30
4. OBJETIVO GENERAL .....	30
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	30
5. METODOLOGÍA .....	31
5.1 Obtención de PBMCS y CBMCS .....	31
5.2 Purificación de CD4+ vírgenes .....	32
5.3 Tinción de marcadores de membrana .....	33
5.4 Tinción de CBMCs .....	33
5.5 Citometría de flujo .....	33
5.6 Estimulación a través de CD3/CD28 .....	34
5.7 Estimulación de CBMCs y CD4+ .....	34
5.8 Evaluación de la estimulación de CBMCs mediante la expresión de CD69 .....	34
5.9 Evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno en CBMCs y en linfocitos T CD4+ de adulto. ....	35
5.10 RT-qPCR .....	35
5.10.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA de linfocitos T CD4+ .....	36
5.10.2 Evaluación de la transcripción mediante qPCR en tiempo real .....	36
6. RESULTADOS .....	38

6.1 Purificación de linfocitos T CD4+ .....	38
6.2 Obtención de linfocitos T CD4+ vírgenes .....	39
6.3 Medición de los niveles de ROS en poblaciones CD4+ de un adulto y de dos neonatos en estado basal y estimulado con CD3/CD28 .....	40
6.4 Medición de los niveles de expresión genética de enzimas que participan en la glucólisis en linfocitos T CD4+ de adulto y neonato tras la estimulación con CD3/CD28 .....	43
6.5 Medición de la activación de CBMCs mediante la expresión de CD69 .....	46
7. Discusión .....	53
8. Conclusiones .....	56
REFERENCIAS.....	57

## **FIGURAS**

**Figura 1.** Vía de señalización mTOR a través de CD28

**Figura 2.** Factores transcripcionales activados por Mtor

**Figura 3.** Enzimas que participan en la glucólisis y la gluconeogénesis

**Figura 4.** Oxidación del piruvato

**Figura 5.** Ciclo de Krebs

**Figura 6.** Cadena transportadora de electrones.

**Figura 7.** Importancia de mTOR en la diferenciación celular

**Figura 8.** Vías metabólicas en la activación de linfocitos T

**Figura 9.** Producción de ROS

**Figura 10.** Purificación de linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos.

**Figura 11.** Expresión de CD45RO

**Figura 12.** La población de células CD4+ de neonatos producen mayores niveles de ROS citoplasmático que los linfocitos T CD4+ de adultos.

**Figura 13.** Las células CD4+ del neonato 2 producen mayores niveles de ROS mitocondrial que los linfocitos T CD4+ de adulto y las células CD4+ del neonato 1.

**Figura 14.** Diseño de cebadores para LDHA, HK1 y HK2.

**Figura 15.** Curvas estándar de los cebadores de los genes LDHA, HK1, HK2 y el gen control B2M.

**Figura 16.** Expresión de mRNA de la enzima LDHA en un neonato y un adulto

**Figura 17.** La expresión del marcador de activación CD69 se incrementó en células CD4+ de neonatos en estado estimulado.

**Figura 18.** Las células CD4+ neonatales de alta producción de ROS mitocondrial en estado estimulado desarrollaron menor expresión del marcador de activación

CD69.

**Figura 19.** Figura 19. Las células CD4+ neonatales en estado estimulado con una alta producción de ROS citoplasmático desarrollan una menor expresión del receptor de activación CD69.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La inmunidad, es el término que históricamente ha hecho referencia a la protección frente a enfermedades infecciosas. A la capacidad de una respuesta conjunta y coordinada de células y moléculas que forman parte del sistema inmune, en respuesta a un estímulo, se le llama respuesta inmunitaria. (1)

El sistema inmunitario tiene como función fisiológica la defensa contra microorganismos infecciosos. Sin embargo, sustancias extrañas de carácter no infeccioso pueden desencadenar respuestas inmunitarias. El sistema inmunitario está compuesto por dos tipos de células y moléculas bien definidos: el sistema inmune innato y el adaptativo. (1)

### **1.1 Sistema inmune innato**

El sistema inmune innato es la primera barrera de defensa que se activa inmediatamente ante un reto inmunológico. Los mecanismos de respuesta reaccionan con productos de microbios y células dañadas. Los principales componentes de la inmunidad innata son: barreras físicas y químicas (piel, mucosas y moléculas antimicrobianas), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas (DC), linfocitos citolíticos naturales (NK o Natural Killer) y proteínas sanguíneas (medios del sistema del complemento y mediadores de inflamación). (1 y 2)

El sistema inmune innato reconoce estructuras compartidas de moléculas que son producidas por patógenos, a esas estructuras se les llama patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) y también reconocen

moléculas endógenas que liberan las células dañadas (DAMP). Estos patrones moleculares PAMP y DAMP son reconocidos por receptores constitutivos del sistema inmune innato, como los receptores tipo toll (TLR), receptores scavenger (SR), receptores de manosa o de péptidos formilados y receptores intracelulares, como los de tipo NOD. (1 y 2)

## **1.2 Sistema inmune adaptativo**

Este sistema se activa cuando hay una exposición a microorganismos infecciosos que no son eliminados por el sistema innato. El sistema inmune adaptativo cuenta con memoria inmunológica, capaz de generar un aumento en las capacidades defensivas cada vez que se expone nuevamente a un mismo microorganismo. La especificidad del sistema inmune adaptativo es particular a un patógeno, a diferencia del sistema innato que reconoce patrones moleculares compartidos por familias de microorganismos. Las células que forman parte del sistema adaptativo son células llamadas linfocitos B y T.

Las células B participan en la respuesta a la inmunidad humoral, liberando moléculas en la sangre y en mucosas llamadas anticuerpos. Estos anticuerpos reconocen antígenos de microorganismos, neutralizan a estos microorganismos y los marcan para su eliminación por diversos mecanismos. Por ejemplo, existen mecanismos que favorecen la fagocitosis, la citotoxicidad o la degranulación de células cebadas, eosinófilos o basófilos. Algunos anticuerpos protegen la mucosa o pueden atravesar la placenta, asignando protección a un recién nacido contra infecciones. (1 y 2)

Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones: linfocitos T cooperadores (Th), que expresan una proteína de superficie llamada CD4 y coordinan la respuesta

inmune mediante contacto celular y la secreción de citocinas y los linfocitos T citotóxicos (Tc), que expresan una proteína de superficie llamada CD8 y tiene una actividad citotóxica sobre células infectadas. Las células T tienen receptores que se generan por la combinación de varios fragmentos de genes, generando así un receptor de linfocito T (TCR, por sus siglas en inglés) diferente para cada célula T. Estos receptores no reconocen a un antígeno en su forma nativa, sino que reconocen antígenos procesados enzimáticamente y que son procesados por las células presentadoras de antígenos (APC). (1 y 2)

Los linfocitos TCD8+ o citotóxicos reconocen antígenos intracelulares presentados por el MHC I. En cambio, los linfocitos T CD4+ o cooperadores reconocen antígenos del MHC clase II que expresan las APC. El papel de las moléculas del MHC clase II es presentar agentes infecciosos extracelulares a través de vesículas endocíticas en donde se procesan los antígenos proteicos antes de ser presentados. (2)

### **1.2.1 Linfocitos T CD4+**

La coordinación de la respuesta inmune se lleva a cabo por los linfocitos Th, en respuesta a las señales proporcionadas por las células presentadoras de antígenos. Las células T al ser activadas se diferencian en distintos linajes de linfocitos Th efectores. Los linajes más reconocidos son las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17. (1)

El desarrollo de diferentes linajes de linfocitos T inicia por diferentes estímulos presentes durante la presentación de antígenos. Los principales estímulos que inducen la diferenciación son las citocinas, de modo que el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y la interleucina 12 (IL-12) son inductores al linaje Th1; la interleucina 4 (IL-4) de

los linfocitos Th2 y las citocinas de interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) y el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ) inducen el linaje de linfocitos Th17.

La subpoblación Th1 participa en la respuesta contra patógenos intracelulares.

Produciendo citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  y culmina con la activación del estallido respiratorio y la capacidad microbicida de los macrófagos. La diferenciación a nivel molecular de la subpoblación Th1 la confieren las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 y los factores de transcripción T-bet, STAT1 y STAT4. Cuando linfocitos T vírgenes reconocen al antígeno se induce la expresión de T-bet y son expuestos a IFN- $\gamma$  e IL-12. Esta señal activa a los factores de transcripción STAT1 y STAT4, que a su vez estimulan la expresión de T-bet favoreciendo la síntesis de IFN- $\gamma$ . (1)

La subpoblación Th2 participa en la respuesta contra parásitos y microorganismos extracelulares que inducen la secreción de la inmunoglobulina G1 (IgG1) e inmunoglobulina E (IgE). La IgE activa células cebadas y eosinófilos. Las células que coordinan esta respuesta son los linfocitos Th2 que secretan IL-4, IL-5 e IL-13. La diferenciación es inducida por la interleucina 4 y los factores de transcripción GATA-3 y STAT6. IL-4 activa a factor transcripcional STAT6, que induce la expresión de GATA-3. GATA-3 aumenta la expresión de genes de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. (1)

La subpoblación Th17 participa en la respuesta contra algunos hongos y bacterias extracelulares, permitiendo el reclutamiento de neutrófilos. Las células que la coordinan son los linfocitos Th17 a través de la secreción de IL-17A e IL-17F e IL-22. La diferenciación es inducida por IL-1, IL-6 y TGF- $\beta$  y el factor de transcripción ROR $\gamma$ T. (1)

### **1.2.2 Linfocitos T CD4+ neonatales**

Los neonatos tienen pocas células de memoria y un sistema inmune que está en desarrollo, que es diferente al de los adultos. Durante la transición del nacimiento pasan de vivir inicialmente en un ambiente estéril para luego pasar a estar expuestos a un entorno lleno de microbios, lo que hace que los neonatos sean susceptibles a infecciones. Alrededor de un 23% de muertes anuales neonatales en todo el mundo son causadas por infecciones.

La respuesta neonatal se polariza hacia la respuesta Th2 con una disminución en la producción de citocinas para Th1. El IFN- $\gamma$  requerido para el linaje Th1 es suprimido por mecanismo epigenéticos y por la secreción de IL-4 o IL-13. (13)

### **1.3 Activación de células T CD4+**

Las células que salen del timo son vírgenes porque aún no se han encontrado con su antígeno específico por lo que no son capaces de una acción inmune. Las células vírgenes se caracterizan porque en su superficie expresan el receptor CD127, CD62L, CD197 (receptor CCR-7) y CD45RA. El CCR-7 conduce la señalización de células vírgenes a la zona T de los ganglios linfáticos. En los nodos linfáticos revisan a las APC para detectar la presencia de antígenos.

Cuando el TCR de un linfocito T CD4+ reconoce a un antígeno del MHC clase II de la APC en un contexto de alarma inmunológica, se activa. La activación se caracteriza por la expresión de marcadores de superficie como CD25, CD44 y CD69 así como por la secreción de la citocina IL-2, que permite su expansión clonal y su diferenciación en células efectoras y de memoria. Las células de memoria se caracterizan por expresar receptores como: CD45RO, CD44 y CD127.

(4 y 2)

Para que una célula se active correctamente, como mencioné anteriormente, se requiere un contexto de alarma inmunológica, es decir que el antígeno no sólo se debe percibir como “extraño” sino también como “peligroso”. Esa alarma inmunológica la presenta la APC como moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias. Los coestimuladores más conocidos son CD80 y CD86, que son reconocidos por CD28 en el linfocito T. Las señales de CD28, además de permitir una activación más fuerte de la cascada de señalización del linfocito T, activan el metabolismo celular. Esto permite que la célula T pueda contender con el gasto energético que representa la ampliación clonal, la migración y la secreción de citocinas.

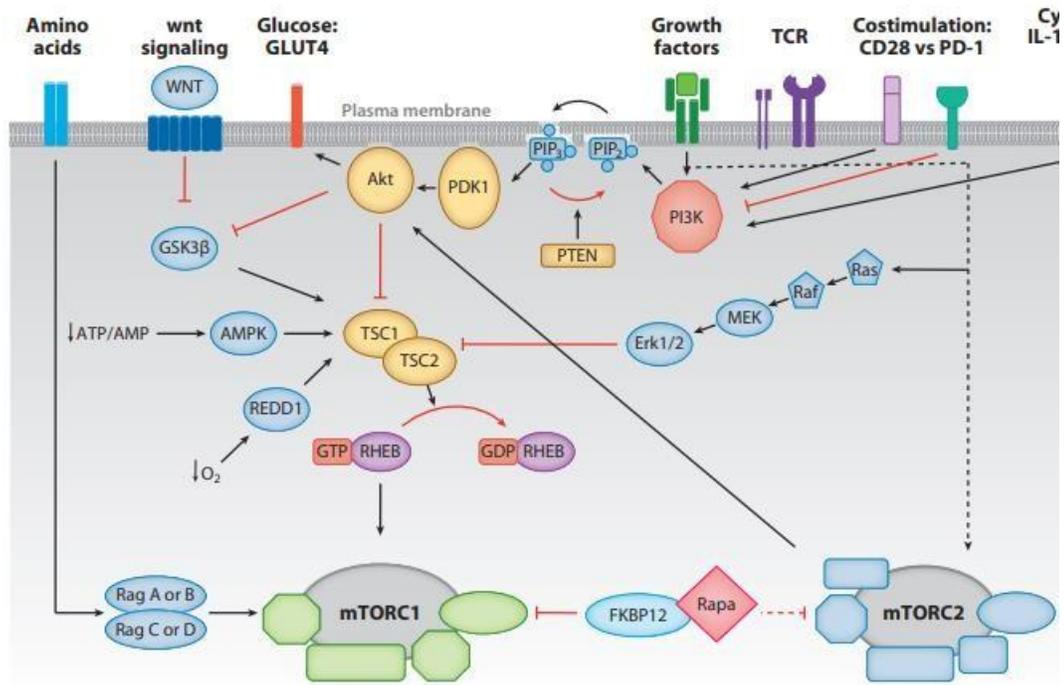
La vía de activación de CD28 se representa en la **figura 1** y se presenta a continuación: CD28 se debe asociar a varias proteínas señalizadoras a su motivo, formado por residuos: Try-Met-Asn-Met o YMNM. El motivo YMNM una vez fosforilado en su residuo de tirosina, se une a la subunidad p85 de PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa), esta unión permite la producción de PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato) que recluta a la proteína PDK-1 (proteína cinasa dependiente de fosfoinositol 1), la cual activa a la proteína cinasa B (Akt). Cuando Akt fosforila al complejo de esclerosis tuberosa 1 (TSC1) y TSC2, se inhibe la actividad de la proteína activadora de GTPasa (GAP), lo que permite la activación del homólogo de Ras enriquecido en el cerebro (RHEB). RHEB activo conduce a la activación de mTORC1 y por lo tanto RHEB es un regulador crucial de la señalización de mTORC1. (5)

La interacción CD28-PI3K y la activación de RHEB y Akt son cruciales para el aumento del metabolismo celular.

## 1.4 La proteína mTOR

mTOR (mammalian TARGET OF RAPAMYCIN, por sus siglas en inglés) es central en la activación del metabolismo y funciones celulares durante la activación. Es una proteína serina-treonina cinasa que ha sido conservada en la evolución, regula el crecimiento celular, metabolismo y supervivencia. Esta proteína puede señalizar en dos complejos distintos, el complejo mTOR 1 (mTORC1) y el complejo mTOR 2 (mTORC2). El complejo mTORC1 es responsable de regular el crecimiento celular, traducción de proteínas y metabolismo, mientras que mTORC2 participa en funciones celulares como la reorganización de actina y supervivencia. En los linfocitos T, mTOR participa regulando funciones especializadas como reconocer señales en el microambiente inmunitario que controle la diferenciación celular. (4 y 8)

mTOR participa en la activación de varias de señalización que controlan la glucólisis, oxidación de ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial.



**Figura 1. Vía de señalización mTOR a través de CD28 (5)**

Nos centraremos en la vía de señalización de mTORC1 porque es la que regula el metabolismo celular, mTORC1 se forma cuando mTOR se asocia a proteínas particulares como la proteína reguladora asociada de mTOR (RAPTOR, por sus siglas en inglés) y es activada por una unión de una GTPasa llamada RHEB que negativamente está regulada por TSC1. Factores como la cantidad de oxígeno o el estado energético de la célula controlan la activación de TSC1 / 2 a través de la cinasa activada por AMP (AMPK) lo que lleva a que mTORC1 esté inhibido.

Cuando existe una relación alta entre AMP/ATP lo que indica que la célula está en un estado de baja energía, se activa AMPK lo que genera también una activación de TSC1 y por lo tanto mTORC1 está inhibido.

El complejo mTORC1 puede ser activada por factores de crecimiento que están mediados por la activación de PI3-K (fosfatidilinositol-3-fosfato) (4,7 y 8)

Existen varios factores transcripcionales que se activan por esta vía, entre ellos:

**Myc**

El factor de transcripción Myc regula muchas vías metabólicas clave para el crecimiento y la proliferación celular. Dentro de estas vías está la glucólisis, glutaminólisis y la oxidación de ácidos grasos. Las células T inducen la expresión de Myc después de la estimulación con el TCR para facilitar el cambio metabólico requerido para la proliferación. (4)

### **HIF1- $\alpha$**

HIF1- $\alpha$  es una proteína heterodímera que consiste en una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\alpha$ . En condiciones normales de oxígeno la subunidad  $\alpha$  sufre una rápida degradación, sin embargo, en condiciones bajas de oxígeno, esta degradación se inhibe y permite la acumulación de HIF1- $\alpha$  y la formación de un dímero HIF-1 transcripcionalmente activo. HIF-1 regula directamente la expresión de productos génicos que participan en toda la vía de la glucólisis, como en transportador de glucosa Glut1 y la lactato deshidrogenasa A (LDHA). (4)

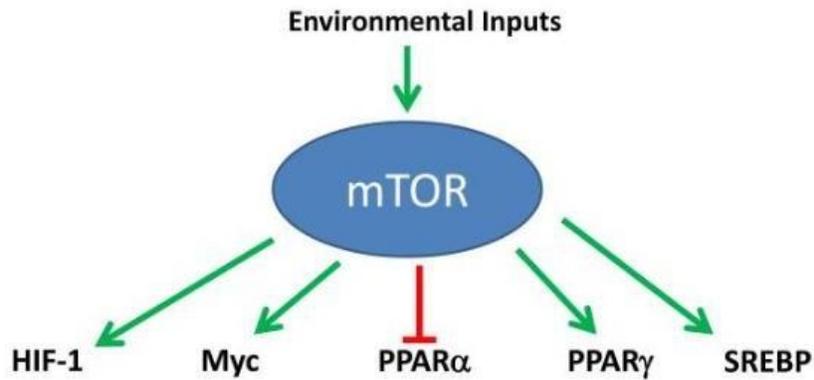
### **PPAR $\gamma$ PPAR $\alpha$**

#### **Receptor $\gamma$ y $\alpha$ activado por proliferador de peroxisoma**

Desempeñan un papel importante en la regulación de adipogénesis, en el metabolismo de los lípidos y participa en la homeostasis de la glucosa. Provocan la translocación celular y regulan varios procesos metabólicos como la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos mitocondriales. (4)

### **SREBP**

La proteína de unión a elementos reguladores de esteroides es un regulador de la lipogénesis celular, facilitando la transcripción de enzimas anabólicas involucradas en la síntesis de ácidos grasos. La transcripción de SREBP es suprimida cuando mTORC1 está inactivo. (4)



**Figura 2. Factores transcripcionales activados por mTOR (4)**

### 1.5 Metabolismo

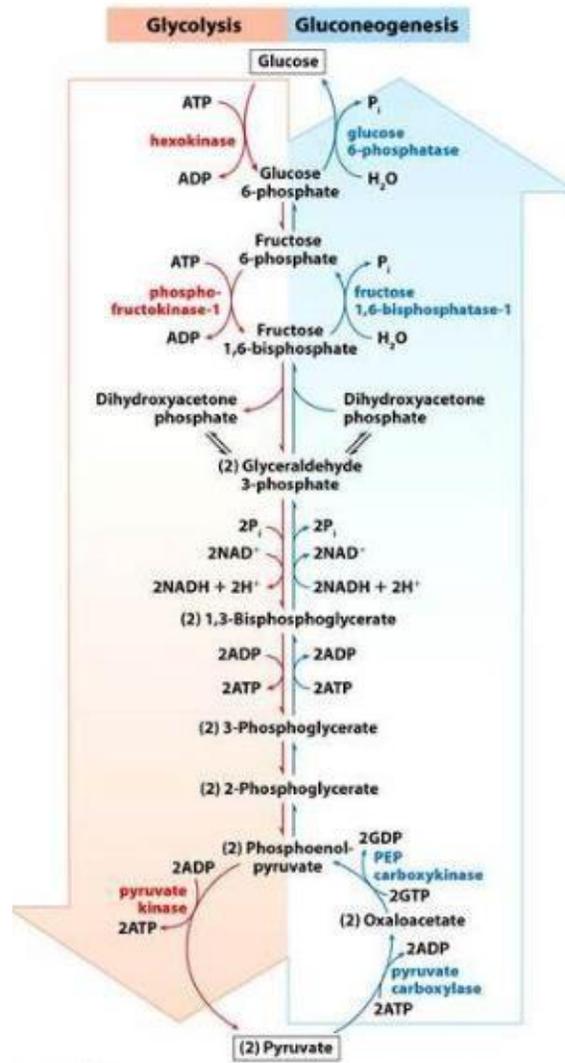
Consiste básicamente en una serie de reacciones enzimáticas que permiten transformaciones entre moléculas y la obtención o gasto de energía, a través de reacciones de oxidación y reducción. En organismos superiores Hans Krebs describió 3 pasos para la generación de energía a partir de la oxidación de los alimentos. En la primera etapa moléculas grandes son convertidas en moléculas más pequeñas, de polisacáridos a azúcares sencillos como glucosa, de grasas a glicerol La segunda etapa es la degradación de esas pequeñas moléculas a unidades más simples que desempeñan un papel importante en el metabolismo como el acetil-CoA. La tercera etapa se encarga de producir ATP a través la oxidación del acetil-CoA, en la que participa en ciclo del ácido cítrico (TCA) y la cadena de transporte de electrones en donde se oxidan moléculas hasta llegar a CO<sub>2</sub>. (9) También proporciona esqueletos carbonados para la biosíntesis de

moléculas importantes para el crecimiento u proliferación celular.

### 1.5.1 Glucólisis

La glucólisis es una serie de reacciones que extraen energía de la glucosa al romperla en dos moléculas de tres carbonos llamados piruvato. En este proceso se requieren de 10 reacciones que tienen lugar en el citosol y se pueden dividir en dos fases: la fase en donde se requiere energía y la fase donde se libera energía. En la fase donde se requiere energía, la primera reacción, un grupo fosfato se transfiere del ATP a la glucosa, este paso lo realiza una enzima llamada hexocinasa (HK1) y la transforma en la glucosa-6-fosfato, esta reacción permite retener a la glucosa dentro de célula. La glucosa-6-fosfato se convierte en su isómero, fructosa-6-fosfato y un grupo fosfato se transfiere del ATP a la fructosa-6-fosfato convirtiéndose así en fructosa 1,6- bifosfato. En estas reacciones se consumen 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En la siguiente reacción la fructosa 1,6- bifosfato se escinde por la enzima dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3- fosfato, la misma enzima DHAP se convierte en otra molécula de gliceraldehído-3-fosfato, solo estas dos moléculas pueden continuar directamente con la vía de la glucólisis. Aquí empieza la fase en donde se libera energía, mientras el gliceraldehído-3-fosfato se oxida,  $\text{NAD}^+$  se reduce en  $\text{NADH}$  y  $\text{H}^+$ , esta reacción libera energía que se usará para fosforilar la molécula para formar 1,3-bifosfoglicerato, esta molécula transfiere un grupo fosfato a un ADP para formar ATP y 3-fosfoglicerato, esta se isomeriza a 2-fosfoglicerato. Una deshidratación de esta molécula se transforma en fosfoenolpiruvato (PEP) esta molécula tiene alto potencial para transferir su grupo fosfato. PEP dona de inmediato su grupo fosfato al ADP y se forma la segunda

molécula de ATP, PEP al perder su grupo fosfato se convierte en piruvato. En esta vía se generan cuatro moléculas de ATP, pero se consumen dos moléculas de ATP lo que da un resultado neto de dos moléculas de ATP a partir de 1 molécula de glucosa. (14)



**Figura 3. Enzimas que participan en la glucólisis y la gluconeogénesis (9)**

### 1.5.2 Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico

El piruvato se produce durante la glucólisis en el citoplasma, pero el ciclo del ácido cítrico ocurre en la mitocondria, antes entrar a la mitocondria, el piruvato debe de oxidarse, ente proceso al piruvato le ocurren 3 reacciones: (1) la eliminación del

grupo carboxilo, liberando dióxido de carbono, (2) la molécula de la reacción 1 se oxida y  $\text{NAD}^+$  se reduce a  $\text{NADH}$  y (3) la molécula de dos carbonos oxidada, se une a la coenzima A (CoA) formando acetil-CoA (**Figura 4**)

El ciclo del ácido cítrico es la vía final para la oxidación de moléculas de combustible. También sirve como fuente de componentes básicos para las biosíntesis. La mayoría de las moléculas de combustible ingresan al ciclo como acetil-CoA. En eucariotas, esta reacción y las del ciclo tienen lugar dentro de las mitocondrias, en contraste con la glucólisis, que tiene lugar en el citosol.

El ciclo comienza con la condensación de oxaloacetato y acetil-CoA para formar una molécula de 6 carbonos llamado citrato, que se isomeriza a isocitrato. La descarboxilación oxidativa de este intermedio da como resultado  $\alpha$ -cetoglutarato. Una segunda molécula de dióxido de carbono se desprende en la siguiente reacción, en la que el  $\alpha$ -cetoglutarato se descarboxila oxidativamente y se convierte a succinil CoA. El enlace tioéster de succinil CoA se separa para producir succinato. El succinato se oxida y se convierte a fumarato, que luego se hidrata para formar malato. Finalmente, el malato se oxida para regenerar oxaloacetato.

En este ciclo dos átomos de carbono del acetil CoA entran en el ciclo y dos átomos de carbono abandonan el ciclo como  $\text{CO}_2$  en las descarboxilaciones sucesivas catalizadas por el isocitrato deshidrogenasa y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. En las cuatro reacciones de oxidación-reducción en el ciclo, tres pares de electrones se transfieren a  $\text{NAD}^+$  y un par a  $\text{FAD}$ . Estos transportadores de electrones reducidos son oxidados posteriormente por la cadena de transporte de electrones para generar aproximadamente 9 moléculas de ATP. (14)

Oxidación del piruvato		
$\begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Piruvato</p>	$\begin{array}{c} \text{CoA-SH} \\ \curvearrowright \\ \text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2 \end{array}$ <p>Reacción de oxidación</p>	$\begin{array}{c} \text{S-CoA} \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Acetil CoA</p>
<p><b>1</b></p> <p>Se elimina grupo carboxilo del piruvato, liberando dióxido de carbono</p>	<p><b>2</b></p> <p>NAD<sup>+</sup> se reduce a NADH.</p>	<p><b>3</b></p> <p>Grupo acetilo se transfiere a coenzima A, y resulta acetil CoA</p>

Figura 4. Oxidación del piruvato

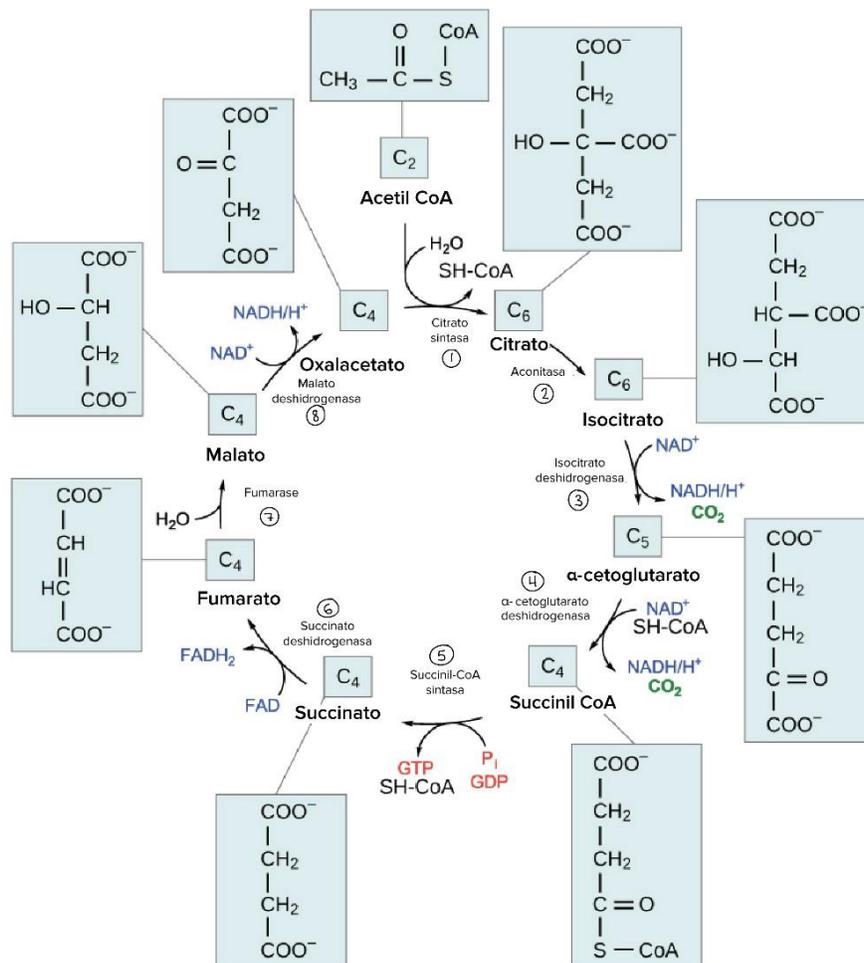


Figura 5. Ciclo de Krebs

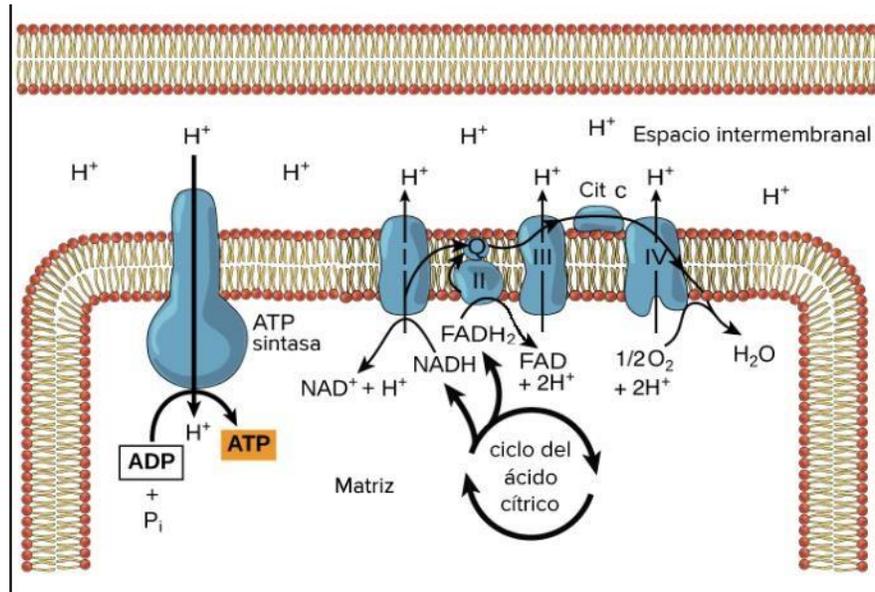
### 1.5.3 Cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora de electrones es una serie de proteínas y moléculas que se encuentran en la membrana interior de la mitocondria. Los electrones pasan de un complejo de la cadena de transporte al siguiente en una serie de reacciones redox. La energía liberada en estas reacciones se captura como un gradiente de protones, el cual se utiliza a su vez para formar ATP.

Los NADH y FADH<sub>2</sub> reducidos en el ciclo de Krebs transfieren sus electrones a las moléculas cercanas al inicio de la cadena transportadora de electrones. Cuando están en su forma NAD<sup>+</sup> y FAD, pueden volver a ser utilizados para volver a generar poder reductor.

El movimiento de los electrones en la cadena va de un lugar más alto de energía a un nivel más bajo, lo que libera energía. Esta energía se utiliza para bombear iones H<sup>+</sup> fuera de la matriz, hacia el espacio intermembranal, generando un gradiente electroquímico. Los electrones se transfieren a una molécula de oxígeno, que se une con H<sup>+</sup> para formar agua.

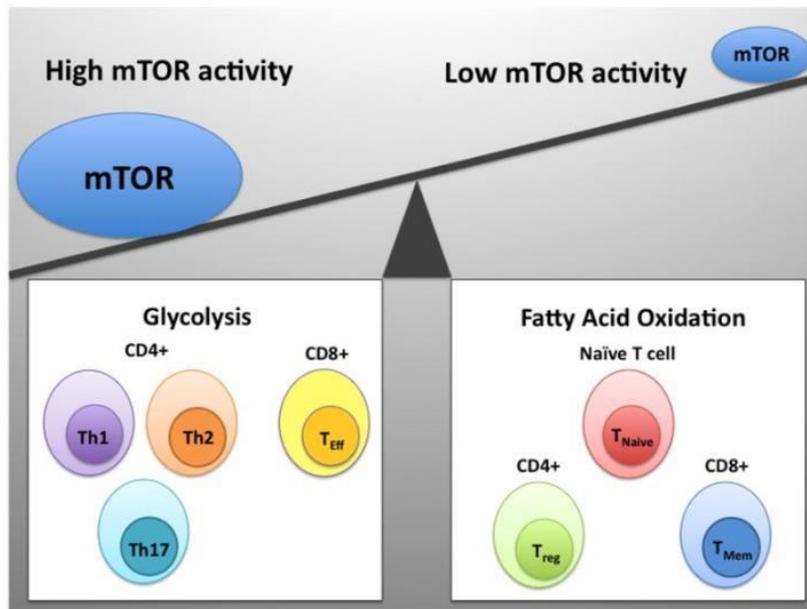
Cuando el flujo del gradiente de regreso a la matriz, los iones H<sup>+</sup> pasan a través de la ATP sintasa para sintetizar ATP. (14)



**Figura 6. Cadena transportadora de electrones.**

#### 1.5.4 Metabolismo en la activación de linfocitos T

Los linfocitos T vírgenes que circulan en la periferia dependen de energía que se genera por la oxidación  $\beta$  de ácidos grasos. En este estado hay una disminución en la actividad de mTOR. Cuando hay una activación de los linfocitos T a través de antígenos y coestimuladores, las células T cambian su metabolismo a una glucólisis aeróbica. mTOR es responsable de este cambio dado que mTORC1 regula factores de transcripción clave para la activación de linfocitos T, estos son: Myc y HIF-1 $\alpha$  (factor inducible por hipoxia). Estos factores de transcripción son importantes para inducir la activación de genes relacionados a la glucólisis.



**Figura 7. Importancia de mTOR en la diferenciación celular**

mTOR fosforila al represor traduccional 4E-BP1 y lo inhibe, permitiendo la liberación eIF-4e lo que promueve la traducción de Myc. La regulación de Myc dependiente de mTOR es un paso crucial para que las células T vírgenes pasen a ser activas. (4 y 8)

La glucólisis es una vía pobre energéticamente hablando porque solo genera 2 ATP a comparación de la cadena transportadora de electrones que genera 36 moléculas de ATP. La activación de linfocitos T promueve la activación de la vía de la glucólisis para generar esqueletos carbonados que le ayudaran a la célula a tener los metabolitos necesarios para su reprogramación celular. Esta activación también va a promover la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través del complejo III. (15)

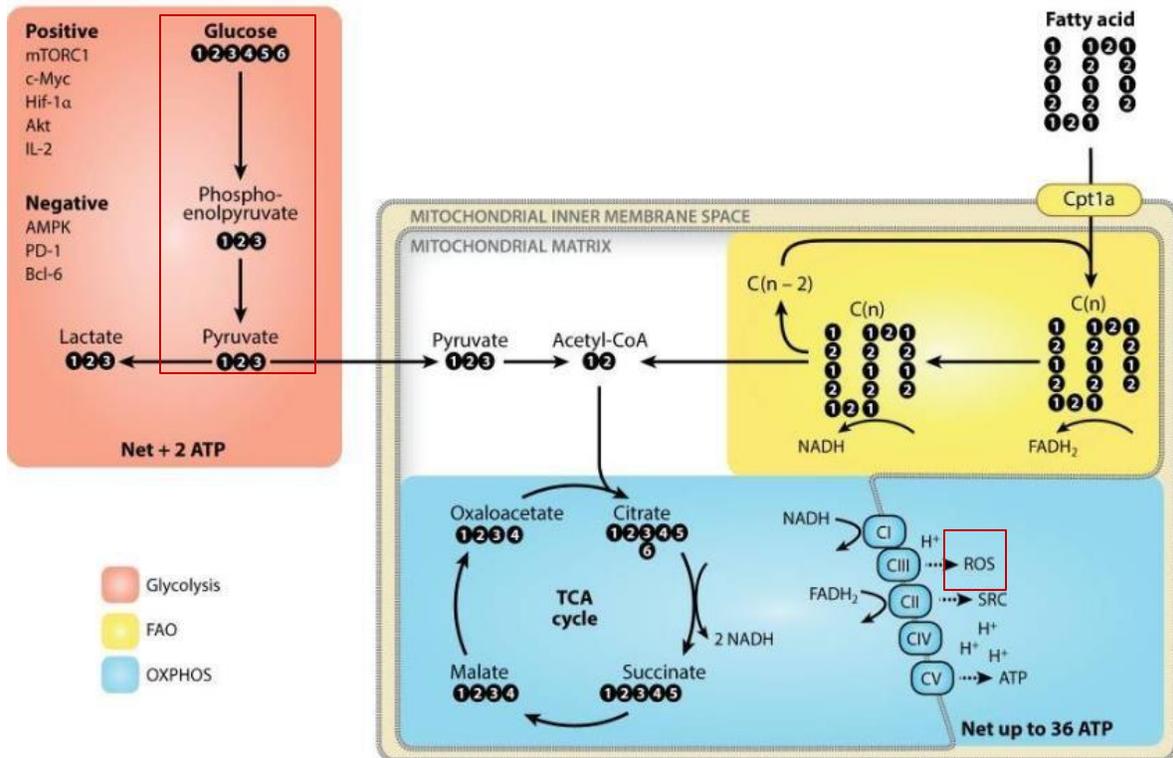


Figura 8. Vías metabólicas en la activación de linfocitos T (15)

## 1.6 Especies reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas pequeñas de una vida corta que químicamente son muy reactivas. Se caracterizan por tener radicales libres (electrones desapareados), que se pueden unir y provocar daño a moléculas que pueden ser importantes para el funcionamiento de la célula (ADN, lípidos y proteínas). En la célula el principal productor de ROS es la mitocondria, que expresa complejos de la cadena transportadora de electrones (ETC), en donde se transfieren electrones del NADPH y succinato a la molécula de oxígeno a través de la vía REDOX. El oxígeno debe recibir cuatro electrones para reducirse a H<sub>2</sub>O. Pero la cadena transportadora de electrones no es perfecta y puede cometer errores como por ejemplo, el O<sub>2</sub> sufre una reducción de uno o dos electrones. Los

complejos I y III son los principales productores de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en la mitocondria.

(4 y 5)

De las ROS más importantes que tienen funciones biológicas son las siguientes: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). El anión superóxido puede generar otras ROS, por ejemplo, el  $H_2O_2$  se genera a partir del superóxido producido por las mitocondrias y NADPH oxidasas.

El superóxido se forma a partir de la reducción de un electrón del oxígeno molecular ( $O_2$ ) y dentro de la célula se convierte por las enzimas superóxido dismutasas 1 y 2 (SOD 1 y 2) en  $H_2O_2$ . Estas superóxido dismutasas evitan que se acumule el anión superóxido que puede dañar e inactivar proteínas. Los aniones hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) se producen a partir de  $H_2O_2$  presencia de iones ferrosos (Reacción de Fenton) (18).

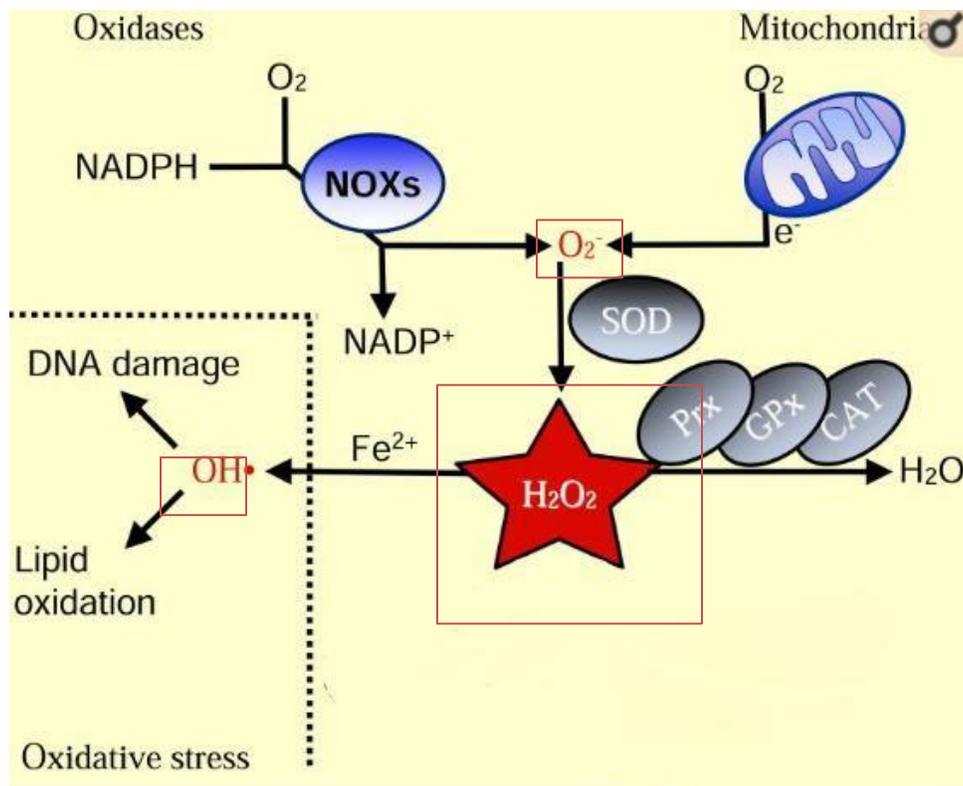


Figura 9. Producción de ROS (18)

### 1.6.1 Antioxidantes

Como ROS en exceso provoca daño en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, el cuerpo humano a través de miles de años de evolución ha diseñado sistemas antioxidantes para contrarrestar y eliminar especies reactivas de oxígeno.

Los antioxidantes son moléculas lo suficientemente estables para donar un electrón a un radical libre para neutralizarlo, más que eliminar e inhibir vías generadoras de ROS. (16) (18)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puede convertir a H<sub>2</sub>O por proteínas antioxidantes como: ácido ascórbico, melatonina, glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), glutatión oxidado (GSSH)/ glutatión reducido (GSH) y las superoxidasas dismutasas (SOD). (17) y (18)

### 1.6.2 Ejemplos de antioxidantes

#### **Superóxido dismutasa**

Son una clase de enzimas que catalizan la descomposición del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Las enzimas SOD están presentes en casi todas las células aeróbicas y en los fluidos extracelulares. En los humanos, existen tres formas de superóxido dismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 es extracelular. El primero es un dímero, mientras que los otros son tetrámeros. (17)

#### **Catalasa**

El peróxido de hidrógeno es un subproducto dañino de muchos procesos metabólicos normales: Para evitar daños, debe convertirse rápidamente en otras sustancias menos peligrosas. Con este fin, las células usan con frecuencia la catalasa para catalizar rápidamente la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno gaseoso menos reactivo y moléculas de agua. (17)

**Glutación reducido (GSH)/ glutación oxidada (GSSG)**

GSH es el principal mecanismo antioxidante utilizado por las células T. GSH es un tripéptido que consiste en glutamina, glicina y cisteína. GSH obtiene su actividad antioxidante del grupo tiol dentro de la cisteína, ya que los grupos tiol son potentes agentes reductores que pueden eliminar libremente los electrones de las moléculas ROS. GSH se convierte en su forma oxidada de disulfuro de glutación (GSSG), que puede convertirse de nuevo en GSH activo mediante la reductasa de GSH. (17) (19)

**Glutación peroxidasa**

La glutación peroxidasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos. Existen al menos cuatro isoenzimas de glutación peroxidasa diferentes en animales. La glutación peroxidasa 1 es la más abundante y es un eliminador muy eficiente del peróxido de hidrógeno, mientras que la glutación peroxidasa 4 es más activa con los hidroperóxidos lipídicos. (17)

**Ácido ascórbico**

Es un antioxidante monosacárido que debe obtenerse de la dieta, es un agente reductor y puede reducir y neutralizar las ROS. (17)

**Melatonina**

Es una hormona natural que funciona como antioxidante, pero tiene la desventaja de no ser cíclica, por lo tanto, una vez oxidada, no puede reducirse a su estado anterior. (17)

## 2. ANTECEDENTES

Existe una interacción compleja entre el metabolismo y la inmunidad que debe ser regulada con gran precisión para realizar funciones biológicas. Se sabe que señales inflamatorias activan procesos anabólicos necesarios para apoyar respuestas inmunes: Las células T pueden tener una reprogramación metabólica para soportar distintos tipos de funciones y actividades celulares, las células T vírgenes y de memoria dependen de metabolismo catabólico. (1,2 y 6)

Las células T CD4+ neonatales a nivel basal presentan una sobreexpresión de enzimas de la vía del glicólisis, así como de componentes de la vía de HIF1 (Kempis Calanis, datos no publicados). Asimismo, en linfocitos T CD8+ neonatales en estado basal se ha reportado que tienen una sobreexpresión de genes asociados a glicólisis y un elevado ROS citoplasmático. (Galindo-Albarrán, A. O, 2016). En otro trabajo, se encontró que los linfocitos T neonatales tienen altos niveles de ROS tanto citoplasmático como mitocondrial (Sanchez-Villanueva, et al. 2019; Gutiérrez-Reyna, et al. 2020). Más aún, un modelo lógico validado experimentalmente nos predice que parte de resistencia a la activación de las células T CD8+ neonatales pudiera ser debido a la alta producción de ROS en estas células. En el laboratorio se está evaluando el transcriptoma de linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos a nivel basal y después de activación y resultados preliminares apuntan a que en estas células también están sobre-expresados los genes de la glucólisis. Así, nos preguntamos en este trabajo si esta sobreexpresión de genes de glicólisis de los linfocitos T CD4+ neonatales se puede evaluar por RT-qPCR y si, de manera análoga a los linfocitos T CD8+, lleva a la producción elevada de ROS.

### **3. HIPÓTESIS**

Observaremos un aumento en la expresión de genes asociados con glicólisis en células T CD4+ neonatales, tanto a nivel basal como después de su activación a través del TCR. Asimismo, encontraremos una alta producción de ROS en los linfocitos T CD4+ de neonatos que aumentará un más después de la activación.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión de genes de las vías metabólicas de linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos, en condiciones basales y estimulados con CD3/ CD28 y la producción de ROS citoplasmático y mitocondrial.

#### **4.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar las especies reactivas de oxígeno en linfocitos T CD4+ de neonatos y de adultos en condiciones basales y estimuladas con CD3 /CD28.
- Evaluar por RT-qPCR algunos genes sobreexpresados que participan en la vía de la glucólisis (LDHA, HK2 y HK1) que se encontraron en un análisis del transcriptoma de linfocitos T CD4+ de neonatos y de adultos en condiciones basales y estimuladas con CD3/CD28, que realizó la M. en C. Linda Aimara Kempis Calanis.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Obtención de PBMCS y CBMCS**

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de adultos hombres sanos entre 20 a 30 años y sangre de cordón umbilical de neonatos sanos de término. Estas muestras se obtuvieron por convenio con Servicios de Salud de Morelos en las sedes del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, el Hospital General Dr. José G. Parres de Cuernavaca y el Hospital General de Temixco. La sangre de cordón umbilical se obtuvo con el consentimiento de la madre y sólo se colectó sangre de cordón de neonatos de más de 38 semanas de gestación. Las muestras se obtuvieron de la sangre colectada del cordón umbilical, después del nacimiento del bebé y antes de la expulsión de la placenta para evitar la contaminación con sangre de la madre. La sangre se recolectó en tubos estériles con 300ul de EDTA (que sirve como anticoagulante) y se procesó ese mismo día. Las células de adulto se obtuvieron de paquetes leucocitarios de adultos sanos, procesados el mismo día de su colecta. La sangre de cada muestra se sometió a centrifugación utilizando un polisacárido hidrofílico llamado Lymphoprep (Ficol hypaque, Sigma-Aldrich) formando un gradiente de densidad, que va a separar en distintas fases a las células presentes en la muestra. Arriba del ficol se encontrará una capa blanca en la cual van a estar los linfocitos T, B, células NK y monocitos que en conjunto se denominan células mononucleares de sangre de cordón umbilical y células mononucleares de sangre periférica (CBMC y PBMC, respectivamente). Una vez aisladas se realizó un lavado con un buffer salino de fosfato (PBS) 1X. Después se realizó un conteo de células en una cámara de Neubauer y se incubaron toda la noche en cajas Petri a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con L-glutamina, ampicilina como antibiótico y

Suero Fetal Bovino (SFB) al 5%. Para que las células no estén estresadas se dejan en una concentración de  $1 \times 10^6$  células por ml. Al realizar en conteo de células en muestras de neonato, se guardaron aproximadamente 10-15 millones de CBMCs para la evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno.

## **5.2 Purificación de CD4+ vírgenes**

Del gradiente formado con ficol, se guardaron 2 ml de eritrocitos a los que se agregó 8 ml de medio y se guardaron en la incubadora, ya que se utilizan para la purificación de linfocitos T CD4+. Al día siguiente las células se mezclaron con 5 ml de eritrocitos y se les adicionó RosetteSep Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail. La mezcla estuvo en agitación leve para inducir a la formación de complejos entrecruzados con anticuerpos de células mononucleares no deseados con eritrocitos. El RosetteSep sirve para separar las células T CD4+ de todas las demás células mononucleadas por selección negativa. Este kit contiene un coctel de complejos de anticuerpos que reconocen a CD8, CD16, CD19, CD36, CD56 y CD66b en anticuerpos tetraméticos unidos a un anticuerpo anti-glicoforina que permite agregar en rosetas a todas las células que no queremos. Después se realizó otro gradiente de densidad con ficol que permite la eliminación de las células que son reconocidas por estos complejos y obtener así poblaciones de células T CD4+. Para la eliminación de células T de memoria se utilizarán marcadores celulares de memoria como anti-CD45RO y anti-CD44 para las muestras de adulto y para las de neonato se utilizaron anticuerpos como anti-CD11b y anti-B220 estos anticuerpos se acoplaron toda la noche a perlas magnéticas (20µl de Protein A/G Magnetic, Pierce). Estas perlas son nanopartículas magnéticas que son recubiertas por anticuerpos contra un antígeno

en particular. Esto hace que las células que expresen este antígeno puedan unirse a las perlas magnéticas. En este paso las células de memoria están pegadas a las perlas y las células T CD4+ vírgenes se recolectaron. Finalmente, las células se sometieron a un proceso de lisis de eritrocitos.

### **5.3 Tinción de marcadores de membrana**

Se lavaron las células con 1 ml de PBS y se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos. Se tiró el sobrenadante y se resuspendieron en seco. Se agregaron los anticuerpos (para realizar un análisis de pureza), el primer anticuerpo fue anti-CD4-APC y un anti-CD3-PE. Se dejaron incubar 30 minutos en oscuridad, después se lavaron con 1 ml de PBS y se fijaron las células con paraformaldehído al 10%, con solución de Facs Juice.

### **5.4 Tinción de CBMCs**

Aproximadamente con  $5 \times 10^6$  de CBMCs se les realizó un lavado con PBS y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos: Se tiró el sobrenadante y se resuspendieron en seco. Se agregaron los anticuerpos anti-CD3 PE, anti-CD3 Violet y anti-CD4 APC. Se dejaron incubar por 30 minutos en oscuridad, después se le hizo un lavado con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído al 10%, con solución de Facs Juice.

### **5.5 Citometría de flujo**

La citometría es una técnica que permite analizar las características de una población celular conforme un haz de laser incide sobre cada célula. Cada preparación celular será analizada para los marcadores CD4 APC, CD3 PE y

CD45RO+ FITC para controlar la pureza de nuestra población. Los datos obtenidos se analizarán con la ayuda del programa FlowJoX.

### **5.6 Estimulación a través de CD3/CD28**

Las células T CD4+ vírgenes se pusieron en placas de 24 pozos a una densidad de  $3-5 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI en un volumen de 500 ul. Después se añadieron los anticuerpos: anti-CD3, anti-CD28 y anti-IgG Goat anti-mouse de ratón a una concentración final de 1 ug/ml, para inducir el entrecruzamiento de los anticuerpos. Se incubaron las células a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas. Al terminar las 6 horas de estimulación, se recolectaron las células y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos. A cada pellet se le añadió 500 ul de Trizol, se homogenizó con pipeta, después se dejó incubar a T.A. por 5 minutos y luego se agitó en el vortex de 3 a 5 minutos. Se guardaron las muestras a -80°C hasta la extracción de RNA.

### **5.7 Estimulación de CBMCs y CD4+**

De los 10-15 millones de CBMCs y también las células T CD4+ vírgenes, se pusieron en placas de 96 pozos a una densidad de  $1-2 \times 10^6$  células/ml en un volumen total de 100 ul. Posteriormente se les añadieron los anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y anti-IgG Goat anti-mouse, todos a una concentración final de 1 ug/ml. Se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas.

### **5.8 Evaluación de la estimulación de CBMCs mediante la expresión de CD69**

40 minutos antes de las 6 horas de estimulación con anti-CD3 y anti-CD28, se prepararon 500,000 células de cada muestra de CBMCs. Las células se lavaron con solución FACS Juice. Posteriormente se les adicionaron los anticuerpos anti-

CD4 conjugado a APC, anti-CD3 conjugado a Violet y anti-CD69 conjugado a FITC. Se incubaron por 30 minutos en oscuridad a 4°C. Después de la incubación se les hicieron dos lavados con FACS y se continuó con el protocolo para la producción de especies reactivas de oxígeno.

### **5.9 Evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno en CBMCs y en linfocitos T CD4+ de adulto.**

Las células T CD4+ de adulto y las CBMCs se incubaron por oscuridad durante 15 minutos a 37°C adicionada con MitoSOX Red Superoxide Indicador, para evaluar el ROS mitocondrial, a una concentración final de 5 uM y con Dihidroetidio (DHE), para evaluar el ROS citoplasmático, a una concentración final de 5 uM. Después de la incubación las células se lavaron 2 veces con FACS Juice y finalmente se dejaron en un volumen de 500 ul de FACS, se guardaron a 4°C hasta el análisis del citómetro. Se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de DHE y MitoSOX usando el software FlowJo X.

### **5.10 RT-qPCR**

PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia.

El compuesto más utilizado es SYBR Green, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán las uniones y las señales de fluorescencia del SYBR Green. Se cuantificará la expresión por medio de curvas estándar para cada gen en relación con el gen de referencia  $\beta$ 2-microglobulina.

### **5.10.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA de linfocitos T CD4+**

Cada muestra de linfocitos T CD4 que se guardó en TRIzol se descongeló y se homogenizó mediante agitación en el vórtex durante 5 minutos, seguidamente se añadieron 200 ul de cloroformo, se agitó durante un minuto para romper las membranas celulares y se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa superior se recolectó a un tubo nuevo y se añadieron 500 ul de isopropanol para precipitar el RNA total, se incubó durante 10 minutos a 25°C y luego se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Se agregó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Finalmente el etanol se desechó y el pellet de RNA se dejó secar al aire durante 5 minutos al cabo de los cuales se le añadió 30 ul de agua libre de nucleasas y se almacenó en a -80°C hasta la síntesis de cDNA. El cDNA de cada muestra se sintetizó a partir de 50 ug de mRNA, usando con los reactivos del Kit Revert Aid Reverse Transcriptase. Al final se obtuvieron 20 ul de cDNA que se almacenaron a -80°C hasta la medición por ensayos cuantitativos de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT- qPCR).

### **5.10.2 Evaluación de la transcripción mediante qPCR en tiempo real**

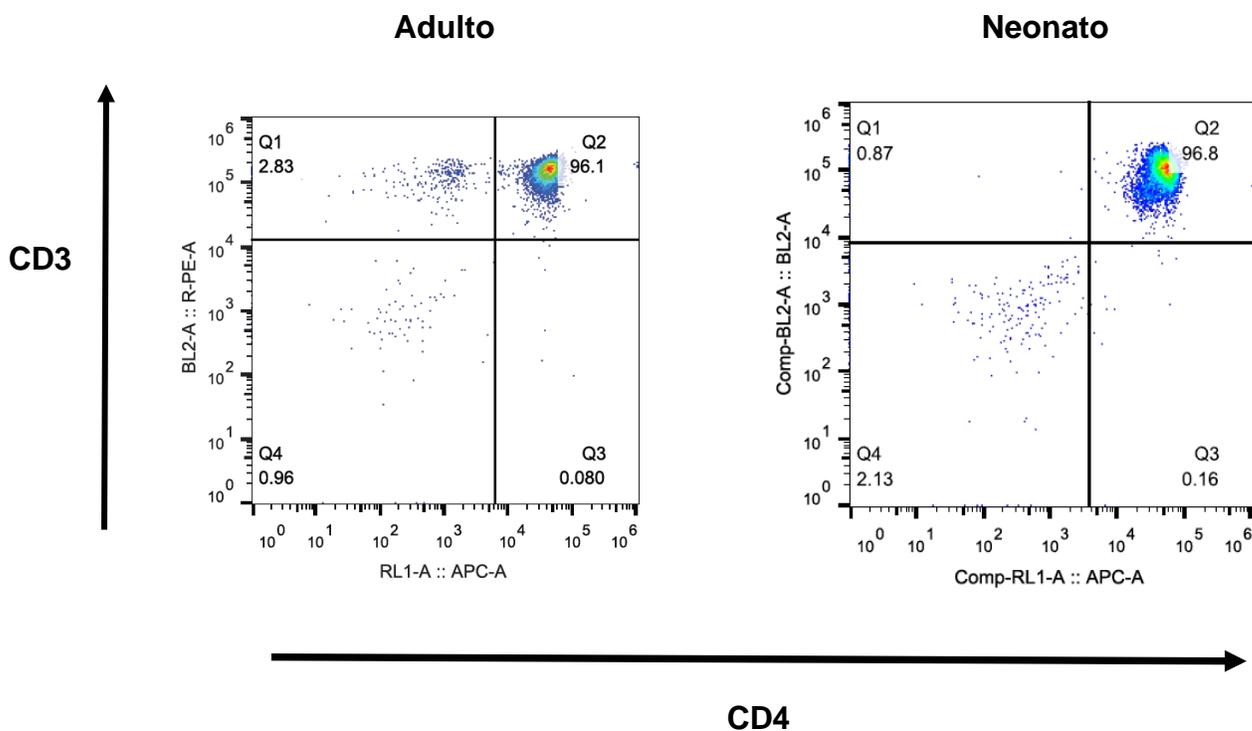
La expresión de los genes de las enzimas que participan en la glucólisis a nivel de mRNA se midió en las muestras de cDNA provenientes de linfocitos T CD4+, se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos para secuencias de mRNA de cada uno de los genes en estudio. Para la amplificación se utilizó SYBR Green/ROX qPCR Master Mix y se aplicó cDNA de cada muestra a varias diluciones de trabajo. Para el análisis de los resultados se utilizó el método de medición de de expresión relativa con la curva estándar. Se utilizó la cuantificación

de los niveles de mRNA de la proteína beta-2 microglobulina como gen de referencia para la normalización en cada muestra.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Purificación de linfocitos T CD4+

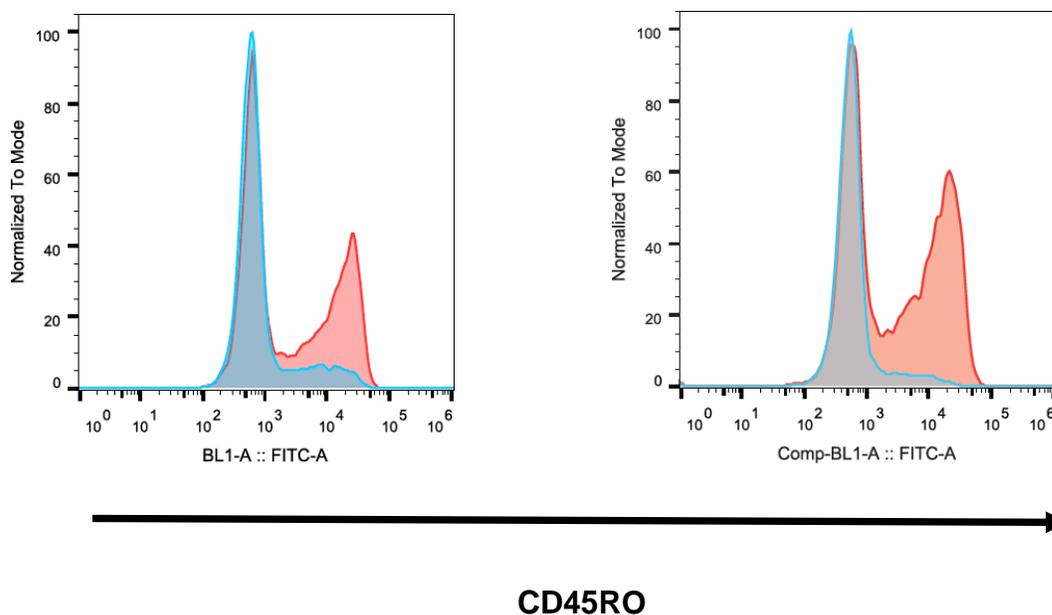
Se purificaron linfocitos T CD4+ neonatales y de adulto como se describió en la metodología. Se lograron obtener linfocitos T CD4+ con una pureza superior al 92%. La pureza de cada muestra fue evaluada mediante la técnica de citometría, realizando tinciones de membrana, usando anticuerpos monoclonales anti-CD3 PE y anti-CD4 APC. En la figura 10 se muestra la pureza obtenida en un adulto y un neonato.



**Figura 10. Purificación de linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos.** Se muestra la pureza representativa de linfocitos T CD4+ de un adulto (izquierda) y de un neonato (derecha). En el eje X se muestra el porcentaje de células que expresan al receptor CD4, en el eje de Y se muestra el porcentaje de células que expresan al receptor CD3. Nuestros linfocitos T CD4+ se encuentran en el cuadrante que es positivo para CD3 y CD4 (cuadrante superior derecho).

## 6.2 Obtención de linfocitos T CD4+ vírgenes.

Una vez obtenida la población de linfocitos T CD4+ totales, se eliminaron los linfocitos T CD4+ de memoria con el uso de perlas magnéticas acopladas a CD45RO y CD44. Para medir la eficacia con la que se eliminaron los linfocitos T CD4+ de memoria, se tiñeron las células con un anticuerpo anti-CD45RO (FITC). En la figura 11 se muestra la expresión de CD45RO en linfocitos T CD4+ totales y en linfocitos T CD4+ vírgenes en dos experimentos independientes de dos adultos.

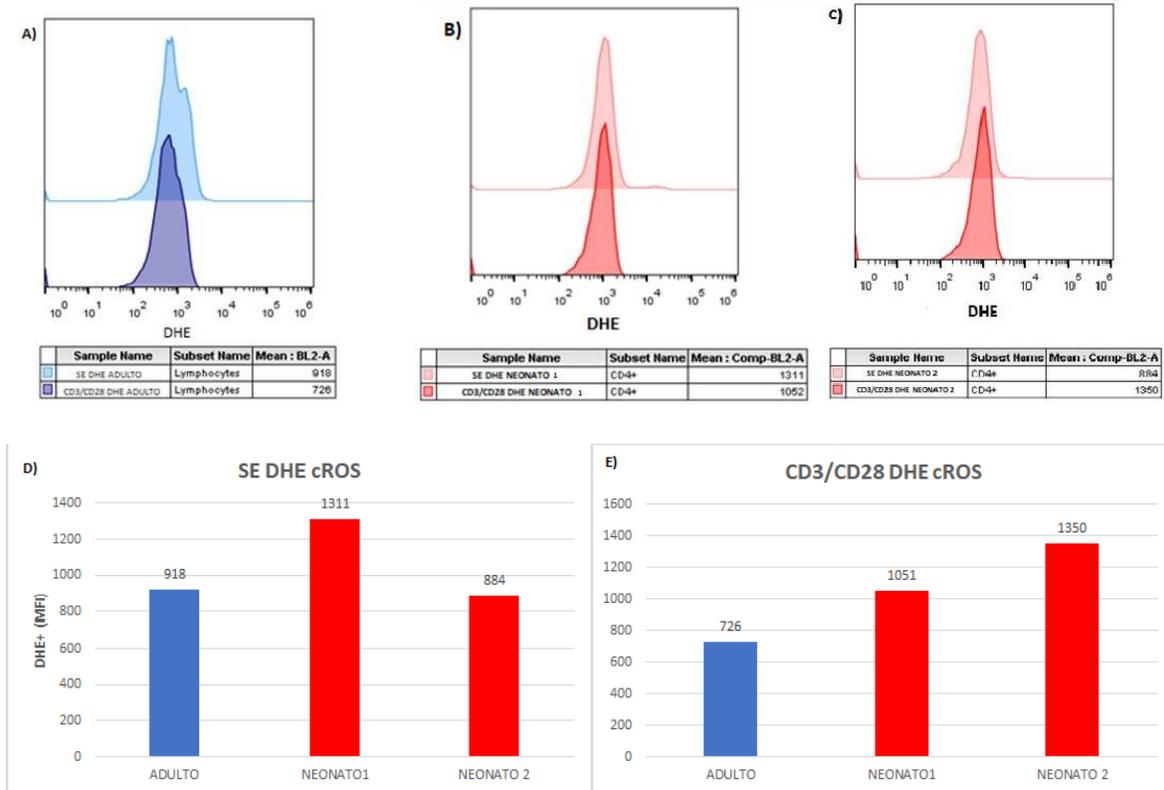


**Figura 11. Expresión de CD45RO.** En el histograma rojo se muestra la población CD45RO+ de linfocitos T CD4+ totales y la población CD45RO+ de linfocitos T CD4+ vírgenes se muestra con el histograma azul.

### 6.3 Medición de los niveles de ROS en poblaciones CD4+ de un adulto y de dos neonatos en estado basal y estimulado con CD3/CD28.

Los linfocitos T CD4+ del adulto y las células CD4+ de los neonatos se estimularon *in vitro* durante 6 horas mediante el uso de anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y el entrecruzador anti-IgG Goat anti-Mouse, para evaluar el impacto que tiene la activación sobre la producción de especies reactivas de oxígeno.

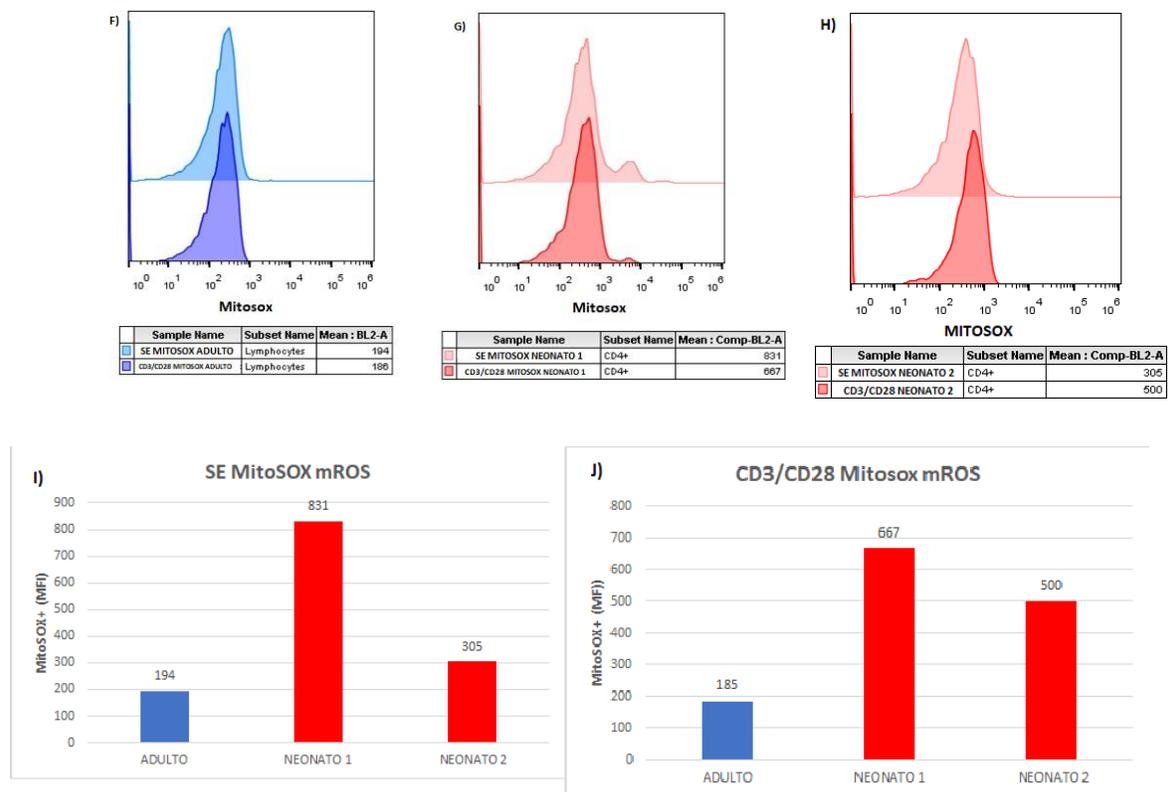
Se midieron los niveles de ROS citoplasmático y mitocondrial tiñendo las células con DHE y MitoSOX, respectivamente en linfocitos T CD4+ de un adulto y en la población CD4+ de CBMCs de dos neonatos en estado basal y estimulado con CD3/CD28. Para medir ROS en las células teñidas con DHE, se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de cada muestra en estado basal y en estado estimulado (**Figura 12A, B y C**). Con estos valores de MFI se realizaron las **figuras D y E**, lo que indica que en las muestras neonatales se detectaron mayores niveles de fluorescencia al comparar con la muestra del adulto. Este resultado indica que las células CD4+ de neonatos producen más ROS citoplasmático en estado basal y en estado estimulado que las células T CD4+ del adulto. En respuesta a la estimulación, se observa claramente que en la muestra de adulto, las ROS disminuyeron, como observamos en las células T CD8+ (Sanchez-Villanueva, et al. 2019). En las muestras neonatales tuvimos dos resultados diferentes, en una muestra el Ros disminuyó después de la estimulación y en la otra aumentó. Hacen falta más replicas para interpretar este resultado, fue lamentable que no pudimos procesar más muestras debido a la pandemia para evaluar la significancia estadística.



**Figura 12. La población de células CD4+ de neonatos producen mayores niveles de ROS citoplasmático en estado basal y estimulado que las células T CD4+ de adultos.** Los linfocitos T CD4+ de adulto en estado basal y en estado estimulado se incubaron con sondas fluorescentes DHE (A). Los histogramas (A, B y C) representan el patrón de fluorescencia medido por el canal BL2-A (DHE), en un estado basal y en un estado activado para cada muestra de neonato (rojo) y adulto (azul). Para obtener la figura C se calcularon los valores de MFI para las muestras de adulto y neonato en estado basal y estimulado con CD3/CD28 utilizando FlowJo X (Mean: BL2-A) y se compararon.

Por otro lado, se utilizó el reactivo fluorescente MitoSOX Red para la medición de ROS mitocondrial (mROS). SE calculó las MFI de cada muestra en estado basaly en estado estimulado con CD3/CD28 (**Figura 13F, G y H**). Con estos valores de MFI se realizaron las **figuras I y J**, estas figuras indican que en las muestras neonatales detectaron mayores niveles de fluorescencia al comparar con la

muestra del adulto con la sonda MitoSOX Red. Este resultado indica que las células CD4+ neonatales producen más ROS mitocondrial en estado basal y en estado estimulado que las células T CD4+ de adulto. Los niveles de ROS mitocondrial debido a la activación tuvieron un comportamiento similar a los niveles citoplasmáticos, disminuyeron en la muestra de adulto y en la del neonato 1 y aumentaron en la otra de neonato 2. Se necesitan más replicas de este experimento para obtener una significancia estadística.



**Figura 13.** Las células CD4+ de neonatos producen mayores niveles de ROS mitocondrial en estado basal y en estado estimulado con CD3/CD28 que los linfocitos T CD4+ de adulto. Las células CD4+ de las muestras de neonato y los linfocitos T CD4+ de adulto se incubaron con sondas fluorescentes MitoSOX Red. Los histogramas representan un patrón de fluorescencia

medido por el canal BL2-A (MitoSOX), en un estado basal y en un estado estimulado para cada muestra de neonato y adulto (**F, G y H**). Para obtener la **figura I y J** se calcularon los valores de MFI para cada muestra de adulto y de neonato en estado basal y estimulado con CD3/CD28 utilizando FlowJo X (Mean: BL2-A) y se compararon.

En resumen, los experimentos de medición de ROS citoplasmático y mitocondrial indican que las células CD4+ neonatales producen más ROS citoplasmático y ROS mitocondrial en estado basal que las células T CD4+ de adulto.

#### **6.4 Medición de los niveles de expresión genética de enzimas que participan en la glucólisis en linfocitos T CD4+ de adulto y neonato tras la estimulación con CD3/CD28.**

En el laboratorio se evaluó el transcriptoma de linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos a nivel basal, (M. en C. Linda Aimara Kempis Calanis, resultados no publicados). Resultados preliminares apuntan a que en células T CD4+ de neonatos en un estado basal se sobreexpresan genes de enzimas que participan en la glucólisis, principalmente HK1, HK2 y LDHA en comparación con células T CD4+ de adulto en estado basal. Además, tras el estímulo a través del TCR se disminuía la expresión de estos genes tanto en células T CD4+ de adulto como de neonatos.

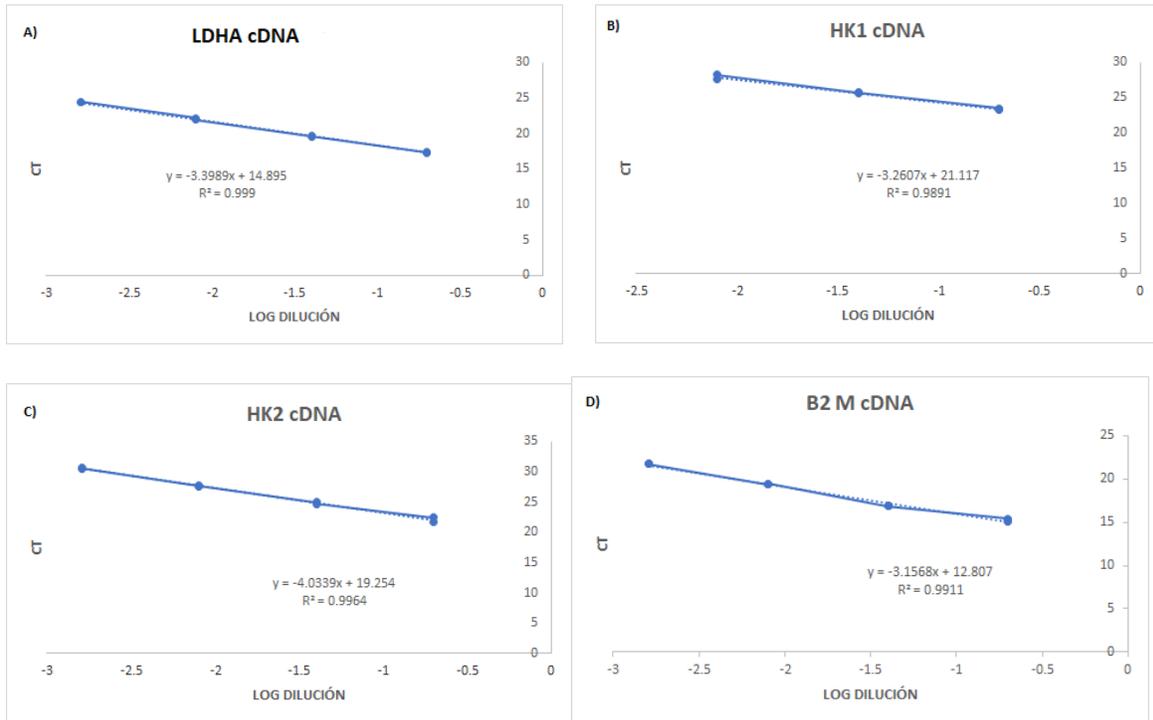
Las muestras que se utilizaron para medir la expresión genética fueron los linfocitos T CD4+ de neonato y adulto en estado basal y en estado estimulado con CD3/CD28, estas últimas se sometieron a 6 horas de estimulación con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y entrecruzador anti-IgG Goat anti-Mouse. Para este trabajo se decidió analizar la regulación de la expresión algunos genes de enzimas que

participan en la vía de la glucólisis. Las muestras se sometieron a extracción de RNA total y se diseñaron cebadores específicos para amplificar y detectar los niveles de los genes en estudio (**Figura 14**), La evaluación fue mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) con el reactivo SybrGreen. Para cada gen se desarrolló una curva estándar con el propósito de determinar la eficacia de los cebadores y obtener una ecuación de la recta, que toma en cuenta la eficacia de amplificación de cada gen (**Figura 15**). Los cebadores que se utilizaron fueron los siguientes:

LDHA FORWARD	5' CgCCgATTCCggATCTCATT 3'
LDHA REVERSE	3' AAgTTCATCTgCCAAgTCCTTCA 5'
HK1 FORWARD	5' CTCCTggCCTATTACTTCACgg 3'
HK1 REVERSE	3' ATCTCCCTTTTCAGAgCCATCAg 5'
HK2 FORWARD	5' ACgCCAAAATCACgTCTCCg 3'
HK2 REVERSE	3' ggTCAACCTTCTgCACTTggTC 5'

**Figura 14. Diseño de cebadores para LDHA, HK1 y HK2.**

Los cebadores se diseñaron utilizando la secuencia de referencia de mRNA de NCBI y Primer-Blast (NCBI), teniendo precaución en introducir una unión exón-exón y que fuera entre 18 y 24 nucleótidos.



**Figura 15. Curvas estándar de los cebadores de los genes LDHA, HK1, HK2 y el gen control B2M.** Para estas curvas se utilizó una muestra de PBMCs de adulto, del cDNA concentrado de la muestra se prepararon diluciones 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625. En todos los casos se observa que la regresión lineal tiene un valor chi cuadrada por arriba de 0.95.

Finalmente, sólo pudimos evaluar un gen en células T CD4+ de neonato y adulto, dado que no tuvimos suficientes muestras debido a las restricciones de acceso a los hospitales durante la pandemia. La enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA) tuvo niveles de expresión basal diferentes entre linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos. En la muestra de neonato y adulto se evaluó la expresión en estado basal del gen de la enzima LDHA, y se observó que en la muestra de neonato en estado basal tiene niveles muy altos de expresión de LDHA, tras la estimulación la expresión de la enzima LDHA disminuyó considerablemente en la muestra de neonato, este resultado corrobora evidencias del análisis del transcriptoma para la expresión basal de este gen (Kempis Calanis, datos no publicados).

Este resultado indica que en linfocitos T CD4+ tras la activación, la enzima LDHA disminuye su expresión a nivel mRNA lo que provoca que en las células T CD4+, el piruvato no pueda convertirse en lactado por lo tanto el piruvato se puede oxidar y convertirse en Acetil-CoA y así poder entrar al ciclo de ácido cítrico, esto hace que haya un aumento de poder reductor en forma de NADPH dentro de la mitocondria lo que genera una alta activación de la cadena transportadora de electrones, produciendo mayores especies reactivas a nivel mitocondrial.

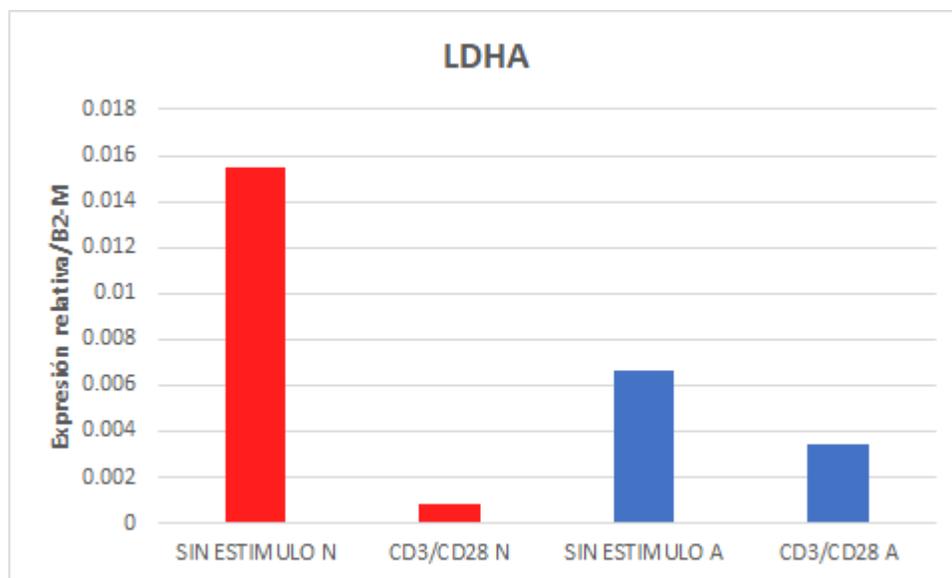


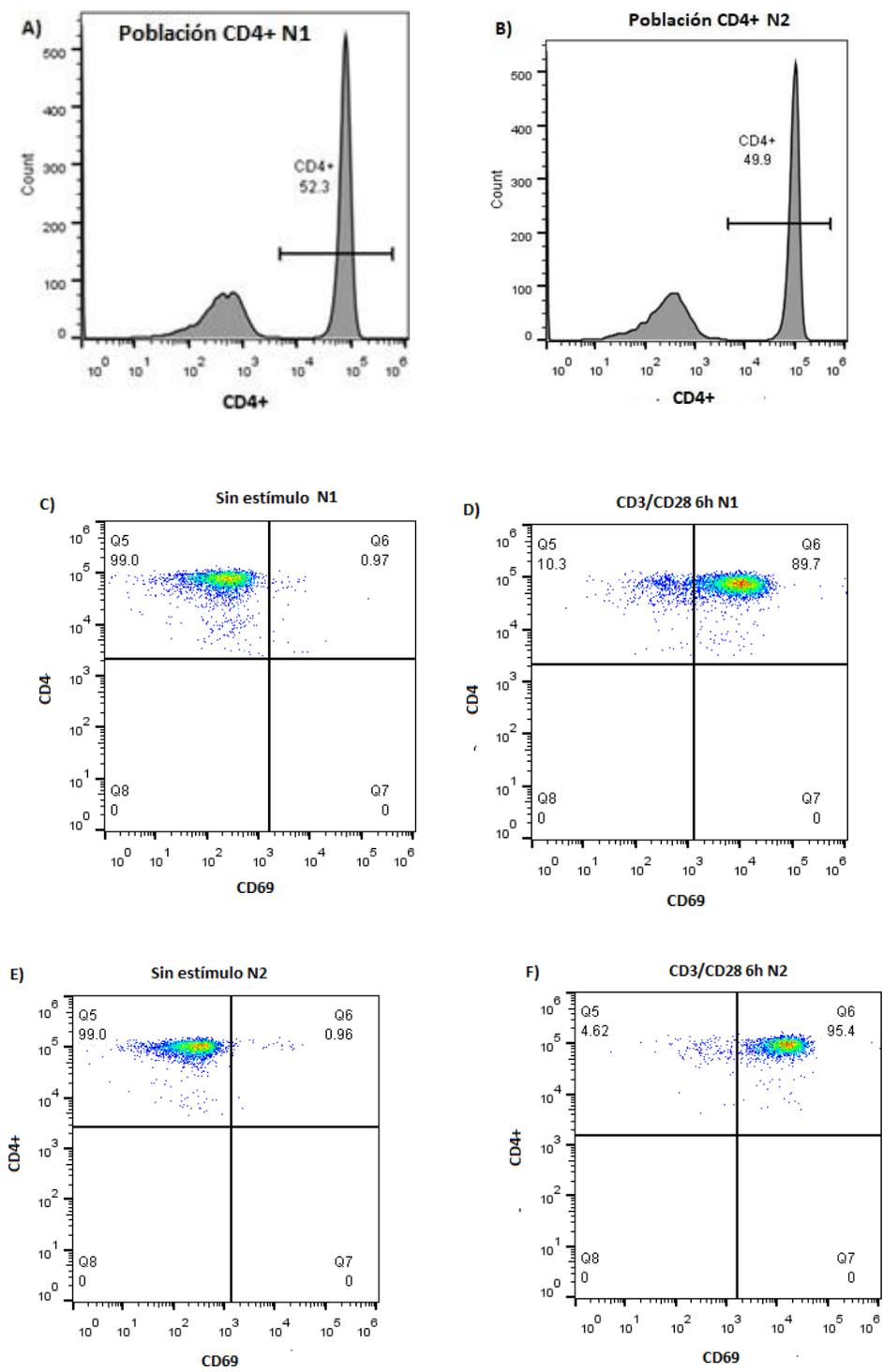
Figura 16. Expresión de mRNA de la enzima LDHA en un neonato y un adulto

### 6.5 Medición de la activación de CBMCs mediante la expresión de CD69

En un trabajo del laboratorio se evaluó la expresión de CD69 en linfocitos T CD8+ para medir la activación de estas células, el resultado fue que la expresión de CD69 en células T CD8+ neonatales no expresan tanto CD69 (Sanchez-Villanueva, et, al. 2019). Así que quisimos hacer este mismo experimento para

células CD4+.

Con el objetivo de evaluar la estimulación de las células T CD4+ de las muestras de neonatos, después de las 6 horas de estimulación se tiñeron las células con anticuerpos anti-CD4 APC, anti-CD3 Violet y anti-CD69 FITC. Las muestras se analizaron en un citómetro Attune, se midieron la cantidad de células positivas para el marcador CD69 (canal BL1). En la **figura 17A y B** se muestran las poblaciones de CBMCs del neonato 1 y neonato 2 positiva para células CD4+. En **la figura 17 C, D, E y F** se muestran ejemplos representativos de células CD4+ de dos muestras de neonato, podemos observar que tanto en la muestra de neonato 1 y neonato 2 en estado basal se observó una baja intensidad de fluorescencia para CD69, mientras que en estado estimulado con CD3/CD28 por 6 horas se observó un gran incremento en la intensidad de fluorescencia para células CD69+. Con este resultado parecería que las células CD4+ neonatales son capaces de responder a la estimulación mediante la sobreexpresión del receptor CD69, mientras que en linfocitos T CD8+ neonatales se observó una respuesta disminuida (Sanchez-Villanueva, et al. 2019).



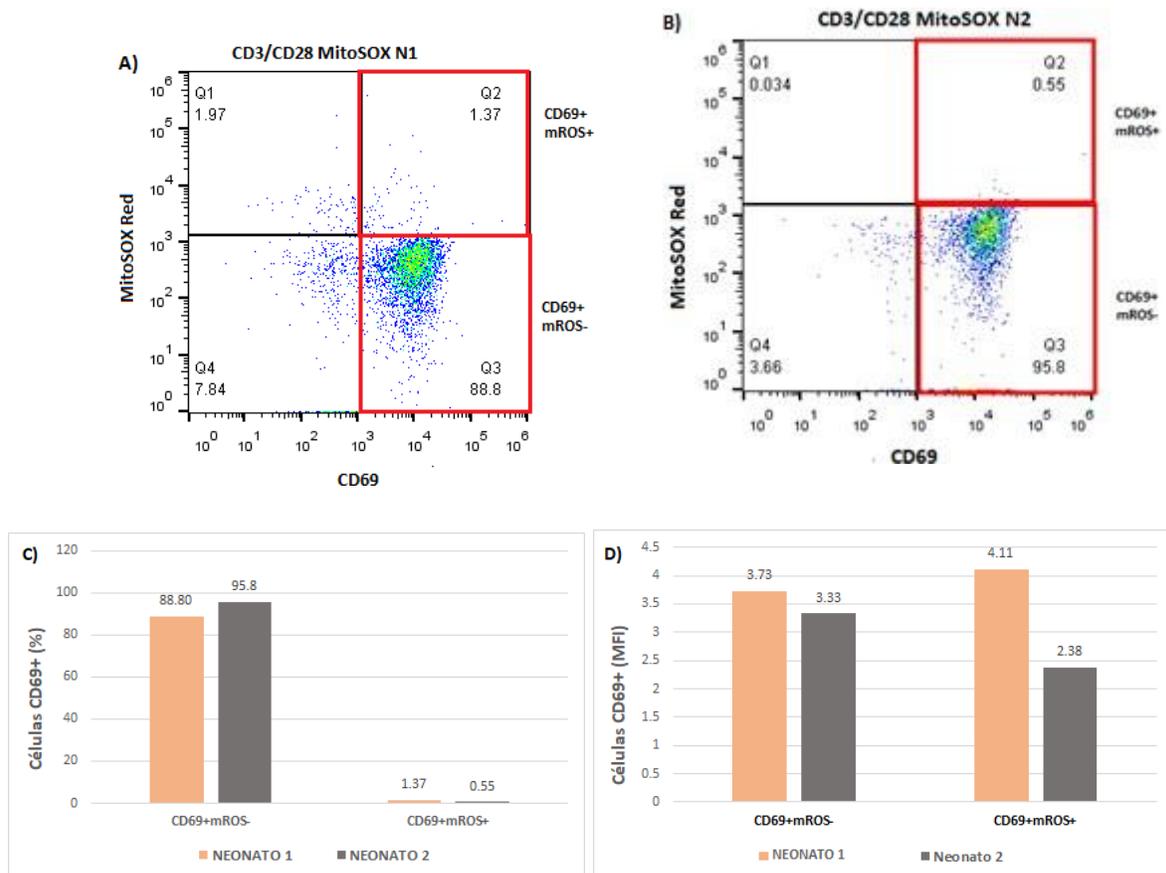
**Figura 17. La expresión del marcador de activación CD69 se incrementó en células CD4+ de neonatos en estado estimulado.** Se muestran la población de CBMCs positivas para células CD4+ en muestras de neonato (A y B). Las muestras en estado estimulado se incubaron por 6 horas con CD3/CD28, posteriormente las células en estado basal y activado se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 APC, anti-CD3 Violet y anti-CD69 FITC, se midió el perfil de fluorescencia en

un citómetro Attune, los datos obtenidos de muestran en los incisos C, D, F y E.

También en un trabajo realizado en el laboratorio se evaluó la relación entre la expresión de CD69 y los niveles de ROS mitocondrial de manera simultánea en linfocitos T CD8+ de neonato, el resultado fue que las células neonatales con una alta producción de ROS mitocondrial, la expresión de CD69 fue menor que las células con baja producción de ROS mitocondrial (Sanchez-Villanueva, et, al. 2019).

Así que quisimos saber si la subpoblación de células CD4+ con una alta producción para ROS mitocondrial (mROS+) y citoplasmático (cROS+) expresaban a CD69. Evaluamos la relación entre la expresión del marcador de activación CD69 y los niveles de ROS mitocondrial y ROS citoplasmático en muestras de neonatos CD4+. Se tiñeron CBMCs con anticuerpos anti-CD4 APC, anti-CD3 Violet y anti-CD69 FITC, y se incubaron con MitoSOX Red y DHE, las muestras se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Definimos nuestra población de células CD4+ y de esa población se definieron 2 subpoblaciones diferentes caracterizadas por los niveles de ROS mitocondrial (MitoSOX) (**Figura 18A y B**), ROS citoplasmático (DHE) (**Figura 19A y B**) y CD69. La subpoblación con bajo nivel de ROS mitocondrial (mROS-) tuvo mayor porcentaje de CD69 en comparación con la subpoblación positiva para ROS mitocondrial (mROS+) en ambos neonatos (**Figura 18C**), sin embargo, hubo muy pocas células positivas para mROS. Al calcular la intensidad media de fluorescencia (MFI) de estas subpoblaciones (CD69+mROS+ y CD69+ mROS-) en las muestras de neonato estimuladas con, la subpoblación CD69+ mROS+ en el

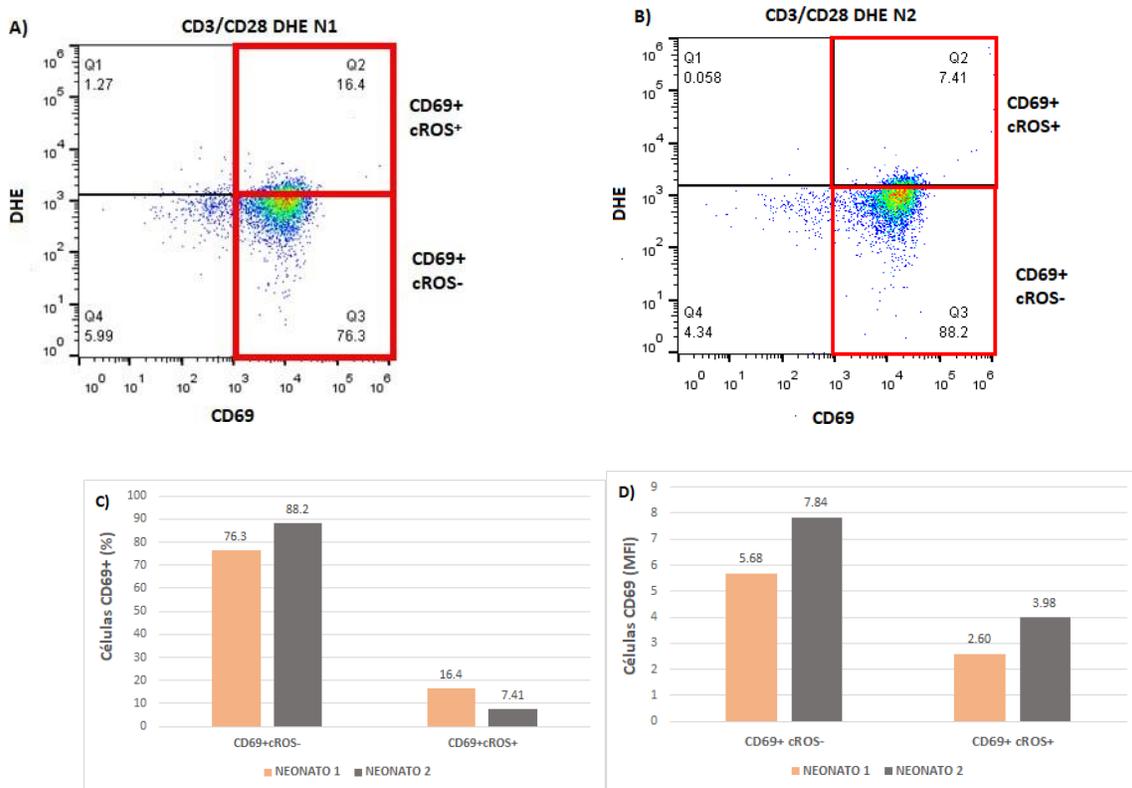
neonato 1 aumenta y en la del neonato 2 disminuye la MFI de CD69 **Figura 18D**. Estos resultados sugieren que los niveles de mROS no son tan altos en las células CD4+ para afectar la expresión de CD69, como fue el caso en linfocitos T CD8+ (Sanchez-Villanueva, et, al. 2019). Sin embargo se necesitan más réplicas de este experimento para evaluar una significancia estadística.



**Figura 18. Las células CD4+ neonatales de alta producción de ROS mitocondrial en estado estimulado desarrollaron menor expresión del marcador de activación CD69. Las células CD4+ de ambos neonatos se estimularon con anticuerpos antiCD3 y antiCD28 por 6 horas, posteriormente las células se tiñeron con anti-CD4 APC, anti-CD3 Violet y anti-CD69 FITC con la sonda de fluorescencia MitoSOX Red. En la imagen A y B se muestran las subpoblaciones seleccionadas y clasificadas como positivas para la expresión de CD69 y negativas para la producción de ROS mitocondrial (CD69+ mROS-) o como positivas para la expresión de CD69 y**

positivas para la producción de ROS mitocondrial (CD69+ mROS+) representadas en cuadros rojos. Para obtener los valores de la tabla D se calcularon las intensidades de fluorescencia media (MFI) para estas dos subpoblaciones.

También, evaluamos el efecto de los niveles de ROS citoplasmático (DHE) sobre la inducción de CD69 **Figura 19A y B**. La subpoblación con bajo nivel de ROS citoplasmático (cROS-) tuvo un mayor porcentaje de células CD69+ en respuesta a la estimulación en comparación con la subpoblación positiva para ROS citoplasmático (cROS+) (**Figura 19C**). También se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de estas subpoblaciones (CD69+ cROS+ y CD69+ cROS- ) en las muestras estimuladas con DHE de neonatos, indicando que la subpoblación con alta producción de ROS citoplasmático (cROS+) induce menormente la expresión de CD69 a comparación de la subpoblación de baja producción de ROS citoplasmático (cROS-) **Figura 19D**.



**Figura 19. Las células CD4+ neonatales en estado estimulado con una alta producción de ROS citoplasmático desarrollan una menor expresión del receptor de activación CD69.** Las células CD4+ de ambos neonatos se estimularon con anticuerpos antiCD3 y antiCD28 por 6 horas, posteriormente las células se tiñeron con anti-CD4 APC, anti-CD3 Violet y anti-CD69 FITC con la sonda de fluorescencia DHE. En la imagen A y B se muestran las subpoblaciones seleccionadas y clasificadas como positivas para la expresión de CD69 y negativas para la producción de ROS citoplasmático (CD69+ cROS-) o como positivas para la expresión de CD69 y positivas para la producción de ROS citoplasmático (CD69+ ROS+). Para obtener los valores de la tabla D se calcularon las intensidades de fluorescencia media (MFI) para estas dos subpoblaciones.

Estos resultados sugieren que el estado redox intracelular de las células CD4+ neonatales, caracterizado por altos niveles de ROS citoplasmático (cROS+) tiene una influencia negativa en la posterior activación inducida por el TCR.

## 7. Discusión

En las células inmunes el metabolismo es muy importante para poder lograr una buena respuesta inmune. Hay mucha investigación relacionada al inmunometabolismo pero la mayoría de estudios han sido realizados en adultos, lamentablemente no se tiene mucha información sobre la inmunidad neonatal.

En este trabajo de tesis, tuvimos muchos problemas con la obtención de las muestras debido a la crisis sanitaria. Por lo mismo no se lograron medir todos los genes propuestos ni los replicados necesarios de los experimentos. Sin embargo, pudimos avanzar en los objetivos propuestos como evaluar las especies reactivas de oxígeno en linfocitos T CD4+ de adulto y células CD4+ de neonato tanto en condiciones basales como estimuladas y evaluar el gen LDHA con células T CD4+ de adulto y neonato en estado basal. A pesar de no haber podido evaluar los demás genes que participan en la vía del glucolisis como HK1 y HK2 , se realizaron otros experimentos de mucho interés, como medir la activación de células T CD4+ de neonatos mediante la expresión de CD69 y evaluar la relación entre la expresión de CD69 y los niveles de ROS mitocondrial y ROS citoplasmático.

Estos resultados nos permiten comparar los perfiles metabólicos de las células CD4+ con los resultados obtenidos en linfocitos T CD8+ (Sanchez-Villanueva, et, al. 2019). Tanto en las células CD4+ y células CD8+ neonatales hemos encontrado niveles más altos de ROS tanto mitocondrial tanto citoplasmático es estado basal en comparación con las células vírgenes de adultos. En respuesta a

la estimulación, encontramos que la muestra de células CD4+ de adultos, bajó sus niveles de ROS; mientras que en las células CD4+ de dos muestras de neonatos tuvieron comportamientos contrarios.

También tuvimos un resultado importante debido a que las células neonatales CD4+ en un estado estimulado expresaron altos niveles CD69 que es un marcador de activación celular, mientras que las células CD8+ tuvieron muy baja expresión tras la estimulación (Sanchez-Villanueva, et, al. 2019). Este resultado podría sugerir que las células neonatales CD4+ se activan bien al menos a nivel de CD69 en comparación con las CD8+ neonatales.

Al evaluar la relación entre la expresión de CD69 y los niveles de ROS mitocondrial y citoplasmático en células CD4+ neonatales podemos sugerir que la subpoblación de alta producción de ROS citoplasmática (cROS+) hubo una reducción en la expresión del receptor de activación CD69 a comparación de la subpoblación de baja producción del mismo (cROS- ). Este resultado sugiere que las células con una alta producción de ROS citoplasmático tienen una influencia negativa posterior a la activación inducida por el TCR. No encontramos un efecto claro del mROS sobre la activación, pero los niveles de mROS disminuyeron durante la activación celular. Esto concuerda con la baja en la expresión del gen de la enzima LDHA que está sobreexpresado en células CD4+ neonatales en estado basal y disminuyó considerablemente después de la activación. Esto está de acuerdo con resultado del análisis transcriptómico que realizó la M. en C. Linda Kempis Calanis. Estos dos resultados sugieren que las células T CD4+ neonatales son capaces de ajustar su metabolismo en respuesta a la activación, reduciendo la

cantidad de ROS citoplasmático.

Es necesario mencionar algunas de las limitaciones del presente estudio, debido a la crisis sanitaria que ocurre a nivel mundial tuve varias dificultades para realizar mis experimentos. En primer lugar, el número de muestras que pude recolectar por parto natural fue uno de los principales problemas, ya que tuve que suspender las idas al hospital durante periodos de altos contagios. Además, debido a esta crisis sanitaria todos los pedidos de soluciones para en este caso usar el citómetro, estaban detenidas y no pudimos realizar experimentos por casi dos meses, a pesar de que prorrogué mi residencia de investigación por un semestre.

## 8. Conclusiones

Las conclusiones a este proyecto, debido a la limitación en el número de muestras son sólo sugerencias, sin embargo de acuerdo a estos resultados se puede sugerir que:

1. Las células T CD4+ neonatales humanas parecerían que producen mayores cantidades de ROS citoplasmático y ROS mitocondrial en un estado basal a comparación los de adulto.
2. LDHA se sobreexpresa en las células CD4+ neonatales en estado basal.
3. Las células CD4+ tras la estimulación expresan CD69
4. El estado redox intracelular de las células CD4+ neonatales, caracterizado por altos niveles de ROS citoplasmático afectan la expresión de CD69.

## REFERENCIAS

1. Abbas A.K, *Inmunología celular y molecular* 6ª edición
2. Prieto, Alfredo & Barbarroja-Escudero, José & Girón, S. & Monserrat, Jorge. (2017). Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 12. 1398-1407. 10.1016/j.med.2016.12.008.
3. Heikamp, E. B., & Powell, and J. D. (2012). Sensing the immune microenvironment to coordinate T cell metabolism, differentiation & function. *NIH*, 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
4. Yarosz, E. L., & Chang, C. H. (2018). Role of reactive oxygen species in regulating T cell-mediated immunity and disease. *Immune Network*, 18(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e14>
5. Jonathan D. Powell, Kristen N. Pollizzi, Emily B. Heikamp and Maureen R. Horton. 2012. “Regulation of Immune Responses by MTOR.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1319(1): 1–34.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3616892/pdf/nihms448316.pdf>.
6. Wang, A., Luan, H. H., & Medzhitov, R. (2019). An evolutionary perspective on immunometabolism. *Science*, 363(6423). <https://doi.org/10.1126/science.aar3932>
7. Engle, K. M.; Mei, T-S.; Wasa, M.; Yu, J.-Q. (2008). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decision. *Nat Rev Immunol.*, 45(6), 788–802.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
8. Adam T Waickman and Jonathan D. Powell. (2013). mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. 249(1), 1–26.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01152.x.mTOR>
9. Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega.

10. Adam T Waickman and Jonathan D. Powell. (2013). mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. 249(1), 1–26.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01152.x.mTOR>
11. Jones, Nicholas et al. 2019. “Akt and STAT5 Mediate Naïve Human CD4+ T-Cell Early Metabolic Response to TCR Stimulation.” *Nature Communications* 10(1): 152–60. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10023-4>.
12. Cao, Yilin, Jeffrey C. Rathmell, and Andrew N. Macintyre. 2014. “Metabolic Reprogramming towards Aerobic Glycolysis Correlates with Greater Proliferative Ability and Resistance to Metabolic Inhibition in CD8 versus CD4 T Cells.” *PLoS ONE* 9(8): 1–15.
13. Basha, Saleem, Naveen Surendran, and Michael Pichichero. 2014. “Immune Responses in Neonates.” *Expert Review of Clinical Immunology* 10(9): 1171–84.
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5ta edición. Nueva York: WH Freeman; 2002. Resumen. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22469/>
15. Ramon I. Klein Geltink, Ryan L. Kyle, and Erika L. Pearce. 2018. 36 Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol*.
16. Adam T Waickman and Jonathan D. Powell. 2013. “MTOR, Metabolism, and the Regulation of T-Cell Differentiation and Function.” 249(1): 1–26.
17. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118–126. doi:10.4103/0973-7847.70902
18. Lin, George Guan-hua, and Jeffrey G Scott. 2012. “ROS Function in Redox Signaling.” *Current Biology* 100(2): 130–34.
19. Yarosz EL, Chang CH. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-mediated Immunity and Disease. *Immune Netw*. 2018 Feb;18(1):e14. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e14>
20. Sánchez-Villanueva, José Antonio et al. 2019. “Contribution of ROS and Metabolic Status to Neonatal and Adult CD8+ T Cell Activation.” *PLoS ONE* 14(12): 1–12.

Galindo-Albarrán, Ariel O. et al. 2016. “CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response.” *Cell Reports* 17(8): 2151–60.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.056> (January 28, 2021).

Callender, Lauren A. et al. 2020. “Mitochondrial Mass Governs the Extent of Human T Cell Senescence.” *Aging Cell* 19(2): 1–13.