



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

**“Modelado computacional de la influencia del metabolismo en la
activación de los linfocitos T CD4 neonatales”**

Tesis

Presenta

Jonathan Ricardo Robles Reyes

Para obtener el grado de

Licenciado en ciencias (Bioquímica y Biología molecular)

Director de tesis:

Dr. Otoniel Rodríguez Jorge

Sinodales:

Presidente: Dra. Angélica Santana Calderón

Secretario: Dr. Armando Hernández Mendoza

Vocal: Dr. Otoniel Rodríguez Jorge

Suplente: Dra. Delia Vanessa López Guerrero

Suplente: Dr. Antonio José Bensussen Salazar

RESUMEN

Los humanos recién nacidos son altamente vulnerables a las infecciones, siendo esta una de las 3 principales causas de muerte durante la etapa neonatal (Paulson et al., 2021). Esta susceptibilidad a patógenos y en particular a patógenos intracelulares, ocasiona una elevada morbilidad en neonatos, en el año 2019 se reportó que ocurrieron 2.4 millones de muerte neonatales (Sharrow et al., 2022). Esta susceptibilidad a infecciones se relaciona con una deficiencia del sistema inmune neonatal, en especial de los linfocitos T.

Para su activación, los linfocitos T reconocen a los antígenos a través de su receptor de células T (TCR), además de señales coestimuladoras a través del receptor CD28, siempre y cuando le sean presentados por células presentadoras de antígenos (APC) a través del MHC II. Adicionalmente, reconocen otras señales proporcionadas por moléculas solubles, como las citocinas, que pueden encontrarse en el ambiente y/o ser secretadas por las APC. El reconocimiento del antígeno y las señales coestimuladoras desencadenan la activación, la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T. El linfocito T CD4⁺ se puede diferenciar en linfocito T cooperador (Th) productor de citocinas, mientras que un linfocito T CD8⁺ se diferencia principalmente en una célula citotóxica (CTL). Durante su activación y diferenciación, los linfocitos T sufren cambios en el metabolismo (reprogramación metabólica), los cuales son necesarios para cubrir los requerimientos energéticos y de precursores importantes durante dichos procesos. Estos cambios metabólicos han sido ampliamente reportados, sin embargo, la influencia que tiene el estado

metabólico en la activación y diferenciación del linfocito T ha sido poco estudiada. En el caso de los linfocitos T neonatales, en el laboratorio hemos reportado que estos sobreexpresan genes relacionados con la glucólisis y tienen una elevada proliferación homeostática, pero aún no se esclarece como esto contribuye a la respuesta inmune limitada que presentan los neonatos.

Este proyecto se tuvo como objetivo hacer uso de herramientas computacionales y bioinformáticas, así como bases de datos y la literatura disponible, para elaborar un modelo computacional lógico del metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ neonatales y su influencia en la respuesta inmune de dichas células. Este modelo fue validado con los resultados de experimentos funcionales reportados en la literatura, lo que nos permitió darle poder predictivo y poderlo emplear para evaluar las consecuencias que tiene el metabolismo y su alteración en la activación y función de los linfocitos T, para lo cual realizamos análisis dinámicos, cómputo de estados estables y análisis *in silico* del efecto que tendría la mayor o menor expresión (*knockouts* y *knockins*) de nodos importantes sobre la activación de los linfocitos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de tesis, el Dr. Otoniel Rodríguez Jorge, por su apoyo y consejos a lo largo de la elaboración de la tesis.

A mi tutora durante la licenciatura, la Dra. Angelica Santana, por todo su apoyo y consejos a lo largo de la licenciatura.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus observaciones y consejos para el desarrollo del trabajo.

Al equipo de trabajo del laboratorio de inmunología, Linda, Carlos, Ale, Yari, Francisco y Oscar, por todo su apoyo y por siempre hacerme sentir bienvenido en el laboratorio.

A CONACYT, por brindarme apoyo económico durante la elaboración del proyecto, apoyo que me permitió seguir y concluir mis estudios.

A mis compañeros de la carrera, en especial a Zazil, Mayte y Paola, por su apoyo durante la pandemia, evitando que mi ritmo y esfuerzo decayera.

A mi familia y en particular a mi madre y mi abuela, por su apoyo sin el cual yo no pude haber terminado la carrera y por brindarme un hogar.

Por último, un agradecimiento a todas las personas que olvidé mencionar, pero que de una u otra forma han contribuido a mi formación a lo largo de la carrera.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. SISTEMA INMUNE	1
1.1.1. <i>Respuesta inmune innata</i>	1
1.1.2. <i>Respuesta inmune adaptativa</i>	2
1.2. LINFOCITOS.....	4
1.3. SISTEMA INMUNE DE NEONATOS	8
1.4. ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T	11
1.4.1. <i>Señales coestimuladoras</i>	12
1.5. METABOLISMO DE LINFOCITOS T	13
1.5.1. <i>Metabolismo de linfocitos T vírgenes</i>	15
1.5.2. <i>Metabolismo de linfocitos T activos</i>	19
1.6. MODELADO LÓGICO.....	25
2. ANTECEDENTES	33
3. OBJETIVOS	36
3.1. GENERAL:.....	36
3.2. ESPECÍFICOS:.....	36
4. HIPÓTESIS	36
5. METODOLOGÍA	37
5.1. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO	37
5.2. REDUCCIÓN DEL MODELO	39
5.3. ANÁLISIS DEL MODELO.....	40
5.4. ANÁLISIS DEL ESTADO NEONATAL	42
5.5. ANÁLISIS ESTRUCTURAL	42
6. RESULTADOS.....	44
6.1. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO	44
6.2. REDUCCIÓN DEL MODELO	48
6.3. ANÁLISIS DEL MODELO.....	52
6.4. ANÁLISIS DEL ESTADO NEONATAL	61
6.5. ANÁLISIS ESTRUCTURAL	65
7. DISCUSIÓN:	71
8. BIBLIOGRAFÍA.....	76

SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

NK: linfocitos citolíticos naturales o natural killer.

ILC: célula linfocítica innata.

APC: célula presentadora de antígeno.

MHC: complejo principal de histocompatibilidad.

TCR: receptor de célula T.

CTL: linfocito T citotóxico.

Th: linfocitos T auxiliares o cooperadores.

TD: respuesta dependiente de T.

TI: respuesta independiente de T.

TLR: receptores tipo toll.

mIg: receptor de inmunoglobulina de membrana.

CD40L: ligando de CD40.

G0: etapa del ciclo celular donde la célula no se divide.

FAO: oxidación de ácidos grasos.

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico.

NADH: nicotinamida adenina dinucleótida.

NADPH: nicotiamida-Adenina

Dinucleotido fosfato.

ATP: adenosín trifosfato.

OXPPOS: fosforilación oxidativa.

S1P: esfingosina 1-fosfato.

IL-7: interleucina 7.

IL-7R: receptor de interleucina 7.

AA: aminoácidos.

FOXO1: proteína de caja forkhead O1.

FOXP1: proteína P1 de la caja de Forkhead.

PI3K: fosfoinositol 3-cinasa.

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero.

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.

KLF: familia de factores de transcripción "factores Kruppel-like".
KLF2: factor 2 Kruppel-like.
S1PR1: receptor 1 S1P.
S1P: Esfingosina-1-fosfato.
Glut1: transportador de glucosa 1.
PI3P: fosfatidilinositol 3-fosfato.
PDK1: Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1.
mTORC1: blanco de mamíferos del complejo de rapamicina 1.
mTORC2: diana de mamíferos del complejo de rapamicina 2.
HIF-1 α : subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia.
LDH: lactato deshidrogenasa
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
 α -KG: alfa cetoglutarato.
ASCT2: Transportador de glutamina.
LAT1-CD98: transportador heterodímero de leuina.
ROS: especies reactivas de oxígeno.

GLS: glutaminasa.
GDH1: glutamato deshidrogenasa 1.
 x = variable asociada a los nodos.
 f = función lógica.
 \vec{x} = vector que representa el estado del modelo.
 n = número de componentes o nodos que tiene un modelo.
 2^n = número de estados posibles de un modelo booleano.
 t = tiempo inicial.
 $t + 1$ = tiempo inicial más una unidad de tiempo.
 k = Grado de un nodo.
 C_a = Coeficiente de agrupamiento.
 l = Número de vectores que un nodo tiene entre sus nodos vecinos.
 $(k(k - 1))$ = número de enlaces posibles de un nodo entre los nodos vecinos
TLR5: receptor 5 tipo toll.

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

AP-1: proteína activadora 1.

NFAT: Factor nuclear de célula T active.

IL-2: interleucina 2.

mROS: especies reactivas de oxígeno mitocondriales.

HumanCyc: Enciclopedia de Genes y Metabolismo Humano.

TABLAS

Tabla 1. Tabla del análisis estructural.....	66
--	----

FIGURAS

Figura 1. Sistema inmune innato y adaptativo	4
Figura 2. Activación de linfocitos T CD8 ⁺ y T CD4 ⁺	7
Figura 3. Activación de linfocitos B.....	8
Figura 4. Causas globales de muertes en niños menores de 5 años en el año 2015	9
Figura 5. Señales para la activación de linfocitos T A) CD4 ⁺ y B) CD8 ⁺	13
Figura 6. Cambios entre un estado metabólico glucolítico y oxidativo a lo largo de la respuesta inmune.....	15
Figura 7. Metabolismo de linfocito T inactivo.....	16
Figura 8. Señales que ayudan a mantener la inactividad y evitar la atrofia de la célula	18
Figura 9. Metabolismo de linfocito T activo.	20
Figura 10. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR.....	22
Figura 11. Glutaminólisis.....	25
Figura 12. Modelado lógico	33
Figura 13. Heatmap del RNA-seq de linfocitos T CD4 ⁺ de adultos (A) y neonatos (N)	35
Figura 14. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4 ⁺	45
Figura 15. Estados estables del modelo WT	47

Figura 16. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4+ reducido y booleanizado	50
Figura 17. Estados estables del modelo reducido y booleanizado WT	52
Figura 18. Estados estables del modelo TCR KO	53
Figura 19. Frecuencia y trayectoria de estados del modelo TCR KO.....	55
Figura 20. Estados estables del modelo CD28 KO	56
Figura 21. Frecuencia y trayectoria de estados del modelo CD28 KO.....	57
Figura 22. Estados estables del modelo TCR y CD28 KI	58
Figura 23. Frecuencia y trayectoria de estados del modelo TCR y CD28 KI	61
Figura 24. Estados estables del modelo con las características de los linfocitos T CD4+ neonatales	63
Figura 25. Frecuencia y trayectoria de estados del modelo con características neonatal	65
Figura 26. Estados estables del modelo con las características de los linfocitos T CD4+ neonatales y lactato y ROS KI	68
Figura 27. Frecuencia y trayectoria de estados del modelo con características neonatal y lactato y ROS KI	70

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema inmune

El sistema inmune es el encargado de generar una respuesta para la defensa de un organismo contra agentes externos potencialmente patógenos, como microorganismos y sus componentes (proteínas, polisacáridos, ADN, etc.), macromoléculas y otras sustancias ajenas al mismo, que pueden ser infecciosas o no infecciosas. En algunos casos el sistema inmune puede generar una respuesta contra componentes o sustancias propias del mismo organismo, dando lugar a enfermedades autoinmunes. El sistema inmune puede responder rápidamente de forma general empleando componentes del sistema inmune preexistentes (respuesta inmune innata) o responder de forma específica (respuesta inmune adaptativa), empleando un conjunto de células y mecanismos específicos para diferentes tipos de respuestas, lo que suele llevar tiempo.

1.1.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra los agentes externos, está compuesta por barreras, físicas, celulares y bioquímicas, las cuales siempre están presentes en el organismo. Esta primera línea de defensa está siempre activa, incluso en ausencia de una infección, patógeno o agente externo, lo que le permite generar una respuesta rápida. La respuesta inmune innata es activada al reconocer productos de patógenos y células dañadas. Los mecanismos

de la inmunidad innata reconocen estructuras comunes presentes en microorganismos relacionados y no distingue diferencias específicas entre ellos (Abul K. Abbas et al., 2019). La respuesta inmune innata es general y es la misma en caso de una reinfección. Los principales componentes de la inmunidad innata son, barreras físicas y químicas (tejido epitelial y sustancias antimicrobianas secretadas en el epitelio), componentes celulares, como las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales (natural killer o NK) y otras células linfocíticas innatas (ILC) y, por último, proteínas sanguíneas, como las proteínas del sistema del complemento [Figura 1] (Abul K. Abbas et al., 2019).

1.1.2. Respuesta inmune adaptativa

La inmunidad adaptativa, a diferencia de la innata, puede reconocer características específicas en las estructuras de los patógenos y es capaz de distinguir entre estos. Los componentes de la inmunidad adaptativa son capaces de reconocer diferencias entre antígenos pertenecientes a estos agentes extraños, los cuales en su mayoría son fragmentos de proteínas de entre 7 y 15 aminoácidos. La respuesta de la inmunidad adaptativa es específica para cada microorganismo o patógeno, además, en el caso de una reinfección la magnitud, intensidad y eficiencia de la respuesta aumenta, esta característica de la inmunidad es llamada memoria inmunológica (Owen et al., 2014).

Identificar al patógeno y generar una respuesta le toma entre 5 y 7 días al sistema inmune adaptativo, así que a diferencia que la del innato, la respuesta del sistema adaptativo es más lenta. Los componentes del sistema inmune adaptativo son los linfocitos y sus productos, como anticuerpos y citocinas [Figura 1] (Abul K. Abbas et al., 2019).

La inmunidad adaptativa puede dividirse en dos tipos diferentes de inmunidad, la humoral y la celular. La inmunidad humoral se encarga principalmente de la defensa contra patógenos extracelulares. Este tipo de inmunidad está compuesta por los linfocitos B o células B y los anticuerpos que estos secretan. Los anticuerpos reconocen y se unen a los antígenos del patógeno, impidiendo su capacidad de infección y marcan al patógeno para su eliminación por diferentes mecanismos efectores, como promoviendo que el patógeno sea fagocitado. Por otro lado, la inmunidad celular depende de los linfocitos T. Este tipo de inmunidad se encarga de combatir a los patógenos intracelulares, como virus y algunas bacterias. Estos últimos pueden sobrevivir en el interior de las células del organismo infectado, por lo que la inmunidad celular fomenta la eliminación de las células que actúan como reservorio del patógeno.

Cabe mencionar, que los linfocitos T también participan en la eliminación de patógenos extracelulares, reclutando leucocitos y ayudando a los linfocitos B a producir anticuerpos con mayor afinidad por los antígenos, aumentando su eficiencia.

Asimismo, también en la inmunidad celular se producen anticuerpos de isotipos específicos, que ayudan a la optimización de los patógenos, lo que permite una mejor eliminación de los mismos (Abul K. Abbas et al., 2019).

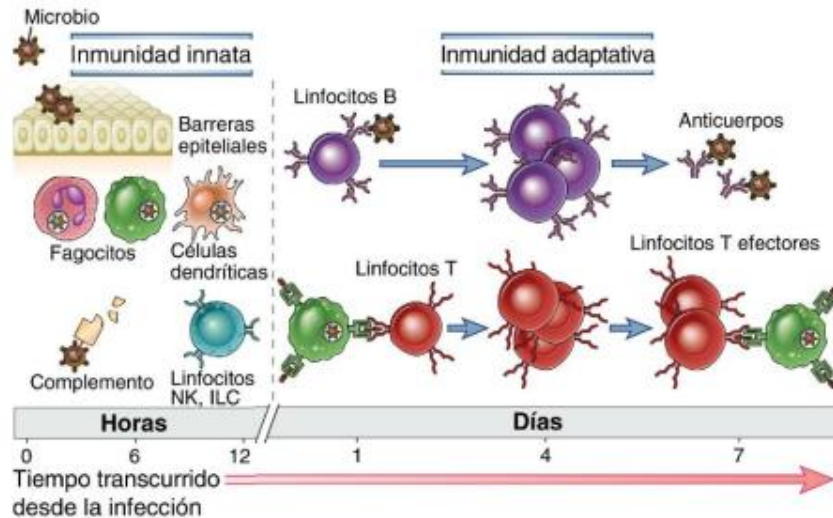


Figura 1. Sistema inmune innato y adaptativo: Se muestran los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa, la inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos, la respuesta adaptativa se activa después y necesita la activación de los linfocitos T. “La cinética de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa son aproximaciones y pueden variar en diferentes infecciones” (Abul K. Abbas et al., 2019).

1.2. Linfocitos

Durante una infección, los componentes de la inmunidad innata son activados por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Posteriormente una célula presentadora de antígeno (APC), normalmente una célula dendrítica, procesa al patógeno y presenta péptidos (antígenos) del mismo en su superficie por medio del complejo principal de histocompatibilidad o MHC

clase I o II. La célula dendrítica activada viaja a un ganglio linfático, donde los linfocitos T reconocen el antígeno por medio de su receptor de célula T (TCR), causando su activación y diferenciación en linfocitos T con funciones efectoras o de memoria (Owen et al., 2014).

Los linfocitos T pueden dividirse en dos tipos de células, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Los linfocitos T CD8⁺ pueden responder a la presentación de antígeno por el complejo MHC clase I y diferenciarse a un linfocito efector citotóxico. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) tienen su actividad en el sitio de la infección, después de haber sido activados en un nodo linfático y regresan al sitio de infección. Estas células identifican y se unen a las células infectadas y las eliminan induciéndoles muerte celular programada (apoptosis). Por su parte, los linfocitos T CD4⁺ responden a los antígenos presentados por el MHC clase II y se pueden diferenciar en uno de varios subgrupos de linfocitos T CD4⁺ activos, por ejemplo, Th1, Th2, Th17 y Treg. Estas poblaciones tienen diferentes funciones efectoras y su diferenciación depende de las señales que el linfocito recibe de la APC, el ambiente químico donde se diferencia y otros linfocitos [Figura 2]. Cada subgrupo de linfocitos T CD4⁺ cumple con funciones específicas para combatir y eliminar al patógeno, los linfocitos T CD4⁺ activos (linfocitos T auxiliares o Th) adquieren la capacidad de producir y secretar varios factores de crecimiento y citocinas. Estos productos desencadenan y dirigen varios eventos importantes para la inmunidad, como promover la activación y proliferación de linfocitos y macrófagos.

Los linfocitos T CD4⁺ activos que se diferencian en linfocitos Th1 se encargan de eliminar patógenos intracelulares como virus y algunas bacterias intracelulares, los que se diferencian en el fenotipo Th2 se encargan de eliminar parásitos extracelulares como helmintos, los del fenotipo Th17 eliminan bacterias y hongos extracelulares, y los linfocitos que se diferencian en Treg regulan la respuesta y permiten la homeostasis de otros linfocitos y la tolerancia inmunológica.

En el caso del fenotipo Th1, este es inducido por el IFN γ y la IL-12, expresa el factor transcripcional T-bet y produce y secreta IFN γ . Por su parte, el fenotipo Th2 es inducido por IL-4 e IL-2, expresa GATA3 y produce IL-4, IL-5, y IL-13. Por otro lado, el Th17 es inducido por TGF- β , IL-6, IL-21 e IL-23, expresa ROR γ t y secreta IL-21 e IL-17. Por último, el fenotipo Treg es inducido por TGF- β e IL-2, expresa Foxp3 y secreta TGF- β e IL-10. (Martínez-Méndez et al., 2022; Zhu & Paul, 2009)

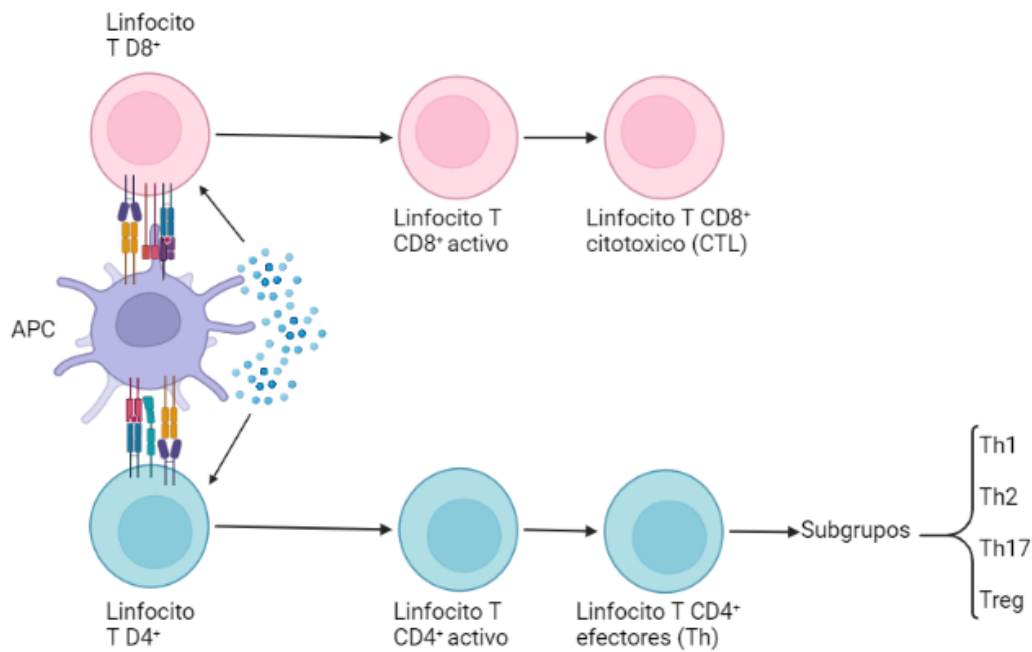


Figura 2. Activación de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺: Se muestra la interacción entre los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ y su diferenciación a linfocitos efectores citotóxicos y auxiliares, respectivamente.

En el caso de los linfocitos B, su activación y respuesta puede ocurrir con ayuda de linfocitos T CD4⁺ auxiliares (respuesta dependiente de T o TD) o sin ayuda de los linfocitos T CD4⁺ auxiliares (respuesta independiente de T o TI). En el caso de la respuesta TI esta se activa por el reconocimiento de antígenos multivalentes con varios sitios de unión a un anticuerpo o receptor, como el receptor tipo toll (TLR) o receptor de inmunoglobulina de membrana (mIg) [Figura 3]. Para una respuesta exitosa de linfocitos B dependiente de T se necesitan tres señales. La primera es la unión de un antígeno multivalente y un receptor mIg. La segunda señal es proporcionada por un linfocito Th activo que se une al linfocito B por medio del TCR

del linfocito Th y el receptor del linfocito B. La última es proporcionada por citocinas secretadas por el linfocito Th activo. También se reciben señales de la unión de receptores secundarios, como CD40 del linfocito T y CD40L del linfocito B [Figura 3] (Owen et al., 2014).

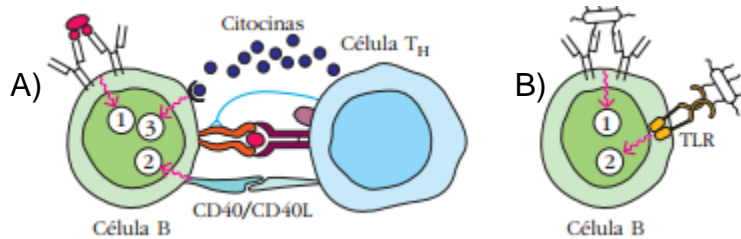


Figura 3. Activación de linfocitos B: Se muestra la activación A) TD y B) TI de los linfocitos B, en la parte A) se puede observar 1) la unión de un antígeno multivalente y un receptor mlg, 2) la unión de un linfocito Th activo al linfocito B por el TCR del linfocito Th y el receptor de antígeno del linfocito B, y 3) la señal proporcionada por citocinas secretadas por el linfocito Th activo, en la parte B) se observa la interacción proporcionada por la unión de un antígeno multivalente con 1) un receptor mlg y 2) un TLR (Owen et al., 2014).

1.3. Sistema inmune de neonatos

Pese a los avances en la medicina, los humanos recién nacidos son un grupo muy vulnerable a las infecciones, con una alta tasa de mortalidad. En el año 2019 se reportaron 5.2 millones de muertes de niños menores de 5 años y de estas muertes 2.4 millones ocurrieron en la etapa neonatal, y en Latinoamérica ocurrieron 94 mil muertes neonatales (Sharrow et al., 2022). Entre los años 2015 y 2019, las infecciones, como la neumonía, junto con defectos de nacimiento congénitos y desórdenes maternos o neonatales, representaron las principales causas de muertes neonatales (Liu et al., 2016; Paulson et al., 2021; Prabhudas et al., 2011;

Sharrow et al., 2022) [Figura 4]. Estas estadísticas revelan una gran importancia del estudio del sistema inmune neonatal si se quiere abordar esta problemática.

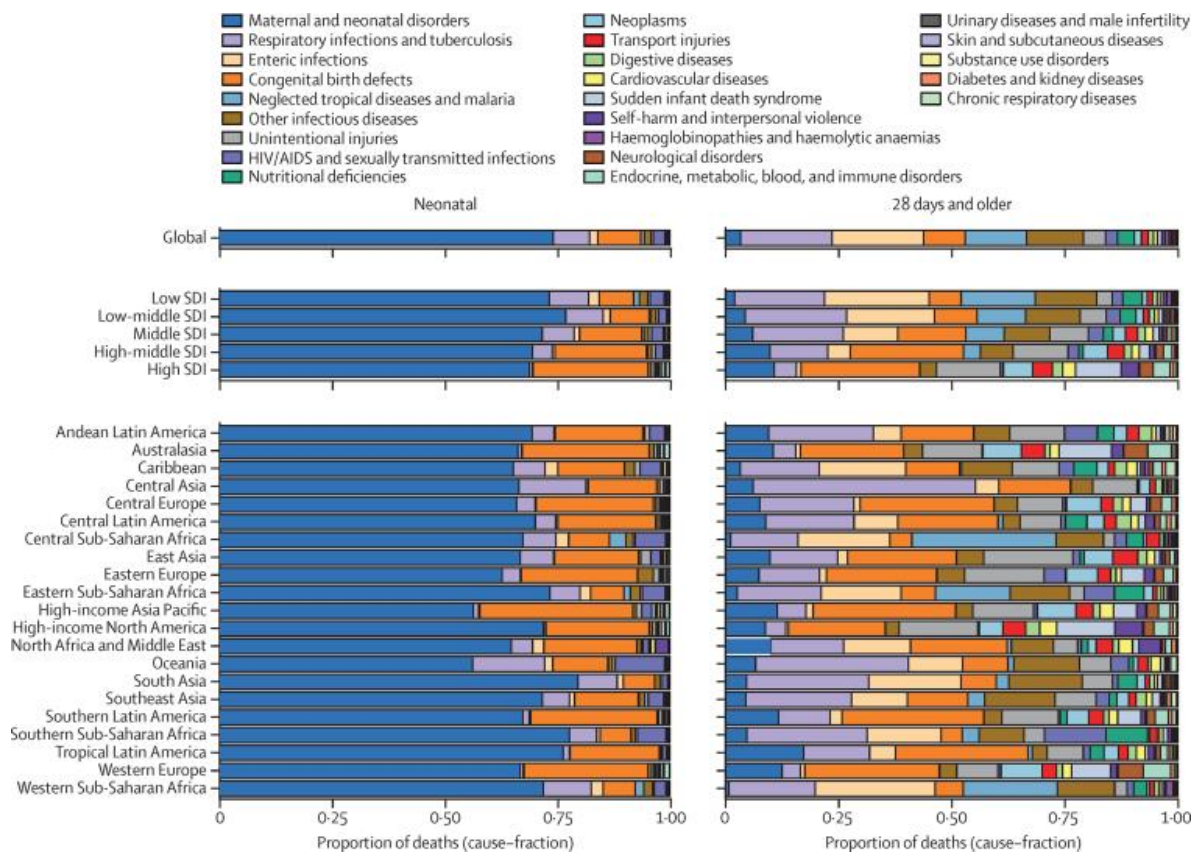


Figura 4. Causas globales de muertes en neonatos y niños menores de 5 años en el año 2019: En estas se muestra las principales causas de muerte de niños menores de 5 años y neonatos y que tanto afectan a estas poblaciones (Paulson et al., 2021).

El sistema inmune neonatal es adecuado para que el recién nacido atraviese por la transición de un ambiente casi estéril, como lo es el vientre de la madre, a un ambiente rico en microorganismos. Aunque el sistema inmune del recién nacido cuenta con cierta protección contra infecciones y patógenos, aún está en desarrollo

y resulta insuficiente para combatir con éxito algunos patógenos, en especial patógenos intracelulares. Además, aunque los bebés obtienen protección de los anticuerpos maternos adquiridos en la placenta, el calostro y la leche materna, esta protección es incompleta y de corta duración, decayendo alrededor de los 6 meses de edad (Basha et al., 2014).

El sistema inmune neonatal difiere del sistema inmune de adultos en muchos aspectos. Por ejemplo, en la inmunidad innata neonatal, muchos de sus componentes presentan una disminución en su cantidad y alteraciones en su actividad, en comparación del sistema inmune de adultos (Tsafaras et al., 2020). En el caso de la inmunidad adaptativa, en su mayoría los linfocitos son emigrantes tímicos recientes (ETR) vírgenes, y los linfocitos T CD4⁺ neonatales presentan un sesgo hacia el fenotipo Th2, favoreciendo este fenotipo sobre el Th1 (Holm et al., 2021). Esto explica la limitación del sistema inmune neonatal para eliminar patógenos intracelulares. Además, el número de linfocitos Treg es mayor en la sangre de neonatos que en la de adultos, 44.81 células/μL en adultos y 173.19 células/μL en el caso de los neonatos (Prabhu et al., 2016). Esta proporción elevada de células Treg, parece causar una elevada respuesta reguladora o supresora, que aunque es importante para evitar una respuesta inmune excesiva y daños colaterales al organismo, deja susceptible al neonato a infecciones (Holm et al., 2021; Pieren, 2022). Adicionalmente, la respuesta inmune parece estar caracterizada por una respuesta efectora rápida a expensas de la generación de

memoria (Pieren, 2022). Por lo anterior, el sistema inmune neonatal, aunque adecuado para la maduración y la transición del nacimiento, deja vulnerable al neonato ante las infecciones.

Las características y la respuesta particular del sistema inmune de los neonatos, su susceptibilidad a infecciones y su ineficiencia para combatir exitosamente patógenos intracelulares, hace evidente la necesidad del estudio de la respuesta inmune neonatal, en particular la inmunidad adaptativa celular mediada por los linfocitos T.

1.4. Activación de linfocitos T

Durante el desarrollo embrionario, las células hematopoyéticas que darán origen a los linfocitos viajan de la médula ósea al timo, donde pasan por un proceso de selección y maduración. Una vez que los linfocitos T maduran, estos salen del timo como células T vírgenes en la etapa G0 del ciclo celular. Al salir del timo, las células o linfocitos T maduros vírgenes entran en circulación pasando por la sangre, linfa y tejidos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, placas de Peyer).

Si durante su recorrido en el sistema circulatorio, o los órganos linfoides secundarios, la célula T virgen encuentra una APC profesional, y esta APC expresa un complejo MHC-antígeno en su superficie que esta célula reconozca, la célula T interactuará con el MHC-antígeno por medio del receptor de células T (TCR), formando un complejo TCR/MHC-antígeno. Esta interacción, junto con señales

coestimuladoras proporcionadas por las APC, o por el ambiente, desencadenan la activación y proliferación del linfocito, logrando que el linfocito T CD4⁺ se diferencie en un linfocito Th productor de citocinas, mientras que un linfocito T CD8⁺ se diferencia en CTL. También es posible que los linfocitos T se diferencien en células de memoria.

1.4.1. Señales coestimuladoras

La afinidad entre el TCR y el complejo MHC-antígeno es relativamente baja, lo que hace esta interacción inestable y que se necesite ayuda para poder lograr la activación correcta de la célula T. El complejo TCR-antígeno-MHC es estabilizado por los correceptores CD4 en el caso de los linfocitos T CD4⁺ y CD8 en el caso de los linfocitos T CD8⁺, estos aumentan la avidéz de la interacción, uniéndose al MHC clase I o II [Figura 4] (Owen et al., 2014).

Otra señal coestimuladora necesaria para la activación de las células T es la del receptor CD28, este receptor se puede unir a dos ligandos que se expresan en la superficie de las APC profesionales, CD80 y CD86. La unión de CD28 con CD80/86 desencadena una serie de señales e interacciones que tienen un papel importante en la activación y respuesta de las células T [Figura 4] (Abul K. Abbas et al., 2019).

Además de las señales proporcionadas por el complejo TCR/antígeno-MHC estabilizado por CD4/8 y la interacción de CD28 con CD80/86, la magnitud y las consecuencias de la activación de las células T están influenciadas por señales

proporcionadas por citocinas, las cuales pueden encontrarse en el ambiente, ser secretadas por la APC o por la célula T. Estas citocinas se unen a receptores de citocinas en la superficie de las células T, interacción que causa la estimulación de señales intracelulares que aumentan la proliferación y la supervivencia de las células T [Figura 4] (Owen et al., 2014).

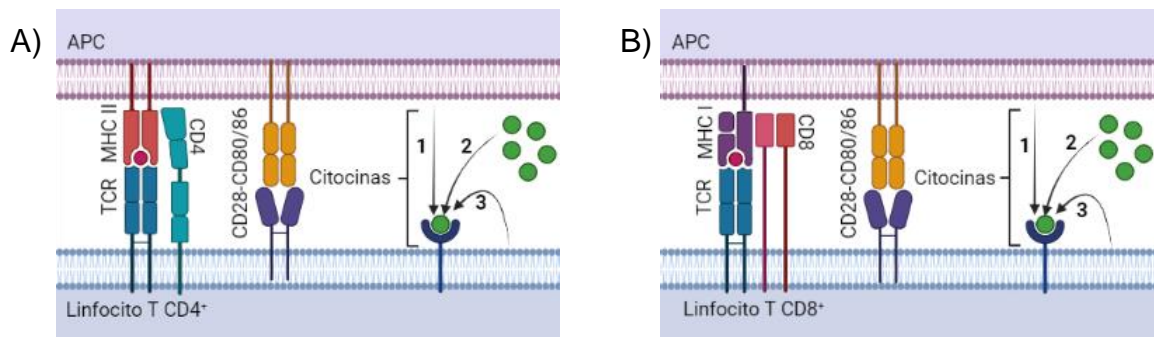


Figura 5. Señales para la activación de linfocitos T A) CD4+ y B) CD8+: Se muestra el complejo TCR/antígeno-MHC estabilizado por el correceptor CD4 en el caso de los linfocitos CD4+ y CD8 para linfocitos CD8+, la interacción entre CD28 y CD80/86 y la señal proporcionada por citocinas provenientes de 1) la APC, 2) el ambiente y 3) el linfocito T.

1.5. Metabolismo de linfocitos T

Es bien sabido que el metabolismo de los linfocitos T está muy vinculado con los diferentes estados y funciones que los linfocitos adquieren a lo largo de su vida. Entre los factores metabólicos que afectan la función de los linfocitos T están, el tipo de metabolismo (anabólico o catabólico), la disponibilidad de nutrientes, el nivel de expresión de proteínas metabólicas y la abundancia de intermediarios y productos de las vías metabólicas. Esta influencia del metabolismo de ha estudiado en

diferentes condiciones y sistemas, como en el caso del microambiente tumoral, el cual es hipóxico, ácido y hay un agotamiento de metabolitos, como la glucosa. En este escenario es afectada la supervivencia, la proliferación y las capacidades de efectoras de los linfocitos T (Leone & Powell, 2020).

Los linfocitos T vírgenes se encuentran en un estado metabólico que depende de la oxidación de los nutrientes para la obtención de energía [Figura 6], pero durante una infección, la activación de los linfocitos T lleva a una reprogramación metabólica a un programa glucolítico elevado [Figura 6]. Este estado, además de permitir la síntesis de biomoléculas, puede inducir cambios epigenéticos necesarios para la activación de los linfocitos T (Lopez Krol et al., 2022). Una vez que la respuesta inmune termina y el patógeno es eliminado, la mayoría de los linfocitos T activos mueren (apoptosis) quedando solo los linfocitos T de memoria. Durante la memoria inmunológica, los linfocitos pasan nuevamente por una reprogramación del estado metabólico en la que la glucólisis se reduce y se regresa a un programa metabólico oxidativo [Figura 6] (Michalek & Rathmell, 2010).

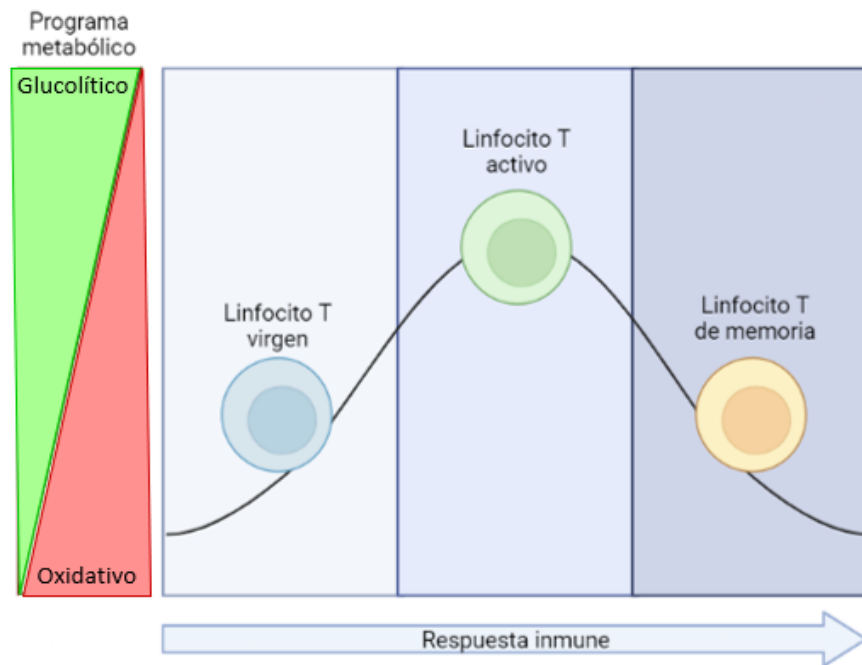


Figura 6. Cambios entre un estado metabólico glucolítico y oxidativo a lo largo de la respuesta inmune: Se muestran los cambios que hay entre el programa metabólico oxidativo y glucolítico en las diferentes etapas de la vida de un linfocito T y a lo largo de la respuesta inmune.

En este trabajo, nos centramos en los eventos de reprogramación metabólica que ocurren durante las etapas tempranas de activación de los linfocitos T CD4⁺ y como estas pueden afectar su activación.

1.5.1. Metabolismo de linfocitos T vírgenes

Las células T vírgenes se encuentran en un estado de baja actividad, en el que tienen bajos niveles de actividad transcripcional y traduccional (Chapman et al., 2020). Estas células no realizan la división clonal ni secretan cantidades significativas de citocinas, por lo que su necesidad energética y de precursores

biosintéticos es limitada (Almeida et al., 2016). Sin la necesidad de producir biomoléculas, los nutrientes disponibles pueden usarse para generar energía, a través de la β -oxidación de ácidos grasos (FAO), la oxidación del piruvato proveniente la glucólisis y la oxidación de glutamina, por la glutaminólisis. La glucólisis y la glutaminólisis se conectan con el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para la producción de poder reductor (NADH y NADPH). Este programa metabólico permite alcanzar un rendimiento óptimo en la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) [Figura 5]. El ATP es necesario para el reordenamiento del citoesqueleto que ocurre constantemente mientras el linfocito T virgen inactivos se encuentra en circulación (Maciver et al., 2013).

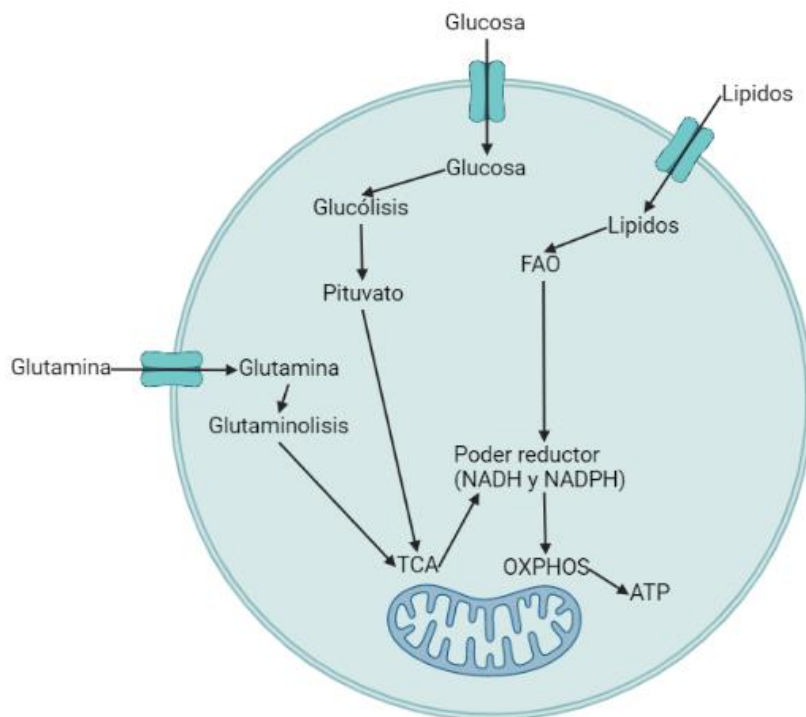


Figura 7. Metabolismo de linfocito T inactivo: se muestra como los nutrientes disponibles son usados para la producción de poder reductor que es aprovechado por la OXPHOS para la síntesis de ATP.

El programa metabólico de los linfocitos T vírgenes es regulado por señales que el linfocito recibe durante su circulación. En ausencia de una infección o patógeno, los linfocitos T en circulación reconocen, en menor cantidad e intensidad, señales que normalmente promueven la activación de los linfocitos, como las señales inducidas por la IL-7 y el TCR. Estas señales mantienen la homeostasis del linfocito evitando la atrofia de la célula (Chapman et al., 2020).

En los linfocitos T vírgenes, la señal IL-7/IL-7R estimula el catabolismo de la glucosa y aminoácidos (AA), regulando el flujo basal de glucosa y AA mediante la vía PI3K/Akt/mTOR, promoviendo la expresión de transportadores, como el transportador de glucosa Glut1, evitando la atrofia de la célula. En los linfocitos vírgenes, FOXO1 regula la señal IL-7/IL-7R promoviendo la expresión del receptor IL-7R, la actividad promotora de FOXO1 es regulada por FOXP1, el cual es activado por la señalización tónica del TCR e inhibe a FOXO1 impidiendo una sobre expresión de IL-7R, evitando que el metabolismo aumente y cause una activación prematura de los linfocitos T. La deficiencia de FOXP1 causa la hiperproliferación del linfocito T virgen como consecuencia de una mayor expresión de IL-7R [Figura 6] (Park & Pan, 2015). La actividad de los miembros de la familia FOXO es inhibida por la vía PI3K/Akt/mTOR, pero esta vía es inhibida por la fosfatasa PTEN. Las células T vírgenes tienen altos niveles de PTEN, durante la activación esta fosfatasa es regulada a la baja por la señalización exitosa del TCR [figura 6] (Chapman et al., 2020).

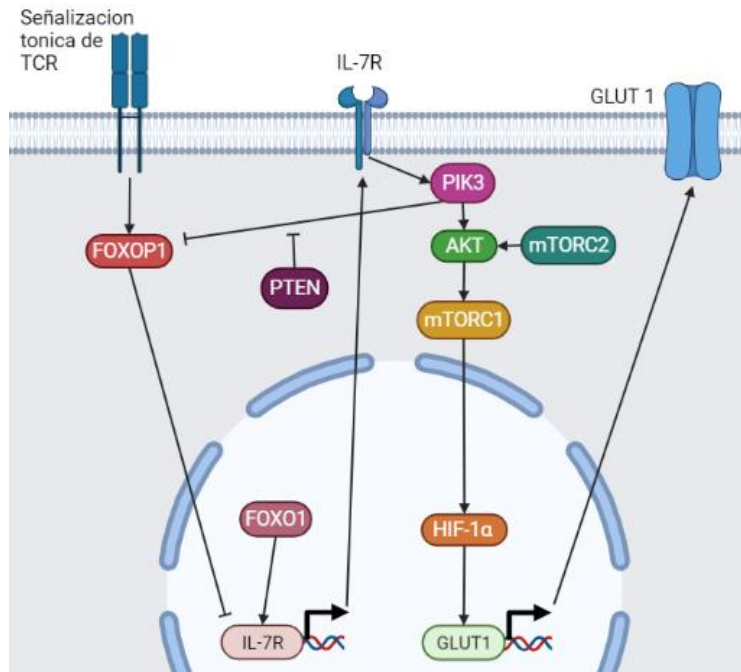


Figura 8. Señales que ayudan a mantener la inactividad y evitar la atrofia de la célula: En esta imagen se muestra como la señal tónica del TCR y la señal IL7-R/IL7, junto con otros componentes celulares, interactúan para mantener la inactividad y evitar la atrofia del linfocito T, en el timo, la señal tónica de TCR evita la activación temprana de la célula regulando la expresión de IL7-R, y durante la circulación, la señal IL7-R/IL7 promueve el catabolismo de glucosa y AA como la glutamina, promoviendo la expresión de sus transportadores y la transcripción de genes relacionados con la glucólisis y glutaminólisis, por medio de la vía PI3K/Akt/mTOR, evitando que se la célula se atrofie. La vía PI3K/Akt/mTOR inactiva a FOXOP1 permitiendo la expresión de IL7-R y PTEN impide la inhibición de FOXOP1 para que IL7-R no se sobre exprese y ocurra una activación temprana.

La familia de factores de transcripción, factores Kruppel-like (KLF), promueven la expresión de moléculas que participan en mantener la inactividad y la activación de los linfocitos T. El factor 2 Kruppel-like (KLF2) aunque no es indispensable para mantener la quiescencia, regula varios receptores de los linfocitos T que participan en la migración de los linfocitos, y como se menciona anteriormente la migración se

relaciona con las señales que regulan la quiescencia. Los miembros de la familia FOXO junto con KLF2, promueven la expresión de moléculas como el receptor 1 S1P (S1PR1), la señal inducida por S1P se produce en la sangre y líquidos linfáticos, esta señal suprime la mitofagia para mantener el contenido mitocondrial y la OXPHOS (Chapman et al., 2020).

1.5.2. Metabolismo de linfocitos T activos

Cuando el linfocito T interactúa con una APC y recibe con éxito todas las señales necesarias para su activación, la célula pasa por cambios transcripcionales y sufre una reprogramación metabólica y de la función mitocondrial. Los linfocitos T activos son altamente proliferativos y biosintéticos, por lo que la tasa metabólica aumenta y cambia de un metabolismo catabólico a uno anabólico. El aumento en la tasa metabólica permite que los intermediarios del metabolismo sean usados para sintetizar todas las biomoléculas e intermediarios que la célula necesita para cumplir con sus funciones de linfocito T activo (Pearce & Pearce, 2013) [Figura 7].

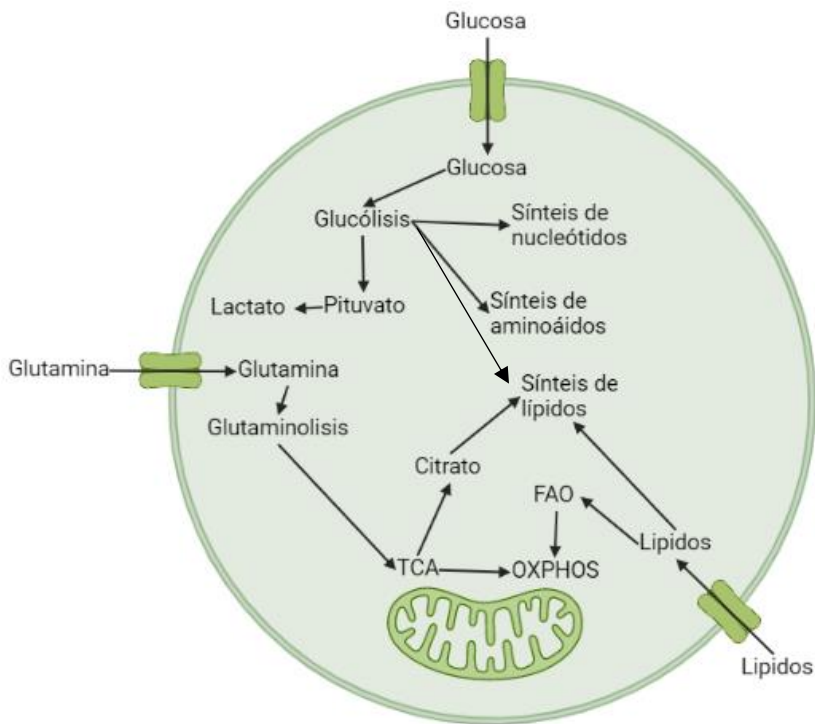


Figura 9. Metabolismo de linfocito T activo: Se muestra como los nutrientes disponibles son usados por el metabolismo anabólico para la producción de las biomoléculas que el linfocito T necesita para cumplir con sus funciones efectoras.

Glucólisis: La reprogramación metabólica de los linfocitos T activos resulta en el cambio de la glucólisis-OXPHOS a la glucólisis aeróbica (Glucólisis-lactato en presencia de oxígeno). Lo cual ocasiona un aumento de los transportadores y del metabolismo de la glucosa. En las células T vírgenes en reposo la captación de glucosa esta mediada por señales extracelulares como citocinas (IL-7), factores de crecimiento y en menor medida por la estimulación tónica del TCR. En las células T activas, la señal más importante es la del compromiso completo y eficiente del TCR/CD28, junto con otras señales estimuladoras como la IL-7, que induce la captación de glucosa tanto en células en reposo como activadas. El aumento de la

captación de glucosa en las células T activadas se caracteriza por una mayor expresión y actividad del transportador de glucosa Glut1 (Palmer et al., 2016).

La activación de las células T requiere de la estimulación del TCR y la señales coestimuladora de CD28, las señales de TCR/CD28 inducen en la vía fosfoinositol 3-cinasa (PI3K)/Akt/mTOR. La unión de CD28 con CD80/86 y TCR con el MHC conduce a la fosforilación de PI3K, activándola y formando el fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3) [Figura 8] (Maciver et al., 2013). PIP3 permite el reclutamiento de hasta 3 isoformas de Akt y PDK1. PDK1 y mTORC2 fosforilan a Akt en sitios separados, lo que resulta en su activación. Akt activado estimula objetivos blancos río abajo como mTORC1. Tanto AKT como mTORC1 promueven la glucólisis, AKT y mTORC1 promueven la expresión del transportador de glucosa, Glut1, activando el factor HIF-1 α , que a su vez inducen la expresión de enzimas glucolíticas [Figura 8] (Palmer et al., 2016).

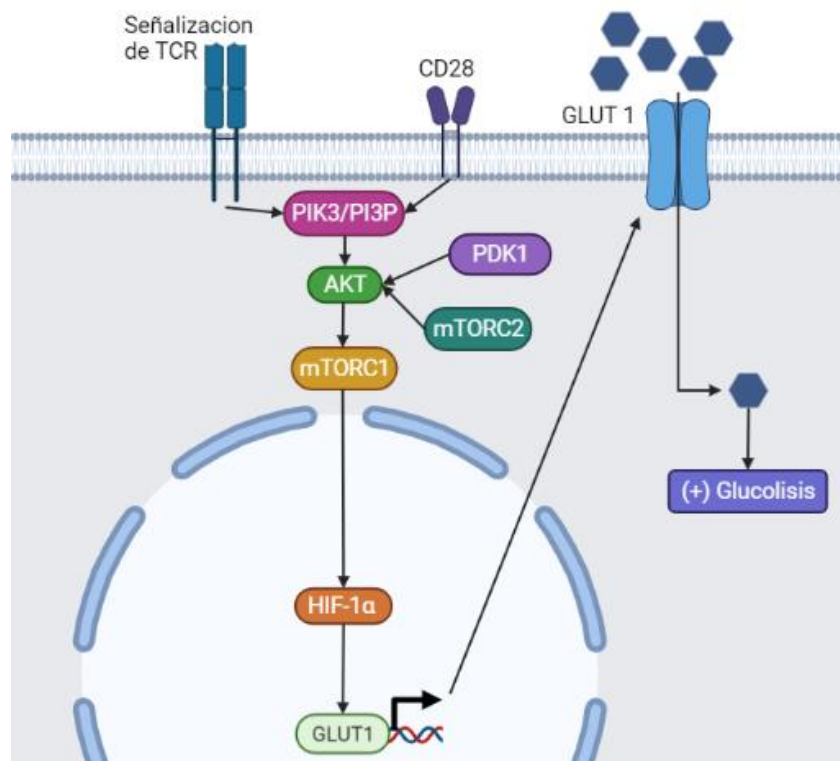


Figura 10. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR: En esta imagen se muestra como las señales del TCR y CD28 activan la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, causando un aumento en la expresión del transportador de glucosa Glut1 y con esto un aumento en el metabolismo de la glucosa.

En la glucólisis aeróbica el piruvato producido por la glucólisis se convierte en lactato en vez de entrar en el TCA, reacción que es catalizada por el lactato deshidrogenasa (LDH), y produce 2 moléculas de NADH necesarias para la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El rendimiento neto de ATP de la glucólisis es de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Este rendimiento de ATP es mucho menor que el que se obtiene por la fosforilación oxidativa, por lo que los linfocitos T activos necesitan consumir glucosa a un ritmo

muy alto para poder producir toda la energía necesaria (Maciolek et al., 2014). Este fenómeno se conoce como el efecto Warbug.

Adicionalmente, el rápido aumento en la glucólisis y la síntesis de lactato, contribuyen a la activación de los linfocitos T a través de cambio epigenético, por medio de la lactilación de residuos de histonas en genes de factores transcripcionales, como NF- κ B y Foxp3. Además se ha reportado que altos niveles de lactato extracelular aumentan la lactilación de los residuos de histonas (Lopez Krol et al., 2022), lo que podría afectar la activación y respuesta de los linfocitos T.

Glutaminólisis: La glutaminólisis es un proceso metabólico de los aminoácidos que convierte la glutamina, en glutamato y alfa cetoglutarato (α -KG). Durante la activación de los linfocitos T se promueve la glutaminólisis, que contribuye a la formación de intermediarios para la síntesis de macromoléculas para la diferenciación y proliferación (Yoo et al., 2020). Se ha demostrado que el uso de fármacos dirigidos a la glutaminólisis sirve como tratamiento contra enfermedades autoinmunes, como en el caso del síndrome de Sjögren, en el que el tratamiento de las células T CD4⁺ con el inhibidor de la Glutaminasa 1 BPTES normaliza su respuesta (Fu et al., 2022).

En la activación de los linfocitos T, la señalización de TCR y CD28 aumenta la expresión de transportadores glutamina (ASCT2) y enzimas del metabolismo de la glutamina. La glutamina regula la activación de células T, promoviendo

indirectamente la captación de leucina, a través del transportador LAT1-CD98. La leucina y la glutamina activan a mTORC1, manteniendo el flujo metabólico, y la glutaminólisis genera glutatión, que neutraliza especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chapman et al., 2020).

Durante la glucólisis aeróbica, donde el piruvato es convertido en lactato, la glutamina soporta el metabolismo oxidativo mitocondrial. La glutamina tiene un papel muy versátil en el metabolismo celular, participa en el TCA, la biosíntesis de nucleótidos, glutatión y otros aminoácidos no esenciales (Yoo et al., 2020).

Cuando la glutamina extracelular entra al citoplasma esta se puede usar para la biosíntesis de hexosamina, nucleótidos esenciales para la proliferación, y asparagina. La glutamina citosólica puede entrar a la mitocondria donde ocurre la glutaminólisis mitocondrial, que convierte la glutamina en glutamato, mediante una reacción que es catalizada por la glutaminasa (GLS). El glutamato se puede exportar al citosol y participa en la biosíntesis de glutatión. En la mitocondria, el glutamato se convierte en α -KG, por la glutamato deshidrogenasa 1 (GDH1), el α -KG puede exportarse al citosol, donde participa en la biosíntesis de ácidos grasos, en la mitocondria el α -KG puede entrar al ciclo TCA (Yoo et al., 2020).

Durante la reprogramación metabólica, la glutaminólisis junto con la oxidación de otros aminoácidos (como el triptófano o la serina) y fuentes fisiológicas de carbono (como el acetato), se incorporan al TCA para mantener los niveles de intermediarios

necesarios para que estos contribuyan al anabolismo y a la generación del poder reductor que será aprovechado por la OXPHOS para la generación de ATP (Feng et al., 2022; Kaymak et al., 2022). En el caso de la glutaminólisis, el α -KG cuando se incorpora al TCA este se convierte en citrato por la carboxilación reductora de α -KG, y este citrato es crucial para la síntesis de lípidos [figura 9] (Yoo et al., 2020).

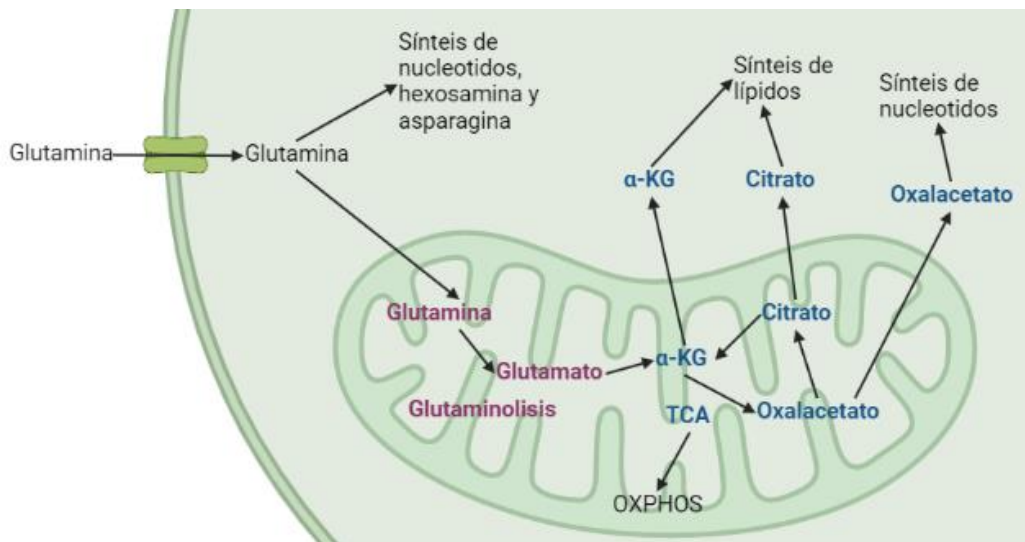


Figura 11. Glutaminólisis: En esta imagen se muestra como la glutaminólisis se conecta con el TCA y se muestra como los intermediarios participan en la síntesis de biomoléculas, como lípidos y nucleótidos, que son importantes para la proliferación.

1.6. Modelado lógico

Entre las décadas de 1960 y 1970 se empezó a introducir el uso de modelados lógico para el estudio de sistemas biológicos (Fauré & Kaji, 2018). En el año 1961, tras el descubrimiento de mecanismos específicos de regulación de genes y la descripción de los primeros circuitos reguladores en bacterias, se propuso el uso de

álgebra booleana para modelar sistemas celulares (Abou-Jaoudé et al., 2016). El primero en modelar un sistema biológico fue Mitoyosi Sugita, que aplicando métodos y herramientas de matemáticas y electrónica, realizó un modelo de circuitos genéticos bacterianos basado en lógica matemática (Sugita, 1963). Poco tiempo después en 1969, Stuart Kauffman realizó un análisis de redes regulatorias de genes descritas con modelos booleanos, utilizando una aproximación sincrónica, centrándose en las propiedades asintóticas (Kauffman, 1969). Paralelamente, René Thomas abordó el modelado de circuitos reguladores específicos, en particular la red que controla la decisión lisis-lisogénica en bacteriófagos lambda, usando un enfoque asincrónico y refinando el formalismo lógico con parámetros o reglas lógicas y la introducción de variables de valores múltiples (Naldi et al., 2018; Thomas, 1973). En sus trabajos Kauffman y Thomas coincidieron en que los estados estables, o atractores, pueden relacionarse con diferentes sistemas biológicos o tipos celulares, y que las transiciones de un estado lógico a otro pueden asociarse con cambios en la expresión génica a lo largo del tiempo. El conjunto de estos trabajos, sentaron las bases para estudios posteriores que demostraron el potencial y el poder del modelado lógico aplicado al estudio de biología molecular, sistemas biológicos y más (Abou-Jaoudé et al., 2016).

Los modelos pueden ser cuantitativos o cualitativos, en el caso de los modelos cuantitativos, estos necesitan información cinética del sistema, información que solo está disponible para sistemas bien definidos y muy investigados, lo que limita su

aplicación. Por otro lado, los modelos cualitativos se basan en una red de interacciones que representa la influencia de los componentes del sistema (Samaga & Klamt, 2013) y no necesitan parámetros cinéticos ni otro tipo de conocimientos precisos sobre los mecanismos moleculares (Schwab et al., 2020). Los modelos booleanos son un tipo de modelado lógico cualitativo, donde los componentes de la red se describen usando valores binarios (0 y 1) y las interacciones entre los componentes son definidas por funciones reguladoras booleanas o reglas lógicas (Niarakis & Helikar, 2021). Este tipo de modelado se puede aplicar para estudiar procesos celulares como la diferenciación o ciclo celular, proliferación, apoptosis, regulación de la expresión de genes, actividad de proteínas, etc. (Abou-Jaoudé et al., 2016).

Los modelos en general pueden considerarse como una abstracción de un sistema biológico que se centra en los componentes del sistema con interacciones que tienen una influencia positiva o negativa sobre otros componentes del sistema (Abou-Jaoudé et al., 2016).

En el modelo lógico un número de n elementos llamados nodos [Figura 10-A)], representan los componentes del sistema biológico, por ejemplo, proteínas, genes o biomoléculas (Schwab et al., 2020). Los nodos también pueden simbolizar procesos, como la transcripción y vías metabólicas, o fenómenos abstractos del sistema biológico, como la diferenciación o el destino celular (Niarakis & Helikar,

2021). Las interacciones entre los componentes del sistema biológico, en el modelo, son representadas por vectores que van del nodo/componente que induce la interacción hasta el nodo/componente al que afecta [Figura 10-A, B) y C)], estos vectores cuentan con una característica que permite saber el efecto que tendrá esta interacción sobre el nodo que afecta. El conjunto de los nodos y vectores forma una red o gráfico regulatorio, el cual es una forma gráfica de describir el sistema [Figura 10-B) y C)] (Abou-Jaoudé et al., 2016). La construcción de una red regulatoria por si sola, puede brindarnos información del sistema y sus componentes por medio de análisis estructurales, por ejemplo, mediante el cálculo del grado y coeficiente de agrupamiento de los nodos del sistema. En el caso del grado de los nodos (k), este nos indica el número total de vectores que están asociados a un nodo, ya sea que representen interacciones positivas o negativas que salen del nodo o que convergen en él. Por otro lado, el coeficiente de agrupamiento (Ca), nos indica que tan densamente está conectado un nodo y este se calcula dividiendo el número de vectores que un nodo tiene entre sus nodos vecinos (l), entre el número de enlaces entre los nodos vecinos que es posibles de existan ($Ca = \frac{l}{k(k-1)}$). (Hao et al., 2012)

Los nodos están asociados a una variable discreta entera ($x = \{x_1, \dots, x_n\}$), la cual es una abstracción lógica que nos permite saber el estado del componente en el sistema biológico. El valor de esta variable puede representar tanto la presencia como la ausencia del componente, como su nivel de concentración o activación

(Saadatpour & Albert, 2013). En el caso de los modelos booleanos, la variable x asociada a los nodos pueden tener un valor de 0 (ausencia/inactivado/apagado) o 1 (presencia/activado/encendido) (Niarakis & Helikar, 2021). Sin embargo, en los sistemas biológicos un solo componente puede tener diferentes efectos en el sistema y los demás componentes, dependiendo de su concentración o activación. En estos casos es necesario el uso de variables multivaluadas con un valor máximo mayor que 1 (Abou-Jaoudé et al., 2016).

Las consecuencias de las interacciones sobre el modelo y sobre el valor de la variable a la que los nodos están asociados, están codificadas en las funciones booleanas o reglas lógicas ($f = \{f_1, \dots, f_n\}$). Las funciones booleanas pueden escribirse con los operadores, **AND**, **OR** y **NOT**, que describen todos los cambios que pueden ocurrir en la variable x asociada a los nodos y las condiciones necesarias para que este cambio ocurra [Figura 10-B) y C)] (Naldi et al., 2018; Niarakis & Helikar, 2021).

En el modelo, los nodos de entrada representan señales externas, como nutrientes (por ejemplo: glucosa) o señales ambientales, estos no están regulados por otros nodos, pero si ejercen regulación sobre otros nodos. Los nodos de entrada no tienen funciones booleanas asociadas y su variable tiene un valor basal, los nodos internos del modelo, están reguladas por otros nodos y ejercen regulación sobre otros nodos. Estos nodos representan componentes como proteínas. Los nodos de salida son

regulados por otros nodos, pero no regulan a otros, y representan componentes como fenotipos o la diferenciación celular (Schwab et al., 2020).

Las funciones booleanas pueden usarse para trazar el progreso del modelo al tiempo $t + 1$ partiendo de un estado inicial al tiempo t . El cambio del valor de la variable de un componente al tiempo $t + 1$ depende de los niveles de los reguladores asociados a ese componente en el tiempo t . El estado del modelo al tiempo t puede definirse con el vector $\vec{x}(t) = \{x_1(t), \dots, x_n(t)\}$, y el cambio en el valor de la variable x del tiempo t al $t + 1$ ($x_i(t) \rightarrow x_i(t + 1)$), está definida por las funciones f asociada al respectivo nodo $x_i(t + 1) = f_i(\vec{x}(t))$ (Schwab et al., 2020). Cabe mencionar, que con el gráfico regulatorio se pueden deducir las funciones booleanas y viceversa, aunque no siempre es evidente si es el operador OR o el AND el que debe ir en cada situación específica.

El comportamiento a largo plazo del modelo puede describirse por un gráfico de transición de estados o estado-grama, donde se representan las transiciones entre todos los estados posibles del modelo a lo largo del tiempo [Figura 10-D) y E)]. Adicionalmente, haciendo uso de procesos estocásticos basados en procesos de Markov de tiempo continuo, podemos obtener un análisis probabilístico de la transición entre los estados del modelo o la transición de nodos específicos a lo largo del tiempo. En los procesos de Markov de tiempo continuo, para el conjunto de estados posibles de un modelo (Σ) donde los estados son finitos ($|\Sigma| = m < \infty$),

se describe mediante procesos estocásticos $\{s(t), t \in I \subset \mathbb{R}\}$ la evolución de un modelo a lo largo de intervalos de tiempo $I = [t_m, t_M]$, que no representan unidades de tiempo real, sino transiciones de eventos. Los cambios de estados a lo largo de estos eventos ocurren con una tasa de transición definida $p(\vec{x} \rightarrow \vec{x}')$ partiendo de un estado inicial $P[s(t_m) = \vec{x}]$, a lo largo de la transición de eventos la posibilidad de que ocurra un cambio en el sistema depende únicamente del estado actual del mismo. Este tipo de análisis nos permite seguir la probabilidad de que el sistema biológico, o uno de los componentes, adquiera un estado estable a lo largo de lo que podemos interpretar como un tiempo biológico (Calzone et al., 2022; Stoll et al., 2012). El uso de herramientas estocásticas basadas en procesos de Markov nos permite igualar las ventajas del uso de modelos cuantitativos sobre los modelos cualitativos, ya que nos permiten obtener información del desarrollo del sistema a lo largo de una interpretación de tiempo usando modelos cualitativos sin la necesidad de datos cinéticos.

En un modelo booleano donde los nodos pueden tener un valor de 0 o 1, la cantidad de estados posibles que puede tener el modelo se puede calcular con la fórmula 2^n , donde n es el número de nodos. Si en el gráfico de transición de estados se llega a una secuencia periódica de estados, significa que se ha llegado a un atractor, los cuales no se pueden cambiar a menos que ocurra una perturbación (Schwab et al., 2020). Los estados estables pueden dividirse en dos tipos: 1) El primer tipo de

estado estable se denomina, atractores de estado estacionario [Figura 10-D)], los cuales son un solo estado donde los valores de cada componente del modelo se mantienen constantes (punto fijo). Estos atractores estables se relacionan con el fenotipo y la diferenciación celular. 2) El segundo tipo de atractores son los cíclicos [Figura 10-E)], estos atractores están formados por una secuencia de estados que se repiten periódicamente, este tipo de atractores se asocian con el ciclo celular o ciclos circadianos (Schwab et al., 2020). En los modelos booleanos, los atractores cíclicos no suelen ser de gran interés, y de serlo se tratan con cautela, ya que pueden surgir como consecuencia de cualquier asa de retroalimentación negativa presente en el modelo, sin que necesariamente represente lo que ocurre en el sistema biológico real.

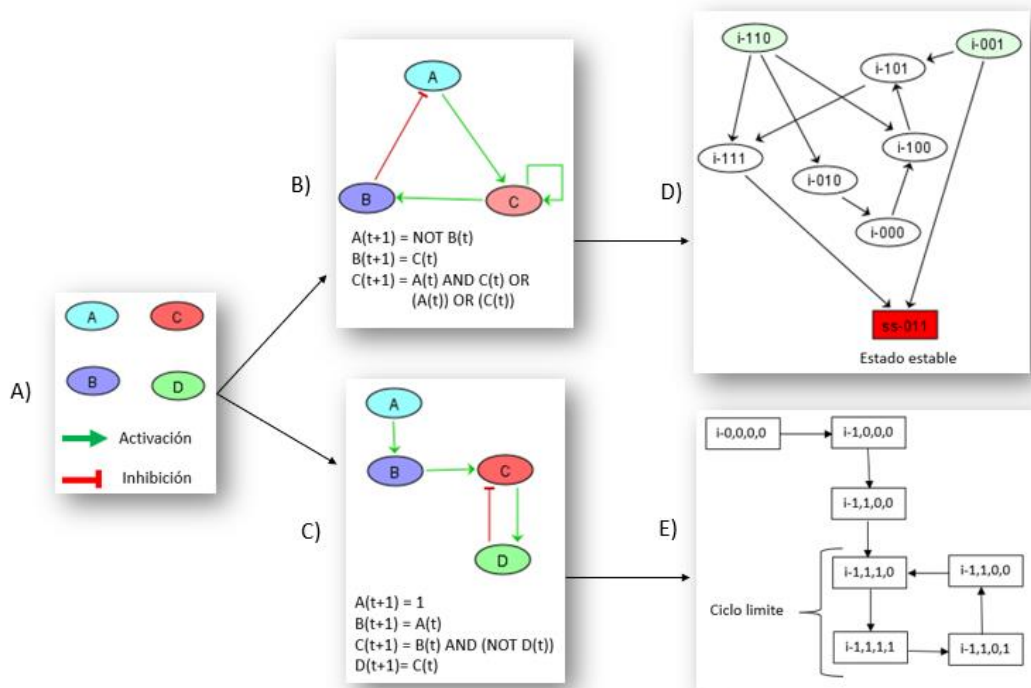


Figura 12. Modelado lógico: En el inciso A) se muestran nodos que representan los componentes de un sistema y los vectores que indican la interacción entre los componentes, los vectores tienen características que indican si la interacción es positiva o negativa. En los incisos B) y C), se muestran dos gráficos regulatorios formados por estos nodos y vectores, junto con sus funciones lógicas que describen las consecuencias de las interacciones sobre las variables asociadas a los nodos a lo largo del tiempo. En los incisos D) y E), se muestran dos gráficos de transición de estados que representan el cambio en los valores de las variables asociadas a los nodos a lo largo del tiempo, en el gráfico de transición de estados D) se llega a un estado estable, en el gráfico de transición de estados E) se llega a un ciclo estable compuesto por 4 estados que se repiten conforme pasa el tiempo.

2. ANTECEDENTES

En una publicación previa del laboratorio, se usó el modelado lógico para el estudio del papel de la señalización del TCR y el TLR5 en la activación de los linfocitos T CD4⁺. En el artículo se concluye que la señalización del TLR5 y el TCR cooperan

para la activación de NF- κ B y AP-1, para la producción de citocinas y para la proliferación de células T CD4⁺ (Rodríguez-Jorge et al., 2019). Además, otro artículo del laboratorio concluyó que la señalización del TLR5 podría ayudar a superar el umbral de activación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, ayudando a la activación y la producción de citocinas proinflamatorias (Labastida-Conde et al., 2018).

Adicionalmente, en otro artículo del laboratorio se usaron datos experimentales y modelado lógico para estudiar la integración del metabolismo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la señalización por el TCR para la activación de los linfocitos T CD8⁺. En este artículo se encontró un mayor porcentaje de linfocitos T neonatales con alto nivel de ROS mitocondriales y citoplásmicos, los cuales se correlacionan con una sobreexpresión de enzimas glucolíticas. Al obtener los estados estables del modelo, se encontraron dos estados de anergia en los que el TCR y CD28 se activan por separado y un estado de activación incompleta donde se activa NFAT, pero no NF- κ B, AP1 o IL-2. En este artículo se concluye que los altos niveles de ROS perjudican la activación de los linfocitos T CD8⁺, y que los altos niveles de ROS en las células neonatales pueden atribuirse a una glucólisis ya activa antes de la activación y/o a una baja capacidad de las mitocondrias para controlar los electrones a lo largo de la cadena respiratoria, produciendo mROS (Sánchez-Villanueva et al., 2019).

Recientemente, en su Tesis de Doctorado (inérita), la Mtra. Linda A. Kempis-Calanis realizó un estudio transcriptómico de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos humanos a nivel basal y activados [Figura 13]. En este estudio, en los neonatos se encontró una sobreexpresión de genes característicos de la glucólisis aerobia y consumo de aminoácidos. Lo que sugiere un estado metabólico altamente glucolítico en condiciones basales.

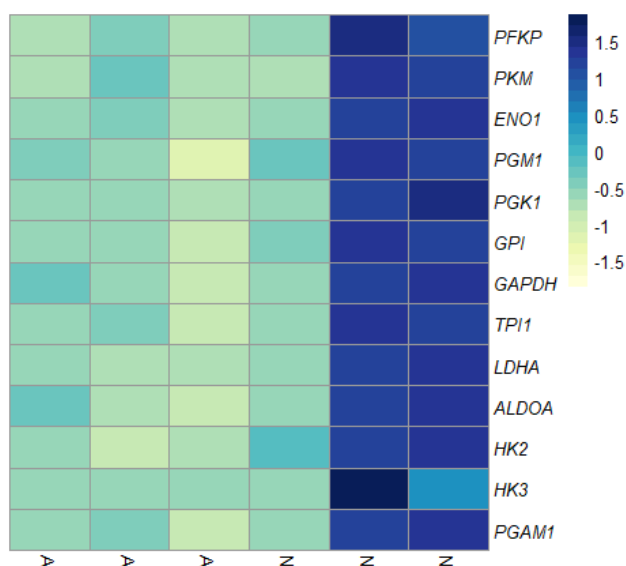


Figura 13. Heatmap del RNA-seq de linfocitos T CD4⁺ de adultos (A) y neonatos (N): Donde se observa la diferencia entre la expresión de enzimas relacionadas con la glucólisis entre linfocitos T CD4⁺ neonatales (N) y adultos (A) (Kempis-Calanis, 2021).

Todo lo anterior sugiere que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos presentan una elevada glucólisis aerobia, alta concentración de ROS y una activación limitada, en comparación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos.

3. OBJETIVOS

3.1. General:

Modelar computacionalmente la regulación cruzada del metabolismo y la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺, enfocándonos en células neonatales.

3.2. Específicos:

1. Modelar computacionalmente la relación entre las vías metabólicas y la activación de los linfocitos T CD4⁺, partiendo de modelos actuales.
2. Reproducir computacionalmente la reprogramación metabólica que ocurre durante la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos.
3. Identificar nodos que probablemente puedan potenciar la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ neonatales a través de modelado computacional.

4. HIPÓTESIS

Se sabe que la activación de los linfocitos T CD4⁺ induce una reprogramación metabólica (efecto Warburg), la cual es necesaria para lograr su activación y diferenciación. También se sabe que el estado metabólico celular puede influenciar positiva o negativamente la respuesta de activación. Por lo tanto, se espera que el modelar computacionalmente estas redes nos permitirá explicar cómo el metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ neonatales afecta su respuesta de activación. Además, existe suficiente evidencia para plantear la hipótesis de que un estado

metabólico altamente glucolítico en los linfocitos T CD4⁺ neonatales influye negativamente en su respuesta de activación, ya que se ha visto que varios metabolitos tienen funciones inmunoregulatoras, en especial el lactato, que en alta concentraciones puede ser inmunosupresor.

Adicionalmente, no descartamos el papel de otras vías metabólicas, así como la existencia de mecanismos independientes del metabolismo, que supriman la función de las células T CD4⁺ neonatales. Sin embargo, es posible que las simulaciones con el modelo computacional junto con análisis estructurales de la red nos permitan descubrir estados metabólicos alterados que influyan negativamente en la activación, e identificar los metabolito o vías metabólicas que causan estos estados, permitiéndonos proponer blancos de intervención para promover la función de los linfocitos T CD4⁺ neonatales.

5. METODOLOGÍA

5.1. Construcción del modelo

Para generar el modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺, se complementaron y actualizaron dos modelos elaborados por el Dr. Rodríguez-Jorge, un modelo del metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ y otro de las vías de activación de los linfocitos T CD4⁺ publicado por el Dr. Rodríguez Jorge el año 2019 [(Rodríguez-Jorge et al., 2019) (<http://ginsim.org/node/225>)]. Para la complementación de los modelos se realizó una búsqueda de información de temas

relacionados con el metabolismo de linfocitos T CD4⁺, su activación y cualquier otro tema que se consideré útil para el proyecto. La investigación se realizó en la bibliografía y bases de datos especializadas, como METABOLIC ATLAS [(Robinson et al., 2020) (<https://metabolicatlas.org/>)] y la Enciclopedia de Genes y Metabolismo Humano (HumanCyc) [(Trupp et al., 2010) (<https://humancyc.org/>)]. Conforme la información era recopilada esta se fue integrando en el gráfico regulatorio de los modelos en forma de nodos y vectores con ayuda del software GINsim [(v3.0), (Naldi et al., 2018) (<http://ginsim.org/>)]. Este paso es necesario, ya que el conocimiento actual sobre el tema debe incluirse en el modelo.

Conforme los modelos se fueron modificando, a los nodos se les asignaron valores booleanos (0, 1), para describir su nivel de actividad. Sin embargo, en algunos casos, a los nodos se les asignó un valor de activación mayor, habiendo nodos con hasta 4 posibles valores (0, 1, 2, 3), siempre y cuando la asignación de estos valores estuviera justificada biológicamente.

Una vez los gráficos regulatorios integraban satisfactoriamente la información recopilada y se definieron los valores que las variables de los nodos pueden tomar, se modificaron las funciones lógicas existentes para coincidir con la nueva dinámica de los modelos, y se redactaron nuevas funciones lógicas para los componentes agregados. Estas funciones lógicas definen los parámetros en los que los cambios en las variables pueden ocurrir. Las reglas lógicas se redactaron usando los

símbolos {&, |, !}, para representar los operadores {AND, OR, NOT}, respectivamente. Cabe mencionar que las reglas lógicas no solo se dedujeron del gráfico regulatorio, también se usó la información disponible en la bibliografía, de lo contrario existirían resultados sin relevancia biológica.

Una vez que el modelo del metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ y el modelo de las vías de activación de los linfocitos T CD4⁺ fueron actualizados satisfactoriamente, estos se unieron por medio de la fusión de nodos en común entre los dos modelos y la modificación de las funciones lógicas de estos nodos fusionados. Este proceso se realizó con ayuda del programa GINsim [(v3.0), (Naldi et al., 2018) (<http://ginsim.org/>)].

Es importante mencionar que, durante la modificación y actualización del modelo, constantemente se calcularon los estados estables que este podía producir, para asegurarse que la dinámica del modelo correspondiera con la reportada en la bibliografía, de lo contrario el modelo era corregido y se volvían a calcular los estados estables.

5.2. Reducción del modelo

Una vez que la dinámica del modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ integraba la información disponible y la dinámica de este fue la adecuada, el modelo fue reducido y discretizado. La reducción y el abordamiento booleano del modelo nos permite trabajar con herramientas

probabilísticas, estas herramientas nos permiten observar la probabilidad de que el modelo adquieran un estado a lo largo de una transición de eventos que pueden interpretarse como tiempo.

La reducción del modelo se realizó eliminando nodos que no tenían retroalimentación, no eran indispensables para la dinámica del modelo y/o no eran de interés para el trabajo. Cabe mencionar que cada vez que se realizaba una reducción se verificaba que los estados estables que la reducción producía fueran los mismos que los que produce la versión completa del modelo, de lo contrario la reducción se corregía. El modelo reducido fue discretizado a un modelo 100% booleano, esto de logro reduciendo los valores que los nodos multivalor podían tomar a solo 0 y 1, donde el valor 1 ahora representa el valor máximo que el nodo multivalor podía tomar y el valor 0 representa los valores por debajo del máximo del nodo multivalor. Pero en algunos casos, para poder abordar el modelo con un enfoque booleano, los nodos multivalor se separaron en nodos que representan los diferentes niveles que el nodo multivalor podía tomar. La reducción y el abordamiento booleano del modelo se realizó con ayuda del programa GINsim [(v3.0), (Naldi et al., 2018) (<http://ginsim.org/>)].

5.3. Análisis del modelo

Como se mencionó anteriormente, a lo largo de la construcción del modelo se realizaron cálculos de estados estables (atractores) para verificar la dinámica de

este, pero además de estos cálculos, se realizaron análisis de estados estables junto con las perturbaciones *knockouts* y *knockins* necesarias para comprobar que el modelo puede recrear las características de los linfocitos T CD4⁺ virgen y activos reportadas en la biobibliografía. El cálculo de los estados estables con las perturbaciones *knockouts* y *knockins* se realizaron con ayuda del programa GINsim [(v3.0), (Naldi et al., 2018) (<http://ginsim.org/>)].

Adicionalmente, la reducción del modelo nos permitió trabajar con herramientas probabilísticas con las que podemos realizar simulaciones estocásticas, permitiéndonos saber cómo el sistema que representa nuestro modelo podría comportarse a lo largo de una serie de eventos que pueden interpretarse como un progreso a lo largo del tiempo. Al igual que el cálculo de los estados estables, este análisis probabilístico se complementó con perturbaciones *knockouts* y *knockins* para verificar que el comportamiento del modelo coincidía con lo reportado en la bibliografía. El análisis probabilístico se realizó con la herramienta estocástica basada en procesos de Markov de tiempo continuo MaBoSS [(v2.0), (Stoll et al., 2012), (<https://maboss.curie.fr/>)], con ayuda del cuaderno interactivo CoLoMoTo [(v2022-10-01), (Levy et al., 2018), (<https://colomoto.github.io/colomoto-docker/>)].

La validación del funcionamiento del modelo se verificó mediante la evaluación de los estados estables y su comparación con la respuesta de activación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos.

5.4. Análisis del estado neonatal

Una vez que se comprobó que el modelo podía recrear lo reportado en la bibliografía, que representa el comportamiento de un linfocito T CD4⁺ de adulto, se volvieron a realizar simulaciones estocásticas y cálculo de estados estables junto con perturbaciones *knockins* para representar el escenario de un linfocito T CD4⁺ neonatal. Gracias a las contribuciones anteriores del grupo de trabajo del laboratorio, sabemos que los linfocitos T de neonatos tienen una mayor expresión de genes de vías metabólicas como la glucólisis y la glutaminólisis, en comparación con los linfocitos T de adultos, además de una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, adicionalmente, nosotros teorizamos que los neonatos producen una mayor cantidad de lactato que los adultos. Para lograr replicar estas características en nuestro modelo, se realizaron perturbaciones *knockins* para que los nodos que representan componentes relacionados con el escenario neonatal previamente descrito, como las enzimas e intermediarios de la vía glucolítica y la glutaminólisis, tuvieran su mayor nivel posible. Esto nos permitió observar las consecuencias que tienen estas características en la activación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales.

5.5. Análisis estructural

Por último, para obtener un mayor entendimiento de los componentes del sistema e identificar los nodo más sensibles de la red, se realizó un análisis estructural de la red regulatoria del modelo con ayuda del programa Gephi [(v0.9.7), (Bastian et al.,

2009) (<https://gephi.org/>)]. Para realizar el análisis primero se realizó la exportación del modelo a un formato compatible con el programa Gephi. Posteriormente se usó la función de análisis estadísticos para el cálculo de características estructurales de los nodos del modelo. Entre las características que se calcularon se encuentra el grado (k) de cada nodo, que nos indica el número total de vectores que están asociados a un nodo, ya sea que representen interacciones positivas o negativas que salen del nodo o que convergen en este. También se calculó el coeficiente de agrupamiento (C_a), que nos indica que tan densamente está conectado un nodo al modelo. El coeficiente de agrupamiento (C_a) se calcula con la ecuación $C_a = \frac{l}{k(k-1)}$, en la que se divide el número de vectores que un nodo tiene entre sus nodos vecinos (l) entre el número de enlaces posibles entre los nodos vecinos ($k(k-1)$). Después de obtener los datos estructurales del modelo, se escogieron nodos que posiblemente pudieran servir como blancos para potenciar la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, y se volvieron a realizar simulaciones estocásticas y cálculos de estados estables junto con perturbaciones *knockouts* y *knockins* para observar cómo estos nodos propuestos afectan la activación de los linfocitos T CD4⁺.

6. RESULTADOS

6.1. Construcción del modelo

La versión final del modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ está compuesto por 212 nodos [Figura 14], de los cuales 156 nodos son booleanos, o sea que estos nodos pueden tener solo 1 de 2 valores (0 y 1), y 56 nodos son nodos multivalor de los cuales la mayoría puede tener 1 de 3 valores (0, 1 y 2), pero algunos pueden tener 1 de hasta 4 valores (0, 1, 2 y 3). Las interacciones entre los nodos del modelo están representadas por 394 vectores, los cuales representan interacciones positivas y/o negativas [Figura 14]. Los componentes del sistema están asociados a 239 reglas lógicas que describen como se comportaran los componentes en una transición de eventos partiendo de un estado inicial. La versión final del modelo cuenta con nodos de entrada de color verde, que representan componentes que inician las vías de señalización y metabólicas, como la señalización del TCR y el CD28 o nutrientes como la glucosa y los ácidos grasos [Figura 14]. También contiene vías de activación de factores transcripcionales resaltados con color amarillo, los cuales son importantes para la activación de los linfocitos T CD4⁺, como NF- κ B, AP-1 y NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) [Figura 14]. Además, contiene vías de señalización que conectan la activación de los linfocitos T con su metabolismo, como la vía PI3K/Akt/mTOR que induce la reprogramación metabólica y es activado por la señalización del TCR y el CD28 [Figura 14]. El modelo contiene vías metabólicas completas como la glucólisis y el

ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo de Krebs) [Figura 14], junto con nodos que representan procesos metabólicos del catabolismo (como la oxidación de ácidos grasos y la glutaminólisis) resaltados de color rosa [Figura 14]. El anabolismo (como la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos) está resaltado de color azul y el anfibolismo (como la vía de las pentosas fosfato) de color morado [Figura 14]. Además, los nodos de fenotipo están mostrados de color gris, que representan conceptos más abstractos, como la secreción de citocinas, el nivel de activación de la glucólisis aerobia o el ciclo celular [Figura 14].

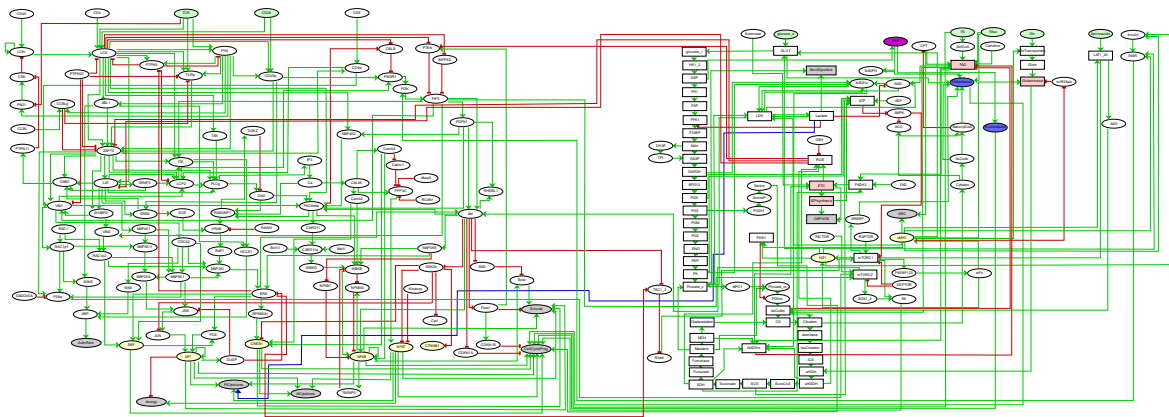


Figura 14. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺: En esta imagen se muestra la versión final del modelo que está formado por 212 nodos (156 nodos booleanos y 56 nodos multivalores) que están unidos entre sí por 394 vectores que representan interacciones positivas y/o negativas entre estos. El modelo tiene 7 nodos de entrada de color verde, 5 nodos que representan componentes del catabolismo de color rosa, 2 nodos que representan componentes del anabolismo de color azul, 1 nodo que representa componentes del anfibolismo de color morado, 8 nodos que representan factores de transcripción de color amarillo, 9 nodos de salida o de fenotipo de color gris y 180 nodos intermedios de color blanco que representan vías de señalización, vías metabólicas, proteínas, intermediarios, etc.

Para confirmar que nuestro modelo puede producir estados estables de interés se calcularon los estados estables que el modelo puede arrojar sin ninguna perturbación. Al realizar el cálculo el modelo produce 4 estados estables: El primer estado (E1) representa dos estados iguales en los que la única diferencia entre estos es la presencia o ausencia de la señal coestimuladora del CD28. En este estado la ausencia de la señal del TCR impide que la célula realice la reprogramación metabólica a un programa glucolítico y anabólico. Por lo mismo no ocurre la entrada al ciclo celular, permaneciendo como un programa catabólico oxidativo donde los nutrientes se destinan a la síntesis de ATP, y tampoco se desencadenan las actividades efectoras del linfocito T CD4⁺, como la secreción de citocinas. Este estado sin actividad efectora, además de poca actividad biosintética y bioenergética, puede asociarse con una célula T CD4⁺ virgen (Naive T cell) [Figura 15], con poca demanda energética y actividad transcripcional. En el segundo estado (E2), la señal del TCR junto con la ausencia de la señal coestimuladora del CD28 causa la anergia de la célula (Anergic T cell) [Figura 15], sin cambios en el metabolismo o en las funciones efectoras. En el tercer estado (E3), la presencia de la señal del TCR y la señal coestimuladora del CD28 desencadenan las funciones efectoras del linfocito T, como la secreción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Sin embargo, no se observa la reprogramación del metabolismo a un metabolismo glucolítico y anabólico, por lo que tampoco se entra al ciclo celular para realizar la división clonal. Esto indicaría que este estado estable representa

una célula con pocas demandas energéticas y biosintéticas, por lo que este estado se asocia con una célula T de memoria (Memory T cell) [Figura 15], con poca actividad efectora y proliferativa. En el cuarto estado (E4), la activación de la señal del TCR y la señal coestimuladora del CD28 desencadenan las funciones efectoras junto con la reprogramación metabólica a un programa altamente glucolítico en un fenómeno conocido como el efecto Warburg, y este aumento en la tasa metabólica de vías como la glucólisis y la glutaminólisis permite un cambio a un programa anabólico para la síntesis de biomoléculas, como nucleótidos y ácidos grasos, promoviendo la entrada al ciclo celular y la división clonal, lo que significa que esta célula tiene grandes demandas energéticas y biosintéticas. Además, también permite un aumento en la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, este estado se relaciona con célula T CD4⁺ efectora (Effector T cell) [Figura 15].

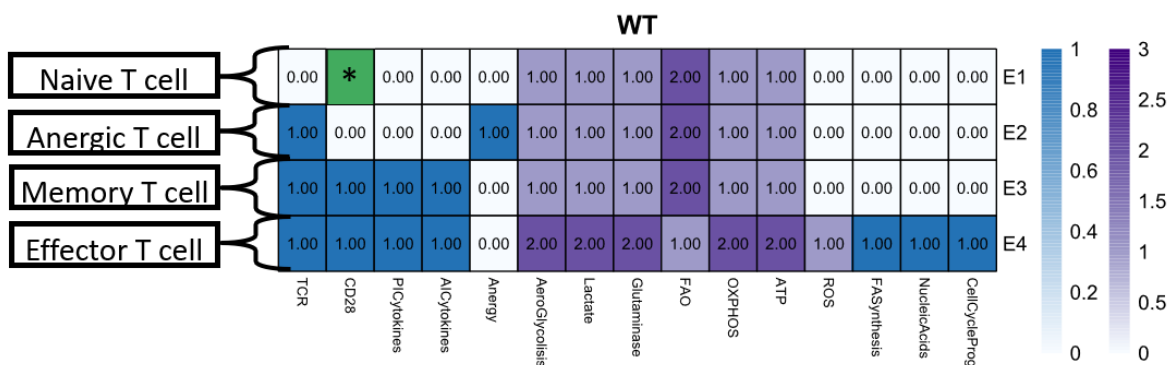


Figura 15. Estados estables del modelo WT: En esta imagen se muestran los estados estables que se obtienen con el modelo sin ninguna perturbación (knockouts o knockins): El estado E1 se relaciona con una célula T virgen que puede tener o no la ausencia de la señal del CD28 (*). El estado E2 se relaciona con una célula T

anérgica que recibe la señal del TCR, pero no la del CD28. El estado E3 representa una célula con funciones efectoras que no tiene gran demanda energética, la cual asociamos con una célula T de memoria. El estado E4 se asocia con una célula T efectora, con actividad efectora y grandes demandas energéticas y biosintéticas.

6.2. Reducción del modelo

Una vez se obtuvo el modelo completo este fue reducido y booleanizado, para poder usar herramientas probabilísticas adicionales. Después de la conversión del modelo a uno booleano, en los nodos que antes eran multivalor, ahora el valor máximo que estos podían tener está representado por el valor 1 y el valor por debajo del máximo es representado por el valor 0, a excepción de los nodos que representan los niveles de lactato, ROS y la oxidación de ácidos grasos, en estos casos, los nodos multivalor se separaron en varios nodos booleanos que representan sus diferentes niveles de activación.

Después de la reducción y la conversión del modelo a uno booleano, se obtuvo un modelo con 64 nodos booleanos, cuyas interacciones están representados por 156 vectores [Figura 16]. Los componentes de esta versión del modelo están asociados a 62 reglas lógicas, que describen el comportamiento del modelo a través de una transición de eventos. La versión reducida del modelo, al igual que la versión completa, cuenta con nodos de entrada de color verde, que representan componentes que inician las vías de señalización y metabólicas, como la señalización del TCR y el CD28 o nutrientes como la glucosa y los ácidos grasos [Figura 16]. La versión reducida del modelo conserva componentes importantes

para las vías de señalización por debajo del TCR y el CD28 como LCK (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), ZAP-70 (zeta-chain associated protein 70) y LAT (Linker for Activation of T cells) [Figura 16]. Además, conserva la mayoría de los factores transcripciones de la versión completa del modelo, como NF- κ B, NFAT y AP-1 [Figura 16], los cuales están resaltados de color amarillo. La reducción también contiene vías de señalización que conectan la activación de los linfocitos T con su metabolismo, como la vía PI3K/Akt/mTOR que induce la reprogramación metabólica y es activado por la señalización del TCR y el CD28 [Figura 16]. La versión reducida del modelo conservo componentes de vías metabólicas que se conectan con otras vías, ya sea del metabolismo o la activación de los linfocitos T, como el citrato del ciclo de Krebs, que puede integrarse a la síntesis de ácidos grasos [Figura 16]. La reducción conserva nodos que representan procesos metabólicos del catabolismo (como la oxidación de ácidos grasos y la glutaminólisis) resaltados de color rosa [Figura 16]. El anabolismo (como la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos) está resaltado de color azul y el anfibolismo (como la vía de las pentosas fosfato) de color morado [Figura 16]. Además, el modelo reducido conserva la mayoría de los nodos de fenotipo están mostrados de color gris, que representan conceptos más abstractos, como la secreción de citocinas, el nivel de activación de la glucólisis aerobia o el ciclo celular [Figura 16].

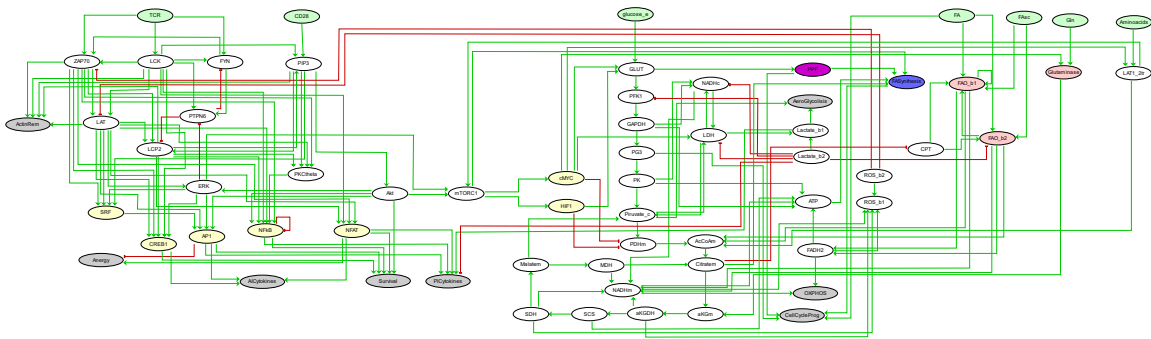


Figura 16. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4+ reducido y discretizado: En esta imagen se muestra la versión final del modelo reducido y convertido a un modelo booleano. Esta versión cuenta con 64 nodos booleanos unidos entre sí por 156 vectores que representan interacciones positivas o negativas. La reducción del modelo cuenta con 7 nodos de entrada de color verde, 3 nodos que representan componentes del catabolismo de color rosa, 1 nodos que representan componentes del anabolismo de color azul, 1 nodo que representa componentes del antifolismo de color morado, 7 nodos que representan factores de transcripción de color amarillo, 8 nodos de salida o de fenotipo de color gris y 37 nodos intermedios de color blanco que representan vías de señalización, vías metabólicas, proteínas, intermediarios, etc.

Para confirmar que nuestro modelo reducido y discretizado puede producir los mismos estados estables que la versión completa del modelo, se realizó el cálculo de los estados estables que la reducción puede arrojar sin ninguna perturbación. Al realizar el cálculo, el modelo reducido produce 4 estados estables al igual que la versión completa: El primer estado (E1), representa dos estados estables en los que la única diferencia entre estos es la presencia o ausencia de la señal coestimuladora del CD28. En este estado, la ausencia de la señal del TCR no permite la activación de las funciones efectoras de los linfocitos T ni promueve la reprogramación metabólica, permaneciendo como un programa oxidativo. Por estas características, al igual que en el modelo completo, este estado estable puede relacionarse con una

célula T virgen (Naive T cell) [Figura 17]. En el segundo estado (E2), la presencia de la señal del TCR junto con la ausencia de la señal coestimuladora del CD28 causa la anergia de la célula, sin cambios en las funciones efectoras o en el metabolismo oxidativo. Este estado al igual que el segundo estado del modelo completo equivale a una célula T anérgica (Anergic T cell) [Figura 17]. En el tercer estado estable (E3), la señal del TCR y la señal estimuladora del CD28 desencadena funciones efectoras de los linfocitos T, como la secreción de citocinas. Sin embargo, al igual que en el modelo completo, en este estado estable no se observa la reprogramación metabólica, por lo que este estado también puede relacionarse con una célula T de memoria (Memory T cell) [Figura 17]. En el caso del cuarto estado estable (E4), al igual que en el modelo completo, se aprecia la presencia de la señal del TCR junto con la señal coestimuladora del CD28, lo que desencadena las funciones efectoras del linfocito T junto con la reprogramación metabólica. En este estado el aumento en la tasa metabólica permite el cambio a un programa metabólico anabólico que permite la entrada al ciclo celular y la división clonal, junto con un aumento en la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Al igual que en el modelo completo, este estado E4 puede relacionarse con una célula T CD4⁺ efectora (Effector T cell) [Figura 17].

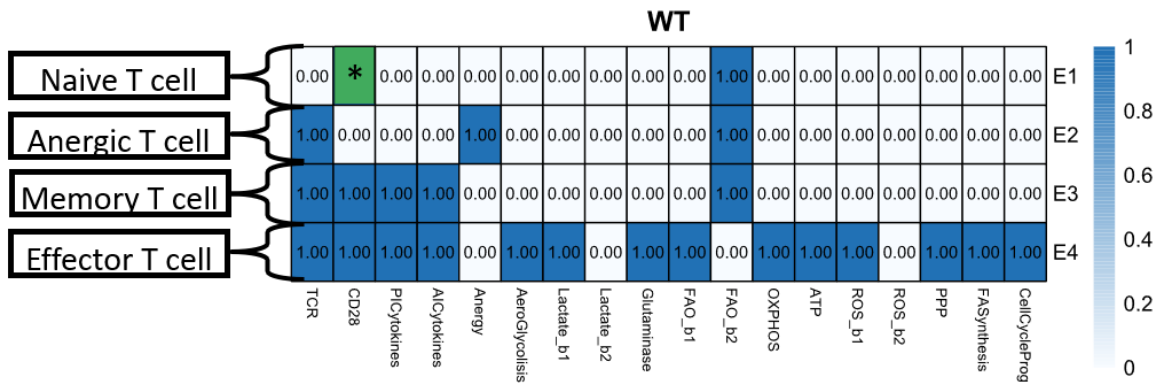


Figura 17. Estados estables del modelo reducido y discretizado WT: En esta imagen se muestran los estados estables que se obtienen con el modelo reducido y discretizado sin ninguna perturbación (*knockouts* o *knockins*). El estado E1 se relaciona con una célula T virgen que puede tener o no la ausencia de la señal del CD28 (*). El estado E2 se relaciona con una célula T anérgica que revive la señal del TCR, pero no la del CD28. El estado E3 representa una célula con funciones efectoras que no tiene gran demanda energética, la cual asociamos con una célula T de memoria. El estado E4 se asocia con una célula T efectora, con actividad efectora y grandes demandas energéticas y biosintéticas.

6.3. Análisis del modelo

Una vez que se comprobó que la dinámica del modelo completo y su versión reducida era la adecuada, se realizaron análisis estocásticos y cálculos de estados estables junto con perturbaciones *knockouts* y *knockins* para verificar que, durante la activación y otros escenarios, como en la ausencia de señales estimuladoras y coestimuladoras durante la activación, la dinámica del modelo coincide con lo reportada en la bibliografía y no arroje estados extraños o biológicamente incorrectos.

Al calcular los estados estables del modelo con una perturbación *knockout* en el nodo del TCR impidiendo la activación de esta señal, nuestro modelo arroja un

estado estable E1, que representa dos estados en los que la única diferencia es la ausencia o presencia de la señal coestimuladora del CD28. Como era de esperarse, en este estado con la ausencia de la señal del TCR no se activan las vías de señalización para la activación de las funciones efectoras y no se realiza la reprogramación metabólica, permaneciendo con las características de una célula T virgen [Figura 18], lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía.

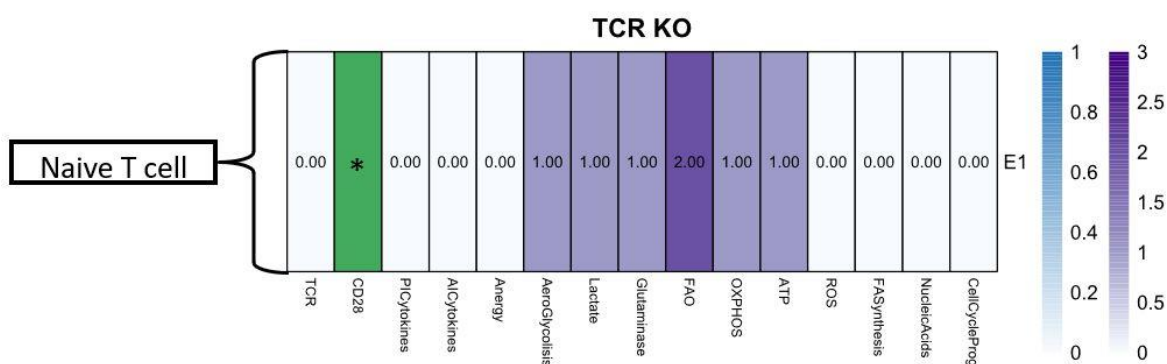


Figura 18. Estados estables del modelo TCR KO: En esta imagen se muestra el estado estable que el modelo arroja cuando este tiene una perturbación knockout que no permite que ocurra la señal del TCR, el modelo arroja un estado E1 que representa dos estados estables en los que la única diferencia es la ausencia o presencia de la señal estimuladora del CD28 (*), este estado estable se relaciona con una célula T virgen.

Al realizar simulaciones estocásticas de nuestro modelo con una perturbación *knockout* que impide la activación del TCR, las trayectorias de probabilidad de nodos a lo largo de 30 unidades de tiempo nos muestran un rápido aumento en la probabilidad de que la célula tenga un alto nivel de oxidación de ácidos grasos a lo largo del tiempo (FAO_b2) [Figura 19-A], lo que significa un estado metabólico muy oxidativo. Las trayectorias de probabilidad de estados a lo largo de 30 unidades de

tiempo muestran que la probabilidad de tener un estado oxidativo sin funciones efectoras (FAO_b2) se eleva rápidamente sobre los demás estados y permanece elevado a lo largo del tiempo [Figura 19-B)]. Por último, la distribución final de estados nos indica que hay un 100% de probabilidad de que la célula T en ausencia de la señalización del TCR tenga un programa metabólico oxidativo sin funciones efectoras (FAO_b2) [Figura 19-C)]. En conjunto, estos resultados de la simulación estocástica en ausencia de la señal del TCR, pueden relacionarse con los linfocitos T vírgenes, lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía y con los resultados obtenidos con el cálculo de estados estables bajo estas mismas condiciones de ausencia de la señal del TCR [Figura 18].

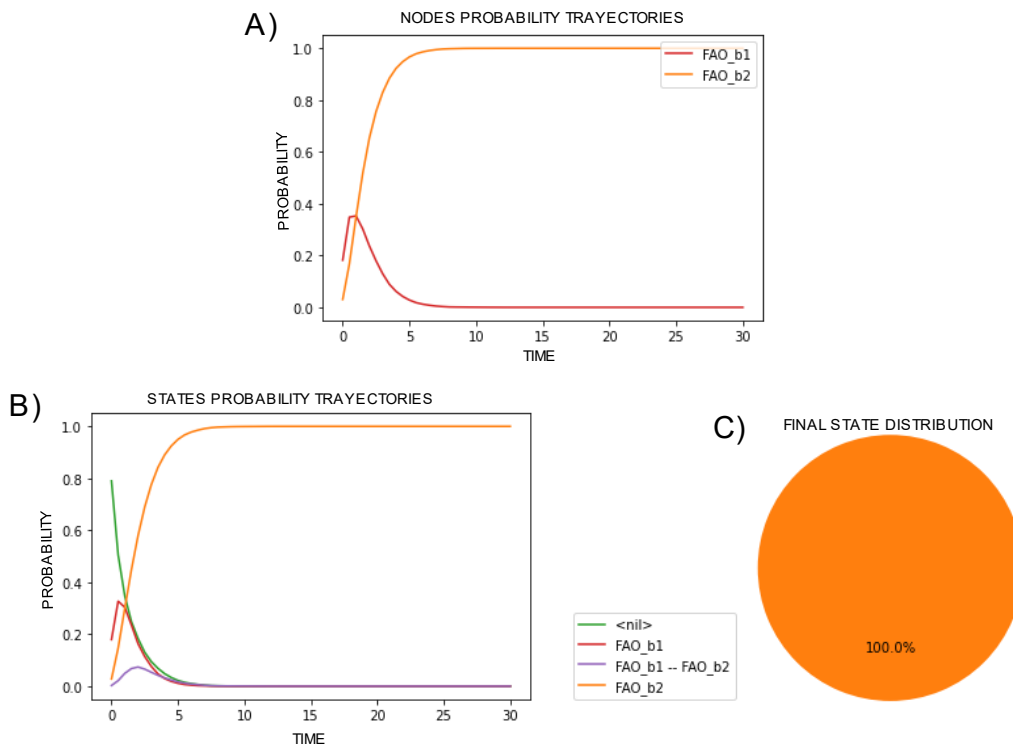


Figura 19. Trayectoria de probabilidad de nodos y estados y distribución final de estados del modelo TCR KO: En esta imagen en el inciso A) se muestran las trayectorias de probabilidad de nodos, en la que se observa una mayor probabilidad de tener altos niveles de oxidación de ácidos grasos a lo largo del tiempo. En el inciso B) se muestran las trayectorias de probabilidad de estados en las que se observa un rápido aumento en la probabilidad de tener un estado metabólico oxidativo. En el inciso C) se muestra la distribución final de estados, en la que se observa un 100% de probabilidad de adquirir un estado que se relaciona con los linfocitos T vírgenes.

Cuando calculamos los estados estables que arroja nuestro modelo con una perturbación *knockout* en el nodo que representa la activación de la señal coestimuladora del CD28 impidiendo su activación, el modelo genera dos estados estables. En el primer estado E1, la ausencia de las señales del CD28 y el TCR, no causa la activación de las funciones efectoras ni la reprogramación metabólica, así que la célula permanece como una célula T CD4⁺ virgen. En el estado E2 la presencia de la señal del TCR pero la ausencia de la señal del CD28 causan la entrada de la célula a un estado anérgico, en el que no ocurren las funciones efectoras ni la reprogramación metabólica, lo cual, corresponde con lo reportado en la bibliografía.

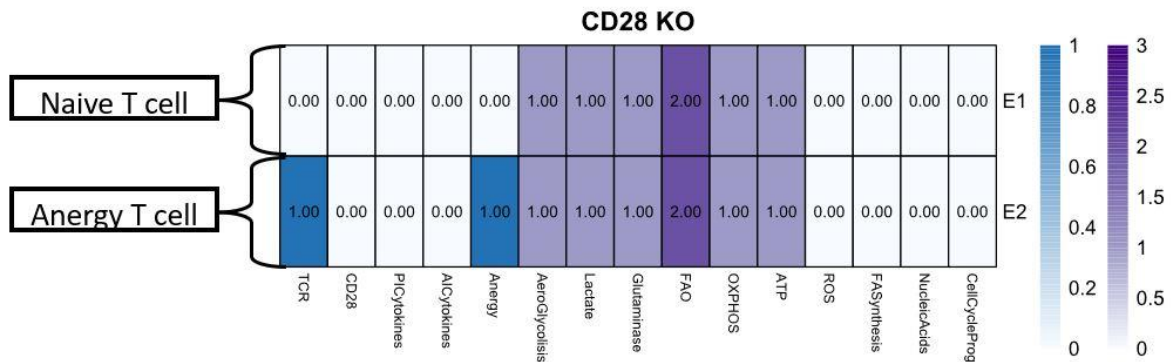


Figura 20. Estados estables del modelo CD28 KO: En esta imagen se muestran los estados estables que el modelo arroja cuando este tiene una perturbación knockout que no permite que ocurra la señal coestimuladora del CD28, el modelo arroja dos estados estables, el estado E1 se relaciona con una célula T virgen, mientras que el estado E2 se relaciona con una célula T anérgica.

Al realizar simulaciones estocásticas de nuestro modelo con una perturbación *knockout* que impide la activación de la señal coestimuladora del CD28, las trayectorias de probabilidad de nodos a lo largo de 30 unidades de tiempo nos muestran un rápido aumento en la probabilidad de un alto nivel de oxidación de ácidos grasos a lo largo del tiempo (FAO_b2) seguido por un posterior aumento en la probabilidad de la célula entre a un estado de anergia (Anergy) [Figura 21-A)], lo cual indica que la célula adquiere un estado anérgico con un estado metabólico muy oxidativo. Las trayectorias de probabilidad de estados a lo largo de 30 unidades de tiempo muestran un aumento en la probabilidad de tener un estado metabólico oxidativo sin funciones efectoras (FAO_b2) que luego decae [Figura 21-B)], pero la probabilidad de adquirir este estado no llega a 0, cuando la probabilidad de FAO_b2 decae, la probabilidad de adquirir un estado anérgico con un programa metabólico oxidativo (Anergy--FAO_b2) aumenta y permanece así a lo largo del tiempo [Figura 21-B)]. Por último, la distribución final de estados nos indica que hay un 90.2% de probabilidad de que la célula T entre a anergia con un programa metabólico oxidativo sin funciones efectoras (Anergy--FAO_b2) [Figura 21-C)] y un 9.8% de probabilidad de que la célula tenga un estado metabólico oxidativo sin funciones efectoras (FAO_b2) [Figura 21-C)]. En conjunto, estos resultados nos indican que

en ausencia de la señal coestimuladora del CD28, es más probable que el linfocito T entren en anergia con un programa metabólico oxidativo que permanezca en su estado virgen con el mismo programa metabólico oxidativo, lo cual coincide con lo reporta en la bibliografía.

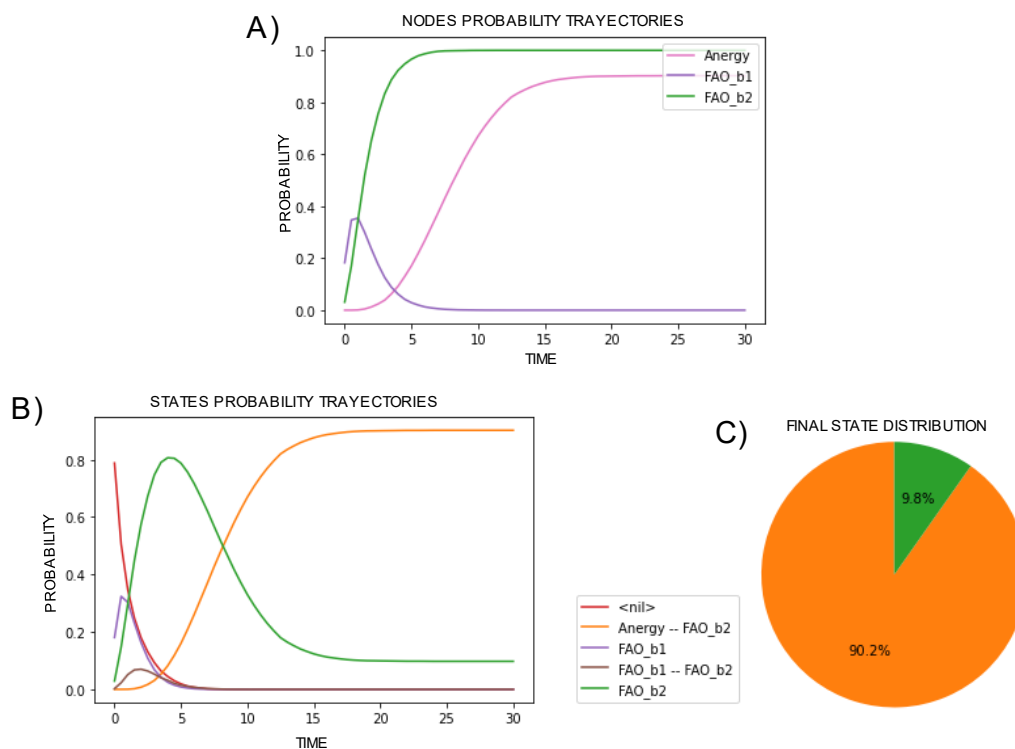


Figura 21. Trayectoria de probabilidad de nodos y estados y distribución final de estados del modelo CD28 KO: En esta imagen en el inciso A) se muestran las trayectorias de probabilidad de nodos, en la que se observa una mayor probabilidad de tener estado anérgico con un altos niveles de oxidación de ácidos grasos a lo largo del tiempo. En el inciso B) se muestran las trayectorias de probabilidad de estados en las que se observa una mayor probabilidad de adquirir un estado anérgico con un programa metabólico oxidativo. En el inciso C) se muestra la distribución final de estados, en la que se observa un 90.2% de probabilidad de adquirir un estado anérgico con un programa metabólico oxidativo y un 9.8% de

probabilidad de que adquiriera un programa metabólico oxidativo sin funciones efectoras.

Cuando se realiza una perturbación *knockin* en la que se mantienen encendidos los nodos que representan la señal del TCR y la señal coestimuladora del CD28, en este escenario el modelo arroja dos estados estables. En el estado E1 la señal del TCR y el CD28 desencadenan las funciones efectoras como la síntesis de citocinas, pero no ocurre la reprogramación metabólica a un programa anabólico, por lo que tampoco ocurre la entrada al ciclo celular, este estado en el que hay actividad efectora en un programa metabólico oxidativo y sin división clonal, coincide con las características de una célula T de memoria reportadas en la bibliografía. En el estado E2, la señal del TCR y la señal coestimuladora del CD28 desencadenan la reprogramación metabólica al programa glucolítico anabólico permitiendo la entrada al ciclo celular, este estado con grandes demandas energéticas y biosintéticas junto con actividades efectoras coincide con lo reportado en la bibliografía y bases de datos para las células T efectoras.

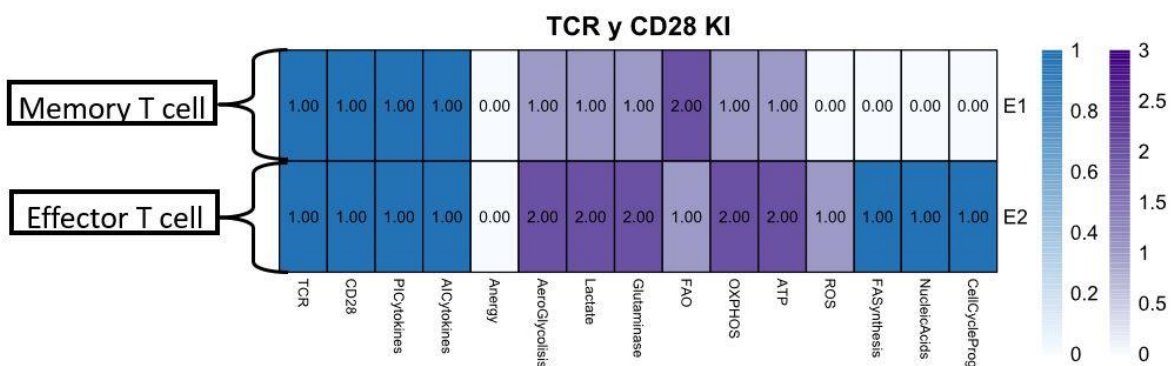


Figura 22. Estados estables del modelo TCR y CD28 KI: En esta imagen se muestran los estados estables que el modelo arroja cuando este tiene una perturbación

knockin que mantiene encendida la señal del TCR y la señal coestimuladora del CD28. El modelo arroja dos estados estables, el estado E1 se relaciona con una célula T de memoria, mientras que el estado E2 se relaciona con una célula T efectoras.

Al realizar simulaciones estocásticas de los estados que produce nuestro modelo con una perturbación *knockin* que mantienen encendida la activación de la señal del TCR y la señal coestimuladora del CD28, las trayectorias de probabilidad de nodos a lo largo de 30 unidades de tiempo nos muestran un aumento en la probabilidad de adquirir funciones efectoras como la síntesis de citosinas proinflamatorias (PICytokines) y antiinflamatorias (AICytokines) [Figura 23-A)], también muestra un rápido aumento en la probabilidad de adquirir un bajo nivel de oxidación de ácidos grasos (FAO_b1) que luego decae [Figura 23-A)], después vemos un aumento en la probabilidad de tener altos niveles de oxidación de ácidos grasos (FAO_b2) [Figura 23-A)], esto indica una disminución en los niveles oxidativos para un posterior aumento de estos, junto con las funciones efectoras. Las trayectorias de probabilidad de estados a lo largo de 30 unidades de tiempo muestran como la probabilidad de adquirir un estado con poca actividad oxidativa que asociamos con la reprogramación metabólica (FAO_b1) se eleva rápidamente para luego disminuir igual de rápido [Figura 23-B)], además, podemos observar que mientras probabilidad de adquirir el estado de la reprogramación metabólica disminuye, la probabilidad de adquirir un estado altamente oxidativo con funciones efectoras (PICytokines--AICytokines--FAO_b2) asociado a los linfocitos T de memoria se

eleva [Figura 23-B)]. Por último, la distribución final de estados nos indica que hay un 100% de probabilidad que el linfocito T adquiera el estado que relacionamos con un linfocito T de memoria (PICytokines--AICytokines--FAO_b2) [Figura 23-C)]. En conjunto, estos resultados indican que, en nuestro modelo, los estados de los linfocitos T activos y de memoria son regulatorios entre sí, por lo que estos no pueden existir al mismo tiempo. Y esto explicaría por que, en las trayectorias de probabilidad de estados, los linfocitos T activos aparecen como un pico rápido, que representaría la reprogramación metabólica, seguido de un aumento de los linfocitos T de memoria, que representaría el fin de una infección, en el que los linfocitos son de memoria, lo cual, coincide con lo reportado en la bibliografía.

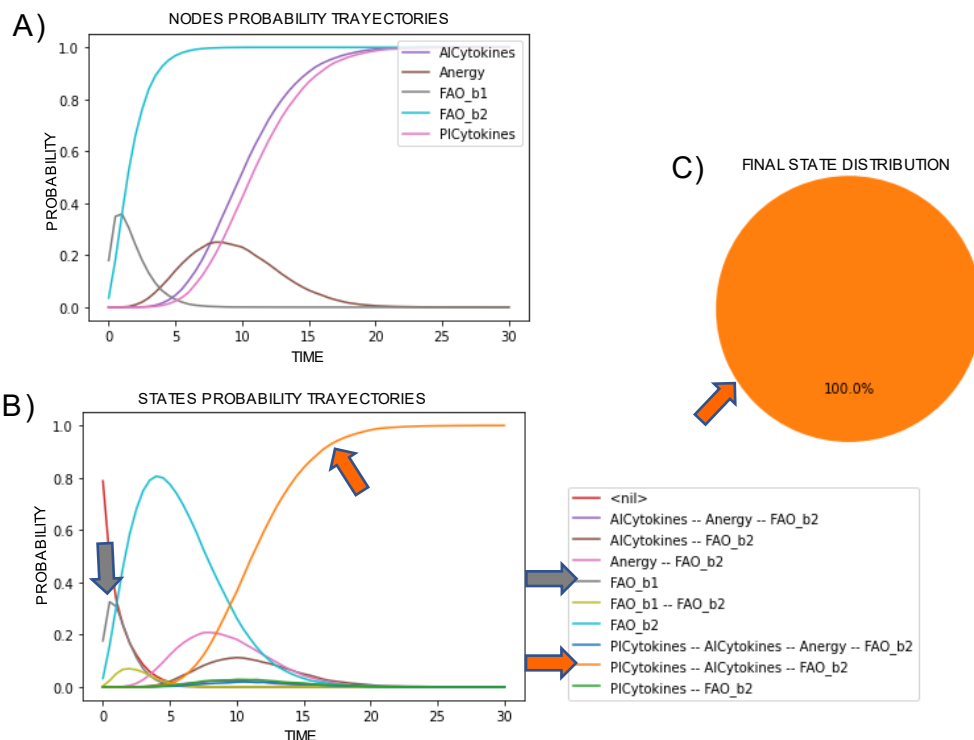


Figura 23. Trayectoria de probabilidad de nodos y estados y distribución final de estados del modelo TCR y CD28 KI: En esta imagen en el inciso A) se muestran las trayectorias de probabilidad de nodos, en la que se observa un cambio entre un estado metabólico poco oxidativo a uno muy oxidativo junto con un aumento en las funciones efectoras. En el inciso B) se muestran las trayectorias de probabilidad de estados en las que se observa un cambio rápido entre el estado que representa la reprogramación metabólica y el estado que representa a los linfocitos T de memoria. En el inciso C) se muestra la distribución final de estados, en la que se observa un 100% de probabilidad de adquirir el linfocito T de memoria.

6.4. Análisis del estado neonatal

Una vez que se comprobó que el modelo puede recrear las características de los linfocitos T CD4⁺ en diferentes escenarios a lo largo de su vida, se realizaron perturbaciones *knockin* para que nuestro modelo adquiriera las características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales. Gracias a trabajos anteriores del laboratorio (Calanis, 2021; Sánchez-Villanueva et al., 2019), sabemos que los linfocitos T de neonatos tienen una mayor actividad de vías metabólicas como la glucólisis y la glutaminólisis en comparación con los linfocitos T CD4⁺ de adultos, además de una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y adicionalmente nosotros teorizamos que los neonatos tiene una mayor cantidad de lactato que los adultos. Para replicar estas características se realizaron perturbaciones *knockin* para que los nodos que representan componentes relacionados con el escenario neonatal, como las enzimas e intermediarios de la vía glucolítica y la glutaminólisis, tuvieran su mayor nivel posible.

Al analizar los estados estables que nuestro modelo puede producir con las perturbaciones KI de las características neonatales, nuestro modelo arroja tres

estados estables, entre los cuales, la única diferencia es la ausencia o presencia de las señales del TCR y/o del CD28. El primer estado E1 representa dos estados en los que la única diferencia es la presencia o ausencia de la señal coestimuladora del CD28, en este estado la ausencia de la señal del TCR no activa las vías de señalización para la activación de las actividades efectoras, sin embargo, la sobre activación de las vías metabólicas permite la síntesis de algunas biomoléculas como los nucleótidos, esta síntesis de biomoléculas junto con los alto nivel de actividad de las vías glucolítica y de la glutaminólisis, que permiten tener altos niveles de ATP, parecen permitir una entrada al ciclo celular prematura. Adicionalmente, las características neonatales impiden la oxidación de ácidos grasos. En el estado E2, aunque se observa la presencia de la señal del TCR con la ausencia de la señal coestimuladora del CD28, sin embargo el estado estable no muestra la entrada de la célula T a un estado anérgico, esto puede ser causado por los altos niveles de productos metabólicos con actividad inmunoreguladora, como en el caso de las ROS, que pueden afectar el funcionamiento de la proteína adaptadora LAT (Linker for the activation of T cells), la cual es importante para la señalización por debajo del TCR. En el estado E3, se observa la presencia de la señal del TCR junto con la señal coestimuladora del CD28, sin embargo, no observamos la activación de las funciones efectoras como la secreción de citocinas, al igual que en el estado anterior, esto puede ser causado por los altos niveles de los productos metabólicos con actividad inmunoreguladora que afectan la señalización por debajo del TCR y

el CD28, y al igual que en los estados anteriores, el programa metabólico altamente glucolítico y el aumento en vías metabólicas como la glutaminólisis sostienen los altos niveles de ATP y la alta tasa metabólica permite la síntesis de algunas biomoléculas como los nucleótidos, lo cual parece sostener la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ activos.

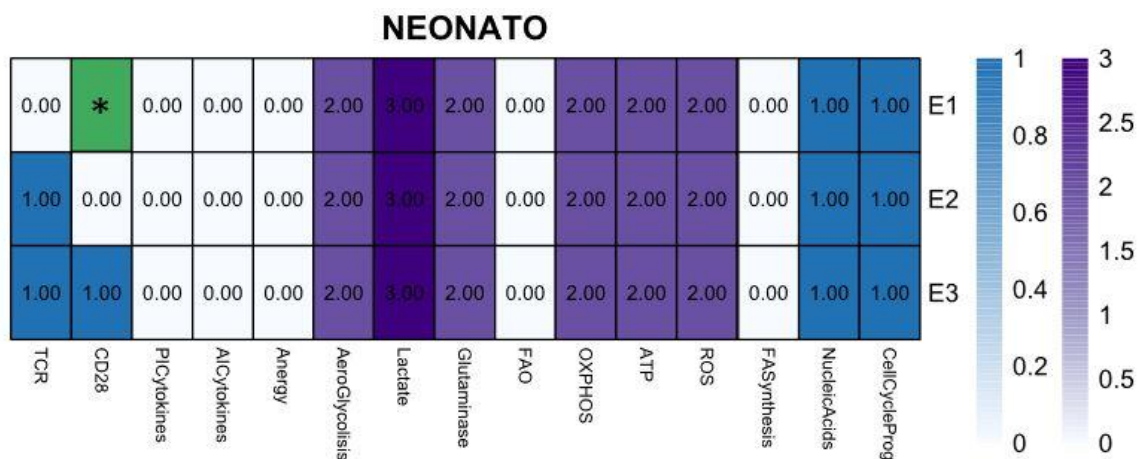


Figura 24. Estados estables del modelo con las características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales: En esta imagen se muestran los estados estables que produce el modelo cuando se realizaron perturbaciones knockin para que los nodos relacionados con la glucólisis, la glutaminólisis, las ROS y el lactato tuvieran su mayor nivel posible, para que nuestro modelo adquiriera las características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales. El modelo arroja tres estados estables, el estado E1 representa dos estados estables en los que la única diferencia es la ausencia o presencia de la señal del CD28 (*). El estado E2 representa una célula que recibe la señal del TCR, pero no la del CD28. El estado E3 representa una célula que recibe la señal del TCR y del CD28. Los tres estados tienen una alta tasa metabólica, lo que sostiene los altos niveles de ATP y permite la síntesis de algunas biomoléculas, lo cual parece sostener la proliferación.

Al realizar simulaciones estocásticas del modelo con las características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, las trayectorias de probabilidad de nodos a lo largo de 30 unidades de tiempo muestra un rápido aumento en las vías de la glucólisis

(AeroGlycolisis), la glutaminolisis (Glutaminase) y en el ciclo celular (CellCycleProg) [Figura 25-A)], lo cual indica una alta tasa metabólica que permite y sostiene el progreso al ciclo celular. Las trayectorias de probabilidad de estados a lo largo de 30 unidades de tiempo muestran que la probabilidad de adquirir un estado sin actividades efectoras y con alta actividad de las vías metabólicas (CellCycleProg--Glutaminase--AeroGlycolisis), se eleva rápidamente sobre los demás estados [Figura 25-B)]. Por último, la distribución final de estados nos indica que hay un 100% de probabilidad que la célula T CD4⁺ neonatales adquiera un estado en el que la célula no tiene actividades efectoras, pero tienen una alta actividad de las vías metabólicas (CellCycleProg--Glutaminase--AeroGlycolisis) [Figura 25-C)].

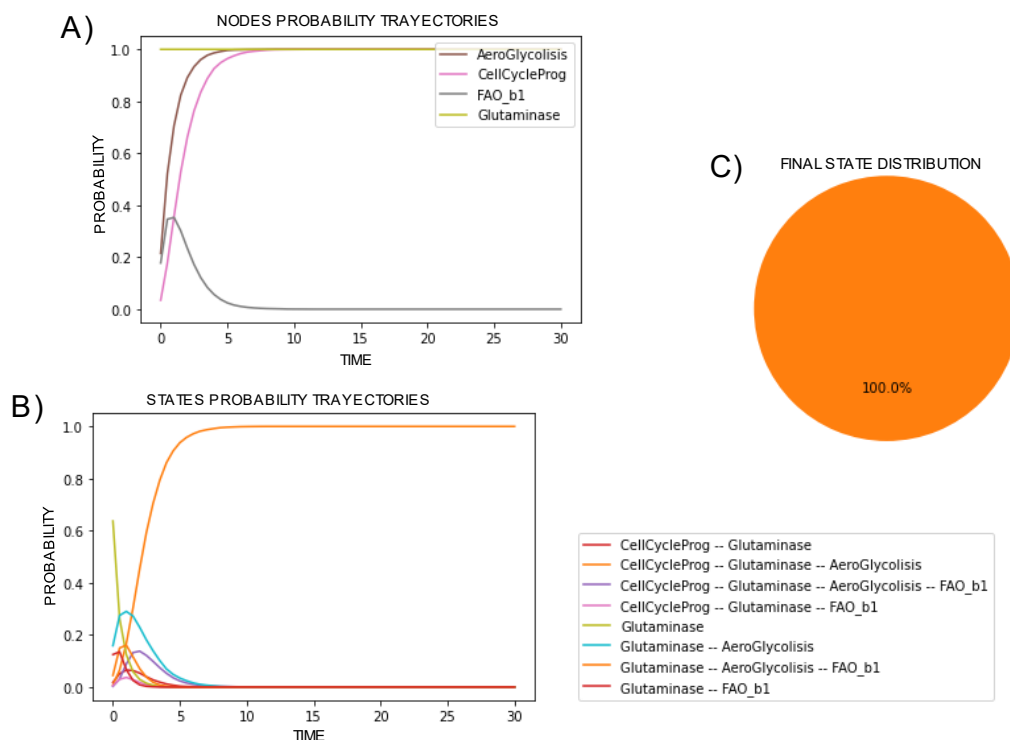


Figura 25. Trayectoria de probabilidad de nodos y estados y distribución final de estados del modelo con características neonatal: En esta imagen en el inciso A) se muestran las trayectorias de probabilidad de nodos, en la que se observa un aumento en la tasa metabólica y un progreso al ciclo celular. En el inciso B) se muestran las trayectorias de probabilidad de estados en las que se observa un rápido aumento en un estado con alta tasa metabólica y progreso al ciclo celular. En el inciso C) se muestra la distribución final de estados, en la que se observa un 100% de probabilidad que la célula T neonatal adquirir un estado sin funciones efectoras, pero con una alta actividad metabólica de la glucólisis y la glutaminólisis, lo cual favorece al entrada al ciclo celular.

6.5. Análisis estructural

Una vez que se calcularon los estados estables que el modelo podía producir con las características de los neonatos, se calcularon las características estructurales (Grado y Clase de modularidad) de los 212 nodos que conforman nuestro modelo para poder tener un mejor entendimiento de la influencia que tiene cada uno de los nodos sobre el modelo y poder proponer nodos para potenciar la respuesta inmune neonatal.

Después de realizar el análisis estructural, los datos se filtraron para obtener una tabla con los 20 nodos relacionados con el metabolismo con mayor grado, los cuales son los nodos más conectados con los demás componentes del sistema.

Node	Degree	Modularity class
FAO	11	4
cMYC	11	7
mTORC1	9	6
LDH	9	4
FASynthesis	7	7
ATP	6	6
mTORC2	6	6
HIF1	6	7
Lactate	6	4
NAD	6	4
Piruvate_c	6	4
ROS	6	8
GLUT	5	7
NADHc	5	4
ETC	5	4
AcCoAc	5	7
SDH	5	8
NADHm	5	4
Glutaminase	4	7
FADH2	4	4

Tabla 1. Tabla del análisis estructural: En esta tabla se muestran los 20 nodos relacionados con el metabolismo con mayor grado.

Una vez se obtuvieron los 20 nodos relacionados con el metabolismo más conectados al modelo, se escogieron los nodos que representan los niveles de ROS y Lactato como posibles objetivos para mejorar la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, y se realizaron perturbaciones *knockin* para que los nodos del Lactato y las ROS tuvieran un nivel parecido a lo que se espera encontrar en un linfocito T CD4⁺ de un adulto.

Cuando calculamos los estados estables que el modelo con las características neonatales puede producir cuando se realiza una perturbación *knockin* para que el lactato y las ROS tengan niveles similares a los de los adultos, el modelo produce cuatro estados estables. El estado estable E1 representa dos estados estables en los que la única diferencia es la ausencia o presencia de la señal coestimuladora del CD28, en este estado la reducción del lactato y las ROS parece permitir la oxidación de ácidos grasos que no ocurría cuando el modelo tenía las características de los neonatos, y la ausencia de la señal de TCR no desencadena la activación de las funciones efectoras pero la alta actividad de la vía de la glucólisis y la glutaminólisi parece ser suficiente para la síntesis de ATP y biomoléculas como los nucleótidos, permitiendo el progreso al ciclo celular. En el estado E2 la reducción en los productos metabólicos inmunoreguladores, osea el lactato y las ROS, permitió la respuesta correcta de las vías de señalización por debajo del TCR, lo que causa que la presencia de la señal del TCR junto con la ausencia de la señal costimuladora del CD28 provoque la entrada de la célula a un estado anérgico, aunque la alta tasa metabólica parece permitir la síntesis de biomoléculas y la entrada al ciclo celular. En el estado E3 y E4, la señal del TCR junto con la señal coestimuladora del CD28 y la reducción de los productos metabólicos inmunoreguladores permite la activación de las funciones efectoras, en el estado E4 ocurre la reprogramación metabólica al estado glucolítico y anabólico con la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos, por lo que este estado coincide con las

características de un linfocito T CD4⁺ efector, sin embargo, en el estado E3 en el que normalmente relacionaríamos con una célula T de memoria, la alta actividad de las vías de la glucólisis permite la síntesis de biomoléculas y la entrada al ciclo celular, cosa que normalmente no debería pasar en este estado, lo que parece indicar que aunque la reducción los productos metabólicos inmunoreguladores es suficiente para potenciar las funciones efectoras de los linfocitos T CD4⁺ efectoras neonatales, como la secreción de citocinas, esto no es suficiente para recuperar o producir un estado de linfocitos T de memoria neonatales parecido al de los adultos.

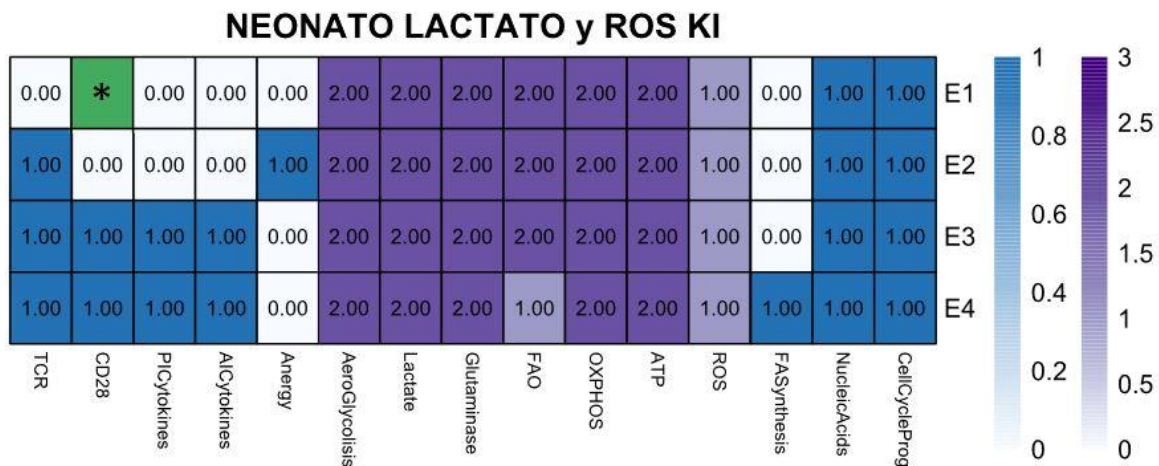


Figura 26. Estados estables del modelo con las características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales y lactato y ROS KI: En esta imagen se muestran los estados estables que produce el modelo con las características neonatales y la disminución de ROS y lactato a niveles similares a los de los adultos. El modelo arroja cuatro estados estables, el estado E1 representa dos estados estables en los que la única diferencia es la ausencia o presencia de la señal del CD28 (*). El estado E2 representa una célula que recibe la señal del TCR, pero no la del CD28, por lo que la célula entra a un estado de anergia. El estado E3 y E4 representan una célula que recibe la señal del TCR y del CD28 con funciones efectoras. Los cuatro estados

tienen una alta tasa metabólica, lo que sostiene los altos niveles de ATP y permite la síntesis de biomoléculas, lo cual parece sostener la proliferación.

Al realizar simulaciones estocásticas de los estados que produce nuestro modelo con las características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, pero con niveles de lactato y ROS, similares a los de los adultos, las trayectorias de probabilidad de nodos a lo largo de 30 unidades de tiempo muestran un aumento en las vías metabólicas de la glutaminólisis (Glutaminase) y la glucólisis (AeroGlycolisis) y un aumento en los altos niveles de oxidación de ácidos grasos (FAO_b2) junto con un aumento en la probabilidad de adquirir funciones efectoras como la síntesis de citosinas proinflamatorias (PICytokines) y antiinflamatorias (AICytokines) [Figura 27-A]. Las trayectorias de probabilidad de estados a lo largo de 30 unidades de tiempo muestran un aumento en la probabilidad de adquirir un estado con una alta tasa metabólica que permite un progreso al ciclo celular, con actividades efectoras con la síntesis de citocinas (PICytokines--AICytokines--CellCycleProg--Glutaminase--AeroGlycolisis--FAO_b2) [Figura 25-B]. Por último, la distribución final de estados nos indica que hay un 81.3% de probabilidad que la célula T CD4⁺ neonatales con niveles de lactato y Ros parecidos al de los adultos, adquiera un estado en el que la célula recupera sus actividades efectoras, como la secreción de citocinas, pero la alta actividad de las vías metabólicas de la glucólisis y la glutaminólisis promueven el ciclo celular, y además se permite la oxidación de ácidos grasos a un nivel

elevada, cosa que no debería suceder normalmente (PICytokines--AICytokines--CellCycleProg--Glutaminase—AeroGlycolisis--FAO_b2) [Figura 27-C)].

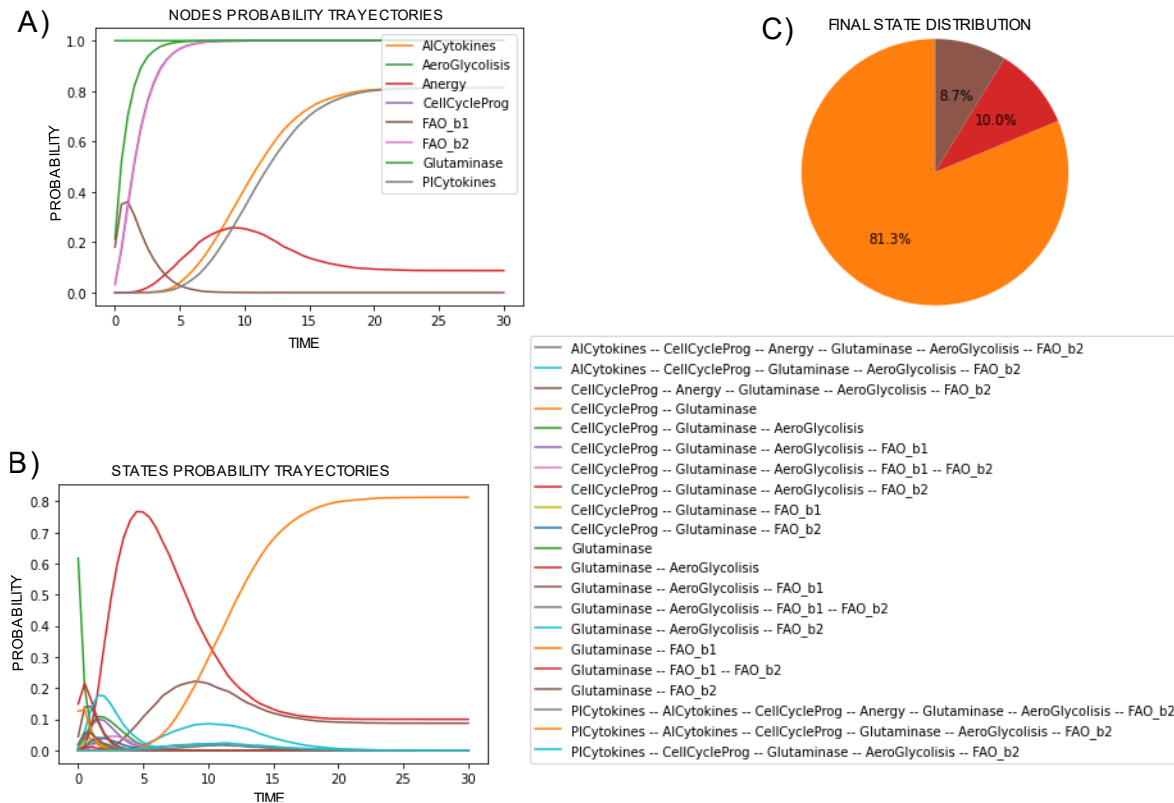


Figura 27. Frecuencia y trayectoria de estados del modelo con características neonatal y lactato y ROS KI: En esta imagen en el inciso A) se muestra la frecuencia de estados, en la que se observa un 61.8% de probabilidad que la célula T neonatal adquirir un estado sin funciones efectoras pero con una alta actividad metabólica de la glucólisis y la glutaminólisis, lo cual favorece al entrada al ciclo celular, sin embargo también se observa altos niveles de oxidación de ácidos grasos, lo cual no debería pasar. En el inciso B) se muestra como el estado (PICytokines--AICytokines--CellCycleProg--Glutaminase—AeroGlycolisis--FAO_b2), se eleva sobre los demás estados.

7. DISCUSIÓN:

En este proyecto se fabricó un modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺, partiendo de dos modelos preexistentes del metabolismo y las vías de activación de los linfocitos T CD4⁺, los cuales fueron actualizados de acuerdo con la información actual disponible en la bibliografía y bases de datos. La versión final del modelo integra vías de señalización para la activación de factores transcripcionales como NF- κ B, NFAT y AP1, los cuales son importantes para el correcto funcionamiento de los linfocitos T y sus actividades efectoras, además el modelo cuenta con la vía PI3K/Akt/mTOR que conectan la activación y el metabolismo de los linfocitos T y contiene vías metabólicas completas como la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico.

Este modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ fue validado por medio de la realización de simulaciones estocásticas y cálculos de estados estables, los cuales se realizaron junto con perturbaciones *knockout* y *knockin* en los nodos que representan las señales del TCR y la señal coestimuladora del CD28, para verificar que el modelo puede recrear correctamente las características que un linfocito T CD4⁺ adquieren a lo largo de su vida, como las características de un linfocito T virgen o un linfocito T activo con funciones efectoras. Durante su validación, los estados estables, frecuencia de estados y trayectoria de estados, que el modelo produjo coincidieron con las características reportadas en la bibliografía, pudiendo relacionar los estados estables con linfocitos T vírgenes,

anérgicos, de memoria y efectoras, estos resultados confirmaron que nuestro modelo es una herramienta útil para el estudio de la influencia del metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ en su activación en un escenario neonatal.

Una vez se validó el modelo, este se usó para estudiar como el metabolismo afecta la activación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, esto se logró mediante el cálculo de simulaciones estocásticas y estados estables junto con perturbaciones *knockin* que causan que los componentes del modelo relacionados con las vías metabólicas de la glucólisis, glutaminólisis, el lactato y las ROS adquieran su mayor valor posible, las cuales son características de los linfocitos T neonatales previamente reportadas por el equipo de trabajo del laboratorio. Cuando calculamos los estados estables que nuestro modelo arroja con las características neonatales, las simulaciones estocásticas y los estados estables muestran una disminución o pérdida de las funciones efectoras, como la secreción de citocinas. Esta pérdida de funciones efectoras es causada por un exceso de productos metabólicos con actividad inmunoreguladora y las vías que los producen, que en este caso son el lactato, el cual es el producto final de la vía de la glucólisis, y las ROS que se producen a lo largo de la cadena de transferencia de electrones y en reacción de algunas enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico como la reacción de la succinato deshidrogenasa (SDH). Sin embargo, este aumento en las vías metabólicas permite a la célula entrar en un programa metabólico parcialmente anabólico con la síntesis de algunas biomoléculas, como los ácidos nucleicos, pero se impide la síntesis y oxidación de

ácidos grasos. En nuestro modelo con estas características, la oxidación de ácidos grasos no ocurre gracias a una monopolización del NAD^+ por parte del lactato deshidrogenasa (LDH), que a niveles excesivos de lactato realiza principalmente su reacción reversa en la que sintetiza piruvato a partir de lactato. La reacción que convierte el lactato en piruvato consume NAD^+ y produce NADH, y la β oxidación de ácidos grasos necesita NAD^+ para poder producir el acetilcoenzima A, el cual es necesario para aumentar la tasa metabólica del ciclo del ácido tricarboxílico y permitir la salida de intermediarios como el citrato, el cual se ocupa para la síntesis de novo de ácidos grasos. Sin embargo, por la monopolización del NAD^+ por parte de la LDH esto no ocurre, y aunque no ocurre la síntesis de ácidos grasos de novo, la célula puede integrar ácidos grasos extracelulares a su metabolismo y junto con el aumento en la tasa metabólica, permitir un progreso al ciclo celular. En el caso del lactato se ha reportado que este participa en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4^+ mediante la lactación de histonas cerca de promotores de factores transcripcionales como FOXP3. Este es clave para la diferenciación en linfocitos T reguladores. Esta evidencia sugiere que la presencia excesiva de lactato podría causar cambios epigenéticos que afectan las funciones efectoras de los linfocitos T CD4^+ . Por otro lado, se ha reportado que los altos niveles de ROS pueden afectar negativamente el funcionamiento de las proteínas LAT y ZAP70 (proteína 70 asociada a zeta), las cuales son muy importante para la vía de señalización del TCR. Por lo mismo, un exceso de ROS podría causar una interrupción de las vías

de señalización debajo del TCR impidiendo la activación adecuada de factores transcripcionales importantes para la activación y funciones efectoras de los linfocitos T CD4⁺ neonatales.

Después de realizar el análisis de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, se realizó un análisis estructural de la red del sistema para entender mejor como los componentes del modelo lo afectan. Una vez obtenidos los datos estructurales, estos se filtraron para obtener los nodos que representan los veinte componentes más conectados al sistema. Entre los componentes que nuestro análisis arrojó como los veinte más conectados, se encontraron a los nodos que representan los niveles de Lactato y ROS, gracias a estos resultados y por sus actividades inmunoregulatorias, estos nodos se propusieron como objetivos para potenciar la respuesta inmune neonatal. Ya que las ROS y el lactato se encuentran en cantidades elevadas en los linfocitos T neonatales, se propone reducir sus niveles para atenuar sus efectos negativos sobre la activación de los linfocitos T, en el caso de las ROS se podrían reducir mediante la adición de agentes antioxidantes y en el caso del lactato se podría reducir mediante la reducción de la actividad o cantidad de las enzimas de la vía glucolítica cuyo producto final es el lactato.

Para observar cómo afectaría a la activación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales la reducción del lactato y las ROS, se volvieron a realizar simulaciones estocásticas y el cálculo de estados estables con las características metabólicas neonatales, pero

con una perturbación *knockins* adicional que reduce los niveles de ROS y lactato a niveles similares a los que se encontrarían en un adulto. Al calcular los estados estables y las frecuencias y trayectorias de estados que nuestro modelo produce con estas características neonatales con niveles adultos de ROS y lactato, los estados estables y el análisis probabilístico muestran una recuperación de funciones efectoras, como la secreción de citocinas en presencia de la señal del TCR y la señal coestimuladora del CD28. La reducción del lactato permitió la disponibilidad del NAD⁺ para la β oxidación de ácidos grasos, la cual va a contribuir con acetilcoenzima A al TCA, permitiendo al síntesis de novo de ácidos grasos, recreando con éxito el estado estable que relacionamos con un linfocito T activo con funciones efectoras. Sin embargo, en los demás estados estables y en la frecuencia y trayectoria de estados, los altos niveles de la glucólisis y la glutaminólisis siguen permitiendo la entrada a un programa metabólico que permite la proliferación incluyendo el estado que normalmente relacionamos con un linfocito T de memoria, además de altos niveles de oxidación de ácidos grasos en un programa metabólico anabólico. Esto indicaría que, aunque la reducción de las ROS y el lactato es suficiente para potenciar la respuesta de los linfocitos T efectoras, esto no es suficiente para recuperar o producir un estado de linfocitos T de memoria neonatales parecido al de los adultos, y para lograr la recuperación de este estado se necesita la reducir la actividad de las vías metabólicas glucolíticas y la glutaminólisis.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jaoudé, W., Traynard, P., Monteiro, P. T., Saez-Rodriguez, J., Helikar, T., Thieffry, D., & Chaouiya, C. (2016). Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. *Frontiers in Genetics*, 7(MAY), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00094>
- Abul K. Abbas, Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *INMUNOLOGÍA Celular y molecular*.
- Almeida, L., Lochner, M., Berod, L., & Sparwasser, T. (2016). Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Seminars in Immunology*, 28(5), 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009>
- Basha, S., Surendran, N., & Pichichero, M. (2014). Immune responses in neonates. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(9), 1171–1184. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.942288>
- Bastian, M., Heymann, S., & Jacomy, M. (2009). Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. BT - International AAAI Conference on Weblogs and Social. *International AAAI Conference on Weblogs and Social Media*, 361–362.
- Calanis, L. A. K. (2021). *Análisis transcriptómico de los linfocitos T CD4 + de adultos y neonatos humanos a nivel basal y activados en presencia o ausencia de flagelina*.
- Calzone, L., Noël, V., Barillot, E., Kroemer, G., & Stoll, G. (2022). Modeling signaling pathways in biology with MaBoSS: From one single cell to a dynamic population of heterogeneous interacting cells. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 5661–5671. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.10.003>
- Chapman, N. M., Boothby, M. R., & Chi, H. (2020). Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 55–70. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y>
- Fauré, A., & Kaji, S. (2018). A circuit-preserving mapping from multilevel to Boolean dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, 440, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.12.013>
- Feng, Q., Liu, Z., Yu, X., Huang, T., Chen, J., Wang, J., Wilhelm, J., Li, S., Song, J., Li, W., Sun, Z., Sumer, B. D., Li, B., Fu, Y. X., & Gao, J. (2022). Lactate increases stemness of CD8 + T cells to augment anti-tumor immunity. *Nature Communications*, 13(1), 4981. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32521-8>

- Fu, J., Pu, Y., Wang, B., Li, H., Yang, X., Xie, L., Shi, H., Wang, Z., Yin, J., Zhan, T., Shao, Y., Chen, C., Luo, Q., Xu, J., Zong, Z., Wei, X., Xiao, W., Yu, C., & Zheng, L. (2022). Pharmacological Inhibition of Glutaminase 1 Normalized the Metabolic State and CD4+ T Cell Response in Sjogren's Syndrome. *Journal of Immunology Research*, 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2022/3210200>
- Hao, D., Ren, C., & Li, C. (2012). Revisiting the variation of clustering coefficient of biological networks suggests new modular structure. *BMC Systems Biology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-34>
- Holm, S. R., Jenkins, B. J., Cronin, J. G., Jones, N., & Thornton, C. A. (2021). A role for metabolism in determining neonatal immune function. *Pediatric Allergy and Immunology*, 32(8), 1616–1628. <https://doi.org/10.1111/pai.13583>
- Kauffman, S. A. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of Theoretical Biology*, 22(3), 437–467. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(69\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(69)90015-0)
- Kaymak, I., Luda, K. M., Duimstra, L. R., Ma, E. H., Longo, J., Dahabieh, M. S., Faubert, B., Oswald, B. M., Watson, M. J., Kitchen-Goosen, S. M., DeCamp, L. M., Compton, S. E., Fu, Z., DeBerardinis, R. J., Williams, K. S., Sheldon, R. D., & Jones, R. G. (2022). Carbon source availability drives nutrient utilization in CD8+ T cells. *Cell Metabolism*, 34(9), 1298-1311.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.07.012>
- Labastida-Conde, R. G., Ramírez-Pliego, O., Peleteiro-Olmedo, M., Lopez-Guerrero, D. V., Badillo-Godinez, O. D., Gutiérrez-Xicoténcatl, M. de L., Rosas-Salgado, G., González-Fernández, Á., Esquivel-Guadarrama, F. R., & Santana, M. A. (2018). Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4+ T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine*, 36(29), 4188–4197. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.005>
- Leone, R. D., & Powell, J. D. (2020). Metabolism of immune cells in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 20(9), 516–531. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0273-y>
- Levy, N., Naldi, A., Hernandez, C., Stoll, G., Thieffry, D., Zinovyev, A., Calzone, L., & Paulevé, L. (2018). Prediction of mutations to control pathways enabling tumor cell invasion with the CoLoMoTo Interactive Notebook (Tutorial). *Frontiers in Physiology*, 9(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00787>
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., Lawn, J. E., Cousens, S., Mathers, C., & Black, R. E. (2016). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications

- for the Sustainable Development Goals. *The Lancet*, 388(10063), 3027–3035. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)
- Lopez Krol, A., Nehring, H. P., Krause, F. F., Wempe, A., Raifer, H., Nist, A., Stiewe, T., Bertrams, W., Schmeck, B., Luu, M., Leister, H., Chung, H., Bauer, U., Adhikary, T., & Visekruna, A. (2022). Lactate induces metabolic and epigenetic reprogramming of pro-inflammatory Th17 cells. *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.15252/embr.202254685>
- Maciolek, J. A., Alex Pasternak, J., & Wilson, H. L. (2014). Metabolism of activated T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 27(1), 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.006>
- Maciver, N. J., Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 31). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>
- Martínez-Méndez, D., Huerta, L., & Villarreal, C. (2022). Modeling the effect of environmental cytokines, nutrient conditions and hypoxia on CD4+ T cell differentiation. *Frontiers in Immunology*, 13(September), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.962175>
- Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunological Reviews*, 236(1), 190–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x>
- Naldi, A., Hernandez, C., Abou-Jaoudé, W., Monteiro, P. T., Chaouiya, C., & Thieffry, D. (2018). Logical modeling and analysis of cellular regulatory networks with GINsim 3.0. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00646>
- Niarakis, A., & Helikar, T. (2021). A practical guide to mechanistic systems modeling in biology using a logic-based approach. *Briefings in Bioinformatics*, 22(4), 1–19. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa236>
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. (2014). *KUBY Inmunoloía*.
- Palmer, C. S., Hussain, T., Duette, G., Weller, T. J., Ostrowski, M., Sada-Ovalle, I., & Crowe, S. M. (2016). Regulators of Glucose Metabolism in CD4+ and CD8+ T Cells. *International Reviews of Immunology*, 35(6), 477–488. <https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1082178>
- Park, B., & Pan, F. (2015). Metabolic regulation of T cell differentiation and function. *Methods Molecular Biology*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.027>.Metabolic

- Paulson, K. R., Kamath, A. M., Alam, T., Bienhoff, K., Abady, G. G., Abbas, J., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abd-Elsalam, S. M., Abdoli, A., Abedi, A., Abolhassani, H., Abreu, L. G., Abu-Gharbieh, E., Abu-Rmeileh, N. M. E., Abushouk, A. I., Adamu, A. L., Adebayo, O. M., ... Kassebaum, N. J. (2021). Global, regional, and national progress towards Sustainable Development Goal 3.2 for neonatal and child health: all-cause and cause-specific mortality findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 398(10303), 870–905. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01207-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01207-1)
- Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38(4), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
- Pieren, D. K. J. (2022). The adaptive immune system in early life: The shift makes it count. *Frontiers in Immunology*, 13(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031924>
- Prabhu, S. B., Rathore, D. K., Nair, D., Chaudhary, A., Raza, S., Kanodia, P., Sopory, S., George, A., Rath, S., Bal, V., Tripathi, R., Ramji, S., Batra, A., Aggarwal, K. C., Chellani, H. K., Arya, S., Agarwal, N., Mehta, U., Natchu, U. C. M., ... Bhatnagar, S. (2016). Comparison of human neonatal and adult blood leukocyte subset composition phenotypes. *PLoS ONE*, 11(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162242>
- Prabhudas, M., Adkins, B., Gans, H., King, C., Levy, O., Ramilo, O., & Siegrist, C. (2011). *Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines*. 12(3).
- Robinson, J. L., Kocabaş, P., Wang, H., Cholley, P. E., Cook, D., Nilsson, A., Anton, M., Ferreira, R., Domenzain, I., Billa, V., Limeta, A., Hedin, A., Gustafsson, J., Kerkhoven, E. J., Svensson, L. T., Palsson, B. O., Mardinoglu, A., Hansson, L., Uhlén, M., & Nielsen, J. (2020). (to read, great approach) An atlas of human metabolism. *Science Signaling*, 13(624), 1–12.
- Rodríguez-Jorge, O., Kempis-Calanis, L. A., Abou-Jaoudé, W., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Hernandez, C., Ramirez-Pliego, O., Thomas-Chollier, M., Spicuglia, S., Santana, M. A., & Thieffry, D. (2019). Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4+ T cell activation. *Science Signaling*, 12(577), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar3641>
- Saadatpour, A., & Albert, R. (2013). Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. *Methods*, 62(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.10.012>

- Samaga, R., & Klamt, S. (2013). Modeling approaches for qualitative and semi-quantitative analysis of cellular signaling networks. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-43>
- Sánchez-Villanueva, J. A., Rodríguez-Jorge, O., Ramírez-Pliego, O., Salgado, G. R., Abou-Jaoudé, W., Hernandez, C., Naldi, A., Thieffry, D., & Santana, M. A. (2019). Contribution of ROS and metabolic status to neonatal and adult CD8+ T cell activation. *PLoS ONE*, *14*(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226388>
- Schwab, J. D., Kühlwein, S. D., Ikonomi, N., Köhl, M., & Kestler, H. A. (2020). Concepts in Boolean network modeling: What do they all mean? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.001>
- Sharrow, D., Hug, L., You, D., Alkema, L., Black, R., Cousens, S., Croft, T., Gaigbe-Togbe, V., Gerland, P., Guillot, M., Hill, K., Masquelier, B., Mathers, C., Pedersen, J., Strong, K. L., Suzuki, E., Wakefield, J., & Walker, N. (2022). Global, regional, and national trends in under-5 mortality between 1990 and 2019 with scenario-based projections until 2030: a systematic analysis by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. *The Lancet Global Health*, *10*(2), e195–e206. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00515-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00515-5)
- Stoll, G., Viara, E., Barillot, E., & Calzone, L. (2012). Continuous time boolean modeling for biological signaling: application of Gillespie algorithm. *BMC Systems Biology*, *6*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-116>
- Sugita, M. (1963). Functional analysis of chemical systems in vivo using a logical circuit equivalent. II. The idea of a molecular automaton. *Journal of Theoretical Biology*, *4*(2), 587-5160. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(63\)90027-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(63)90027-4)
- Thomas, R. (1973). Boolean formalization of genetic control circuits. *Journal of Theoretical Biology*, *42*(3), 563–585. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90247-6](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90247-6)
- Trupp, M., Altman, T., Fulcher, C. A., Caspi, R., Krummenacker, M., Paley, S., & Karp, P. D. (2010). Beyond the genome (BTG) is a (PGDB) pathway genome database: HumanCyc. *Genome Biology*, *11*(Suppl 1), O12. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-s1-o12>
- Tsafaras, G. P., Ntontsi, P., & Xanthou, G. (2020). Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Frontiers in Pediatrics*, *8*(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00005>
- Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell

metabolism. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(9), 1496–1516.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>

Zhu, J., & Paul, W. E. (2009). CD4 T cells : fates , functions , and faults ASH 50th anniversary review CD4 T cells : fates , functions , and faults. *Immunobiology*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>.BLOOD



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



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. **ROBLES REYES JONATHAN RICARDO** con número de matrícula **10018682** cuyo título es:

“Modelado computacional de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4 neonatales”.

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 04 de mayo del 2023

Atentamente
Por una universidad culta

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

Dra. Angelica Santana Calderón	(presidente)
Dr. Armando Hernández Mendoza	(secretario)
Dr. Otoniel Rodríguez Jorge	(Vocal)
Dra. Delia Vanessa López Guerrero	(Suplente)
Dr. Antonio José Bensusán Salazar	(Suplente).



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:2023-05-04 12:39:50 | Firmante

uW3gsBNExFtyigSZ83AB8UHB7r8ucQVGkSxP2TjEI++/4QXyhoUkn1MkPCjgFMSdLisrFAz3UaCl5u8trvq2voZP+WEwowGRAEm/S2V19oB7VFIW2CiVN1z6SfRxfWXLQ0fY1H3qSLAXQi5DgZcXnXL51xikerqS86xwNc8Tp3zJc/g7Fd/wiQ+jcSicZ1eVsswsanoDfLsJWCQhnT/K8Av/rzoXcX9VP6hgJa4Ot8CdjTPFJtz7zPgWq3t3yzkEXWB0m71JR4VLzt/qFe h2r6jO/zjQSRU9LMpFUDU1Fh8b8fBeT+bSk/U0CJooSjg2u8ES3ZSMB0H+Zx/sEZA==

OTONIEL RODRIGUEZ JORGE | Fecha:2023-05-04 12:40:34 | Firmante

M9bDNdwYqJ7mwivJxYsXVNXAo2lGmSrBL/GMP1j24GdWRMFqnll8RiRXXQoYc7/JvvmkYapOe2Ll6mwC1HIL1JvMJ1IZFbD82sv0b6s7xDD/ZtVoADjJpzC6RTQcQ5EoeLMNf1WBv7bYIDGDNXD2R/sgM+utKDUndcpCE30eNZXyRTbMf2sn+acPkYw+Mrzq0eg/MxCrrBxllk5ASM/F3T2uCXrMLMS4+cWUduqb8gPWuA5vtPHqUfwXXrUGNYEgScyF+WgU3hsHORwz1XUUhKauhf2vMgJLcKArqgAakKgDmKytCcfcZYWugeyyDOCemhYWb8qxY7deupXqXaHkA==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2023-05-04 15:43:20 | Firmante

Blnd2++EaTTgWkbgJFGbdNHpXcvoO2lz6H6XnMhNxBGwqNdyhBmfCicPptPNUhoTiS/4cvQWoY5PcIMUbsOt42WtKxxzDUbkUy2jbYjIWeRI2PCw+3CKqT8PIWMYqnK/s3qRDTWU3CYug9TD+ee0EabaACutCkniLOBB59Ju2aSt54QygD6o+G1XqT0qQYrZgvSCHM9WuXd/j8/9OxS8FqLPvt3qqasESvHaQcO1P9G0jz/OSi5lykJKl3vB5hZL4Y2mjPiPHw3Y00LoP1nvF4tZodbnf63MR0IVFFaZnShF0Yxqm4XvJxRKqyvykKkbfEBfb1j/xT9iQGyX/y18O8Q==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-05-04 16:02:26 | Firmante

wdQi3b1wHOC5qmc1rovnQXiZ5Mcb27fzSzDbBmGO3BuYtN4kVwnOVG5WpAp2OhHTSlucEHlWGEtG3bSnpvPDeRlSmIvdNRUX+UUMnZTNKtKJ78q4uKwEIQIEtoJAF6dA9oDC2H5PrazJicGVYFumTLphLYBHeBjVykWXe8wA8fkHQxPMKXspLXKQjtr9Dn7nhRwv7NFNUqE2MwOxZCKJkG+EeL0RJBS/qtmFm5Z+yyw84p/TriiDxJRjD+iTnzUPOaSGDhg/ApsvQ+ch0LpSeGpD/18zKr4yOJBrn+rhZaqGb9LZxoOaxB7pkvluqvzhmwg+N9vtgLaJW1e8MXDFg==

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



Qft80SqLW

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mgJlgqTyP7p6t7hnUDuNrr8ARt3F6kLZ>

