

**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

**“Modulación de la activación de linfocitos T CD8⁺ de neonatos
humanos por especies reactivas de oxígeno”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ VILLANUEVA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Angélica Santana Calderón

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **Modulación de la activación de linfocitos T CD8+ de neonatos humanos por especies reactivas de oxígeno**; que presenta el alumno **José Antonio Sánchez Villanueva (5920130501)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM-UAEM	APROBADO	
Dr. Raúl Peralta Rodríguez CIDC-UAEM	Aprobado	
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva IBT-UNAM	Aprobado	
Dra. Alejandra Medina Rivera Lab. Int. de Inv. del Genoma Humano UNAM	Aprobado	
Dr. Jesús Martínez Barnetche INSP	Aprobado	
Dra. Ma. Del Carmen Beltrán Núñez IBT-UNAM	Aprobado	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	

Agradecimientos

A todos los trabajadores del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (Morelos) y de la Sala de Tococirugía del Hospital José G. Parres por permitir el acceso a las muestras.

A las madres de los bebés que voluntariamente accedieron a participar en el estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado 286361, por los proyectos 168182, 257188, M11S01 y M17S02.

A los Doctores Gustavo Pedraza y Carmen Beltrán. Gracias por tantos buenos consejos académicos y por tantos documentos revisados en todos estos años.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología Celular, los de ahorita y los que ya no están. Con ustedes aprendí que hacer trabajo en equipo es bueno, pero hacer trabajo en familia es mucho mejor.

A la Doctora Santana. Gracias por la gran oportunidad de trabajar con usted y ser su estudiante. Gracias por preocuparse incluso más allá de las cuestiones académicas. Gracias por tanta comprensión y hospitalidad.

A la comunidad de cubanos en Cuernavaca. Gracias por compartir consejos, anécdotas y diversiones. Gracias por tanto apoyo. Gracias por hacerme sentir que no estoy tan lejos de casa cuando estoy con ustedes.

A mis grandes amigos mexicanos Irving, Giovanni, Sara y Mariana. Gracias por tantas alegrías. Gracias por enseñarme al México sin filtros, ese que tanto amo.

A mis grandes amigos de toda la vida: Nilda, Ramón, Gilberto y Andrés. Gracias por acompañarme en el camino de mis sueños y por dejarme también ser testigo y cómplice de los sueños de ustedes.

A mi madre, mi primera fan. Gracias por tanto amor y educación. Gracias por enseñarme a querer saber siempre todo. Gracias por no apaciguar a este niño preguntón.

A mi pareja, mi compañera, mi copiloto: Ivette. Gracias por tanto apoyo. Gracias por acompañarme, por tolerarme e impulsarme. Gracias por darme mil motivos para no rendirme. Gracias mi amor.

Índice

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. MORTALIDAD NEONATAL Y SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIONES.....	8
1.2. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T.....	9
1.3. INFLUENCIA DEL METABOLISMO EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T.....	10
1.4. EL ION CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO ESENCIAL EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T.....	11
1.5. CANALES IÓNICOS DE POTASIO Kv1.3 Y KCa3.1.....	12
1.6. CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (Cav).....	13
1.7. CANALES DE TIPO TRP.....	15
1.8. CANAL DE PROTONES Hv1.....	17
1.9. ENZIMA NADPH OXIDASA.....	18
1.10. ESTALLIDO RESPIRATORIO, ESTRÉS OXIDATIVO Y SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR ROS.....	18
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	21
2.1. ANTECEDENTES.....	21
2.2. HIPÓTESIS.....	22
2.3. OBJETIVO GENERAL.....	22
2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. METODOLOGÍA.....	23
3.1. COLECTA DE LAS MUESTRAS Y OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS T CD8 ⁺ DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS Y DE SANGRE PERIFÉRICA DE ADULTOS.....	23
3.2. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE CD3/CD28.....	24
3.3. EVALUACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8 ⁺ MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE CD69.....	24
3.5. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROLIFERATIVO DE LAS MUESTRAS NEONATALES Y DE ADULTOS MEDIANTE EL ENSAYO DE DILUCIÓN DE CFDA-SE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	25
3.6. EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE CDNA.....	26
3.7. EVALUACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN MEDIANTE qPCR EN TIEMPO REAL.....	27
3.8. CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO COMPUTACIONAL PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL METABOLISMO REDOX Y LA SEÑALIZACIÓN DEL TCR.....	27
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. MEDICIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS EN LINFOCITOS T CD8 ⁺ DE NEONATOS Y ADULTOS HUMANOS EN ESTADO BASAL.....	29
4.2. MEDICIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS EN LINFOCITOS T CD8 ⁺ DE NEONATOS Y ADULTOS HUMANOS COMO RESULTADO DE LA ESTIMULACIÓN CON TCR/CD28.....	32
4.3. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE CANALES IÓNICOS EN LINFOCITOS T CD8 ⁺ DE NEONATOS Y ADULTOS HUMANOS COMO RESULTADO DE LA ESTIMULACIÓN CON TCR/CD28.....	34
4.4. MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ DE NEONATOS Y ADULTOS HUMANOS COMO RESULTADO DE LA ESTIMULACIÓN CON TCR/CD28.....	38
4.5. MODULACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ MEDIANTE EL USO DEL FÁRMACO ANTIOXIDANTE N-ACETYL-L-CYSTEINE (NAC).....	41
4.6. MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ DE NEONATOS Y ADULTOS HUMANOS COMO RESULTADO DE LA ESTIMULACIÓN CON TCR/CD28.....	45
4.7. CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO COMPUTACIONAL PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL METABOLISMO REDOX Y LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8 ⁺	50

5. DISCUSIÓN	57
6. CONCLUSIONES	62
7. PERSPECTIVAS	63
8. BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXO 1	76
ANEXO 2	77

Resumen

La baja respuesta de los linfocitos T neonatales a las infecciones contribuye a una alta incidencia de morbilidad y mortalidad de los recién nacidos. En este trabajo se evaluó el impacto de los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de las especies reactivas de oxígeno de las células T CD8⁺ de donadores adultos y neonatos en su potencial de activación. Además, se construyó un modelo computacional lógico para descifrar la interacción del metabolismo y las ROS en la señalización de las células T. El modelo captura la interacción entre el reconocimiento de antígeno, las ROS y el estado metabólico en las respuestas de las células T. Este modelo muestra estados estables alternativos que corresponden a diferentes destinos celulares, es decir, estados inactivo, activado y anérgico, dependiendo del estado redox intracelular. Las simulaciones estocásticas con este modelo indican además el efecto que tienen las diferencias en el estado redox intracelular inicial a nivel de la población celular. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el alto nivel de ROS en las células neonatales contribuye a la tasa de activación más baja de las células T CD8⁺ neonatales en comparación con las de adulto tras la estimulación del TCR.

Abstract

A low response of neonatal T cells to infections contributes to a high incidence of neonatal morbidity and mortality. Here we evaluated the impact of the cytoplasmic and mitochondrial levels of Reactive Oxygen Species of adult and neonatal CD8⁺T cells on their activation potential. We further constructed a logical model to decipher the interplay of metabolism and ROS on T cell signaling. Our model highlights the interplay between antigen recognition, ROS and metabolic status in T cell responses. This model displays alternative stable states corresponding to different cell fates, i.e. quiescent, activated or anergic states, depending on ROS status. Stochastic simulations with this model further indicate that differences in ROS status at the cell population level tentatively explain the lower activation rate of neonatal compared to adult CD8⁺ T cells upon TCR engagement.

Lista de abreviaturas y siglas

ADPR	A denosine Di Phosphate R ibose
AMP	A denosine Mono Phosphate
ATP	A denosine Tri Phosphate
BCR	B Cell R eceptor
Ca _v	C anales de C alcio dependientes de V oltaje
CBMC	C ord B lood M ononuclear C ells
CD	C luster D ifferentiation
cDNA	c omplementary D eoxyribonucleic A cid
CRAC	C alcium R elease A ctivated C hannel
DHP	D ihidropiridinas
DUOX	D ual O xidase
ER/SR	E ndoplasmic R eticulum/ S arcoplasmic R eticulum
FACS	F luorescence- A ctivated C ell S orting
FAS	F atty A cid S ynthesis
g	g ravedades
GAPDH	G lyceraldehyde-3- p hosphate D ehydrogenase
GM-CSF	G ranulocyte- M acrophage C olony- S timulating F actor
GTPasa	T rifosfatasa de G uanosina
Hv1	C anal de P rotones dependiente de V oltaje
IgG	I munoglobulina G
IL	I nterleucina
IP ₃	I nositol 1,4,5- t rifosfato
K _{Ca}	C anales de p otasio dependientes de C alcio

K _v	Canales de potasio dependientes de V oltaje
LRG	L ogical R egulatory G raph
MAPK	M itogen A ctivated P rotein K inase
MFI	M edian F luorescence I ntensity
μg	micro g ramo
MHC	M ajor H istocompatibility C omplex
μM	micro M olar
ml	m ililitro
mM	m ili M olar
mRNA	m essenger R ibonucleic A cid
NAADP	N icotinic A cid A denine D inucleotide P hosphate
NAC	N - A cetyl- L - C ysteine
NADPH	N icotinamide A denine D inucleotide P hosphate
NFAT	N uclear F actor of A ctivated T -Cells
NFκB	N uclear F actor κ B
nM	n ano M olar
NOX	N icotinamide A denine D inucleotide P hosphate O xidase
PBMC	P eripheral B lood M ononuclear C ells
PBS	P hosphate B uffered S aline
PKC	P rotein K inase C
PLC	P hospholipase C
PMA	P horbol M yristate A cetate
PPP	P entose P hosphate P athway
qPCR	q uantitative P olymerase C hain R eaction
RNA	R ibonucleic A cid
ROS	R eactive O xygen S pecies
RPMI	R oswell P ark M emorial I nstitute

SFB	Suero Fetal Bovino
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
SOD	Superoxide Dismutase
STIM	Stromal Interaction Molecule
TCR	T Cell Receptor
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tregs	T Reguladoras
TRP	Transient Receptor Potential
VSOP	Voltage Sensor Only Protein

1. Introducción

1.1. Mortalidad neonatal y susceptibilidad a infecciones.

La mortalidad infantil constituye un problema de salud pública a nivel mundial. Se calcula que anualmente mueren aproximadamente 4 millones de recién nacidos menores de 6 meses por enfermedades infecciosas. Dentro del grupo de niños menores de 5 años la principal causa de muerte es la neumonía, una enfermedad provocada por la pobre respuesta inmune a la infección con bacterias tales como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b (World Health Organization United Nation Population Fund UNICEF., 2009).

Las primeras investigaciones sobre la respuesta inmune de neonatos promovieron la noción de que el sistema inmune neonatal era inmunodeficiente y que, por tanto, desarrollaba respuestas inmunes pobres (Clayton, et al., 1989; Gammon, et al., 1986). Posteriormente, se demostró que los neonatos tienen la capacidad de respuestas inmunes similares a las del adulto bajo condiciones potentes de co-estimulación y en respuesta a patógenos altamente inmunogénicos (Forsthuber, Yip, & Lehmann, 1996; Ridge, Fuchs, & Matzinger, 1996; Sarzotti, Robbins, & Hoffman, 1996). La clasificación y caracterización de subpoblaciones celulares de linfocitos T (Mosmann, & Coffman, 1989), permitió detectar diferencias sustanciales a nivel de sus fenotipos, y de sus perfiles de secreción de citocinas entre células de neonatos y adultos. Se ha demostrado que los neonatos desarrollan respuestas inmunes desviadas hacia el patrón celular Th2 (ver más adelante), y no la típica respuesta inflamatoria caracterizada por la secreción de citocinas del patrón Th1 (ver más adelante). En consecuencia, el sistema inmune de neonatos es particularmente susceptible a infecciones por patógenos intracelulares y a reacciones alérgicas (Adkins, Bu, Cepero, & Perez, 2000; Chen, & Field, 1995; Forsthuber, et al., 1996; Min, et al., 2000; Powell, & Streilein, 1990; Singh, Hahn, & Sercarz, 1996). En la actualidad existen muchas lagunas en el conocimiento de los

factores que condicionan el desarrollo de la inmunidad en neonatos y de las diferencias con los adultos. El avance en este campo es crítico para desarrollar estrategias adecuadas de vacunación y de terapias que permitan disminuir la alta tasa de mortalidad en este sector tan vulnerable de la población humana.

1.2. Subpoblaciones de linfocitos T.

Las células que componen al sistema inmunológico se han clasificado en diferentes subgrupos o subpoblaciones basado en su origen, sus características fenotípicas y sus funciones más representativas. Los linfocitos T constituyen una subpoblación derivada del linaje linfoide, se originan en la médula ósea y posteriormente terminan su proceso de maduración en el timo antes de salir a la circulación periférica. El complejo denominado receptor de células T (TCR, siglas en inglés), localizado en la membrana citoplasmática, funciona como la principal vía de comunicación con otras células, las cuáles presentan fragmentos peptídicos como antígenos en superestructuras denominadas complejo principal de histocompatibilidad (MHC, siglas en inglés). La expresión de la molécula correceptora CD4 caracteriza al subconjunto de las células T cooperadoras o T helper (del inglés, Th), las cuales se subdividen a su vez en diferentes subpoblaciones tales como Th1, Th2, Th17, Treg, etc (Zhu, Yamane, & Paul, 2010). En términos generales las células T cooperadoras ejercen la función de modular y coordinar la respuesta de otras células inmunes mediante la secreción de citocinas. Por otro lado, la expresión de la molécula correceptora CD8 caracteriza a la subpoblación de linfocitos T citotóxicos, los cuáles son importantes en la eliminación de patógenos intracelulares.

Para lograr una activación completa los linfocitos T requieren de señales adicionales al contacto del TCR con el antígeno presentado en el MHC. Existen un conjunto de moléculas accesorias que se localizan en la membrana citoplasmática en las proximidades del TCR, las cuales tienen ligandos específicos en la célula vecina que les transmiten señales co-estimuladoras o co-inhibitorias al linfocito T (Dustin, 2014). Adicionalmente las citocinas secretadas por otras células presentes en el

microambiente contribuyen a potenciar o inhibir una respuesta determinada. Cada una de las señales anteriormente mencionadas es transducida mediante cascadas de señalización intracelular específicas, las cuáles están influenciadas por la regulación de segundos mensajeros, por el estado redox y por el estado metabólico intracelular. De este modo, una combinación de señales determinada podría resultar en diferentes respuestas celulares tales como quiescencia, anergia o activación; en dependencia del estado intracelular (Li, 2017).

1.3. Influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T.

El proceso de activación de los linfocitos T involucra una serie de cambios importantes a nivel intracelular en los que la participación del metabolismo es esencial. Múltiples evidencias señalan que las principales rutas del metabolismo energético se acoplan de manera coordinada en un fenómeno denominado reprogramación metabólica, el cual está regulado a nivel transcripcional (Hough, Chisolm, & Weinmann, 2015; Man, & Kallies, 2015). De esta manera, cada tipo celular posee un perfil metabólico característico, el cual va cambiando en la medida que las condiciones celulares lo requieran. En estado basal, las células T obtienen energía en forma de ATP predominantemente a través de la respiración aerobia, o sea, Ciclo de Krebs seguido de Cadena de Transporte Electrónico y Fosforilación Oxidativa en la mitocondria, y mantienen bajos niveles de actividad de la ruta glucolítica en el citoplasma. En cambio, al recibir las señales de estimulación por el TCR y moléculas co-estimuladoras, los linfocitos T incrementan la tasa de la Glicólisis y de la Glutaminólisis, y ambas rutas se vuelven las principales fuentes de energía en forma de ATP y de esqueletos de carbono requeridos para la síntesis de nuevas macromoléculas (Pearce, 2010; Pearce, & Pearce, 2013; Pearce, Poffenberger, Chang, & Jones, 2013). El incremento de la tasa glucolítica aún en presencia de dioxígeno es conocido como efecto Warburg, y es análogo al que ocurre en las células tumorales de alta tasa de proliferación (Warburg, 1956).

1.4. El ion calcio como segundo mensajero esencial en la activación de células T.

En los linfocitos T, como resultado de la activación y señalización a través del TCR se reclutan y activan un conjunto de tirosin cinasas que favorecen la activación de diversas rutas de señalización intracelular, las cuales conducen eventualmente a la proliferación celular y a la producción de citocinas. Una de las enzimas activadas es la fosfolipasa $C\gamma$ ($PLC\gamma$), la cual cataliza la transformación del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato en inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. El IP_3 tiene como receptores a canales de calcio (Ca^{2+}) expresados en la membrana del retículo endoplasmático y retículo sarcoplasmático (ER/SR), los cuales constituyen grandes reservas de Ca^{2+} intracelular. La unión del IP_3 a estos receptores induce su apertura y la liberación inicial de Ca^{2+} al citoplasma. El vaciamiento de las reservas de Ca^{2+} del retículo endoplasmático activa sensores de Ca^{2+} expresados en la membrana del ER/SR denominados Stromal Interaction Molecule (STIM), los cuales a su vez se asocian a canales de Ca^{2+} expresados en la membrana citoplasmática denominados Orai, conocidos también como canales CRAC (por sus siglas en inglés calcium release activated channel), e inducen la entrada de Ca^{2+} al citoplasma desde el exterior celular. Este proceso se conoce como SOCE, (por sus siglas en inglés store-operated calcium entry). La entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular, mediada por la asociación entre ORAI y STIM se considera la mayor contribución al incremento del Ca^{2+} intracelular en el proceso de activación de los linfocitos T (Feske, 2013; Feske, et al., 2006; Liou, et al., 2005; Roos, et al., 2005; Vig, et al., 2006; S. L. Zhang, et al., 2005). Este incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} activa la ruta de calcio-calmodulina y calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio que desfosforila a varios miembros de la familia del factor nuclear de células T activadas (NFAT), lo cual le permite la translocación al núcleo para ejercer su función. En el núcleo NFAT puede inducir directa o indirectamente la transcripción de genes vitales para la activación, maduración y proliferación de los linfocitos T (Borde, Barrington, Heissmeyer, Carroll, & Rao, 2006; Feske, 2007; Mellström, Savignac, Gomez-Villafuertes, & Naranjo, 2008).

De esta manera el Ca^{2+} constituye un segundo mensajero universal que controla numerosos procesos vitales en el linfocito T. Se ha calculado que, en condiciones basales, la concentración intracelular de Ca^{2+} en los linfocitos T oscila entre 50-100 nM, y que como resultado de la activación a través del TCR puede incrementarse hasta 1 μM (Robert, Triffaux, Savignac, & Pelletier, 2011). El tránsito entre ambos estados es un proceso altamente regulado cuya magnitud y duración incide notablemente sobre el destino funcional de la célula T y define estadios tan diferentes como la proliferación, la apoptosis o la anergia (Qu, Al-Ansary, Kummerow, Hoth, & Schwarz, 2011). Varias especies moleculares participan en este proceso; ya sea facilitando la entrada de Ca^{2+} directamente o modulando el potencial de membrana para mantener la fuerza que permite la entrada pasiva de Ca^{2+} .

Además de los canales de Ca^{2+} antes mencionados, se conoce que participan otros canales de Ca^{2+} como los dependientes de voltaje (Ca_v), los activados por ligandos intracelulares y los activados por segundos mensajeros. Además, no solo participan canales de Ca^{2+} , también se expresan canales de cationes de la familia TRP, canales de protones (H^+), canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje (K_v) y canales de K^+ activados por Ca^{2+} intracelular (K_{Ca}) (Robert, et al., 2011). La contribución real de cada uno de estos tipos de canales iónicos a la señalización intracelular en los linfocitos T, así como su expresión diferencial en las diferentes subpoblaciones linfoides es un tema debatido y aun pobremente estudiado.

1.5. Canales iónicos de potasio Kv1.3 y KCa3.1 .

Los canales de K^+ facilitan la salida de K^+ hacia el exterior de la célula, lo cual contribuye a contrarrestar la despolarización de la membrana citoplasmática (Michael D. Cahalan, & Chandy, 2009). En linfocitos, los canales de K^+ más caracterizados son el canal de K^+ dependiente de voltaje $\text{K}_v1.3$ y el canal de K^+ activado por Ca^{2+} $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, también conocido como KCNN4 , IKCa^{2+} o SK4 . El canal $\text{K}_v1.3$ es un tetrámero conformado por cuatro subunidades α idénticas, cada una

con 6 segmentos transmembranales, que se activan por despolarización de la membrana citoplasmática (Bezanilla, 2008; M. D. Cahalan, Chandy, DeCoursey, & Gupta, 1985). Por su parte, el canal $K_{Ca3.1}$ tiene una estructura topológica similar al $K_v1.3$, pero además se encuentra unido de manera constitutiva a la calmodulina en su región C terminal citoplasmática, lo cual hace que sea activado como consecuencia de la unión de Ca^{2+} a la calmodulina (Xia, et al., 1998). Se plantea que la actividad de $K_{Ca3.1}$ hiperpolariza la membrana luego del incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y contribuye a mantener el potencial necesario para la entrada de Ca^{2+} subsiguiente a la activación. La contribución relativa de ambos tipos de canales de K^+ a la activación de los linfocitos está determinada primariamente por sus niveles de expresión, los cuales varían entre subpoblaciones de células T y también entre estados de activación. En condiciones basales, las células T vírgenes humanas expresan predominantemente canales $K_v1.3$ y dependen de éstos para mantener el equilibrio electrostático durante su activación (Leonard, Garcia, Slaughter, & Reuben, 1992). Luego de la activación, se promueve la expresión de $K_{Ca3.1}$ (Ghanshani, et al., 2000) y se ha demostrado que su inhibición bloquea el influjo de Ca^{2+} y la proliferación (Fanger, Neben, & Cahalan, 2000; Fanger, et al., 2001). Por otro lado, en ratones se ha visto que las células Th1 y Th2 expresan predominantemente el canal $K_{Ca3.1}$ y que dependen de su actividad para el influjo de Ca^{2+} seguido a la estimulación por el TCR y para la secreción de citocinas; en cambio las células Th17 expresan fundamentalmente el canal $K_v1.3$ y requieren de éste para su activación y para la producción de IL-17 (L. Di, et al., 2010).

1.6. Canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v).

Los canales Ca_v fueron caracterizados originalmente en células excitables, aunque posteriormente se demostró su expresión y funcionalidad en células no excitables tales como los linfocitos T. Están constituidos por una subunidad formadora de poros sensible a cambios de voltaje denominada α_1 , la cual se acompaña de las subunidades α_2 , β , δ y γ , que modulan la apertura. En mamíferos, existen 10 tipos

de canales Ca_v diferentes, los cuales han sido agrupados en 5 categorías (L, P ó Q, N, R y T), con base en sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas. Se postula que cada una participa en distintas rutas de señalización intracelular (Catterall, 2000). Los canales Ca_v de tipo L han sido muy estudiados recientemente en linfocitos T humanos y de ratón (Kotturi, Carlow, Lee, Ziltener, & Jefferies, 2003; Kotturi, & Jefferies, 2005). Se sabe, por ejemplo, que su expresión se incrementa como resultado de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 *in vitro* (Badou, et al., 2006), y que su activación se puede inhibir usando antagonistas de dihidropiridinas (DHP). Estudios recientes han demostrado el papel fundamental de los canales Ca_v dependientes de voltaje de tipo L en la regulación de la homeostasis de los linfocitos T vírgenes y en la activación a través del TCR. Se demostró que el canal $Ca_v1.4$, expresado en la membrana citoplasmática de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ vírgenes, es esencial en la modulación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} y en la modulación del incremento del Ca^{2+} intracelular inducido por la activación a través del TCR, lo cual tiene un impacto en regulación de las rutas de señalización a través de la GTPasa pequeña RAS y el factor transcripcional NFAT (Omilusik, et al., 2011). Otras evidencias han demostrado que los canales Ca_v se encuentran diferencialmente expresados en las subpoblaciones de linfocitos T (Weber, Miller, & Allen, 2008). Los canales Ca_v tienen una expresión incrementada en linfocitos del patrón Th2, y el bloqueo específico de estos canales afecta la internalización de Ca^{2+} seguida a la estimulación por el TCR y disminuye la producción de citocinas típicas de dicho patrón celular (Cabral, et al., 2010). Estos hallazgos sugieren un papel fundamental de estos canales en las diferencias en la concentración intracelular de Ca^{2+} en estado basal entre las células Th1, Th2 y Th17, y, por tanto, en las diferencias en el umbral de activación de dichas subpoblaciones celulares.

Las subunidades β reguladoras ($\beta1$ – $\beta4$), son fundamentales para la función correcta de los canales Ca_v (Dolphin, 2003), debido a que se requieren para la expresión funcional de los canales Ca_v en la membrana citoplasmática (Bichet, Lecomte, Sabatier, Felix, & De Waard, 2000) y además modulan sus propiedades biofísicas mediante la interacción con las subunidades α formadoras del poro (Dolphin, 2003).

Las primeras evidencias acerca de la relevancia de estas subunidades β en células del sistema inmune se obtuvieron a partir de estudios con cepas de ratones BALB/cGn portadores de mutaciones espontáneas de la subunidad $\beta 4$, caracterizados por la manifestación de ataxia, convulsiones y comportamiento letárgico (Smeyne, 2007). Adicionalmente estos ratones manifiestan un desorden inmunológico, caracterizado fundamentalmente por la afectación de la respuesta inmune celular (Morrison, Moyer, Dung, Rogers, & Moyer, 1984). Posteriormente se demostró que las células T humanas y de ratón expresan las subunidades $\beta 3$ y $\beta 4$, y que la deficiencia en alguna de estas subunidades afecta la señalización intracelular del calcio, la activación de NFAT, y la producción de citocinas (Tsien, et al., 1987). Sin embargo, el mecanismo exacto que explique el requerimiento de estas subunidades β en la respuesta de las células T efectoras no está bien dilucidado.

A pesar de la expresión y función de los canales Ca_v en células T, no se conoce con exactitud cómo se abren estos canales para conducir el Ca^{2+} . En células excitables, tales como neuronas y cardiomiocitos, se ha demostrado su activación inducida por la despolarización de la membrana (Catterall, 2000; Thomas, & Meech, 1982); en cambio en linfocitos T la despolarización parece no tener un efecto directo sobre la activación de estos canales. Esto tiene sentido desde el punto de vista fisiológico, dado que en linfocitos T la inducción de la entrada de Ca^{2+} mediada por los canales Ca_v y la posterior activación celular debería estar acoplada con estímulos específicos de antígeno tales como la estimulación a través del TCR (Bernheim, et al., 1993). La apertura de estos canales por una despolarización de la membrana sin estimulación mediada por el TCR pudiera inducir una activación y proliferación celular en ausencia de antígeno.

1.7. Canales de tipo TRP.

Los canales iónicos de tipo TRP, de transient receptor potential (en inglés), constituyen una amplia superfamilia de 28 canales de cationes en humanos, la cual

se ha subdividido en 7 subfamilias (Venkatachalam, & Montell, 2007). En linfocitos T se expresan fundamentalmente canales de las subfamilias TPRC y TRPM (Wenning, et al., 2011). La mayoría de los canales TRP son permeables a varios cationes, fundamentalmente Ca^{2+} y Na^+ (Owsianik, Talavera, Voets, & Nilius, 2006; Ramsey, Delling, & Clapham, 2006). El canal TRPM2 es un caso muy particular debido a que es un canal permeable a Ca^{2+} que posee un dominio con actividad enzimática en su región C terminal citoplasmática, la cual cataliza la hidrólisis de pirofosfato del nucleótido ADPR (Knowles, Li, & Perraud, 2013). Se conoce que el canal TRPM2 es activado por varias señales citoplasmáticas entre las que se incluyen el Ca^{2+} , el difosfato de adenosina ribosa cíclico (cADPR, siglas en inglés), H_2O_2 y el dinucleótido de ácido nicotínico y adenina fosforilado (NAADP, siglas en inglés) (Sumoza-Toledo, & Penner, 2011; Yamamoto, Takahashi, & Mori, 2010). Se ha planteado que TRPM2 pudiera funcionar como un sensor de stress metabólico y oxidativo en la célula, que conecta esta información con flujos iónicos los cuales regulan el potencial de membrana y afectan la señalización intracelular de Ca^{2+} (Knowles, et al., 2013). La modulación de la actividad de TRPM2 por H_2O_2 , y el hecho de que este es producido por varias células inmunes durante la inflamación ha centrado la atención en el canal TRPM2 como un mediador potencial de patologías provocadas por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (A. Di, et al., 2011; Hara, et al., 2002). Experimentos *in vivo* con ratones deficientes de TRPM2 mostraron que los animales son resistentes a colitis en un modelo experimental de esta enfermedad inflamatoria, lo cual se debió a defectos en el influjo de calcio, en la activación del factor nuclear NFkB y en la producción de la quimiocina CXCL2 en monocitos, y que finalmente esto se refleja en una inhibición de la infiltración de neutrófilos en los intestinos (Yamamoto, et al., 2008). Por otro lado, se sabe que TRPM2 inhibe la producción de ROS en células fagocíticas, mediante la modulación de la función de la enzima NADPH oxidasa, y así previene la inflamación pulmonar inducida por endotoxinas en ratones (A. Di, et al., 2011). En células T se conoce que la expresión de TRPM2 se incrementa luego de la estimulación a través del TCR (Wenning, et al., 2011). No existe una evidencia directa que conecte la actividad de TRPM2 con el influjo de calcio o con la función

de las células T. Sin embargo, se ha demostrado que la estimulación a través del TCR induce la liberación de ADPRc del retículo endoplasmático y que esto potencialmente activa al canal TRPM2 (Guse, et al., 1999). Queda por elucidar si la actividad del canal TRPM2 es modulada por ROS en células T, y si esto incide sobre la respuesta de células T durante una respuesta inflamatoria *in vivo*.

1.8. Canal de protones Hv1.

Las corrientes de protones (H^+) también fueron estudiadas inicialmente en células excitables tales como neuronas y células musculares (Ramsey, Moran, Chong, & Clapham, 2006; Sasaki, et al., 2013). Posteriormente se identificó que dichas corrientes eran mediadas por un canal de H^+ dependiente de voltaje (DeCoursey, Morgan, & Cherny, 2003; Henderson, Chappell, & Jones, 1987), y su estudio se extendió a espermatozoides y células del sistema inmune, tales como neutrófilos, basófilos y linfocitos B. El canal funcional está formado por dímeros de dos subunidades polipeptídicas idénticas con 4 segmentos transmembranales denominadas VSOP y codificadas por el gen *Hvcn1*. Se activa por despolarización en la membrana citoplasmática y permite la salida de H^+ del citoplasma hacia el exterior celular (DeCoursey, et al., 2003; Henderson, et al., 1987). Sus funciones son muy particulares para cada tipo celular donde se ha estudiado. Se sabe, por ejemplo, que la actividad de estos canales en células del sistema inmune ayuda a contrarrestar la acidificación del citoplasma generada por la actividad de la enzima NADPH oxidasa durante la transferencia de electrones al dioxígeno a partir del NADPH (Schilling, Gratopp, DeCoursey, & Eder, 2002). También se ha planteado que la salida de H^+ de la célula contrarresta la despolarización celular y contribuye a mantener la diferencia de potencial necesaria para la entrada de Ca^{2+} al citoplasma. En linfocitos B se conoce que el canal Hv1 se encuentra localizado en las proximidades del receptor de linfocitos B (BCR, siglas en inglés) en la membrana citoplasmática y que ambas moléculas se internalizan juntas luego de la estimulación. Además, la deficiencia de dicho canal en las células B se asoció con una menor producción de ROS, una señalización del BCR atenuada, menores

niveles de activación de las cinasas Syk y Akt, así como también menores niveles de producción de anticuerpos *in vivo* (Capasso, et al., 2010). En linfocitos T de ratones deficientes de este canal también se observó menor producción de ROS después de la estimulación con ésteres de forbol (PMA, siglas en inglés) (Sasaki, et al., 2013). Sin embargo, la deficiencia de Hv1 en estos ratones no es exclusiva de las subpoblaciones de linfocitos T y B, sino que es en todas las células del organismo, lo cual se debe tener en cuenta al hacer interpretaciones a partir de los análisis funcionales y fenotípicos de poblaciones aisladas (Schilling, et al., 2002).

1.9. Enzima NADPH oxidasa.

Este complejo enzimático consiste en una subunidad catalítica denominada gp91^{phox} o NOX2, con 6 isoformas (NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2), y varias subunidades auxiliares (Rac2, p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}) que constituyen a la enzima activa, la cual se localiza en la membrana de los fagosomas o en la membrana citoplasmática de diferentes tipos celulares. En células del sistema inmunológico, tales como macrófagos, neutrófilos y linfocitos T y B, se expresa mayoritariamente la isoforma NOX2, aunque también se conoce de la expresión de DUOX1 (Kwon, et al., 2010). NOX2 cataliza la formación del anión superóxido (O_2^-) a partir del dioxígeno (O_2), utilizando NADH o NADPH como donadores de electrones. Existen varias señales intracelulares que pueden activar a la NADPH oxidasa, entre ellas está la PKC, MAPKs, fosfolípidos aniónicos y el incremento del calcio citoplasmático. De manera general y en dependencia del tipo celular, se ha visto que la activación de la enzima está asociada con las señales de hormonas, tales como insulina, de citocinas, como por ejemplo el GM-CSF o el TNF, o también por señales del BCR o TCR para linfocitos B y T respectivamente.

1.10. Estallido respiratorio, estrés oxidativo y señalización mediada por ROS.

El fenómeno de estallido respiratorio o estallido oxidativo consiste en la conversión del oxígeno bi-molecular (O_2) en el anión superóxido (O_2^-) por la actividad de la

enzima NADPH oxidasa, y la posterior dismutación del superóxido a H_2O_2 (Babior, Curnutte, & McMurrich, 1976). Fue descrito originalmente en fagocitos y se asoció íntimamente con la actividad microbicida de estas células. La deficiencia de componentes del complejo de la NADPH oxidasa en pacientes con enfermedad crónica granulomatosa provoca una disminución de la capacidad microbicida de los neutrófilos, en gran medida debido a una pobre producción de ROS (Klebanoff, 2005; Stasia, & Li, 2008). La detección de la actividad de la NADPH oxidasa y la producción de ROS en otras células que no fagocitan, tales como linfocitos B y otras células del sistema inmune, atrajo mayor atención sobre el estudio de las diferentes funciones de las ROS y del estallido respiratorio. En la actualidad ya se conoce que además de las funciones microbicidas, las ROS participan en diversos procesos celulares tales como la transducción de señales, muerte celular, quimiotaxis, regulación del crecimiento celular y síntesis de diversos compuestos celulares (Dupré-Crochet, Erard, & Nüße, 2013). Esta versatilidad de funciones asociadas a las ROS está condicionada en gran medida por el tipo celular en cuestión y por la actividad de la enzima NADPH oxidasa (Dupré-Crochet, et al., 2013). Los factores que determinan la prevalencia de unas funciones sobre otras en cada tipo celular no se conocen a cabalidad, pero se sabe que debe ser un fenómeno altamente regulado debido al daño potencial que representa la liberación de las ROS en condiciones no controladas; el exceso de estos compuestos en el organismo puede causar estrés oxidativo sobre las biomoléculas, sobre todo en los lípidos de las membranas, pero también sobre proteínas, y DNA. Se conocen varios mecanismos y especies moleculares implicados en neutralizar las ROS intracelulares, tales como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, catalasas, peroxiredoxinas, tioredoxinas; y también compuestos no enzimáticos como el glutatión, el ascorbato, el piruvato, el α -cetoglutarato y el oxaloacetato (Dröge, 2002). Los canales iónicos y su actividad también tienen un efecto en la regulación de la producción de ROS y del estallido respiratorio, como se explicó anteriormente para el canal TRPM2 y el canal Hv1; mediante la modulación de la señalización del calcio y el control del pH intracelular, respectivamente.

El H_2O_2 se considera como una de las especies reactivas de oxígeno de mayor impacto en la señalización intracelular y en la transducción de señales, esto se debe fundamentalmente a su estabilidad y a su capacidad de atravesar las membranas celulares (Marinho, Real, Cyrne, Soares, & Antunes, 2014; Sies, 2014, 2017). Reacciona preferencialmente con los residuos de cisteína de las proteínas en un proceso denominado sulfenilación. La sulfenilación constituye una marca molecular en las proteínas análoga a la fosforilación, la acetilación u otras modificaciones postraduccionales (Holmström, & Finkel, 2014); y puede conducir a cambios conformacionales en las proteínas que alteren su actividad. Por ejemplo, las cisteínas del centro catalítico de algunas fosfatasa pueden sufrir la sulfenilación provocada por el H_2O_2 y así quedar inactivas para ejercer su función (Jang, et al., 2014; Schwertassek, et al., 2014). Además de las fosfatasa se conoce de muchas otras proteínas que son blanco de sulfenilación tales como cinasa, factores de transcripción, desacetilasa de histonas, proteasa, componentes del citoesqueleto, etc. (Jones, & Sies, 2015). Por este diverso número de proteínas blanco y procesos en los cuales está implicada, la señalización redox tiene un rol fundamental en diferentes rutas de señalización y en diferentes mecanismos de regulación transcripcional que influyen sobre el destino funcional de la célula.

2. Fundamentación teórica.

2.1. Antecedentes.

Recientemente se realizó un estudio epigenético comparativo entre el genoma de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos. Este estudio se realizó con el propósito de identificar promotores de genes asociados con cromatina abierta (pobre en nucleosomas) y cromatina cerrada (rica en nucleosomas), así como la expresión genética. Este estudio se complementó luego con ensayos funcionales comparativos de proliferación, actividad citotóxica y estallido respiratorio en linfocitos T, con lo cual se lograron asociar y relacionar evidencias epigenéticas, transcriptómicas y funcionales. Los estudios anteriormente mencionados identificaron más de 2000 genes diferencialmente asociados con cromatina abierta y cerrada entre linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos. Entre los genes preferencialmente localizados en regiones de cromatina abierta en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos se encuentran varios genes de canales iónicos. Algunos de estos están implicados directamente en la señalización del Ca²⁺ en los linfocitos T, como el canal de cationes TRPM2, y el canal de K⁺ dependiente de Ca²⁺ intracelular KCNN4; otros están involucrados indirectamente en la regulación del estado redox intracelular, como el canal de protones Hv1. Además de la localización en regiones de cromatina abierta se logró comprobar que también estaban asociados con la marca de histona H3K4me3, la cual correlaciona muy frecuentemente con una alta tasa de transcripción. Por último, se detectó una expresión incrementada de dichos genes en una evaluación del transcriptoma de muestras de linfocitos T CD8⁺ neonatales. La expresión diferencial de este tipo de canales iónicos en las subpoblaciones de linfocitos T de neonatos pudiera tener impacto en la señalización del Ca²⁺ en estas células, y pudiera incidir sobre los mecanismos de activación y diferenciación celular. Además, se demostró que las células T neonatales tienen una menor expresión de componentes de las vías de señalización intracelular asociadas al TCR y menor actividad citotóxica. Por otro lado, se encontró que cuentan con un nivel superior de proliferación homeostática,

una mayor expresión de péptidos antimicrobianos y mayor producción de especies reactivas de oxígeno y de estallido respiratorio; componentes y funciones de defensa típicamente asociadas con células de la inmunidad innata y una mayor expresión de enzimas relacionadas con la glicólisis. Este conjunto de resultados y evidencias fue revisado ampliamente en un trabajo de tesis doctoral anterior, y además están incluidos en un artículo original de investigación (Galindo-Albarrán, et al., 2016).

2.2. Hipótesis.

Los linfocitos T CD8⁺ neonatales tienen un estado redox basal diferente al de los adultos. Este estado redox de los linfocitos neonatales es un obstáculo para una activación apropiada después de la estimulación del TCR.

2.3. Objetivo general.

Comparar el estado redox basal de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos, y evaluar su influencia en el proceso de activación. Construir un modelo lógico predictivo donde se capture toda la información bibliográfica del metabolismo energético y su impacto sobre la activación de los linfocitos T CD8⁺.

2.4. Objetivos específicos.

1. Comparar los estados redox basales de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.
2. Determinar el impacto del estado redox basal en la activación de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos luego de la estimulación *in vitro*.
3. Modular el estado redox basal de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos con agentes farmacológicos.
4. Desarrollar un modelo computacional capaz de recapitular la relación entre el metabolismo redox y la activación de linfocitos T.

3. Metodología

3.1. Colecta de las muestras y obtención de las células T CD8⁺ de sangre de cordón umbilical de neonatos y de sangre periférica de adultos.

La sangre de cordón umbilical se obtuvo del Hospital General de Cuernavaca Dr. José G. Parres. Se obtuvo consentimiento informado de las madres y sólo se colectó sangre de cordón proveniente de infantes de más de 38 semanas de gestación. Las muestras se obtuvieron de la sangre colectada del cordón umbilical, después del nacimiento del bebé y antes de la expulsión de la placenta para evitar la contaminación con sangre de la madre. La sangre se colectó en tubos estériles y se procesó el mismo día. Las células de adulto se obtuvieron del Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, de paquetes leucocitarios de donantes sanos, procesados el mismo día de su colecta. La sangre de cada donante se sometió a centrifugación en colchón de Lymphoprep (StemCell Cat. No. 07851) para aislar las células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CBMC, siglas en inglés) y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, siglas en inglés). Una vez aisladas se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, siglas en inglés) y posteriormente se incubaron toda la noche en placas Petri en incubadora de 37 °C y 5 % de CO₂, en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Thermo Fisher Scientific Cat. No. 88426) adicionado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5%, L-glutamina, y antibiótico, en lo adelante medio RPMI suplementado. Al siguiente día las células se mezclaron con 1 ml de eritrocitos del mismo donante, guardados en cultivo, y se les adicionó RosetteSep™ Human CD8⁺ T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Cat. No. 15023). La mezcla se incubó por 40 minutos en agitación para inducir la formación de complejos entrecruzados con anticuerpos de leucocitos no deseados con eritrocitos. Después de la incubación la muestra se sometió nuevamente a centrifugación en colchón de Lymphoprep para separar los linfocitos T CD8⁺. Seguidamente los linfocitos T CD8⁺ se sometieron a selección negativa con anticuerpos anti-CD11b (Tonbo Biosciences Cat. No. 70-0112) para las muestras neonatales y anti-CD45RO (Tonbo Biosciences Cat. No. 70-0457-U100) para las

muestras de adulto, unidos a perlas magnéticas conjugadas a proteína A/G (ThermoFisher Scientific Cat. No. 88802) con el propósito de eliminar las células contaminantes y células de memoria respectivamente. Finalmente, las células se sometieron a un paso de lisis de eritrocitos con solución tampón de cloruro de amonio.

3.2. Ensayo de estimulación a través de CD3/CD28.

Las células T CD8⁺ se sembraron en medio RPMI suplementado en placas de 24 pozos a una densidad de 5×10^6 células/ml en un volumen total de 1 ml. Seguidamente se les añadieron los anticuerpos anti-CD3 (Tonbo Biosciences Cat. No. 70-0037-U100) y anti-CD28 (Tonbo Biosciences Cat. No. 70-0289-U100) a una concentración final de 1 µg/ml, y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Luego de esta incubación inicial se les añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón (BioLegend Cat. No. 405301) a una concentración final de 1 µg/ml para inducir entrecruzamiento de los anticuerpos, y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 6 horas. En algunos experimentos las células se incubaron en presencia de 5 mM de N-Acetyl-L-Cysteine (Sigma-Aldrich Cat. No. A9165-5G) durante 1 hora previa a la estimulación del TCR. Al cabo de las 6 horas las células se cosecharon y se lavaron 2 veces con PBS. A cada pellet celular se le añadió 1 ml del reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific Cat. No. 15596-018) y se homogenizó con pipeta y luego con agitación en vórtex durante 1 minuto. Los lisados celulares de cada muestra se almacenaron en ultracongelación a -80 °C hasta la extracción de RNA total.

3.3. Evaluación de la estimulación de los linfocitos T CD8⁺ mediante la expresión de CD69.

Después de las 6 horas de estimulación con anti-CD3/anti-CD28, se separaron 200 000 células de cada muestra. Las células se lavaron 2 veces con solución de tinción de citometría o solución de FACS, la cual consiste en PBS adicionado con suero fetal bovino al 2 %. Seguidamente se les adicionaron los anticuerpos anti-CD8

conjugado a PE (Tonbo 50-0089-T100) y anti-CD69 conjugado a FITC (Genetex GTX43516), y se incubaron por 30 min en oscuridad y a 4 °C. Después de la incubación las células se lavaron 2 veces con solución de FACS y finalmente se fijaron con para-formaldehído, se almacenaron a 4 °C hasta el análisis en el citómetro.

3.4. Evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno en linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos.

Las células T CD8⁺ de neonatos y de adultos se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a 37 °C en solución de FACS adicionada con 2.5 µM de MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator (M36008 ThermoFisher Scientific); o 2 µM de Dihydroethidium (DHE) (D11347 ThermoFisher Scientific); o 5 µM de Carboxy-H₂DCFDA (C400 ThermoFisher Scientific). Después de la incubación las células se lavaron 2 veces con solución de FACS y finalmente se fijaron con para-formaldehído, se almacenaron a 4 °C hasta el análisis en el citómetro. En algunos experimentos las células se incubaron en presencia de 5 mM de N-Acetyl-L-Cysteine (Sigma-Aldrich Cat. No. A9165-5G) en medio RPMI suplementado durante 1 hora previa a la incubación con las sondas fluorescentes.

3.5. Evaluación del potencial proliferativo de las muestras neonatales y de adultos mediante el ensayo de dilución de CFDA-SE por citometría de flujo.

Las células CBMC o PBMC se incubaron con el reactivo CFDA-SE (21888, Sigma) 2.5 µM durante 15 minutos en medio RPMI. Seguidamente se les añadieron los anticuerpos anti-CD3 (Tonbo Biosciences Cat. No. 70-0037-U100) y anti-CD28 (Tonbo Biosciences Cat. No. 70-0289-U100) a una concentración final de 1 µg/ml, y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Luego de esta incubación inicial se les añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón (BioLegend Cat. No. 405301) a una concentración final de 1 µg/ml para inducir entrecruzamiento de los anticuerpos

y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 96 horas en medio RPMI suplementado, de manera paralela se incubaron otras células las cuáles no recibieron estimulación. Al cabo de las 96 horas las células se cosecharon y se lavaron 2 veces con solución de FACS. Se tiñeron con el anticuerpo anti-CD8 conjugado a PE (Tonbo 50-0089-T100) durante 30 minutos y se incubaron por 30 min en oscuridad y a 4 °C. Después de la incubación las células se lavaron 2 veces con solución de FACS y finalmente se fijaron con para-formaldehído, se almacenaron a 4 °C hasta el análisis en el citómetro.

3.6. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

La extracción de RNA a partir de las muestras de linfocitos T CD8⁺ se realizó mediante el protocolo descrito por Life Technologies para el uso de TRIzol[®] Reagent (Thermo Fisher Scientific Cat. No. 15596-018). Brevemente, cada muestra de lisado celular en TRIzol se descongeló y se homogenizó mediante agitación en vórtex durante 5 minutos a 25 °C, seguidamente se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitó durante 1 minuto para garantizar la separación de fases y se centrifugó a 12 000 gravedades por 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa superior se pasó a un tubo nuevo y se añadieron 0,5 mL de Isopropanol para precipitar el RNA total, se incubó durante 10 minutos a 25 °C, y luego se centrifugó a 12 000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el pellet de RNA se lavó con etanol al 75 %, seguidamente se centrifugó a 12 000 gravedades por 10 minutos a 4 °C. Finalmente el sobrenadante de etanol se desechó y el pellet de RNA se secó al aire durante 5 minutos al cabo de los cuales se re-disolvió en 15 µL de agua destilada libre de nucleasas y se almacenó a -80 °C hasta la síntesis de cDNA. El cDNA de cada muestra se sintetizó con los reactivos del kit Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Cat. No. # EP0441). Al final se obtuvieron 20 µL de cDNA que se almacenaron a -80 °C hasta la medición por ensayos cuantitativos de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR, siglas en inglés).

3.7. Evaluación de la transcripción mediante qPCR en tiempo real.

La expresión de los genes de los canales iónicos a nivel de mRNA se midió en las muestras de cDNA provenientes de linfocitos T CD8⁺, se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos para secuencias de mRNA de cada uno de los genes en estudio. Para la reacción de amplificación se utilizó Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific #K0221) y se aplicó el cDNA de cada muestra a varias diluciones de trabajo. Para el procesamiento y análisis de los resultados se utilizó el método de medición de expresión relativa con curva estándar. Se utilizó la cuantificación de los niveles de mRNA de la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, siglas en inglés) como referencia para la normalización en cada muestra. Para la cuantificación de IL-2 se utilizó Maxima Probe qPCR Master Mix de Thermo Scientific #K0261 y los cebadores de Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (Human IL-2) de Applied Biosystems #4327036F.

3.8. Construcción de un modelo computacional para el estudio de la interacción entre el metabolismo redox y la señalización del TCR.

El modelo computacional se construyó con ayuda del software GINsim (<http://ginsim.org>). GINsim permite la implementación de modelos computacionales basados en formalismos lógicos para el estudio de redes de señalización intracelular (Naldi, et al., 2018). La interfaz gráfica principal consiste en un gráfico regulatorio lógico (LRG, inglés), en el que cada nodo representa un componente de la red de señalización (receptor, segundo mensajero, factor transcripcional, complejo proteico, o gen). La mayoría de los nodos son booleanos, o sea, que pueden tomar únicamente dos niveles de actividad (0 ó 1), lo cual corresponde con el nivel funcional del componente que dicho nodo representa. Algunos nodos no son booleanos y pueden tomar tres niveles de actividad (0, 1 ó 2), en estos casos se representan los componentes para los cuales es relevante un nivel funcional intermedio. Los nodos están conectados entre sí mediante arcos, que representan las influencias regulatorias entre los componentes de la red de señalización, ya sean positivas o negativas. Para cada nodo se definió una regla lógica basada en el uso

de los operadores AND, OR y NOT, mediante la cual se determina el nivel de actividad del nodo blanco en función de los niveles de sus nodos reguladores. Una vez que el LRG quedó construido, el software GINsim permitió el análisis de los estados estables y otros parámetros dinámicos del modelo.

3.9. Análisis estadístico.

En cada ensayo comparativo se incluyeron entre 3 y 9 réplicas biológicas por grupo. En cada gráfico se representa la media y la desviación estándar de cada grupo. Para las comparaciones entre muestras de neonatos y adultos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney no pareada. Para las comparaciones entre muestras antes y después de la estimulación se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas si el valor de p fue menor o igual que 0.05.

4. Resultados.

4.1. Medición de los niveles intracelulares de ROS en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos en estado basal.

Los linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos purificados como se describió en la metodología y con un grado de pureza superior al 93 % (**Figura 1**), se incubaron en presencia de las sondas fluorescentes DHE o CH₂DCFDA y se analizaron mediante citometría de flujo para medir los niveles de ROS citoplasmático (cROS). En las muestras neonatales se detectaron mayores niveles de fluorescencia al comparar con las muestras de adultos utilizando ambas sondas (**Figura 2A y B**). Este resultado confirma hallazgos previos en los que se compararon los niveles de ROS en muestras neonatales y de adultos con la sonda DHE (Galindo-Albarrán, et al., 2016).

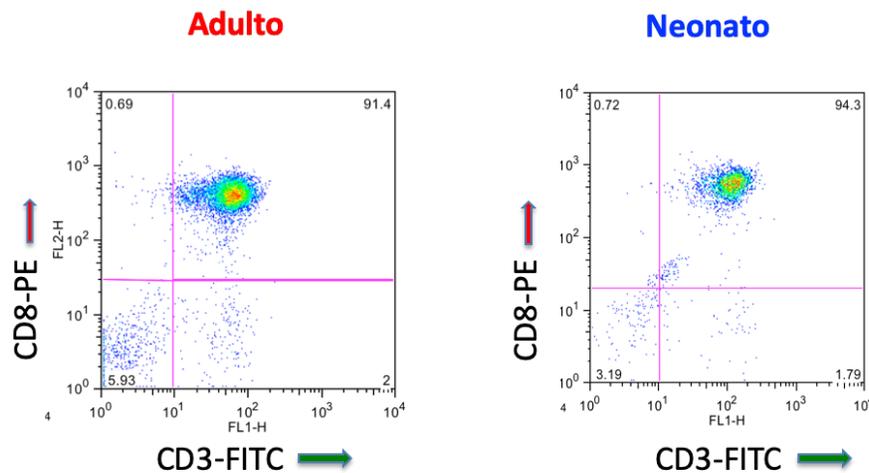


Figura 1. Se obtuvieron linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos con una pureza superior al 90 %. Las células mononucleares de cordón umbilical de neonatos (CBMC) y de sangre periférica de adultos (PBMC) se sometieron al protocolo de purificación descrito en la sección de metodología. Posteriormente se tiñeron con anticuerpos anti-CD8 conjugado a PE y anti CD3 conjugado a FITC y

se evaluó su perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En los gráficos de puntos se representan los perfiles de fluorescencia de una muestra representativa de cada grupo.

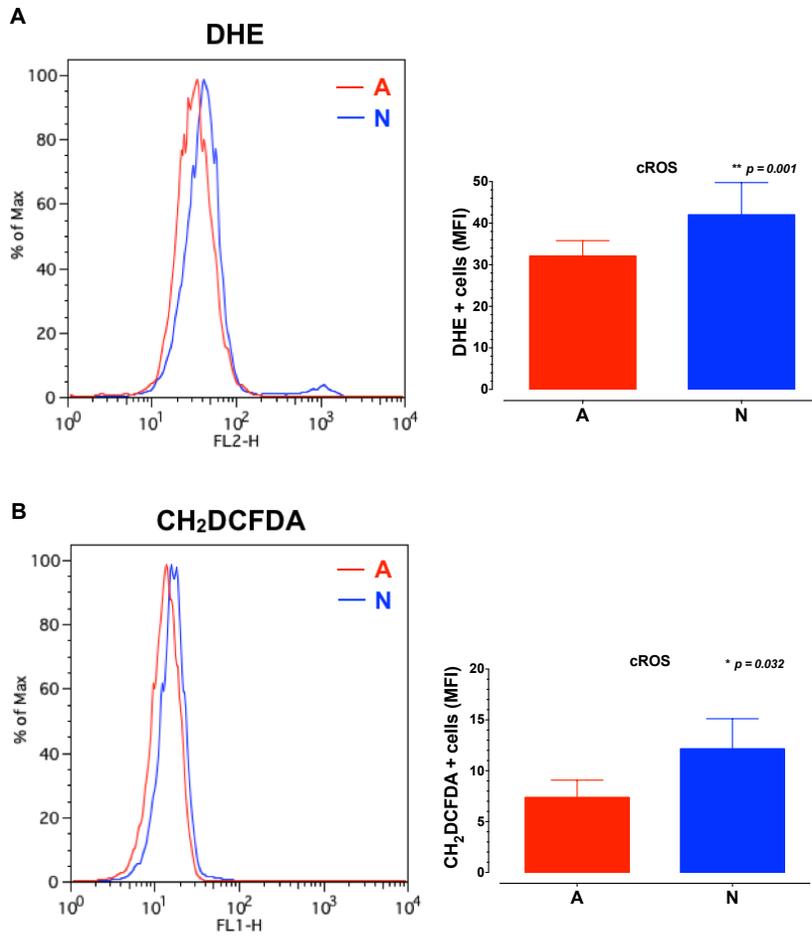


Figura 2. Los linfocitos T CD8⁺ neonatales producen mayores niveles de ROS citoplasmático en estado basal que los linfocitos T CD8⁺ de adultos. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N) y de adultos (A) se incubaron con las sondas fluorescentes DHE (en A) y CH₂DCFDA (en B). Los histogramas a la izquierda representan el patrón de fluorescencia medido por el canal FL1-H en un citómetro FACScalibur de una muestra representativa de cada grupo. En los gráficos de la derecha las barras representan los promedios de MFI y las desviaciones estándar. Para la comparación entre muestras de neonatos y adultos se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos.

Por otro lado, se utilizó el reactivo fluorescente MitoSOX Red para la medición de ROS mitocondrial (mROS). En este caso, en cada muestra se observó la presencia

de dos subpoblaciones de diferente intensidad de fluorescencia de mROS, las cuales fueron denominadas como alta y baja (**Figura 3A**). Un análisis comparativo de la frecuencia de ambas subpoblaciones detectó que las muestras neonatales tuvieron una mayor proporción de la población alta de mROS (high mROS) en comparación con las de adultos; en cambio, las muestras de adultos estuvieron más enriquecidas en la subpoblación baja de mROS (low mROS) (**Figura 3B**).

En resumen, los experimentos de medición de ROS citoplasmático y mitocondrial evidencian que los linfocitos T CD8⁺ neonatales poseen mayores niveles de ROS intracelular en comparación con los adultos en estado basal.

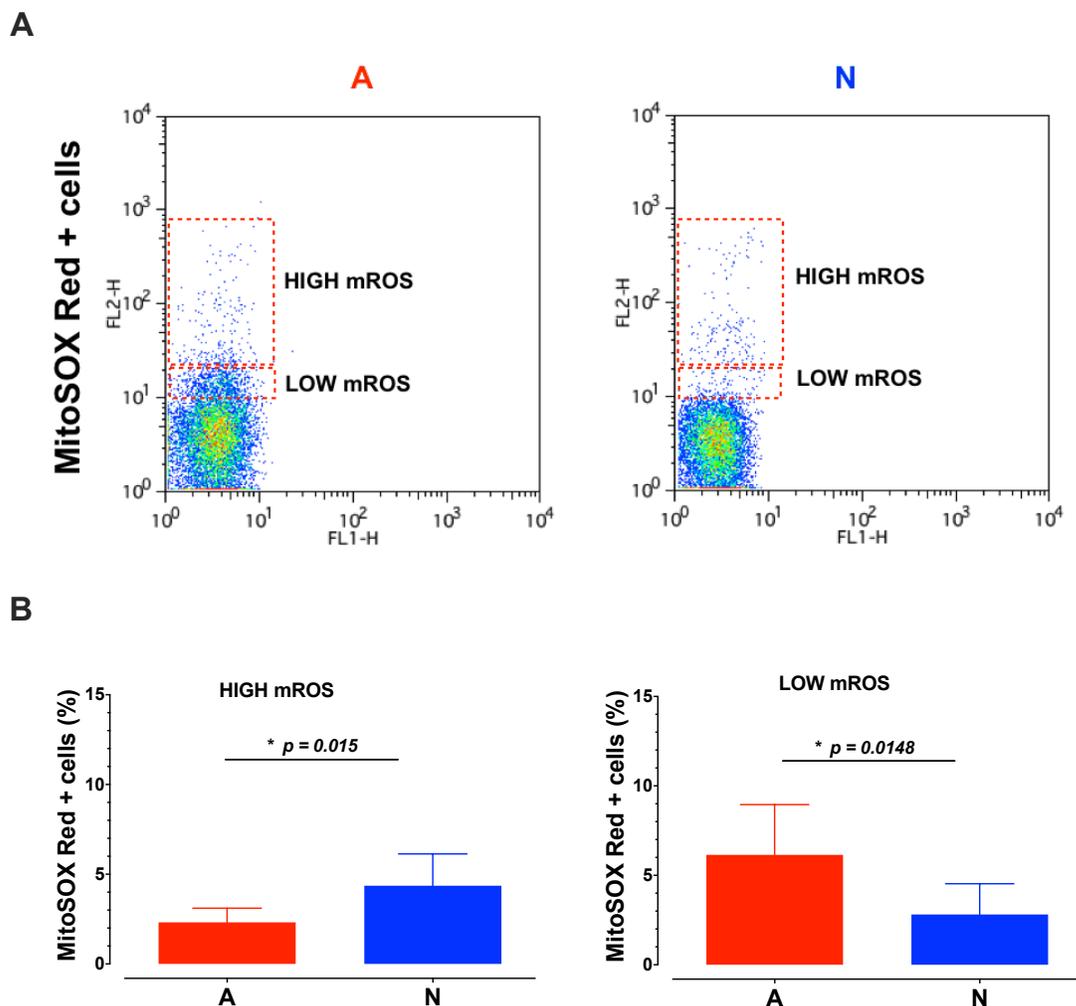


Figura 3. Las muestras de linfocitos T CD8⁺ neonatales contienen mayor proporción de células con ROS mitocondrial alto en estado basal en comparación con los linfocitos T CD8⁺ de adultos. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N) y de adultos (A) se incubaron con la sonda fluorescente MitoSOX Red y se midió su perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En los gráficos de puntos (en A) se representan las subpoblaciones seleccionadas y clasificadas como de alto (high mROS) o bajo (LOW mROS) mitocondrial en una muestra representativa de cada grupo. Los gráficos de barras (en B) representan los promedios de las frecuencias de dichas subpoblaciones y sus desviaciones estándar. Para la comparación entre muestras de neonatos y adultos se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos.

4.2. Medición de los niveles intracelulares de ROS en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos como resultado de la estimulación con TCR/CD28.

Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos se sometieron a estimulación *in vitro* durante 6 horas mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 entrecruzados, con el propósito de evaluar el impacto de la activación sobre el estado redox intracelular.

Los niveles de cROS, medidos por fluorescencia de DHE, disminuyeron ligeramente tanto en muestras de neonatos como de adultos después de la estimulación; sin embargo, esta disminución no resultó significativa al realizar los análisis estadísticos correspondientes. Por otro lado, al analizar los niveles de mROS se observó un comportamiento diferente entre las muestras de neonatos y de adultos. En las muestras de adultos se observó una ligera disminución en la frecuencia de la subpoblación de mROS alto, esta disminución no fue significativa al realizar el análisis estadístico; adicionalmente la subpoblación de mROS bajo sufrió una disminución en su proporción, la cual alcanzó diferencias significativas con respecto a los niveles previos a la estimulación. Las muestras neonatales, en cambio, incrementaron las proporciones de ambas subpoblaciones de mROS después de la

estimulación, y en ambos casos hubo diferencias significativas con respecto a las muestras de adultos. Sin embargo, dichos incrementos en los niveles de mROS de las muestras neonatales no fueron significativos al comparar con sus niveles basales respectivamente (análisis estadísticos encima de cada barra) (**Figura 4**).

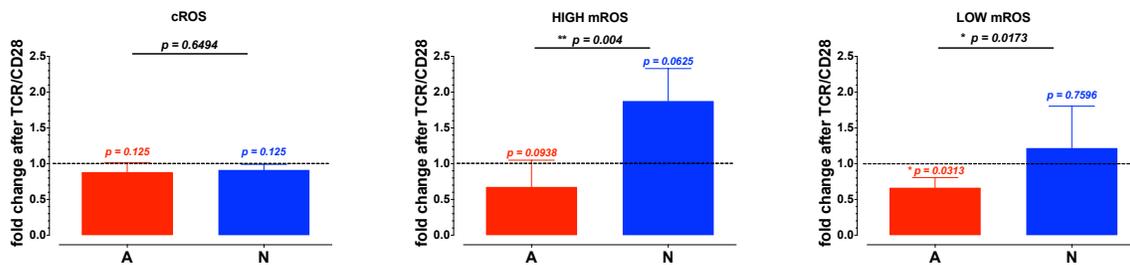


Figura 4. Los linfocitos T CD8⁺ neonatales incrementaron la producción de ROS mitocondrial como resultado de la estimulación del TCR *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N) y de adultos (A) se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* durante 6 horas y posteriormente se incubaron con las sondas fluorescentes DHE o MitoSOX Red, luego se analizó su perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. Los gráficos de barras representan el cambio con respecto a los niveles basales (líneas punteadas) de los promedios de MFI, para el caso del ROS citoplasmático (cROS) o de la frecuencia de las subpoblaciones de alto (HIGH mROS) o bajo (LOW mROS) ROS mitocondrial y las desviaciones estándar de cada grupo. Para la comparación entre muestras de neonatos y adultos se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos y fuente negra encima de ambas barras. Para el análisis de la comparación entre muestras del mismo grupo con respecto al nivel basal se aplicó el test Wilcoxon para muestras pareadas, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos y fuente del mismo color del grupo encima de cada barra.

En resumen, la estimulación del TCR tiene un impacto diferente en la modulación del estado redox intracelular de los linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos. Las células neonatales incrementaron significativamente su producción de ROS mitocondrial, mientras que en las células de adultos se redujo.

4.3. Medición de los niveles de expresión genética de canales iónicos en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos como resultado de la estimulación con TCR/CD28.

Los linfocitos T CD8⁺ neonatales mostraron un perfil epigenético y de transcripción diferente en comparación con las células de adultos en estado basal en un estudio previo (Galindo-Albarrán, et al., 2016). Dentro del conjunto de genes diferencialmente expresados se encontraron genes de citotoxicidad, factores transcripcionales, transportadores, enzimas de la glicólisis y canales iónicos. Para este trabajo se decidió analizar la regulación de la expresión de un conjunto de dichos genes, como resultado de la estimulación *in vitro* durante 6 horas. Las muestras se sometieron a extracción de RNA total y se emplearon cebadores específicos para amplificar y detectar los niveles de los genes en estudio mediante PCR cuantitativo en tiempo real. Se analizaron los genes de los canales iónicos KCa3.1, Kv1.3 y Hv1; y de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa CYBB y NCF1. Para cada gen se desarrolló una curva estándar con el propósito de determinar la eficiencia de los cebadores y obtener una ecuación de la recta (**Anexo 1**).

El canal de potasio dependiente de calcio intracelular KCa3.1 tuvo niveles de expresión basal diferentes entre linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. En las muestras neonatales evaluadas la expresión basal previa a la estimulación tuvo una distribución más homogénea que en las muestras de adultos, y se observó una tendencia a que los niveles de expresión fueran mayores en las muestras de neonatos; este resultado corrobora las evidencias del análisis de transcriptoma para la expresión basal de este gen (Galindo-Albarrán, et al., 2016). La estimulación con anti-CD3/anti-CD28 no cambió notablemente los niveles basales de expresión de KCa3.1 en las muestras evaluadas, sin embargo, se puede observar una tendencia a la disminución en los niveles de expresión en una de las muestras de adulto y en dos de las muestras neonatales (**Figura 5A**).

El canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3 tuvo niveles de expresión más heterogéneos en estado basal, tanto en muestras de neonatos como de adultos. La estimulación con anti-CD3/anti-CD28 indujo una tendencia a disminución de la expresión en 2 de las muestras neonatales, y un incremento pequeño en la tercera; por otro lado, en dos de las muestras de adultos se logró observar un incremento notable en la expresión del canal Kv1.3 luego de la estimulación, mientras que la tercera no cambió su estado basal (**Figura 5B**).

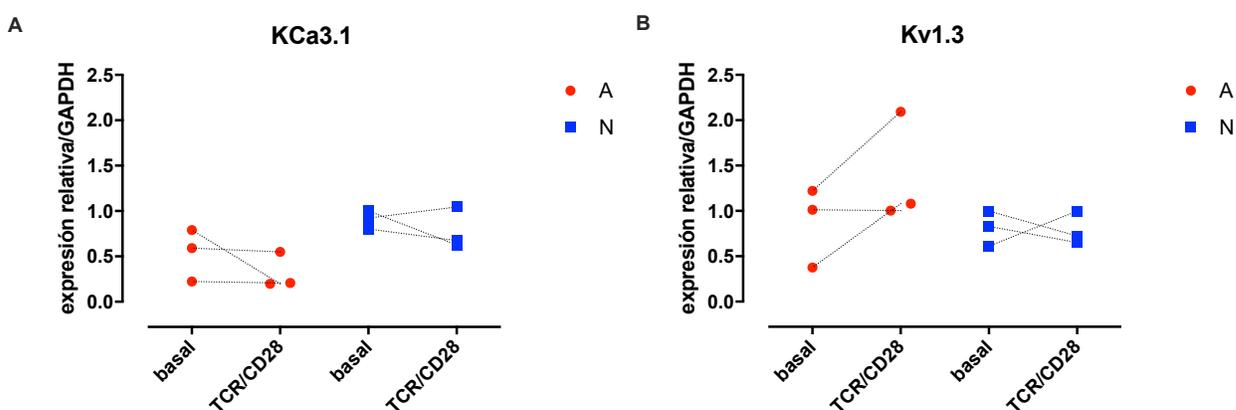


Figura 5. La expresión de mRNA de los canales de potasio Kca3.1 y Kv1.3 no se modificó como resultado de la estimulación del TCR *in vitro* en linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N, cuadros azules) y de adultos (A, esferas rojas) se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* durante 6 horas, posteriormente se extrajo su RNA total y se midió la expresión de mRNA de los canales iónicos KCa3.1 (en A) y Kv1.3 (en B) mediante qPCR. Los gráficos representan la expresión relativa de cada canal antes (basal) y después de la estimulación (TCR/CD28), el mRNA de la enzima GAPDH fue empleado como referencia para normalización.

El canal de protones Hv1 tuvo niveles de expresión en estado basal más homogéneos en las muestras de neonatos que en las de los adultos. En las muestras de adultos se observó una marcada disminución en su expresión como resultado de la estimulación con anti-CD3/anti-CD28. En las muestras de neonatos, en cambio, se detectó un incremento notable en su expresión como resultado de la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 (**Figura 6**).

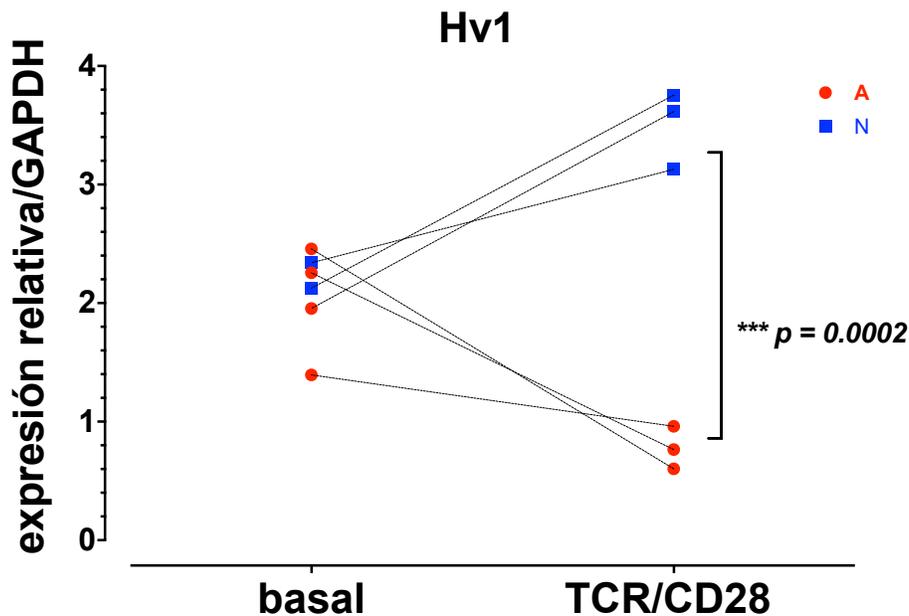


Figura 6. La expresión de mRNA del canal de protones Hv1 se incrementó en linfocitos T CD8⁺ neonatales y disminuyó en linfocitos T CD8⁺ de adultos como resultado de la estimulación del TCR *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N, cuadros azules) y de adultos (A, esferas rojas) se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* durante 6 horas, posteriormente se extrajo su RNA total y se midió la expresión de mRNA del canal iónico Hv1 mediante qPCR. En el gráfico se representa la expresión relativa del canal antes (basal) y después de la estimulación (TCR/CD28), el mRNA de la enzima GAPDH fue empleado como referencia para normalización. Para la comparación entre muestras de neonatos y adultos se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con asteriscos.

Posteriormente, se procedió a medir la expresión de mRNA de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa CYBB y NCF1. Las muestras neonatales tuvieron una expresión basal muy heterogénea de ambos genes, y esta heterogeneidad se mantuvo después de las 6 horas de estimulación; debido a esto no se logró determinar un patrón claro ni una tendencia concreta de regulación de la expresión de estos genes en función de la activación. Por otro lado, las muestras de adultos tuvieron un patrón de expresión más homogéneo en ambos genes. Para el gen CYBB se logra ver una tendencia a un incremento de su expresión luego de la

activación, y para el gen NCF1 se logra ver una tendencia a disminuir su expresión luego de la activación (**Figura 7 A y B**).

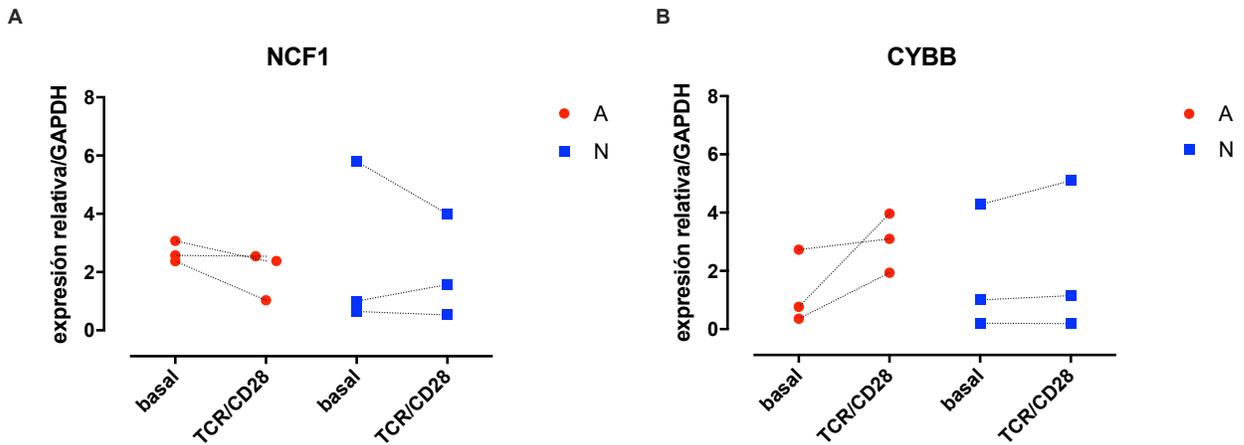


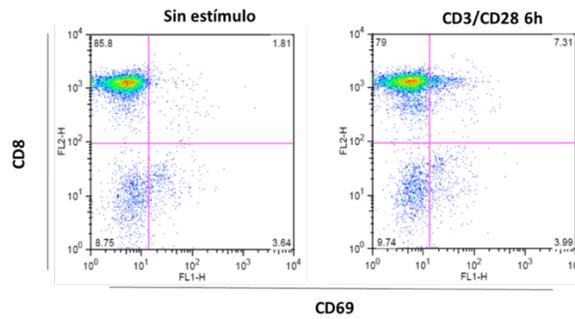
Figura 7. La expresión de mRNA de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa NCF1 y CYBB no se modificó como resultado de la estimulación del TCR *in vitro* en linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N, cuadros azules) y de adultos (A, esferas rojas) se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* durante 6 horas, posteriormente se extrajo su RNA total y se midió la expresión de mRNA de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa NCF1 (en A) y CYBB (en B) mediante qPCR. Los gráficos representan la expresión relativa de cada canal antes (basal) y después de la estimulación (TCR/CD28), el mRNA de la enzima GAPDH fue empleado como referencia para normalización.

Este conjunto de resultados demuestra que la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 está asociada con una regulación diferente de la expresión del canal de protones Hv1 a nivel de mRNA entre linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. Las células neonatales incrementaron su expresión del canal, a diferencia de las muestras de adultos, en las que se observó una disminución de la expresión.

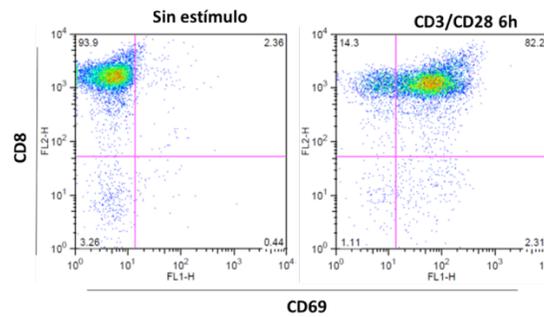
4.4. Medición del potencial de activación de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos como resultado de la estimulación con TCR/CD28.

Con el objetivo de evaluar la estimulación de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos, después de las 6 horas se tiñeron las células con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD69. Las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur, se contaron un total de 10 000 células en cada muestra, y se comparó la frecuencia de células positivas para el marcador CD69 (canal FL1) del total de células positivas para CD8 (canal FL2). En la **Figura 8A** y **8B** se muestra un ejemplo representativo de células T CD8⁺ de neonato y de adulto respectivamente, teñidas con el marcador CD69 antes y después de la estimulación. En la **Figura 8C** se observa la comparación del incremento en la intensidad de fluorescencia o en la frecuencia de células positivas para CD69 en muestras de neonatos y adultos, antes y después de la estimulación. En estado basal, antes de la estimulación, se observó una baja intensidad de fluorescencia y baja frecuencia de células positivas para CD69 tanto en muestras neonatales como en las de adulto. Luego de las 6 horas de estimulación, se observó un incremento notable en la intensidad de fluorescencia, con una media de 51.8; así como también en la frecuencia de células CD69⁺, con una media de 50.66 % en las muestras de adultos. En cambio, este incremento fue menos marcado en las muestras neonatales, las cuales se mantuvieron en valores similares a los basales.

A) Neonato



B) Adulto



C)

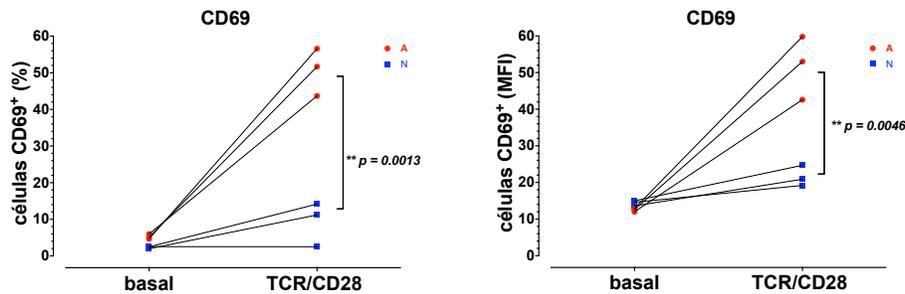


Figura 8. La expresión del marcador de activación CD69 se incrementó en linfocitos T CD8⁺ de adultos como resultado de la estimulación del TCR *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N, cuadros azules) y de adultos (A, esferas rojas) se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* durante 6 horas. Posteriormente las células se tiñeron con los anticuerpos anti-CD8 conjugado a PE y anti-CD69 conjugado a FITC, y se midió el perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En los incisos A y B se muestra una réplica biológica representativa de cada grupo de neonatos y adultos, respectivamente. En el inciso C se muestran las comparaciones de la frecuencia de las poblaciones (a la izquierda) y la MFI (a la derecha), antes (basal) y después de la estimulación (TCR/CD28). Para la comparación entre muestras de neonatos y adultos se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos.

En un experimento adicional se decidió evaluar la relación entre la expresión del marcador de activación CD69 y los niveles de ROS mitocondrial de manera simultánea en las muestras neonatales. Con este propósito se tiñeron los linfocitos T CD8⁺ neonatales con el anticuerpo anti-CD69 conjugado a FITC, y posteriormente se incubaron con el reactivo MitoSOX Red; finalmente las muestras se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Se definieron dos subpoblaciones diferentes caracterizadas por los niveles de ROS mitocondrial y CD69. El análisis de dichas subpoblaciones permitió detectar diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia y en la frecuencia de CD69. La subpoblación de bajo nivel de ROS mitocondrial (mROS-) tuvo mayores niveles de expresión de CD69 en comparación con la subpoblación positiva para ROS mitocondrial (mROS+) (**Figura 9**). En las muestras de adultos no fue posible realizar la comparación análoga debido a que la subpoblación de ROS mitocondrial alto se redujo notablemente como resultado de la estimulación.

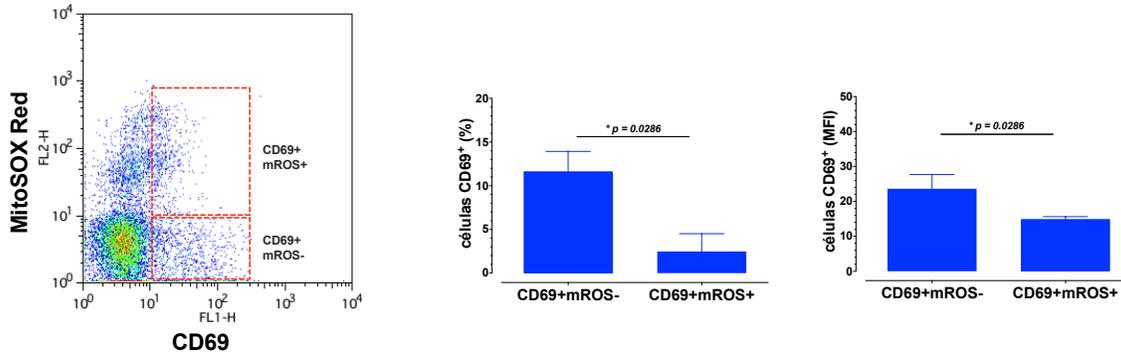


Figura 9. Los linfocitos T CD8⁺ neonatales de alta producción de ROS mitocondrial desarrollaron menor expresión del marcador de activación CD9 como resultado de la estimulación del TCR *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* durante 6 horas. Posteriormente las células se tiñeron con el anticuerpo anti-CD69 conjugado a FITC, y con la sonda fluorescente MitoSOX Red, y se midió el perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En el gráfico de puntos de la izquierda se muestran las subpoblaciones seleccionadas y clasificadas como positivas para la expresión de CD69 y de alta producción de ROS mitocondrial (CD69+mROS+) o como positivas para la expresión de CD69 y de baja producción de ROS mitocondrial (CD69+mROS-), en una réplica biológica representativa. Los gráficos de barras de la derecha representan los promedios de las frecuencias o de MFI de la

expresión de CD69 en dichas subpoblaciones y sus desviaciones estándar. Para la comparación entre las subpoblaciones se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos.

Los resultados anteriores sugieren que el estado redox intracelular de los linfocitos T CD8⁺ neonatales, caracterizado por altos niveles de ROS citoplasmático y mitocondrial, tiene una marcada influencia negativa en la posterior activación inducida por la estimulación del TCR.

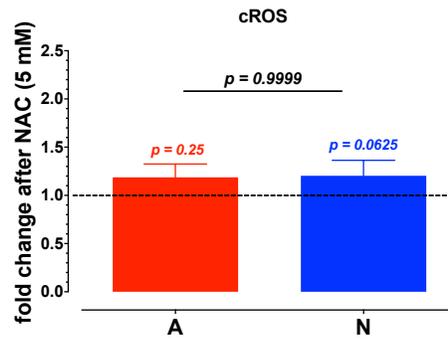
4.5. Modulación de los niveles intracelulares de ROS de linfocitos T CD8⁺ mediante el uso del fármaco antioxidante N-Acetyl-L-Cysteine (NAC).

Una vez conocidos los niveles intracelulares de ROS de linfocitos T CD8⁺ en estado basal y como resultado de la estimulación del TCR, se procedió a evaluar la posibilidad de modularlos mediante el uso de un agente antioxidante. Existen diferentes compuestos que, por su naturaleza química, pueden interaccionar directamente con los componentes de la maquinaria intracelular de detoxificación redox y modificar su grado de oxidación. El fármaco N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) es frecuentemente empleado con estos fines, debido a que constituye un precursor de la síntesis *de novo* del glutatión.

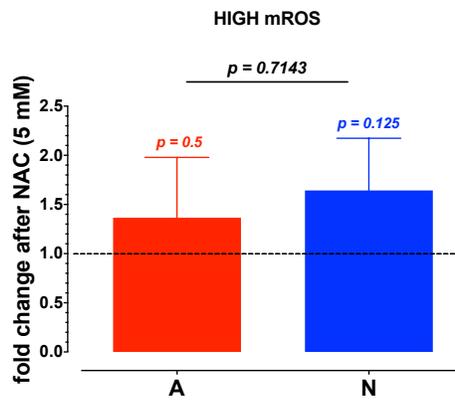
Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos se incubaron durante 1 h con NAC a una concentración de 5 mM, seguidamente se lavaron 2 veces con solución de FACS y luego se cargaron con MitoSOX Red o DHE como se describió anteriormente. El tratamiento con NAC no modificó significativamente los niveles de ROS intracelular en los linfocitos neonatales y tampoco en los de adulto. Para el caso de ROS citoplasmático ambos grupos muestrales mostraron una tendencia al incremento; y un efecto similar se detectó en la subpoblación de ROS mitocondrial alto. En cambio, para el caso de la subpoblación de ROS mitocondrial bajo, las

muestras de adulto mostraron una tendencia a disminuir y las muestras neonatales a aumentar bajo el efecto del tratamiento con NAC (Figura 10 A, B y C).

A)



B)



C)

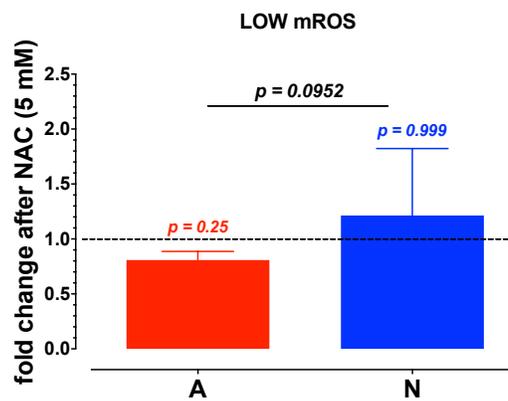


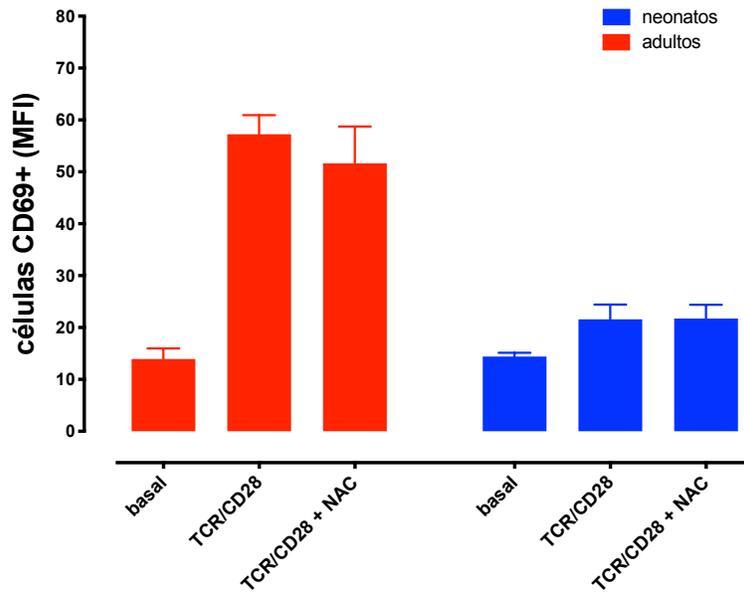
Figura 10. El tratamiento con NAC *in vitro* no modifica la producción de ROS intracelular en linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N) y de adultos (A) se trataron con 5 mM de NAC *in vitro* durante 1 hora y posteriormente se incubaron con las sondas fluorescentes DHE o MitoSOX Red, luego se analizó su perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. Los gráficos de barras representan el cambio con respecto a los niveles basales (líneas punteadas) de los promedios de MFI, para el caso del ROS citoplasmático (cROS) (en A) o de la frecuencia de las subpoblaciones de alto (HIGH mROS) (en B) o bajo (LOW mROS) ROS mitocondrial (en C) y las desviaciones estándar de cada grupo. Para la comparación entre muestras de neonatos y adultos se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos y fuente negra encima de ambas barras. Para el análisis de la comparación entre muestras del mismo grupo con respecto al nivel basal se aplicó el test Wilcoxon para muestras pareadas, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos y fuente del mismo color del grupo encima de cada barra.

Por otro lado, se desarrollaron experimentos de estimulación del TCR de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos bajo la influencia del tratamiento previo con NAC. Los linfocitos se incubaron con NAC a una concentración de 5 mM durante 1 hora, y posteriormente se adicionaron los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 seguidos de un anticuerpo anti-IgG de ratón para entrecruzar. Pasadas 6 horas se colectaron las células y se evaluó la expresión del marcador de activación CD69 mediante citometría de flujo como se describió previamente.

El tratamiento con NAC no modificó significativamente el efecto de la estimulación del TCR en células de adultos y tampoco en las neonatales. De manera particular, para el caso de las muestras de adulto se observó una tendencia a la disminución de los niveles de expresión de CD69 al emplear NAC como tratamiento previo a la estimulación del TCR (**Figura 11**). En necesario señalar que en estas muestras la expresión de CD69 se midió 7 horas después del tratamiento con NAC, por lo que es muy probable que el efecto de este fármaco se haya disipado. Se requiere evaluar el efecto de NAC en linfocitos T CD8⁺ en otras condiciones, como por ejemplo en intervalos de tiempo más tempranos o a dosis mayores, para poder

extraer conclusiones certeras sobre su efecto en la activación de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

A)



B)

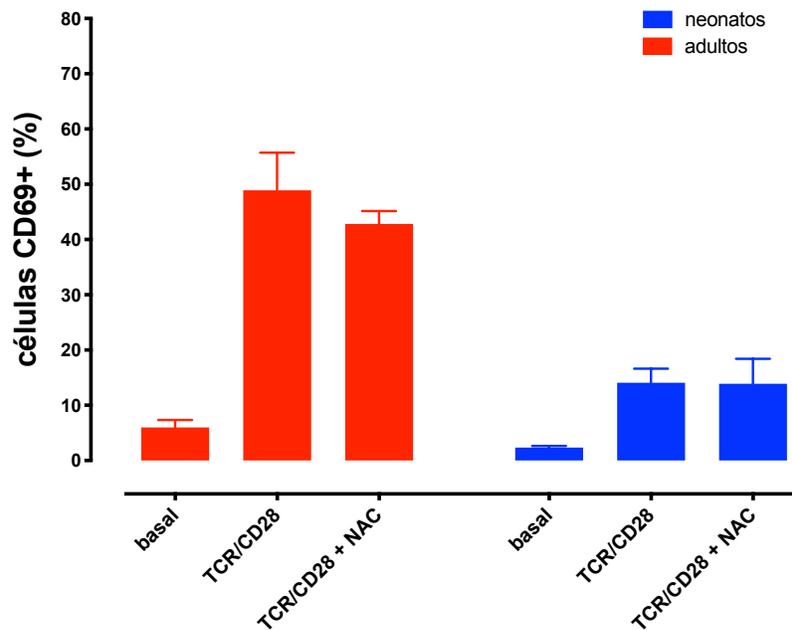
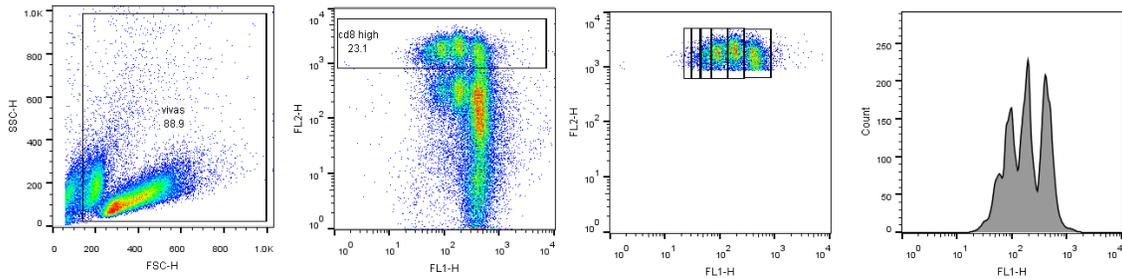


Figura 11. El tratamiento con NAC *in vitro* no modifica los niveles de expresión del marcador de activación CD69 como resultado de la estimulación del TCR en linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos. Los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (N) y de adultos (A) se trataron con 5 mM de NAC *in vitro* durante 1 hora y posteriormente se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* durante 6 horas. Seguidamente las células se tiñeron con el anticuerpo anti-CD69 conjugado a FITC, y se midió el perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En los gráficos de barras se muestran las comparaciones de la expresión de CD69 medido como la frecuencia de las poblaciones (en A) y como MFI (en B), antes (basal), después de la estimulación (TCR/CD28), y bajo el efecto del tratamiento previo con NAC (TCR/CD28 + NAC). Para el análisis de la comparación entre muestras del mismo grupo con respecto al nivel basal se aplicó el test Wilcoxon para muestras pareadas, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos y fuente del mismo color del grupo encima de cada barra.

4.6. Medición del potencial de proliferación de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos como resultado de la estimulación con TCR/CD28.

Por otro lado, se decidió evaluar la influencia del estado redox intracelular de las células neonatales y de adultos en el potencial proliferativo bajo el efecto de la estimulación con anti-CD3/anti-CD28. Para esto se emplearon células PBMC de 4 donantes y CBMC de 3 donantes, teñidas con 2.5 μM de CFDA-SE, las cuáles se estimularon con anti-CD3/anti-CD28 y se incubaron durante 96 horas al cabo de las cuales se midió la proliferación; paralelamente se midió la proliferación de células no estimuladas. En la **Figura 12** se puede ver un ejemplo de la proliferación de células PBMC de uno de los donantes adultos inducida por la estimulación al cabo de las 96 horas.

A) Con estímulo



B) Sin estímulo

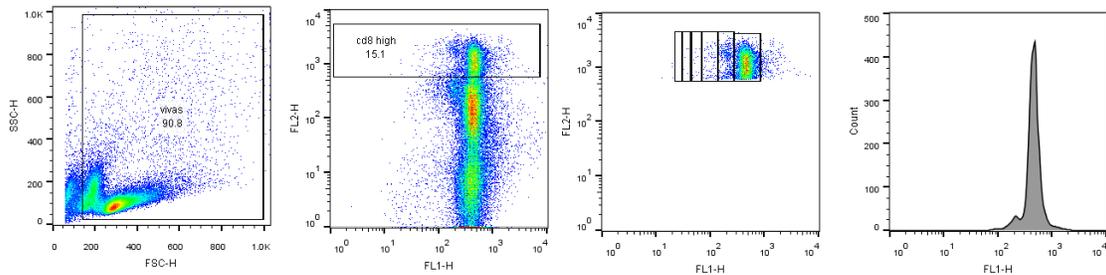
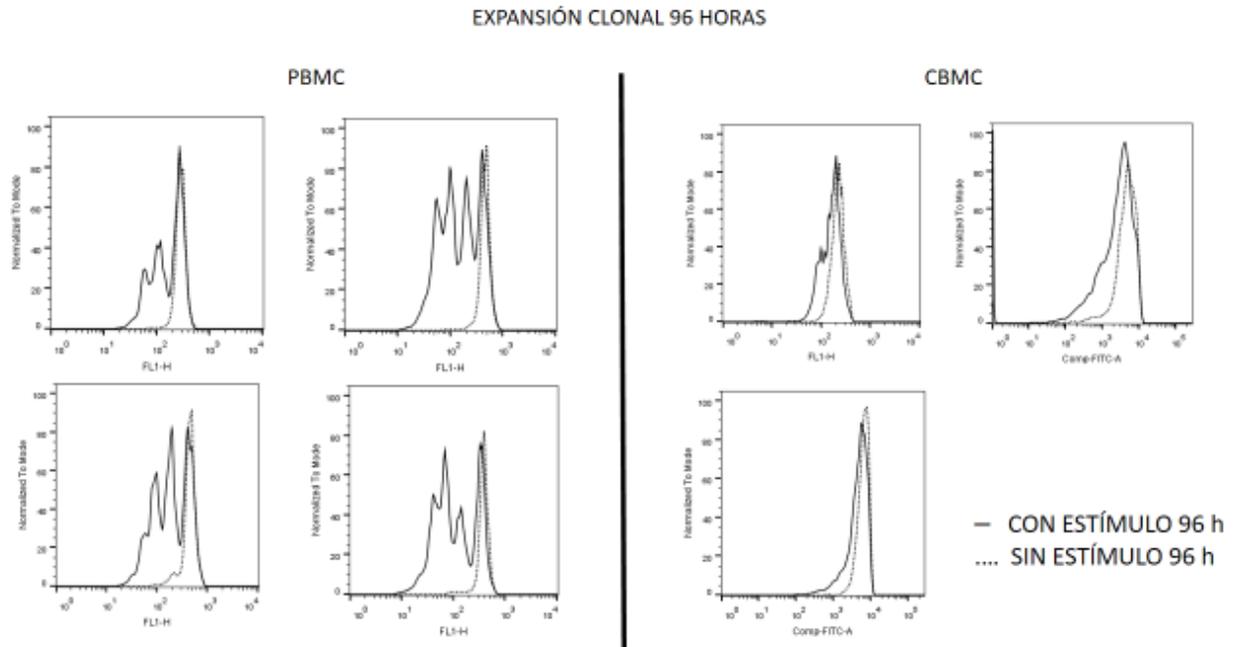


Figura 12. Los linfocitos T CD8⁺ de adultos mostraron alto potencial proliferativo como resultado de la estimulación del TCR *in vitro*. Las células PBMC de un donante adulto se incubaron con 2.5 μ M de la sonda fluorescente CFDA-SE y a continuación se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro* (A) o se dejaron sin estímulo (B) durante 96 horas. Posteriormente se tiñeron con un anticuerpo anti-CD8 conjugado al fluoróforo PE y se evaluó su perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En cada panel de izquierda a derecha se muestra la estrategia de selección de subpoblaciones empleada hasta llegar a las generaciones de linfocitos derivadas de la subpoblación original. En los gráficos de histogramas cada pico de derecha a izquierda representa una nueva generación de células derivadas de la generación representada por el pico anterior.

La estimulación con anti-CD3/anti-CD28 indujo una notable expansión clonal de las células PBMC al cabo de las 96 horas, se pueden observar en las muestras de cada donante varios picos de diferente fluorescencia de CFDA-SE correspondientes a las nuevas generaciones celulares, se logró detectar que las células PBMC llegan hasta la quinta generación pasadas 96 horas desde la estimulación. En cambio, las células CBMC no proliferaron en el mismo grado como resultado de la estimulación, y se

puede observar que el número de divisiones fue mucho menor en comparación con las PBMC (Figura 13 A y B).

A)



B)

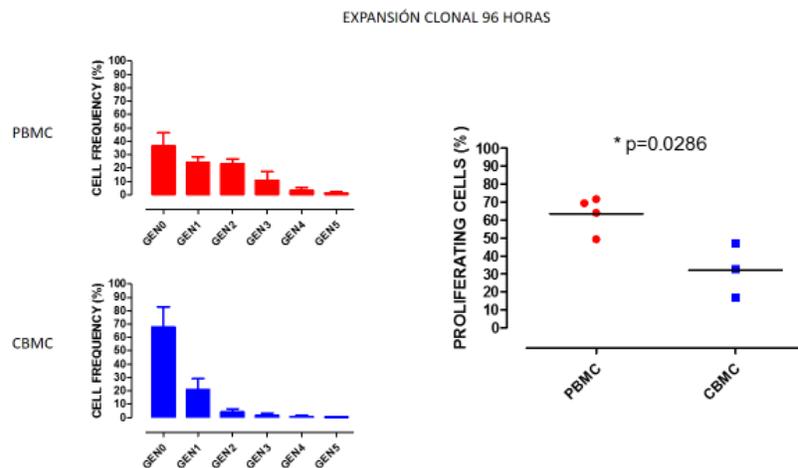
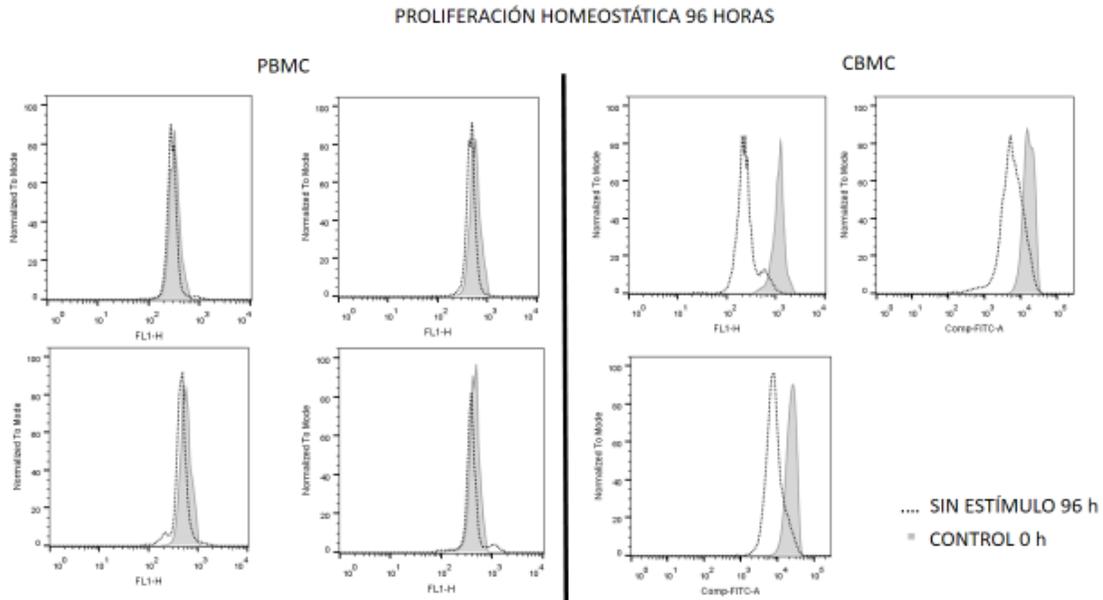


Figura 13. Las células PBMC mostraron una mayor tasa de expansión clonal inducida por la estimulación del TCR *in vitro* en comparación con las CBMC. Las células PBMC de 4 donantes adultos y CBMC de 3 neonatos se incubaron con 2.5 μ M de la sonda fluorescente CFDA-SE y a

continuación se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 *in vitro*, o se dejaron sin estímulo durante 96 horas. Posteriormente se evaluó su perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En los gráficos de histogramas (A) cada pico de derecha a izquierda representa una nueva generación de células derivadas de la generación representada por el pico anterior. En los gráficos de barras (B) se representa la media de la proporción, en porcentaje, de células en cada generación (Gen 0-5), y sus respectivas desviaciones estándar. Para la comparación entre las subpoblaciones de células en proliferación de cada grupo se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos.

Por otro lado, se observó que las células CBMC que no recibieron estímulo al cabo de las 96 horas disminuyeron su fluorescencia de CFDA-SE en comparación con el momento inicial de la tinción. Este fenómeno no se observó en las células PBMC no estimuladas e incubadas por 96 horas, las cuales mantuvieron los mismos niveles de fluorescencia de CFDA-SE que en el momento inicial de la tinción. Este fenómeno es particular de las muestras neonatales y puede ser explicado por la ocurrencia de proliferación homeostática, o sea, la proliferación celular que ocurre en ausencia de la estimulación. Estos resultados indican que la tasa de proliferación homeostática es mayor en las muestras neonatales en comparación con las de adulto (**Figura 14**).

A)



B)

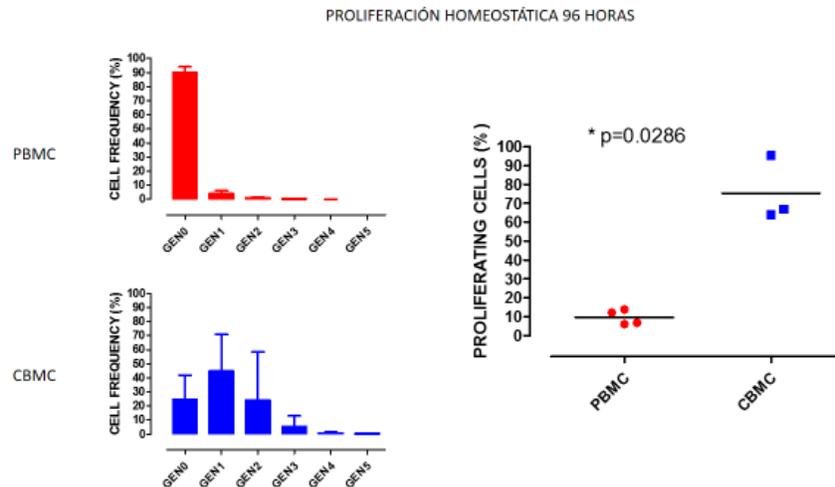


Figura 14. Las células CBMC mostraron una mayor tasa de proliferación homeostática *in vitro* en comparación con las PBMC. Las células PBMC de 4 donantes adultos y CBMC de 3 neonatos se incubaron con 2.5 μM de la sonda fluorescente CFDA-SE y a continuación se dejaron sin estímulo durante 96 horas. Posteriormente se evaluó su perfil de fluorescencia en un citómetro FACScalibur. En los gráficos de histogramas (A) cada pico de derecha a izquierda representa una nueva generación de células derivadas de la generación representada por el pico anterior. En los gráficos de barras (B) se representa la media de la proporción, en porcentaje, de células en cada generación

(Gen 0-5), y sus respectivas desviaciones estándar. Para la comparación entre las subpoblaciones de células en proliferación de cada grupo se aplicó el test U de Mann Whitney, las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ y se representan con uno o varios asteriscos.

Los resultados anteriores en conjunto sugieren diferencias marcadas en el potencial de proliferación de las células neonatales y las de adultos. Las células de neonatos responden mejor ante condiciones de proliferación homeostática, mientras de las células de adultos proliferan más en presencia de estímulos a través del TCR.

4.7. Construcción de un modelo computacional para el estudio de la interacción entre el metabolismo redox y la activación de los linfocitos T CD8⁺.

Con el propósito de estudiar la influencia recíproca entre el metabolismo redox y la activación de linfocitos T, se integraron datos de la literatura con mediciones experimentales recientes y con un modelo computacional de la señalización del TCR de nuestro grupo, ya existente (Rodríguez-Jorge, et al., 2019). El nuevo modelo computacional contiene 111 nodos y 244 interacciones o arcos (**Figura 15**). Los nodos se agruparon en 3 categorías principales: nodos mitocondriales (arriba a la izquierda), nodos de señalización temprana del TCR (arriba a la derecha), y nodos citoplasmáticos (al centro y abajo a la derecha). Adicionalmente se definió un código de colores para el tipo de nodo: verde para denotar los componentes de entrada, gris para representar las rutas metabólicas, rosa para los ROS o sus fuentes, amarillo para componentes sensibles a la oxidación, magenta para los nodos de salida, y violeta para representar los fenotipos alternativos de quiescencia, anergia, anergia metabólica y activación. Por otro lado, los nodos de forma elíptica denotan componentes booleanos, que solamente pueden tomar los valores 0 ó 1; y los nodos rectangulares denotan componentes ternarios, que pueden tomar los valores 0, 1 ó 2. Los arcos de color verde representan influencias regulatorias positivas, y los de color rojo representan las influencias regulatorias negativas. El modelo completo

con anotaciones específicas se puede consultar en el siguiente link:
<http://ginsim.org/node/229> (ver también el **Anexo 2** de este documento).

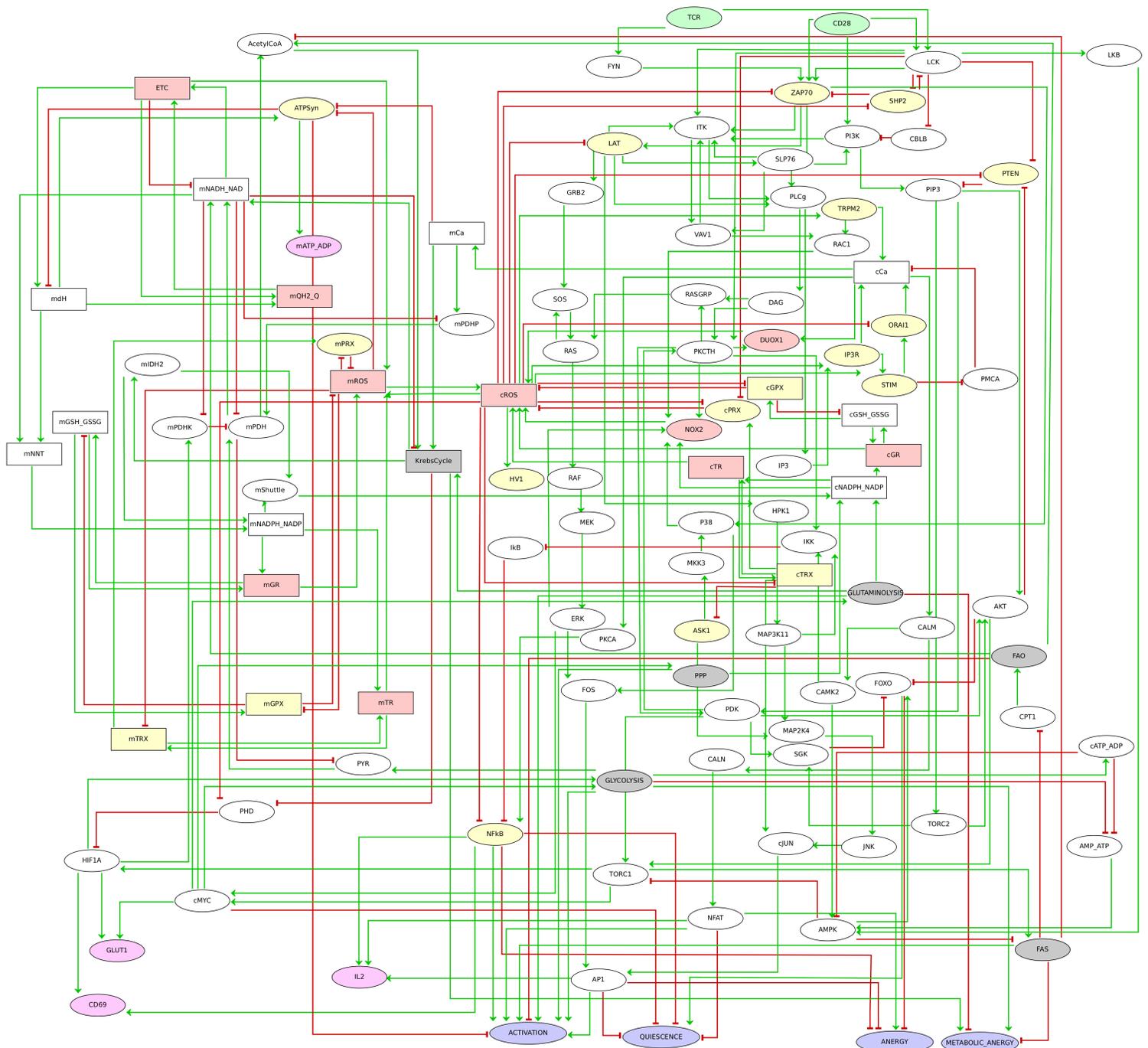


Figura 15. Gráfico regulatorio lógico del modelo TCR-REDOX-METABOLISM. Para el diseño y construcción del modelo se utilizó el programa GINSim (<http://ginsim.org>). Los nodos se pueden

dividir en tres categorías principales: nodos mitocondriales (arriba a la izquierda), nodos de señalización del TCR (arriba a la derecha), nodos componentes del citosol (centro a la derecha y abajo a la derecha). Un código de color denota además el tipo de nodo: verde (entrada), gris (vía metabólica), rosa (fuente de ROS o ROS), amarillo (sensible a ROS), magenta (salida) y violeta (fenotipo). Las formas elípticas denotan nodos booleanos (toman los valores 0 o 1), mientras que las formas rectangulares denotan nodos multinivel (ternarios) (toman los valores 0, 1 o 2). Los arcos que conectan los nodos representan influencias reguladoras positivas (verdes) o negativas (rojas). Información adicional sobre las reglas lógicas y los umbrales de activación se puede encontrar disponible en línea (<http://ginsim.org/node/229>).

El análisis de los estados estables del modelo permite detectar que en ausencia de las señales de estimulación (TCR ó CD28) las células permanecen en los estados de quiescencia o de anergia metabólica. Por otro lado, en presencia del estímulo combinado (TCR/CD28) las células se activan; sin embargo, si existen altos niveles de ROS no se logra alcanzar la activación y las células permanecen anérgicas (**Figura 16A**).

El software GINsim permite el análisis de los estados estables bajo condiciones específicas, o perturbaciones, en las que se mantienen fijos los niveles de determinados nodos, simulando inhibiciones o expresiones ectópicas de algún componente de señalización.

Al mantener fijos los niveles elevados de ROS mitocondrial o citoplasmáticos se logró detectar que no se alcanzan los estados de activación aún con las señales de estimulación (TCR/CD28), sino que las células se mantienen anérgicas (**Figura 16B**). Un efecto similar se obtuvo al mantener bloqueada la ruta de la Glutaminólisis, la cual favorece la entrada de esqueletos carbonados al Ciclo de Krebs (**Figura 16C**).

A

No perturbations

	TCR	CD28	HV1	mCa	mROS	cCa	cROS	GLYCOLYSIS	FAO	FAS	GLUTAMINOLYSIS	PPP	KREBS CYCLE	ETC	ATPSYN	AP1	NFKB	NFAT	IL2	CD69	QUIESCENCE	ACTIVATION	ANERGY	METABOLIC ANERGY
0	*	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
0	*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	0	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	2	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1	1	0	2	1	2	1	1	0	1	1	1	1	2	2	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0

B

Perturbation:

mROS:2 (maximum)
cROS:2 (maximum)

	TCR	CD28	HV1	mCa	mROS	cCa	cROS	GLYCOLYSIS	FAO	FAS	GLUTAMINOLYSIS	PPP	KREBS CYCLE	ETC	ATPSYN	AP1	NFKB	NFAT	IL2	CD69	QUIESCENCE	ACTIVATION	ANERGY	METABOLIC ANERGY
0	*	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
1	0	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
1	1	1	2	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

C

Perturbation:

GLUTAMINOLYSIS:0
(blocked)

	TCR	CD28	HV1	mCa	mROS	cCa	cROS	GLYCOLYSIS	FAO	FAS	GLUTAMINOLYSIS	PPP	KREBS CYCLE	ETC	ATPSYN	AP1	NFKB	NFAT	IL2	CD69	QUIESCENCE	ACTIVATION	ANERGY	METABOLIC ANERGY
0	*	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
0	*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	0	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	2	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1	1	0	2	0	2	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0

Figura 16. Los estados estables del modelo computacional recapitulan los fenotipos de linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adultos observados *in vitro*. Se utilizó el programa GINsim (<http://ginsim.org>) para calcular los estados estables del modelo en un conjunto reducido de nodos en tres escenarios diferentes: No perturbation (A); mROS: 2 o cROS: 2 (B) y GLUTAMINOLYSIS: 0 (C). Cada fila representa un estado estable. Un código de color denota el tipo de nodo: verde (entrada), gris (vía metabólica), rosa (fuente de ROS o ROS), amarillo, magenta (salida) y violeta (fenotipo). Para cada nodo las celdas en blanco (0) denotan el nivel funcional más bajo, y las celdas en gris denotan un nivel intermedio (1) o máximo (2) de actividad funcional. Las celdas en naranja y con asteriscos denotan las situaciones en que el nodo CD28 puede tomar cualquiera de los estados (0) o (1).

Posteriormente se utilizó el software MaBoSS (v2.0, (Stoll, et al., 2017)) con el objetivo de evaluar la probabilidad de alcanzar cada uno de los estados estables bajo las condiciones basales y con estimulación (TCR/CD28). Bajo estas condiciones, el modelo predice que en el escenario sin estimulación la mayoría de las células permanecen en estado quiescente y solamente el 2 % de estas desarrollan anergia metabólica; y como resultado de la estimulación el 23 % de las células se activa. Por otro lado, en presencia de niveles altos de ROS mitocondrial o citoplasmático las probabilidades de activación se reducen, el 31% ó 25% de las células desarrollan anergia metabólica, y solamente el 15% logra alcanzar el estado de activación (Figura 17).

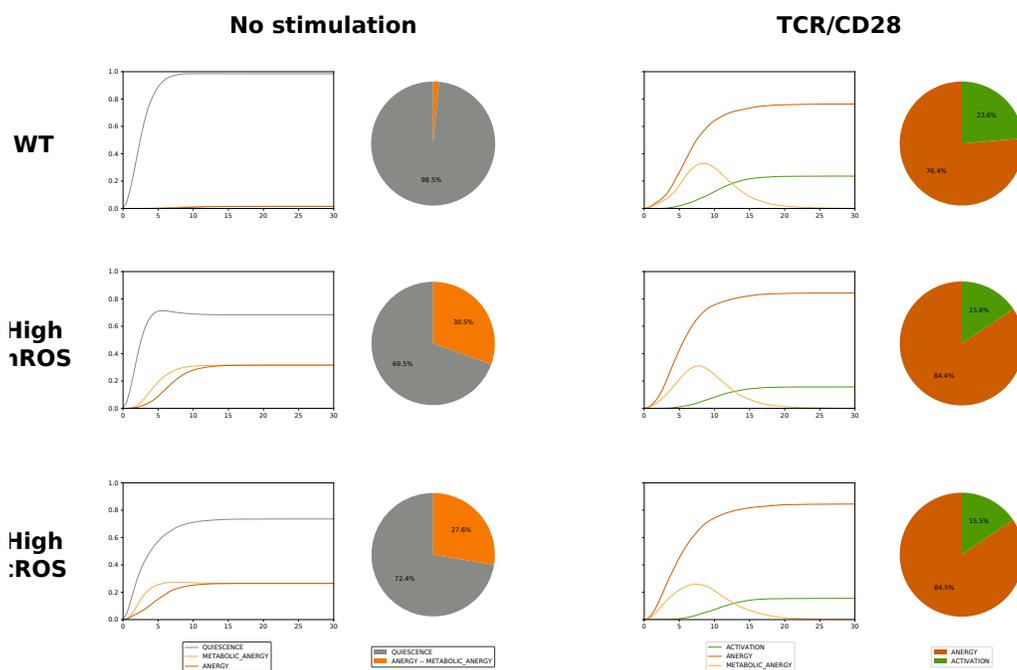


Figura 17. Las simulaciones estocásticas predicen un impacto negativo de altos niveles de ROS intracelular sobre el potencial de activación en linfocitos T CD8⁺. Se utilizó la herramienta MaBoSS (<https://maboss.curie.fr/>), para evaluar la accesibilidad de algunos de los nodos fenotípicos del modelo antes (No stimulation) y después de la estimulación (TCR/CD28), en diferentes condiciones o estados redox: niveles bajos de ROS (WT), niveles altos de ROS mitocondrial (High mROS) o niveles altos de ROS citoplasmático (High cROS). Los gráficos de pastel representan la frecuencia o probabilidad de cada fenotipo, los gráficos de líneas representan la evolución de cada nodo fenotípico en el tiempo de la simulación.

En resumen, las simulaciones del modelo computacional predicen un impacto notable del estado redox intracelular en la activación de las células T. En condiciones de altos niveles de ROS intracelular se dificulta la estimulación de varias rutas metabólicas importantes para lograr el estado activado de los linfocitos T, lo cual los predispone a adquirir un fenotipo anérgico.

5. Discusión

El metabolismo energético tiene una influencia muy importante en la homeostasis y la regulación de la respuesta de las células inmunes. Diversos estudios han abordado este aspecto en los escenarios *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, en lo relacionado con la inmunidad neonatal la información disponible es escasa. Los hallazgos y evidencias derivadas del presente trabajo sugieren que los linfocitos T CD8⁺ neonatales poseen un perfil metabólico y de señalización muy particular, lo cual los pone en desventaja y provoca una baja respuesta a la estimulación.

Los linfocitos T CD8⁺ neonatales mostraron niveles basales muy altos de especies reactivas de oxígeno, los cuales se incrementan como resultado de la estimulación del TCR; este comportamiento fue esencialmente diferente al de las células de adulto. Los niveles moderados de especies reactivas de oxígeno favorecen el proceso de activación de los linfocitos T, particularmente se ha demostrado un impacto directo de la señalización redox en la inhibición de las fosfatasa SHP1 y SHP2, que participan como reguladores negativos de la señalización temprana del TCR. Adicionalmente, existen evidencias de un impacto positivo de la señalización redox en la activación del factor transcripcional NFκB. Un ambiente intracelular altamente oxidado en cambio, provocado por estrés oxidativo o reductivo, tiene un impacto negativo e irreversible en el estado de oxidación de varias proteínas de señalización temprana del TCR, como LAT y Zap70; por otro lado, los niveles muy altos de especies reactivas de oxígeno pueden afectar la estabilidad mitocondrial y conducir a la formación del poro mitocondrial, el cual es una de las señales iniciales que desencadenan el inicio de la apoptosis (Simeoni, & Bogeski, 2015).

El ion Ca²⁺ es uno de los segundos mensajeros más importantes en los procesos de señalización intracelular de los linfocitos T. Múltiples evidencias experimentales en diferentes modelos celulares apuntan hacia una regulación mutua entre el Ca²⁺

y las especies reactivas de oxígeno. Evidencias más recientes sugieren la participación de las mitocondrias en las proximidades de la sinapsis inmunológica como organelos reguladores importantes de las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular. Se ha demostrado que este segundo mensajero está alterado en linfocitos neonatales en modelos animales (Palin, Ramachandran, Acharya, & Lewis, 2013) y en humanos (Mészáros, et al., 2015), en los que también correlaciona con una función mitocondrial alterada. Los resultados experimentales de ROS en linfocitos T CD8^+ neonatales humanos y las predicciones del modelo computacional son congruentes con estas evidencias. El modelo predice que los altos niveles de ROS intracelular pueden inducir un incremento en los niveles intracelulares de calcio y esto conduciría a la activación de NFAT, el cual a su vez, en ausencia de otros factores transcripcionales podría estimular la expresión preferencial de IL-4 por encima de otras citocinas. Esto está en concordancia con varios modelos animales en los que se ha demostrado experimentalmente un incremento en la expresión de IL-4 inducido o asociado a elevados niveles de ROS intracelular (Anupam, Kaushal, Prabhakar, & Bhatnagar, 2018; Li-Weber, et al., 1998; Seo, et al., 2019).

La expresión del canal de protones Hv1 se encontró elevada específicamente en las muestras neonatales después de la estimulación del TCR. Este canal iónico funciona expulsando el exceso de protones generados por la acción de la enzima NADPH oxidasa del citoplasma al exterior celular, por lo que generalmente se considera como un indicativo de niveles elevados de ROS intracelular. Evidencias recientes sugieren que el canal podría estar localizado adicionalmente en la mitocondria y que contribuye a la producción y modulación de ROS (Patel, et al., 2019).

El empleo de N-Acetyl-L-Cysteine tuvo un efecto contrario al deseado en la disminución de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno en las muestras neonatales. Múltiples evidencias promueven su función antioxidante

debido a que constituye un precursor importante para la síntesis de novo de glutatión, por lo que ayudaría a mantener elevado el poder antioxidante de la célula (Abimannan, et al., 2016; Irani, et al., 1997; Sablina, et al., 2005). Sin embargo, evidencias más recientes indican que el tratamiento con NAC puede tener un efecto pro oxidante o antioxidante en dependencia del estado metabólico intracelular y del estado energético de la mitocondria, situaciones que asemejan un estado de estrés reductivo intracelular (Löhrke, et al., 2010; Peris, et al., 2018; H. Zhang, et al., 2012). Bajo la luz de estas nuevas evidencias, la ausencia de efecto antioxidante de NAC en las células neonatales podría ser un indicativo adicional de disfunción mitocondrial.

Los linfocitos T CD8⁺ neonatales mostraron una baja tasa de expansión clonal inducida por la estimulación del TCR; sin embargo, desarrollaron una mayor tasa de proliferación homeostática (en ausencia de estímulo) en comparación con los de adultos (Galindo-Albarrán, et al., 2016). Este fenómeno corrobora evidencias previas (Reynaldi, et al., 2016; Schietinger, Delrow, Basom, Blattman, & Greenberg, 2012), las cuales sugieren particularidades en el programa de diferenciación de las células T en el período neonatal.

Medir la funcionalidad de varias rutas metabólicas intracelulares de manera simultánea constituye un reto experimental por lo complicado y costoso que esto resulta. Por otro lado, el empleo de estrategias reduccionistas que implican la medición de unas pocas variables metabólicas de manera aislada generalmente conduce a interpretaciones incompletas y de poco valor explicativo. Es por esto que la modelación computacional ofrece un acercamiento alternativo muy valioso. El modelo lógico computacional generado permitió estudiar en el mismo contexto tres aspectos importantes de la funcionalidad de los linfocitos T: la señalización del TCR, la señalización redox y el metabolismo energético celular.

Los resultados del modelo indican que los altos niveles de ROS de las células neonatales impiden la activación de las rutas de las pentosas fosfato (PPP, siglas en inglés), de la síntesis de ácidos grasos (FAS, siglas en inglés) y la Glutaminólisis, las cuáles son necesarias para una activación completa y una posterior expansión clonal, debido a que aportan esqueletos carbonados requeridos para la síntesis de nuevas moléculas y la construcción de nuevas estructuras celulares. En estas condiciones las células estarían con mayor probabilidad en un estado de anergia o anergia metabólica, aún cuando reciben las señales de estimulación del TCR. Los niveles elevados de ROS intracelular en los linfocitos neonatales podrían estar ocasionados por un mantenimiento de la ruta glicolítica activa en estado basal (Galindo-Albarrán, et al., 2016).

La alteración en el metabolismo intracelular de los linfocitos neonatales podría estar combinada con dificultades en la internalización o la disponibilidad de algunos nutrientes. El microambiente de los linfocitos neonatales en el cordón umbilical parece mostrar una elevada expresión de la enzima arginasa (Elahi, et al., 2013). La acción enzimática de la arginasa limitaría la disponibilidad de los aminoácidos Arginina y Glutamina, lo cual afectaría la ruta de la síntesis *de novo* de glutatión. Una situación similar se alcanza en el modelo al mantener un bloqueo de la ruta de la Glutaminólisis, en este escenario las células permanecen en un estado de anergia, incluso con las señales de estimulación del TCR.

Es necesario mencionar algunas limitaciones del presente estudio, para tener una dimensión apropiada de las interpretaciones derivadas de los hallazgos. En primer lugar, el número de muestras fue limitado, a pesar de que se lograron evidenciar diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los análisis realizados. Segundo, las muestras neonatales de cordón umbilical contienen una proporción considerable de linfocitos emigrantes recientes del timo, los cuales frecuentemente poseen un potencial de activación disminuído. La identificación de estas subpoblaciones de linfocitos emigrantes recientes del timo constituye un reto en la

actualidad, particularmente para las CD8⁺, debido a que uno de los pocos marcadores fenotípicos confiables solamente identifica a los linfocitos T CD4⁺(den Braber, et al., 2012). Tercero, todos los experimentos del presente trabajo fueron realizados *in vitro*, por lo tanto no se logró evaluar la influencia de otras subpoblaciones leucocitarias relevantes, como macrófagos y células dendríticas, en la regulación del estado redox de los linfocitos T CD8⁺.

En resumen, el perfil metabólico y redox de los linfocitos neonatales podría ser un mecanismo adicional en el programa de tolerancia materno-fetal que los pone en desventaja en el momento de la activación. Este debería ser considerado para cualquier estrategia que busque potenciar la inmunidad neonatal.

6. Conclusiones

1. Los linfocitos T CD8⁺ neonatales humanos producen mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno en estado basal en comparación con los de adultos.
2. Como resultado de la estimulación del TCR, los linfocitos neonatales incrementan sus niveles mitocondriales de especies reactivas de oxígeno; los de adultos en cambio, los disminuyen.
3. El modelo lógico computacional construido reproduce la influencia mutua entre el metabolismo redox intracelular y la señalización del TCR en linfocitos T.
4. Las simulaciones estocásticas del modelo computacional predicen un impacto muy marcado del estado redox intracelular en la activación de los linfocitos T.

7. Perspectivas

1. Implementar la evaluación de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno en linfocitos T CD8⁺ neonatales mediante metodologías más precisas y sensibles como proteínas fluorescentes sensibles a la oxidación, o espectrometría de masas.
2. Implementar la evaluación del estado metabólico intracelular de linfocitos T CD8⁺ neonatales mediante la medición de los niveles de GSH/GSSG, ATP/ADP, NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺.
3. Implementar la evaluación del impacto del estado redox intracelular en las señales que desencadenan la apoptosis en linfocitos T CD8⁺ neonatales.
4. Enriquecer el modelo lógico computacional con nodos e interacciones adicionales correspondientes a cinasas (GSK3b) y factores transcripcionales (NRF2) implicados en la regulación redox intracelular.

8. Bibliografía

- Abimannan, T., Peroumal, D., Parida, J. R., Barik, P. K., Padhan, P., & Devadas, S. (2016). Oxidative stress modulates the cytokine response of differentiated Th17 and Th1 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 99, 352–363. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.026>
- Adkins, B., Bu, Y., Cepero, E., & Perez, R. (2000). Exclusive Th2 Primary Effector Function in Spleens but Mixed Th1/Th2 Function in Lymph Nodes of Murine Neonates. *The Journal of Immunology*, 164(5), 2347–2353. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2347>
- Anupam, K., Kaushal, J., Prabhakar, N., & Bhatnagar, A. (2018). Effect of redox status of peripheral blood on immune signature of circulating regulatory and cytotoxic T cells in streptozotocin induced rodent model of type I diabetes. *Immunobiology*, 223(10), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.07.004>
- Babior, B. M., Curnutte, J. T., & McMurrich, B. J. (1976). The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *The Journal of Clinical Investigation*, 58(4), 989–996. <https://doi.org/10.1172/JCI108553>
- Badou, A., Jha, M. K., Matza, D., Mehal, W. Z., Freichel, M., Flockerzi, V., & Flavell, R. A. (2006). Critical role for the β regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15529–15534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607262103>
- Bernheim, L., Krause, R. M., Baroffio, A., Hamann, M., Kaelin, A., & Bader, C. R. (1993). A voltage-dependent proton current in cultured human skeletal muscle myotubes. *The Journal of Physiology*, 470(1), 313–333. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019860>
- Bezanilla, F. (2008). How membrane proteins sense voltage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 323–332. <https://doi.org/10.1038/nrm2376>
- Bichet, D., Lecomte, C., Sabatier, J.-M., Felix, R., & De Waard, M. (2000). Reversibility of the Ca²⁺ Channel $\alpha 1$ - β Subunit Interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(3), 729–735. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3750>
- Borde, M., Barrington, R. A., Heissmeyer, V., Carroll, M. C., & Rao, A. (2006).

- Transcriptional basis of lymphocyte tolerance. *Immunological Reviews*, 210(1), 105–119. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00370.x>
- Cabral, M. D., Paulet, P. E., Robert, V., Gomes, B., Renoud, M. L., Savignac, M., ... Pelletier, L. (2010). Knocking down Cav1 calcium channels implicated in Th2 cell activation prevents experimental asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(12), 1310–1317. <https://doi.org/10.1164/rccm.200907-1166OC>
- Cahalan, M. D., Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., & Gupta, S. (1985). A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *The Journal of Physiology*, 358(1), 197–237. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015548>
- Cahalan, Michael D., & Chandy, K. G. (2009). The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunological Reviews*, 231(1), 59–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x>
- Capasso, M., Bhamrah, M. K., Henley, T., Boyd, R. S., Langlais, C., Cain, K., ... Dyer, M. J. S. (2010). HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nature Immunology*, 11(3), 265–272. <https://doi.org/10.1038/ni.1843>
- Catterall, W. A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 521–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>
- Chen, N., & Field, E. H. (1995). Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation*, 59(7), 933–941. <https://doi.org/10.1097/00007890-199504150-00002>
- Clayton, J. P., Gammon, G. M., Ando, D. G., Kono, D. H., Hood, L., & Sercarz, E. E. (1989). Peptide-specific prevention of experimental allergic encephalomyelitis. Neonatal tolerance induced to the dominant T cell determinant of myelin basic protein. *Journal of Experimental Medicine*, 169(5), 1681–1691. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1681>
- DeCoursey, T. E., Morgan, D., & Cherny, V. V. (2003). The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature*, 422(6931), 531–534. <https://doi.org/10.1038/nature01523>

- den Braber, I., Mugwagwa, T., Vrisekoop, N., Westera, L., Mögling, R., Bregje de Boer, A., ... Tesselaar, K. (2012). Maintenance of Peripheral Naive T Cells Is Sustained by Thymus Output in Mice but Not Humans. *Immunity*, 36(2), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.006>
- Di, A., Gao, X.-P., Qian, F., Kawamura, T., Han, J., Hecquet, C., ... Malik, A. B. (2011). The redox-sensitive cation channel TRPM2 modulates phagocyte ROS production and inflammation. *Nature Immunology*, 13(1), 29–34. <https://doi.org/10.1038/ni.2171>
- Di, L., Srivastava, S., Zhdanova, O., Ding, Y., Li, Z., Wulff, H., ... Skolnik, E. Y. (2010). Inhibition of the K⁺ channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4), 1541–1546. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910133107>
- Dolphin, A. C. (2003). β Subunits of Voltage-Gated Calcium Channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35(6), 599–620. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000008026.37790.5a>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 657–670. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>
- Dustin, M. L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*, 2(11), 1023–1033. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161>
- Elahi, S., Ertelt, J. M., Kinder, J. M., Jiang, T. T., Zhang, X., Xin, L., ... Way, S. S. (2013). Immunosuppressive CD71⁺ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*, 504(7478), 158–162. <https://doi.org/10.1038/nature12675>
- Fanger, C. M., Neben, A. L., & Cahalan, M. D. (2000). Differential Ca²⁺ influx, KCa channel activity, and Ca²⁺ clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(3), 1153–1160. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1153>
- Fanger, C. M., Rauer, H., Neben, A. L., Miller, M. J., Rauer, H., Wulff, H., ... Cahalan, M. D. (2001). Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12249–12256.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M011342200>
- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 690–702. <https://doi.org/10.1038/nri2152>
- Feske, S. (2013). Ca²⁺ influx in T cells: How many Ca²⁺ channels? *Frontiers in Immunology*, 4(APR), 2–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00099>
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., ... Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>
- Forsthuber, T., Yip, H. C., & Lehmann, P. V. (1996). Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science*, 271(5256), 1728–1730.
<https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1728>
- Galindo-Albarrán, A. O., López-Portales, O. H., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Rodríguez-Jorge, O., Sánchez-Villanueva, J. A., Ramírez-Pliego, O., ... Santana, M. A. (2016). CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Reports*, 17(8), 2151–2160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.056>
- Gammon, G., Dunn, K., Shastri, N., Oki, A., Wilbur, S., & Sercarz, E. E. (1986). Neonatal T-cell tolerance to minimal immunogenic peptides is caused by clonal inactivation. *Nature*, 319(6052), 413–415. <https://doi.org/10.1038/319413a0>
- Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M. J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G. A., ... Chandy, K. G. (2000). Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation: Molecular mechanism and functional consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37137–37149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003941200>
- Guse, A. H., Da Silva, C. P., Berg, I., Skapenko, A. L., Weber, K., Heyer, P., ... Mayr, G. W. (1999). Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*, 398(6722), 70–73.
<https://doi.org/10.1038/18024>
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., ... Mori, Y. (2002). LTRPC2 Ca²⁺-Permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular Cell*, 9(1), 163–173.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00438-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00438-5)

- Henderson, L. M., Chappell, J. B., & Jones, O. T. G. (1987). The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel. *Biochemical Journal*, *246*(2), 325–329. <https://doi.org/10.1042/bj2460325>
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(6), 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Hough, K. P., Chisolm, D. A., & Weinmann, A. S. (2015). Transcriptional regulation of T cell metabolism. *Molecular Immunology*, *68*(2), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.038>
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., ... Goldschmidt-Clermont, P. J. (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, *275*(5306), 1649–1652. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1649>
- Jang, J. Y., Min, J. H., Chae, Y. H., Baek, J. Y., Wang, S. Bin, Park, S. J., ... Chang, T. S. (2014). Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via shp-2 oxidation. *Antioxidants and Redox Signaling*, *20*(16), 2528–2540. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5337>
- Jones, D. P., & Sies, H. (2015). The Redox Code. *Antioxidants and Redox Signaling*, *23*(9), 734–746. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6247>
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, *77*(5), 598–625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>
- Knowles, H., Li, Y., & Perraud, A. L. (2013). The TRPM2 ion channel, an oxidative stress and metabolic sensor regulating innate immunity and inflammation. *Immunologic Research*, *55*(1–3), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8373-8>
- Kotturi, M. F., Carlow, D. A., Lee, J. C., Ziltener, H. J., & Jefferies, W. A. (2003). Identification and Functional Characterization of Voltage-dependent Calcium Channels in T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(47), 46949–46960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309268200>
- Kotturi, M. F., & Jefferies, W. A. (2005). Molecular characterization of L-type calcium channel splice variants expressed in human T lymphocytes. *Molecular Immunology*, *42*(12), 1461–1474. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.01.014>

- Kwon, J., Shatynski, K. E., Chen, H., Morand, S., De Deken, X., Miot, F., ... Williams, M. S. (2010). The nonphagocytic NADPH oxidase Duox1 mediates a positive feedback loop during T cell receptor signaling. *Science Signaling*, 3(133), ra59. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000976>
- Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., & Reuben, J. P. (1992). Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10094–10098. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10094>
- Li-Weber, M., Salgame, P., Hu, C., Davydov, I. V, Laur, O., Klevenz, S., & Krammer, P. H. (1998). Th2-specific protein/DNA interactions at the proximal nuclear factor-AT site contribute to the functional activity of the human IL-4 promoter. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(3), 1380–1389. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686601>
- Li, B. (2017). *Immune Metabolism in Health and Tumor* (Vol. 1011). <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1170-6>
- Liou, J., Kim, M. L., Won, D. H., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store- depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology*, 15(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>
- Löhrke, B., Xu, J., Weitzel, J. M., Krüger, B., Goldammer, T., & Viergutz, T. (2010). N-Acetylcysteine impairs survival of luteal cells through mitochondrial dysfunction. *Cytometry Part A*, 77(4), 310–320. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20873>
- Man, K., & Kallies, A. (2015). Synchronizing transcriptional control of T cell metabolism and function. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 574–584. <https://doi.org/10.1038/nri3874>
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, 2(1), 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006>
- Mellström, B., Salignac, M., Gomez-Villafuertes, R., & Naranjo, J. R. (2008). Ca²⁺-operated transcriptional networks: Molecular mechanisms and in vivo models. *Physiological Reviews*, 88(2), 421–449. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2005>

- Mészáros, G., Orbán, C., Kaposi, A., Toldi, G., Gyarmati, B., Tulassay, T., & Vásárhelyi, B. (2015). Altered mitochondrial response to activation of T-cells in neonate. *Acta Physiologica Hungarica*, *102*(2), 216–227. <https://doi.org/10.1556/036.102.2015.2.12>
- Min, B., Legge, K. L., Li, L., Caprio, J. C., Pack, C. D., Gregg, R., ... Zaghouani, H. (2000). Neonatal tolerant immunity for vaccination against autoimmunity. *International Reviews of Immunology*, *19*(2–3), 247–264. <https://doi.org/10.3109/08830180009088507>
- Morrison, D. G., Moyer, M. P., Dung, H. C., Rogers, W., & Moyer, R. C. (1984). Tumor growth rate varies with age in lethargic mutant BALB/cGnDu mice. *Developmental and Comparative Immunology*, *8*(2), 435–442. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6734874>
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, *7*(1), 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- 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), 646. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00646>
- Omilusik, K., Priatel, J. J., Chen, X., Wang, Y. T., Xu, H., Choi, K. B., ... Jefferies, W. A. (2011). The CaV1.4 Calcium Channel Is a Critical Regulator of T Cell Receptor Signaling and Naive T Cell Homeostasis. *Immunity*, *35*(3), 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.011>
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., & Nilius, B. (2006). Permeation and Selectivity of Trp Channels. *Annual Review of Physiology*, *68*(1), 685–717. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
- Palin, A. C., Ramachandran, V., Acharya, S., & Lewis, D. B. (2013). Human Neonatal Naive CD4 + T Cells Have Enhanced Activation-Dependent Signaling Regulated by the MicroRNA miR-181a. *The Journal of Immunology*, *190*(6), 2682–2691. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202534>
- Patel, B., Zheleznova, N. N., Ray, S. C., Sun, J., Cowley, A. W., & O'Connor, P. M. (2019). Voltage gated proton channels modulate mitochondrial reactive oxygen species production by complex I in renal medullary thick ascending limb. *Redox Biology*, 101191. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101191>

- Pearce, E. L. (2010). Metabolism in T cell activation and differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.018>
- 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>
- Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C. H., & Jones, R. G. (2013, October 11). Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*, Vol. 342, pp. 1242454–1242454. <https://doi.org/10.1126/science.1242454>
- Peris, E., Micallef, P., Paul, A., Palsdottir, V., Enejder, A., Bauzá-Thorbrügge, M., ... Wernstedt Asterholm, I. (2018). Antioxidant treatment induces reductive stress associated with mitochondrial dysfunction in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, jbc.RA118.004253. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004253>
- Powell, T. J., & Streilein, J. W. (1990). Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4-secreting, tolerogen-responsive T cells. *Journal of Immunology*, 144(3), 854–859. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2136901>
- Qu, B., Al-Ansary, D., Kummerow, C., Hoth, M., & Schwarz, E. C. (2011). ORAI-mediated calcium influx in T cell proliferation, apoptosis and tolerance. *Cell Calcium*, 50(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.015>
- Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). A *trp c*. *October*, 68(2), 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
- Ramsey, I. S., Moran, M. M., Chong, J. A., & Clapham, D. E. (2006). A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*, 440(7088), 1213–1216. <https://doi.org/10.1038/nature04700>
- Reynaldi, A., Smith, N. L., Schlub, T. E., Venturi, V., Rudd, B. D., & Davenport, M. P. (2016). Modeling the dynamics of neonatal CD8⁺ T-cell responses. *Immunology and Cell Biology*, (April), 1–11. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.47>
- Ridge, J. P., Fuchs, E. J., & Matzinger, P. (1996). Neonatal tolerance revisited: Turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science*, 271(5256), 1723–1726. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1723>
- Robert, V., Triffaux, E., Savignac, M., & Pelletier, L. (2011). Calcium signalling in T-lymphocytes. *Biochimie*, 93(12), 2087–2094. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.016>

- Rodríguez-Jorge, O., Kempis-Calanis, L. A., Abou-Jaoudé, W., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Hernandez, C., Ramirez-Pliego, O., ... Adkins, B. (2019). Cooperation between T cell receptor and Toll-like receptor 5 signaling for CD4 + T cell activation . *Science Signaling*, *12*(577), eaar3641. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar3641>
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., ... Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *Journal of Cell Biology*, *169*(3), 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., & Chumakov, P. M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine*, *11*(12), 1306–1313. <https://doi.org/10.1038/nm1320>
- Sarzotti, M., Robbins, D. S., & Hoffman, P. M. (1996). Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science*, *271*(5256), 1726–1728. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1726>
- Sasaki, M., Tojo, A., Okochi, Y., Miyawaki, N., Kamimura, D., Yamaguchi, A., ... Okamura, Y. (2013). Autoimmune disorder phenotypes in Hvcn1-deficient mice. *The Biochemical Journal*, *450*(2), 295–301. <https://doi.org/10.1042/BJ20121188>
- Schietinger, A., Delrow, J. J., Basom, R. S., Blattman, J. N., & Greenberg, P. D. (2012). Rescued tolerant CD8 T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state. *Science*, *335*(6069), 723–727. <https://doi.org/10.1126/science.1214277>
- Schilling, T., Gratopp, A., DeCoursey, T. E., & Eder, C. (2002). Voltage-activated proton currents in human lymphocytes. *The Journal of Physiology*, *545*(Pt 1), 93–105. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.028878>
- Schwertassek, U., Haque, A., Krishnan, N., Greiner, R., Weingarten, L., Dick, T. P., & Tonks, N. K. (2014). Reactivation of oxidized PTP1B and PTEN by thioredoxin 1. *FEBS Journal*, *281*(16), 3545–3558. <https://doi.org/10.1111/febs.12898>
- Seo, Y.-S., Kim, H. S., Lee, A. Y., Chun, J. M., Kim, S. B., Moon, B. C., & Kwon, B.-I. (2019). Codonopsis lanceolata attenuates allergic lung inflammation by inhibiting Th2 cell activation and augmenting mitochondrial ROS dismutase (SOD2) expression. *Scientific Reports*, *9*(1), 2312. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38782-6>
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress.

Journal of Biological Chemistry, 289(13), 8735–8741.

<https://doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>

Sies, H. (2017). Redox Biology Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress : Oxidative eustress ☆. *Redox Biology*, 11(November 2016), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>

Simeoni, L., & Bogeski, I. (2015). Redox regulation of T-cell receptor signaling. *Biological Chemistry*, 396(5), 555–568. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0312>

Singh, R. R., Hahn, B. H., & Sercarz, E. E. (1996). Neonatal peptide exposure can prime T cells and, upon subsequent immunization, induce their immune deviation: Implications for antibody vs. T cell-mediated autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1613–1621. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1613>

Smeyne, R. J. (2007). Catalog of the Neurological Mutants of Mouse revisited: Honoring the 40th anniversary of its initial publication. *Brain Research*, 1140, 1. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.039>

Stasia, M. J., & Li, X. J. (2008). Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Seminars in Immunopathology*, 30(3), 209–235. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0121-8>

Stoll, G., Caron, B., Viara, E., Dugourd, A., Zinovyev, A., Naldi, A., ... Calzone, L. (2017). MaBoSS 2.0: An environment for stochastic Boolean modeling. *Bioinformatics*, 33(14), 2226–2228. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx123>

Sumoza-Toledo, A., & Penner, R. (2011). TRPM2: A multifunctional ion channel for calcium signalling. *Journal of Physiology*, 589(7), 1515–1525. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201855>

Thomas, R. C., & Meech, R. W. (1982). Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature*, 299(5886), 826–828. <https://doi.org/10.1038/299826a0>

Tsien, R. W., Fox, A. P., Hess, P., McCleskey, E. W., Nilius, B., Nowycky, M. C., & Rosenberg, R. L. (1987). Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Society of General Physiologists Series*, 41, 167–187. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2436308>

Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels TRP: Transient Receptor

- Potential. *Annu Rev Biochem.*, 76(1), 387–417.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., ... Kinet, J. P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*, 312(5777), 1220–1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309–314.
<https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Weber, K. S., Miller, M. J., & Allen, P. M. (2008). Th17 Cells Exhibit a Distinct Calcium Profile from Th1 and Th2 Cells and Have Th1-Like Motility and NF-AT Nuclear Localization. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1442–1450.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1442>
- Wenning, A. S., Neblung, K., Strauß, B., Wolfs, M. J., Sappok, A., Hoth, M., & Schwarz, E. C. (2011). TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(3), 412–423. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.022>
- World Health Organization United Nation Population Fund UNICEF. (2009). *The state of the world's children December 2009; Maternal and New born health.*
- Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., ... Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395(6701), 503–507. <https://doi.org/10.1038/26758>
- Yamamoto, S., Shimizu, S., Kiyonaka, S., Takahashi, N., Wajima, T., Hara, Y., ... Mori, Y. (2008). TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Medicine*, 14(7), 738–747.
<https://doi.org/10.1038/nm1758>
- Yamamoto, S., Takahashi, N., & Mori, Y. (2010). Chemical physiology of oxidative stress-activated TRPM2 and TRPC5 channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 103(1), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.005>
- Zhang, H., Limphong, P., Pieper, J., Liu, Q., Rodesch, C. K., Christians, E., & Benjamin, I. J. (2012). Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB Journal*, 26(4), 1442–1451. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199869>

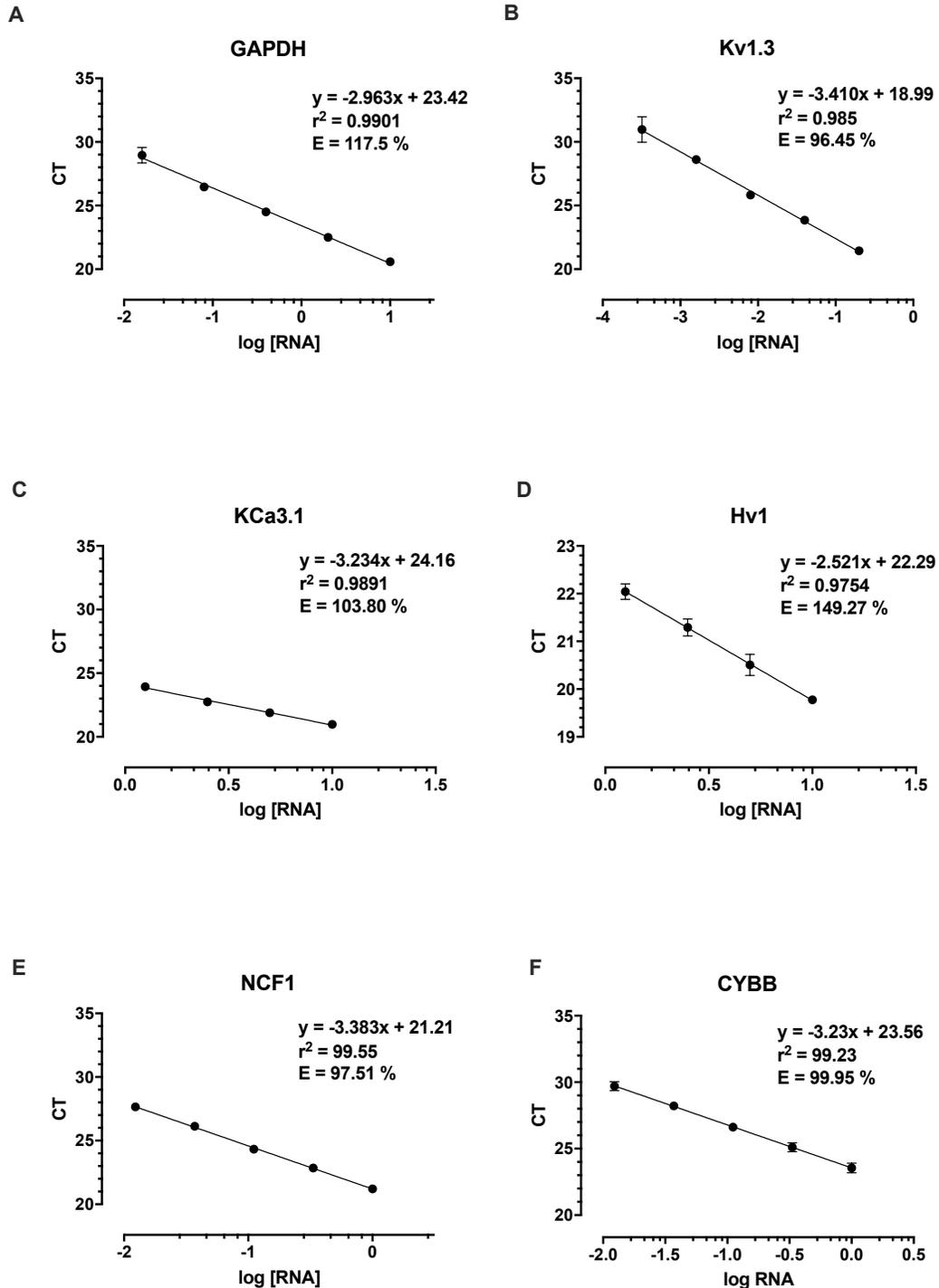
Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., ... Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060), 902–905.
<https://doi.org/10.1038/nature04147>

Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 445–489.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>

9. Anexos.

Anexo 1.

Desarrollo de curvas estándar y ecuaciones de la recta para los genes GAPDH, Kv1.3, Kca3.1, Hv1 NCF1 y CYBB mediante qPCR. Para cada gen se determinó el ajuste lineal y la eficiencia de amplificación de los cebadores.



Anexo 2.

Tabla complementaria 1. Documentación y anotaciones del modelo TCR-REDOX-Metabolism.

Esta tabla se ha generado utilizando una función de exportación del software GINsim y enumera la siguiente información para cada nodo del modelo (primera columna):

- una serie de identificadores de entrada de las bases de datos que documentan las fuentes de información utilizadas para construir el modelo (segunda columna);
- las reglas booleanas definidas para cada nodo; en el caso de nodos multinivel (ternario), se especifican dos reglas, para los valores 2 y 1, respectivamente (tercera columna, parte superior de las celdas); estas reglas combinan literales (nombres de nodo) con los operadores booleanos estándar NOT (denotado por el símbolo !), AND (denotado por &), OR (denotado por |), y paréntesis siempre que sea necesario;
- anotaciones textuales que argumentan los supuestos utilizados para definir las reglas lógicas de cada nodo del modelo.

Node ID	References (HGNC, CHEBi or PMID)	Logical rule
		Brief description of the node
TCR	1. HGNC:1674 2. PMID:19132916	Input
		This node represents the TCR heterodimer, including the CD3 complex as well. It is an input node. The functional level 1 is analog to the antigen encounter. The early TCR signaling is reviewed in [2].
CD28	1. HGNC:1653 2. PMID:27192564	Input
		This node represents the costimulatory CD28 protein. It is an input node. The functional level 1 is analog to the ligation with CD80/CD86 molecule. The relevance of CD28 on the early TCR signaling is reviewed in [2].

LCK	1. HGNC:6524	(TCR & CD28 & (SHP2 !SHP2)) (TCR & !CD28 & !SHP2)
	2. PMID:22723799	This node represents the Src-family kinase LCK protein. Its action on the early TCR signaling is reviewed in [2].
FYN	1. HGNC:4037	TCR
	2. PMID:15489916	This node represents the Src-family kinase FYN protein. Its action on the early TCR signaling is reviewed in [2].
ZAP70	1. HGNC:12858	(LCK & FYN & CD28 & (!SHP2 SHP2) & !cROS)
	2. PMID:1423621	(!LCK & FYN & CD28 & !SHP2 & !cROS) (LCK & !FYN & CD28 & !SHP2 & !cROS)
	3. PMID:16273097	This node represents the tyrosine kinase ZAP-70, one of the most relevant of the kinases involved on the early TCR signaling [2], [3]. It is a redox sensitive node [4], [5].
	4. PMID:25287889	
	5. PMID:11744042	
LAT	1. HGNC:18874	ZAP70 & !cROS
	2. PMID:9489702	This node represents the scaffold protein LAT, important for the downstream signaling derived from the TCR activation [2]. It is a redox sensitive node [3], [4].
	3. PMID:10657671	
	4. PMID:11756537	
SLP76	1. HGNC:6529	LAT & ZAP70
	2. PMID:8702662	This node represents the Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kDa, a substrate of ZAP70 connecting TCR signals with downstream activation of RAS and calcium pathways [2], [3].
	3. PMID:10021361	
ITK	1. HGNC:6171	SLP76 & (VAV1 LCK ZAP70 LAT PI3K)
	2. PMID:11994416	This node represents the Tec family kinase ITK. It is an important mediator of the early TCR signals [2], [3], [4].
	3. PMID:9584150	
	4. PMID:15771581	

VAV1	1. HGNC:12657	ITK & SLP76
	2. PMID:11994416 3. PMID:17050525 4. PMID:10849438	This node represents the signaling protein VAV1, important in the early TCR signaling events [2], [3], [4].
RASGRP	1. HGNC:9878	DAG & PKCTH
	2. PMID:15899849	This node represents the RAS exchange factor RASGRP1, an important activator of RAS during TCR activation [2].
SOS	1. HGNC:11187	GRB2 & RAS
	2. PMID:9846483	This node represents the RAS activator protein SOS. It is an important mediator of the TCR signals [2], [3].
	3. PMID:17283063	
GRB2	1. HGNC:4566	LAT
	2. PMID:9846483	This node represents the early TCR signaling protein GRB2 involved in the LAT signalosome.
	3. PMID:8479536	
PLCg	1. HGNC:9065	SLP76 & ITK & LAT
	2. PMID:17148460	This node represents the phospholipase C gamma, an important signaling protein connecting the TCR signals with the downstream calcium currents [2], [3].
	3. PMID:11994416	
PI3K	1. HGNC:8975	(SLP76 & CD28 & (!CBLB CBLB)) (!SLP76 & CD28 & !CBLB) (SLP76 & !CD28 & !CBLB)
	2. PMID:11994416	This node represents the phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K), an important mediator of the CD28 signaling pathway [2], [3]. This node is important for the metabolic shift necessary upon T cell activation [4].
	3. PMID:8183372	
	4. PMID:12121659	
PIP3	1. CHEBI:16618	PI3K & IPTEN
	2. PMID:12670391	This node represents the second messenger phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3), important in the PI3K signaling pathway [2], [3].
	3. PMID:30692200	

PDK	1. HGNC:8816	PIP3 PKCTH
	2. PMID:19122654 3. PMID:28152304 4. PMID:23183047	This node represents the enzyme phosphoinositide-dependent kinase 1. It is important for integrating the TCR and CD28 signals [2], [3], [4].
DAG	1. CHEBI:18035	PLCg
	2. PMID:17548359	This node represents the molecule diacylglycerol, an important second messenger downstream the TCR signaling pathway [2].
PKCTH	1. HGNC:9410	DAG & LCK & PDK
	2. PMID:17548359	This node represents the kinase PKC theta, a Ca ²⁺ independent and DAG dependent PKC [2], [3].
	3. PMID:17544292	
RAC1	1. HGNC:9801	TRPM2 VAV1
	2. PMID:15258578	This node represents the Rho small GTPase RAC. It is an important subunit for the activation of the NADPH-oxidase complex [2], [3], [4].
	3. PMID:30007118	
	4. PMID:24598074	
AKT	1. HGNC:391	PIP3 & PDK & TORC2
	2. PMID:12121659	This node represents the serine/threonine kinase Akt. It is an important mediator of the metabolic shift required for T cell activation.
	3. PMID:18354169	
	4. PMID:15718470	
	5. PMID:28137869	
	6. PMID:29523440	
	7. PMID:29109121	
NOX2	1. HGNC:2578	
	2. PMID:15258578	This node represents the NADPH-oxidase enzyme complex assembled at the cytoplasmic membrane, which is activated upon TCR activation [2] It is composed of several subunits [4]. It is a source of cROS.
	3. PMID:25081034	
	4. PMID:19028840	
	5. PMID:29757466	

DUOX1	1. HGNC:3062	cCa & PKCTH
	2. PMID:20682913	This node represents the nonphagocytic NADPH oxidase enzyme DUOX1. It is a ROS source important for the early TCR signaling [2].
SHP2	1. HGNC:9644	!(cROS LCK)
	2. PMID:17982034	This node represents the tyrosine phosphatase SHP-2, an important negative modulator of the early TCR signaling. It is a redox sensitive node [2], [3].
	3. PMID:20682913	
PTEN	1. HGNC:9588	!(cROS LCK AKT)
	2. PMID:15534200	This node represents the phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN), a negative modulator of PI3K signaling pathway. It is a redox sensitive node [2].
CBLB	1. HGNC:1542	!LCK
	2. PMID:11087752	This node represents the E3 ubiquitin ligase Cbl-b, an important negative modulator of the T cell signaling [2], [3].
	3. PMID:12193687	
RAS	1. HGNC:6407	RASGRP SOS
	2. PMID:10807788	This node represents the small GTPase RAS, important for T cells activation [6].
	3. PMID:9582122	
	4. PMID:15899849	
	5. PMID:9846483	
	6. PMID:17283063	
TRPM2	1. HGNC:12339	cROS
	2. PMID:26839633	This node represents the TRPM2 cation channel located at the cytoplasmic membrane. It is a selective calcium channel [3], sensitive to the redox status of the cell [4], [5], [6].
	3. PMID:24009611	
	4. PMID:23302782	
	5. PMID:23077651	
	6. PMID:22547068	

	7. PMID:15952035	
PMCA	1. HGNC:814	!STIM
	2. PMID:22246182 3. PMID:14966303	This node represents the Plasma Membrane Calcium ATPase. It is a pump that extrudes calcium and modulates its cytoplasmic concentration [2], [3].
ORAI1	1. HGNC:25896	STIM & !cROS
	2. PMID:20354224 3. PMID:19754898 4. PMID:16582901	This node represents the ORAI1 calcium channel. It is located at the cytoplasmic membrane and is the main channel responsible for the Store Operated Calcium Entry (SOCE) in T cells [3], [4]. It is a redox sensitive protein [2].
IP3	1. CHEBI 16595	PLCg
	2. PMID:26052328 3. PMID:23805141	This node represents the second messenger inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3), produced by the action of the PLC gamma enzyme. It is an important connection between the TCR signals and the calcium currents [2], [3].
IP3R	1. HGNC: 6180	IP3 cROS
	2. PMID:26052328 3. PMID:30228182	This node represents the inositol trisphosphate receptor (IP3) located at the endoplasmic reticulum membrane. It is a calcium channel opened by the ligation with inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3). It induces the depletion of the internal calcium stores [2]. It is a redox sensitive node [3].
STIM	1. HGNC:11386	IP3R cROS
	2. PMID:15866891 3. PMID:16005298 4. PMID:24053140	This node represents the calcium sensor and activator of SOCE STIM1, located at the endoplasmic reticulum. It senses the depletion of

	5. PMID:28900911	the internal calcium reserves and activates ORAI1 [2], [3]. It is also a redox sensitive node [4], [5].
CALM	1. HGNC:1442	cCa
	2. PMID:19290928	This node represents calmodulin. It is a sensor for intracellular calcium [2].
CALN	1. HGNC:9315	CALM
	2. PMID:1715244	This node represents the phosphatase calcineurin. This enzyme activates NFAT transcription factor upon elevated cytosolic calcium levels [2], [3], [4].
	3. PMID:27941787	
	4. PMID:11015619	
RAF	1. HGNC:9829	RAS
	2. PMID:9826444	This node represents the serine/threonine kinase Raf-1. It is a MAPKKK upstream of ERK [2], [3], [4].
	3. PMID:14737111	
	4. PMID:19542438	
MEK	1. HGNC:6847	RAF
	2. PMID:19542438	This node represents the mitogen-activated protein kinase kinase 7. It is an activator of ERK [2], [3].
	3. PMID:12899942	
MAP3K11	1. HGNC:6850	HPK1
	2. PMID:10713178	This node represents the Mitogen Activated Kinase Kinase Kinase 11, or MLK3. It is an upstream activator of the NFkB and JNK pathways [2], [3].
	3. PMID:10849438	
MAP2K4	1. HGNC:6844	MAP3K11 ASK1
	2. PMID:29248490	This node represents the MKK4, a MAPKK important in the activation of JNK in T cells [2], [3].
	3. PMID:10785355	
MKK3	1. HGNC:6843	ASK1

	2. PMID:8974401	This node represents the enzyme MAPKK3. It is a MAPKK involved in the activation of p38 during intracellular stress [2].
ASK1	1. HGNC:6857	!cTRX
	2. PMID:18206122 3. PMID:11274345 4. PMID:17883330	This node represents the Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). It is a MAPKKK upstream of JNK and P38 which activates in response to cellular stress. It is a redox sensitive node [2], [3], [4].
HPK1	1. HGNC:6863	LAT
	2. PMID:10849438	This node represents the hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1), a serine/threonine kinase important for the signaling downstream the TCR [2].
Hv1	1. HGNC:28240	cROS
	2. PMID:28013412 3. PMID:23798303 4. PMID:24890927 5. PMID:20139987 6. PMID:25425665 7. PMID:29643227 8. PMID:31060879	This node represents the Hv1 proton channel located at the cytoplasmic membrane [3]. This channel extrudes the excess of protons generated by the NADPH-oxidase enzyme, thus preventing cellular acidification [2]. Recent evidences support a role in the modulation of the mROS generation located at the internal mitochondrial membrane [8].
mCa (multilevel)	1. CHEBI:29108	2 -cCa:2
	2. PMID:20668216 3. PMID:30622345 4. PMID:29032101 5. PMID:30982525 6. PMID:26100311 7. PMID:29030115	1- cCa:1 This node represents the mitochondrial level of the Ca ion, an important second messenger for T cells signaling [3]. It is important for the mitochondrial metabolic activity [4], [5], [7]. Recent evidences suggest that the Ca levels are differentially regulated between T cells from

		<p>neonates and adults [6]. It is a multilevel node, taking</p> <p>level 2 iff very high mCa^{2+} levels;</p> <p>level 1 iff intermediate mCa^{2+} levels;</p> <p>level 0 iff very low mCa^{2+} levels.</p>
<p>mROS (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:26523 2. PMID:23415911 3. PMID:23880762 4. PMID:30466061 5. PMID:30057684 6. PMID:19061483 7. PMID:27965578 8. PMID:26100311 	<p>2 - (!mPRX mGPX) & (cROS ETC mGR mTR)) (cROS & (mPRX mGPX ETC mGR mTR))</p> <p>1 - (!!mPRX & mGPX) (mPRX & !mGPX)) & (ETC mGR mTR) & !cROS</p> <p>This node represents the levels of Reactive Oxygen Species generated in the mitochondria (mROS). This is representing mainly by hydrogen peroxide (H₂O₂), but it also includes the superoxide anion (O₂⁻) and other derivatives. It is an important second messenger for signaling but it is detrimental at higher levels. Thus, its concentration is maintained under a strict balance between production and scavenging. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff very high damaging levels of mROS;</p> <p>level 1 iff normal signaling levels of mROS;</p> <p>level 0 iff very low levels of mROS.</p>
<p>mQH2_Q (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:17976 2. PMID:19061483 3. PMID:27085844 	<p>2 - ETC & mdH</p> <p>1 - ETC & !mdH</p> <p>This node represents the ratio between the reduced (QH₂) and the oxidized (Q) ubiquinone, the electron carrier in the mitochondrial internal membrane. At some conditions of very reduced values, it is a source of mROS [2], [3]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff very reduced;</p>

		<p>level 1 iff normal physiological levels;</p> <p>level 0 iff very oxidized.</p>
<p>mNADH_NAD (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:16908 2. PMID:28648096 3. PMID:20175987 4. PMID:23442855 5. PMID:19061483 	<p>2 - (KrebsCycle mPDH FAO) & !ETC</p> <p>1 - (KrebsCycle mPDH FAO) & ETC</p>
		<p>This node represents the ratio between the redox couple of the reduced (NADH) vs oxidized (NAD⁺) coenzyme at the mitochondria. It is an important indicator of the energetic status of the cell [2], [3], [4], [5]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff corresponds to a very high NADH/NAD⁺ ratio, the couple is at an extreme of reduction;</p> <p>level 1 iff corresponds to a high or medium NADH/NAD⁺ ratio, the couple is at normal physiological levels of reduction;</p> <p>level 0 iff corresponds to a very low NADH/NAD⁺ ratio, the couple is at an extreme of oxidation.</p>
<p>mGSH_GSSG (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:16856 2. PMID:25701705 3. PMID:28558477 	<p>2 - mGR & !mGPX</p> <p>1 - mGR & mGPX</p>
		<p>This node represents the ratio between the reduced (GSH) and the oxidized (GSSG) mitochondrial pool of glutathione, an important antioxidant of the cell [3]. In some cases of reductive stress, the extremely reduced GSH/GSSG ratio is an inductor of ROS production by the enzyme Glutathione Reductase [2]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff highly reduced;</p> <p>level 1 iff normal physiological reduction status;</p> <p>level 0 iff highly oxidized.</p>

<p>mdH (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:24636 2. PMID:29626541 3. PMID:19061483 	<p>2 - ETC & !ATPSyn 1 - ETC & ATPSyn</p> <p>This node represents the proton concentration at the mitochondrial intermediate membrane space. It is the proton motive force which drive ATP production by the ATP synthase. Several evidences connect the proton motive force to the generation on mROS [2], [3]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff very high proton motive force; level 1 iff intermediate levels of proton motive force; level 0 iff very low proton motive force.</p>
<p>mNADPH_NADP (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:16474 2. PMID:28648096 3. PMID:20175987 4. PMID:23442855 	<p>2 - (mNNT:2 & !mIDH2) (mNNT:2 & mIDH2) (mNNT:1 & mIDH2) 1 - (!mNNT & mIDH2) (mNNT:1 & !mIDH2)</p> <p>This node represents the ratio between the redox couple of the reduced (NADHP) vs oxidized (NADP⁺) coenzyme in the mitochondria. It is an important indicator of the reducing power of the cell [2], [3], [4]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 for a very high NADPH/NADP⁺ ratio, the couple is at an extreme of reduction level 1 for a high or medium NADPH/NADP⁺ ratio, the couple is at normal physiological levels of reduction. level 0 for a very low NADPH/NADP⁺ ratio, the couple is at an extreme of oxidation.</p>
<p>mNNT (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:7863 2. PMID:28648096 	<p>2 - (mNADH_NAD:2 & mdH:2) (mNADH_NAD:1 & mdH:2) (mNADH_NAD:2 & mdH:1) 1 - mNADH_NAD:1 & mdH:1</p>

	<p>3. PMID:16730324</p> <p>4. PMID:20007326</p>	<p>This node represents the NAM nucleotide transhydrogenase, an important mediator of the conversion between NADH and NADPH pools in the mitochondria. It is regulated by the proton motive force. It is a multilevel node.</p>
mIDH2	<p>1. HGNC:5383</p>	<p>KrebsCycle</p>
	<p>2. PMID:28648096</p> <p>3. PMID:20007326</p>	<p>This node represents the mitochondrial enzyme Isocitrate dehydrogenase II. It is a source of mitochondrial NADPH [2], [3].</p>
mGPX (multilevel)	<p>1. HGNC:4553</p>	<p>2 - mGSH_GSSG:2 & !mROS</p>
	<p>2. PMID:23397885</p>	<p>1 - mGSH_GSSG:1 & !mROS</p> <p>This node represents the mitochondrial levels of the glutathione peroxidase. It is an important element of the antioxidant machinery [2]. It is a multilevel node.</p>
mGR (multilevel)	<p>1. HGNC:4623</p>	<p>2 - mGSH_GSSG:2 & (mNADPH_NADP:1 mNADPH_NADP:2)</p>
	<p>2. PMID:25701705</p>	<p>1 - (mNADPH_NADP:1 & !mGSH_GSSG) (mNADPH_NADP:1 & mGSH_GSSG:1) (mNADPH_NADP:2 & !mGSH_GSSG) (mNADPH_NADP:2 & mGSH_GSSG:1)</p> <p>This node represents the mitochondrial enzyme Glutathione Reductase (mGR). This enzyme is important in the generation of reduced Glutathione from NADPH. It is a source of ROS at extreme reduction conditions. It is a multilevel node [2] taking</p> <p>level 2 iff highly reduced enzyme;</p> <p>level 1 iff normal physiological redox status of the enzyme;</p> <p>level 0 iff highly oxidized enzyme.</p>
mPDHP	<p>1. HGNC:9279</p>	<p>mCa & !mNADH_NAD</p>

	2. PMID:30982525	This node represents the enzyme Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase located at the mitochondria. This enzyme is a positive regulator of the Pyruvate Dehydrogenase. It is an important mediator of the oxidative metabolism in the mitochondria [2].
mTR (multilevel)	1. HGNC:18155 2. PMID:29278740 3. PMID:25701705 4. PMID:20175987	2 - mTRX:2 & mNADPH_NADP:2 1 - (mNADPH_NADP:1 & !mTRX) (mNADPH_NADP:1 & mTRX:1) (mNADPH_NADP:2 & !mTRX) (mNADPH_NADP:2 & mTRX:1) (mNADPH_NADP:1 & mTRX:2)
		This node represents the mitochondrial enzyme Thioredoxin Reductase (mTR) [2]. This enzyme is important in the generation of reduced Thioredoxin from NADPH. It is a source of ROS at extreme reduction conditions [3], [4]. It is a multilevel node taking level 2 iff highly reduced enzyme; Level 1 iff normal physiological redox status of the enzyme; Level 0 iff highly oxidized enzyme.
mTRX (multilevel)	1. HGNC:17772 2. PMID:23397885 3. PMID:25701705	2 - mTR & !mROS 1 - mTR & mROS
		This node represents the thioredoxin mitochondrial pool. This is an important element on the antioxidant machinery of the cell. It receives electrons from NADPH and transfers the electrons to other signaling proteins [2]. In some cases of reductive stress, the extremely reduced TRX pool is an inductor of ROS production by the

		<p>enzyme Thioredoxin Reductase [3]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff highly reduced;</p> <p>level 1 iff normal physiological reduction status;</p> <p>level 0 iff highly oxidized.</p>
mPRX	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:9354 2. PMID:23397885 	<p>(mTRX & !mROS) (mTRX:2 & mROS)</p> <p>This node represents the mitochondrial pool of peroxiredoxin. It is an important antioxidant protein also involved in redox signaling [2].</p>
mShuttle	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:10979 2. PMID:28648096 3. PMID:20007326 	<p>mIDH2 & mNADPH_NADP</p> <p>This node represents the 2-oxoglutarate/isocitrate NADP(H)-redox shuttle located in the mitochondria. It connects the mitochondrial and cytosolic NADPH pools [2], [3].</p>
mPDH	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:8806 2. PMID:30982525 	<p>(mPDHP PYR) & !mPDHK & !mNADH_NAD</p> <p>This node represents the Pyruvate Dehydrogenase enzyme, located in the mitochondria. This enzyme is important for the complete oxidation of glucose derivatives [2].</p>
mPDHK	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:8809 2. PMID:16517405 3. PMID:25437876 	<p>!mNADH_NAD & HIF1A</p> <p>This node represents the enzyme Pyruvate Dehydrogenase Kinase located at the mitochondria. This enzyme is a negative regulator of the Pyruvate Dehydrogenase. It is an important mediator of the metabolic shift towards aerobic glycolysis [2], [3].</p>
mATP_ADG	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:15422 2. PMID:25229666 	<p>ATPSyn</p> <p>This node represents the mitochondrial ATP/ADP ratio. It is an indicator of the oxidative metabolism of quiescent cells supported mainly by the mitochondria, different from the Warburg</p>

		metabolism of proliferative cells supported mainly by the cytosol [2].
cCa (multilevel)	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:29108 2. PMID:29030115 3. PMID:30622345 4. PMID:26100311 5. PMID:23408835 	<p>2 - (IP3R & ORAI1 & TRPM2 & !PMCA) (IP3R & ORAI1 & !TRPM2 & !PMCA) (IP3R & !ORAI1 & TRPM2 & !PMCA)</p> <p>1 - (IP3R & !ORAI1 & !TRPM2 & !PMCA) (!IP3R & !ORAI1 & TRPM2 & !PMCA) (!IP3R & ORAI1 & TRPM2 & !PMCA) (!IP3R & ORAI1 & !TRPM2 & !PMCA)</p> <p>This node represents the cytosolic levels of the Ca²⁺ ion, an important second messenger for T cells signaling [2], [3]. Recent evidences suggest that the Ca²⁺ levels are differentially regulated between T cells from neonates and adults [4], [5]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff very high mCa²⁺ levels;</p> <p>level 1 iff intermediate mCa²⁺ levels;</p> <p>level 0 iff very low mCa²⁺ levels.</p>
cROS (multilevel)	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:26523 2. PMID:17982034 3. PMID:27965578 	<p>2 - (!(cPRX cGPX) & (NOX2 mROS DUOX1 cTR cGR)) (mROS & (cPRX cGPX NOX2 DUOX1 cTR cGR))</p> <p>1 - ((cPRX & !cGPX) (!cPRX & cGPX)) & (NOX2 DUOX1 cTR cGR) & !mROS</p> <p>This node represents the levels of Reactive Oxygen Species generated in the cytosol (cROS). This is representing mainly by hydrogen peroxide (H₂O₂), but it also includes the superoxide anion (O₂⁻) and other derivatives. It is an important second messenger for signaling but it is detrimental at higher levels. Thus, its concentration is maintained under a strict balance</p>

		<p>between production and scavenging. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff very high damaging levels of cROS;</p> <p>level 1 iff normal signaling levels of cROS;</p> <p>level 0 iff very low levels of cROS.</p>
<p>cNADPH_NADP (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:16474 2. PMID:28648096 3. PMID:20175987 4. PMID:23442855 	<p>2 - (mShuttle & PPP & GLUTAMINOLYSIS) (!mShuttle & PPP & GLUTAMINOLYSIS) (mShuttle & !PPP & GLUTAMINOLYSIS) (mShuttle & PPP & !GLUTAMINOLYSIS)</p> <p>1 - (mShuttle & !PPP & !GLUTAMINOLYSIS) (!mShuttle & PPP & !GLUTAMINOLYSIS) (!mShuttle & !PPP & GLUTAMINOLYSIS)</p> <p>This node represents the ratio between the redox couple of the reduced (NADHP) vs oxidized (NADP⁺) coenzyme at the cytosol. It is an important indicator of the reducing power of the cell [2], [3], [4]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff corresponds to a very high NADPH/NADP⁺ ratio, the couple is at an extreme of reduction;</p> <p>level 1 iff corresponds to a high or medium NADPH/NADP⁺ ratio, the couple is at normal physiological levels of reduction;</p> <p>level 0 iff corresponds to a very low NADPH/NADP⁺ ratio, the couple is at an extreme of oxidation.</p>
<p>cGSH_GSSG (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHEBI:16856 2. PMID:30232291 	<p>2 - cGR & !cGPX</p> <p>1 - cGR & cGPX</p>

	3. PMID:25701705	<p>This node represents the ratio between the reduced (GSH) and the oxidized (GSSG) cytosolic pool of glutathione, an important antioxidant of the cell [2]. In some cases of reductive stress, the extremely reduced GSH/GSSG ratio is an inductor of ROS production by the enzyme Glutathione Reductase [3]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff highly reduced;</p> <p>level 1 iff normal physiological reduction status;</p> <p>level 0 iff highly oxidized.</p>
cATP_ADG	1. CHEBI:15422	GLYCOLYSIS
	2. PMID:20814441	<p>This node represents the cytosol ATP/ADP ratio. It is an indicator of the Warburg metabolism of proliferative cells supported mainly by the cytosol, different from the oxidative metabolism of quiescent cells supported mainly by the mitochondria [2].</p>
AMP_ATP	1. CHEBI:16027	!cATP_ADG & !GLYCOLYSIS
	2. PMID:20814441	<p>This node represents the cellular AMP to ATP ratio. An important indicator of the energy status of the cell [2].</p>
cTRX (multilevel)	1. HGNC:12435	2 - cTR & !cROS
	2. PMID:29749372	1 - cTR & cROS:1
	3. PMID:23397885	<p>This node represents the thioredoxin cytosolic pool. This is an important element on the antioxidant machinery of the cell. It receives electrons from NADPH and transfers the electrons to other signaling proteins [2]. In some cases of reductive stress, the extremely reduced TRX pool is an inductor of ROS production by the enzyme Thioredoxin Reductase [3]. It is a multilevel node taking</p>

		<p>level 2 iff highly reduced;</p> <p>level 1 iff normal physiological reduction status;</p> <p>level 0 iff highly oxidized.</p>
<p>cGR (multilevel)</p>	<p>1. HGNC:4623</p> <p>2. PMID:25701705</p>	<p>2 - cGSH_GSSG:2 & (cNADPH_NADP:1 cNADPH_NADP:2)</p> <p>1 - (cNADPH_NADP:1 & !cGSH_GSSG) (cNADPH_NADP:1 & cGSH_GSSG:1) (cNADPH_NADP:2 & !cGSH_GSSG) (cNADPH_NADP:2 & cGSH_GSSG:1)</p> <p>This node represents the cytoplasmic enzyme Glutathione Reductase (cGR). This enzyme is important in the generation of reduced Glutathione from NADPH. It is a source of ROS at extreme reduction conditions. It is a multilevel node [2] taking</p> <p>level 2 iff highly reduced enzyme;</p> <p>level 1 iff normal physiological redox status of the enzyme;</p> <p>level 0 iff highly oxidized enzyme.</p>
<p>cGPX (multilevel)</p>	<p>1. HGNC:4554</p> <p>2. PMID:23397885</p>	<p>2 iff cGSH_GSSG:2 & !cROS</p> <p>1 iff cGSH_GSSG:1 & !cROS</p> <p>This node represents the cytoplasmic levels of the glutathione peroxidase. It is an important element of the antioxidant machinery [2]. It is a multilevel node.</p>
<p>cTR (multilevel)</p>	<p>1. HGNC:12437</p> <p>2. PMID:29278740</p>	<p>2 - cTRX:2 & cNADPH_NADP:2</p> <p>1 - (cNADPH_NADP:1 & !cTRX) (cNADPH_NADP:1 & cTRX:1) </p>

	<ol style="list-style-type: none"> 3. PMID:25701705 4. PMID:20175987 	<p>(cNADPH_NADP:2 & !cTRX) (cNADPH_NADP:2 & cTRX:1) (cNADPH_NADP:1 & cTRX:2)</p> <p>This node represents the cytosolic enzyme Thioredoxin Reductase (cTR) [3]. This enzyme is important in the generation of reduced Thioredoxin from NADPH. It is a source of ROS at extreme reduction conditions [4], [2]. It is a multilevel node taking</p> <p>level 2 iff highly reduced enzyme;</p> <p>level 1 iff normal physiological redox status of the enzyme;</p> <p>level 0 iff highly oxidized enzyme.</p>
cPRX	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:9354 2. PMID:23397885 	<p>cTRX & !(cROS & LCK)</p> <p>This node represents the cytosolic pool of peroxiredoxin. It is an important antioxidant protein also involved in redox signaling [2].</p>
TORC1	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:3942 2. PMID:23183047 3. PMID:24076634 4. PMID:21233853 5. PMID:14668532 6. PMID:30320109 7. PMID:25893604 8. PMID:30619240 9. PMID:22517423 	<p>(PDK AKT) & !AMPK</p> <p>This node represents the mTORC1 complex. It is an important regulator of the metabolic adaptation of T cells upon activation.</p>
TORC2	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:3942 2. PMID:21310961 3. PMID:30320109 4. PMID:25893604 	<p>PIP3</p> <p>This node represents the mTORC2 complex. It is an important regulator of the metabolic adaptation of T cells upon activation.</p>

	5. PMID:22517423	
SGK	1. HGNC:10810	PDK & TORC2
	2. PMID:11154281 3. PMID:22517423	This node represents the Serum and glucocorticoid inducible kinase. It is activated by mTORC2 complex and is important in the inhibition of the FOXO1 transcription factor during T cell activation [2], [3].
LKB	1. HGNC:11389	LCK
	2. PMID:21930968 3. PMID:21487392	This node represents the serine/threonine kinase liver kinase B 1 (LKB1). It is an important regulator of T cell activation and metabolism [2], [3].
AMPK	1. HGNC:9376	(LKB CAMK2 AMP_ATP) & !cATP_ADG
	2. PMID:21670147 3. PMID:18719600 4. PMID:16818670 5. PMID:23310952 6. PMID:21892142 7. PMID:25360847	This node represents the AMP-activated protein kinase (AMPK). This is an important regulator of cellular energetic metabolism. It controls the transition between the basal metabolism of quiescent cells and the highly anabolic metabolism of proliferating cells.
CAMK2	1. HGNC:1461	CALM
	2. PMID:15843557	This node represents the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. This enzyme connects the calcium waves with other signaling events important for T cells activation and proliferation [2].
PHD	1. HGNC:8548	!cROS & !KrebsCycle
	2. PMID:20199358 3. PMID:24491179 4. PMID:23535595	This node represents the enzyme prolyl 4-hydroxylase. It inhibits HIF1 activation in response to high ROS levels or high succinate levels [2], [3], [4].

IKK	1. HGNC:5960	PKCTH CAMK2 MAP3K11
	2. PMID:10713178 3. PMID:10733597	This node represents the I kappa B kinase (IKK). This kinase is activated by several other kinases (PKC theta, CAMK2 or MAP3K11) and inhibits by phosphorylation the IκB inhibitor of the NFκB transcription factor [2], [3].
IκB	1. HGNC:7797	!IKK
	2. PMID:7594468	This node represents I kappa B alpha, a negative modulator of NFκB transcription factor [2].
PKCA	1. HGNC:9393	cCa
	2. PMID:26826124	This node represents the Ca (2+)-dependent protein kinase C A (PKCA). It activates NFκB transcription factor [2], [3], [4].
	3. PMID:1388136	
	4. PMID:30048879	
CPT1	1. HGNC:2328	!FAS
	2. PMID:30619240	This node represents the enzyme carnitine palmitoyl transferase, an important regulatory enzyme controlling the rate of Fatty Acid Oxidation (FAO) in the mitochondria [2], [3], [4].
	3. PMID:22206904	
	4. PMID:25001241	
PYR	1. CHEBI:15361	GLYCOLYSIS & !mPDH
	2. PMID:30619240	This node represents pyruvate. This is a metabolite derived from the catabolism of glucose through glycolysis [2].
AcetylCoA	1. CHEBI:15351	(mPDH FAO) & !FAS
	2. PMID:30619240	This node represents the mitochondrial pool of the Acetyl CoA metabolite. It is an intermediate metabolite between lipids and carbohydrates. It is a common indicator of the energy fitness of the cell [2], [3].
	3. PMID:25703630	
GLUT1	1. HGNC:11005	HIF1A cMYC

	2. PMID:30619240	This node represents the glucose transporter Glut1, relevant for the glucose uptake required after TCR activation [2].
GLYCOLYSIS	1. 12121659	HIF1A cMYC
	2. PMID:30619240	This node represents the pathway Glycolysis, with enzymes located at the cytosol, responsible for the glucose catabolism. This pathway is upregulated upon TCR activation and is a metabolic signature of highly proliferative cells [1], [2].
FAO	1. PMID:19494812	CPT1
		This node represents the Fatty Acid Oxidation (FAO) metabolic pathway rate. This pathway is maintained high during T cell quiescence and is downregulated upon TCR activation [1].
FAS	1. PMID:24567531	TORC1 & IAMPK
	2. PMID:25592731	This node represents the Fatty Acid Synthesis pathway, regulated mainly by the ACC enzyme [1]. The upregulation of this pathway is important to the cell growth and proliferation after the TCR activation.
GLUTAMINOLYSIS	1. PMID:22195744	cMYC
	2. PMID:20554958	This node represents the rate of the Glutaminolysis metabolic pathway. It is a catabolic pathway upregulated during T cell activation and proliferation [1], [2].
PPP	1. PMID:22195744	cMYC
		This node represents the Pentose Phosphate Pathway, important in the generation of reduction power and carbon skeletons for anabolism and T cell growth and proliferation [1].

<p>KrebsCycle (multilevel)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. PMID:30982525 2. PMID:22195744 	<p>KrebsCycle:2 □ mCa & (AcetylCoA GLUTAMINOLYSIS) & !mNADH_NAD</p> <p>KrebsCycle:1 □ (AcetylCoA GLUTAMINOLYSIS) & !mCa & !mNADH_NAD</p> <p>This node represents the enzymes of the TCA cycle located at the mitochondrial matrix. It is an important indicator of the energetic status of the cell. It is a multilevel node.</p>
<p>ETC</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. PMID:16818739 2. PMID:22206904 3. PMID:12471050 4. PMID:19061483 5. PMID:27085844 6. PMID:30982525 	<p>2 - mNADH_NAD & mQH2_Q</p> <p>1 - (!mNADH_NAD & mQH2_Q) (mNADH_NAD:1 & !mQH2_Q) (mNADH_NAD:2 & !mQH2_Q)</p> <p>This node represents the enzymes of the Electron Transport Chain located in the internal mitochondrial membrane, which transfer electrons from reduced coenzymes to O₂. Several evidences point to the importance of this pathway on T cell activation [2], [3]. At some metabolic situations it generates ROS [4], [5].</p> <p>It is a multilevel node. The ROS production occurs at level 2.</p>
<p>ATPSyn</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC: 823 2. PMID:22889218 3. PMID:28522037 4. PMID:23312134 5. PMID:19061483 6. PMID:27085844 	<p>mdH & !mROS & !mCa</p> <p>This node represents the ATP synthase enzyme complex, located at the internal mitochondrial membrane. It is a redox sensitive node [4], [5], [6].</p>
<p>P38</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:6876 2. PMID:12670401 3. PMID:16542479 	<p>MKK3 ZAP70</p> <p>This node represents P38, a MAPK important in the activation of T cells.</p>

	<ol style="list-style-type: none"> 4. PMID:25151490 5. PMID:18451303 6. PMID:10924852 7. PMID:16799472 8. PMID:15735648 	
ERK	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:6871 2. PMID:19017950 3. PMID:26990855 	<p>MEK</p> <p>This node represents the Extracellular regulated Kinase, a MAPK. It is an important regulator of T cells activation and proliferation [2], [3].</p>
FOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:3796 2. PMID:12972619 3. PMID:15708845 	<p>ERK P38</p> <p>This node represents the subunit FOS, a component of the AP1 transcription factor.</p>
cJUN	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:6204 2. PMID:25680272 3. PMID:10970869 	<p>JNK & cTRX</p> <p>This node represents the subunit JUN, a component of the AP1 transcription factor.</p>
JNK	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:6881 2. PMID:24673683 3. PMID:12670401 4. PMID:10924852 	<p>MAP2K4</p> <p>This node represents the c-Jun N-terminal kinase. It is a MAPK important in the activation of the AP1 transcription factor.</p>
HIF1A	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:4910 2. PMID:23183047 3. PMID:24076634 	<p>TORC1 IPHD</p> <p>This node represents the hypoxia-inducible factor 1 alpha protein. It is an important mediator of the metabolic shift towards aerobic glycolysis in T cells during activation [2], [3].</p>
cMYC	<ol style="list-style-type: none"> 1. HGNC:7553 2. PMID:21704229 3. PMID:22195744 4. PMID:30619240 	<p>TORC1 & ERK</p> <p>This node represents the transcription factor MYC. It is an important regulator of the metabolic shift required for T cells activation and proliferation.</p>

	5. PMID:8035827	
FOXO	1. HGNC:3821	!AKT & !SGK & AMPK
	2. PMID:18391970 3. PMID:19658095	This node represents the Forkhead transcription factor 1. This factor is important in the homeostatic survival of naive T cells [2], [3].
AP1	1. HGNC:6204	FOS & cJUN
	2. HGNC:3796	This node represents the transcription factor AP1. It is composed of the subunits FOS and JUN. It is an important transcriptional regulator of T cell fate upon stimulation. In combination with AP1 it promotes activation, but alone it promotes anergy [3], [4].
	3. PMID:25680272	
	4. PMID:10970869	
NFKB	1. HGNC:9955	!(cROS IkB) & PKCA
	2. PMID:26826124	This node represents the transcription factor NFkB. It is a combination of multiple heterodimers of p50, p65 and c-Rel. It is an important factor for the T cell activation upon stimulation or antigen encounter [2], [3], [4].
	3. PMID:21199863	
	4. PMID:11714266	
NFAT	1. HGNC:7775	CALN
	2. PMID:20725108	This node represents the Nuclear Factor of Activated T cells. It is an important transcriptional regulator of T cell fate upon stimulation [2], [3]. In combination with AP1 it promotes activation, but alone it promotes anergy [4].
	3. PMID:12975316	
	4. PMID:25680272	
IL2	1. HGNC:6001	AP1 & NFAT & NFkB
	2. PMID:23352221	This node represents the cytokine Interleukin-2. It is a marker of T cell activator, and also a mediator of T cells growth and proliferation.
CD69	1. HGNC:1694	NFkB & HIF1A
	2. PMID:28507790	This node represents the early activation marker of T cells CD69. It is a type II C-type lectin
	3. PMID:7665567	

	4. PMID:19841192	involved in lymphocyte migration and cytokine secretion.
QUIESCENCE	1. PMID:23601682	FOXO & !(AP1 NFkB NFAT cMYC)
		This node represents the phenotype of resting naive T cells. It is defined as a unique configuration of metabolic and signaling pathways; which results in a basal oxidative metabolism supported mainly by the mitochondria.
ACTIVATION	1. PMID:19132916	AP1 & NFAT & NFkB & GLYCOLYSIS & GLUTAMINOLYSIS & !FAO & FAS & PPP & !ATPSyn
	2. PMID:23601682	
		This node represents the phenotype of activated T cells. It is defined as a unique configuration of metabolic and signaling pathways; which results in Warburg metabolism of proliferative cells supported mainly by the cytosol.
ANERGY	1. PMID:26256793	NFAT & !FOXO & !AP1 & !NFkB
	2. PMID:24115444	
	3. PMID:19841171	
	4. PMID:19494254	
		This node represents the phenotype of anergic T cells. It is defined as a unique configuration of metabolic and signaling pathways; which results in an incomplete activation and no response.
METABOLIC_ANERGY	1. PMID:26256793	GLYCOLYSIS & KrebsCycle & !(FAS & GLUTAMINOLYSIS)
	2. PMID:24115444	
	3. PMID:19841171	
		This node represents the phenotype of metabolically anergic T cells. It is defined as a unique configuration of metabolic and signaling pathways; which results in a cell not ready for proliferation upon stimulation.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Formato de autorización para depósito de tesis en el
Repositorio Institucional de Acceso Abierto de la UAEM (RIAA-UAEM)

Folio: UAEM000026911

Datos Generales		Autor/Autores:	
Nombre completo (Nombre(s) y apellidos)	JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ VILLANUEVA		
Programa Educativo de Posgrado del que egresa	Doctorado en Ciencias		
Unidad Académica	Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)		
Domicilio (calle, número, colonia, municipio, estado y código postal)	PRIVADA DÁTILES #28 RINCONADA PALMIRA. JIUTEPEC. MORELOS. C.P. 62566		
Correo electrónico	jasvilla84@gmail.com		
Teléfono domicilio (incluirla)	777 404 32 41		
Teléfono celular (incluirla)	777 215 77 29		
Nombre completo del Representante Legal (De ser el caso, acompañar con el original y copia de la carta poder)			
Datos del trabajo recepcional:			
Título y subtítulo	Modulación de la activación de linfocitos T CD8+ de neonatos humanos por especies reactivas de oxígeno.		
Nombre del Director(a) de tesis	MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN	Seleccione una opción: <input checked="" type="radio"/> Tesis <input type="radio"/> Tesina <input type="radio"/> Memoria de trabajo <input type="radio"/> Trabajo de desarrollo profesional por etapas <input type="radio"/> Otro: _____	
Nombre del Codirector(a) de tesis (si aplica)			
Datos del depósito en el RIAA-UAEM:			
<input type="radio"/> Depósito inmediato, con acceso abierto inmediato <input checked="" type="radio"/> Depósito inmediato, con acceso abierto después del periodo de embargo ¹ Fecha de finalización del periodo de embargo (DD/MM/AAAA): <u>19</u> / <u>11</u> / <u>2020</u> <input type="radio"/> Depósito inmediato, con embargo ¹ por tiempo indefinido.		Motivo del embargo: <input type="checkbox"/> La tesis deriva en el registro de una patente <input type="checkbox"/> La tesis deriva en la publicación de un libro <input checked="" type="checkbox"/> La tesis deriva en la publicación de un artículo de investigación en revista arbitrada <input type="checkbox"/> Otro: _____	
Registro INDAUTOR (Opcional):			
No. de registro INDAUTOR: _____ Fecha registro (DD/MM/AAAA) : ___ / ___ / _____			

¹embargo: Significa que el acceso al texto completo de una tesis está restringido para todos por un periodo fijo o indefinido después de que se deposita una tesis en el RIAA-UAEM. Los periodos de embargo pueden abarcar de 6 meses a 5 años. El motivo y la duración del embargo lo determina el(los) autor(es) de la tesis y su director(a).



Formato de autorización para depósito de tesis en el Repositorio Institucional de Acceso Abierto de la UAEM (RIAA-UAEM)

Por este medio, se hace constar que es mi/nuestra libre voluntad en mi/nuestro doble carácter de egresado(s) de la UAEM y autor(es) del trabajo recepcional previamente especificado, lo siguiente:

I.- Hacer entrega a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en adelante UAEM, la copia digital del referido trabajo recepcional que obtuvo los votos aprobatorios, en formato PDF con un tamaño de 4.5 MB, mismo que se deposita en el Repositorio Institucional de Acceso Abierto de la UAEM con fecha (DD/MM/AAAA): 20 / 11 / 20.

II.- Con fundamento en los artículos 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor y 11 y 15 fracción II de la Ley Orgánica de la UAEM y 5,7,8, 9 y 13 de los Lineamientos Generales para la Política de Acceso Abierto de la institución, autorizar a la UAEM para comunicar y exhibir públicamente, en forma total o parcial, en medios digitales, la tesis, tesina, memoria de trabajo y/o trabajo de desarrollo profesional por etapas, por un periodo de 5 (cinco) años, contados a partir de la fecha de la presente autorización. Dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar quien/quienes esto suscribe(n) aviso expreso por escrito a la UAEM de su terminación; en caso de solicitar la terminación, ésta tendrá efectividad al mes siguiente de la notificación realizada a la UAEM. Lo anterior, en el entendido de que el referido organismo público autónomo se compromete en todo momento a respetar y atribuir la autoría en la exhibición pública en medios digitales del trabajo recepcional objeto de este trámite.

III.- Quien(es) esto suscribe(n) manifiesta(n) que el contenido académico, literario, la edición y, en general, cualquier parte de la tesis, tesina, memoria de trabajo y/o trabajo de desarrollo profesional por etapas, son de mi/nuestra autoría y lo que no lo es, se encuentra correctamente referenciado, por lo que se deslinda de toda responsabilidad a la UAEM, en caso de que el contenido del trabajo recepcional (tesis, tesina, memoria de trabajo, trabajo de desarrollo profesional por etapas) o la autorización concedida, afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o, en general, cualquier derecho de propiedad intelectual de tercero(s). Asumiré/asumiremos cabal e incondicionalmente las consecuencias de cualquier acción legal que pueda derivarse del caso.

IV.- En caso de haber elegido la opción de embargo por periodo fijo o indefinido, me/nos comprometo/comprometemos a dar aviso a la UAEM de terminación anticipada del mismo, si fuera el caso.

V.- Acepto/Aceptamos que las notificaciones relacionadas al presente trámite se me/nos hagan llegar exclusivamente al correo electrónico que aparece anotado en el presente.

Nombre y firma del(os) Autor(es) o del Representante Legal		Fecha y sello de recepción de la Dirección de Desarrollo de Bibliotecas
<p><i>José Antonio Sánchez Villanueva</i></p> 		
Vo. Bo. del Director(a) de tesis	Nombre y firma del Codirector(a) de tesis (si aplica)	
		

