



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
Licenciatura en Ciencias: Área terminal Bioquímica y Biología
Molecular

**“Evaluación de la expresión de genes asociados a tolerancia en
linfocitos T CD8+ de neonatos y adultos humanos”**

T E S I S

QUE PRESENTA:

ALEJANDRA CEDILLO BAÑOS

Para obtener el Grado de

LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dra. Ma. Angélica Santana Calderón (CIDC, UAEM)

Sinodales:

- ***Presidente.* Dra. Verónica Narváez Padilla (CIDC, UAEM)**
 - ***Secretario.* Dra. Sonia Dávila Ramos (CIDC, UAEM)**
- ***Suplente 1.* Dr. Ramón González García Conde (CIDC, UAEM)**
- ***Suplente 2.* Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC, UAEM)**

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2021

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar gracias a mi familia por estar siempre conmigo, a mis papás por amarme y apoyarme incondicionalmente en todo momento, por creer siempre en mí, por esforzarse para que nunca me faltara nada, ustedes mi mayor ejemplo, este trabajo es gracias a ustedes. También es en memoria de mi abuelita Leonides, quien ya no pudo estar para verme terminar pero siempre estuvo pendiente de mis logros, un abrazo hasta el cielo abuelita.

A Antonio, por ser siempre mi refugio al final de un mal día, por estar siempre a mi lado alentándome a seguir adelante para cumplir mis sueños. Gracias por estar conmigo desde principio a fin.

A la Dra. Angélica Santana quiero agradecerle profundamente por ser la mejor tutora posible, por ser una gran mentora que forma profesionistas de calidad tanto profesional como humanamente. Por ser tan paciente y comprensiva con nosotros sus alumnos “los chiquitos” y por preocuparse en todos los aspectos por nosotros. Gracias Dra. por dejarme ser parte de la familia que ha formado en el laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio, a todos y cada uno de ustedes les agradezco por apoyarme y tenderme una mano cada vez que lo necesité, por ser buenos amigos y hacer grato el tiempo compartido. Especialmente quiero agradecerle a la Dra. Darely Gutiérrez por ser la mejor mentora experimental que pude haber tenido, por tu gran paciencia y apoyo, por guiarme a través de tu experiencia gracias, Dare.

A mis sinodales, les agradezco por haber sido parte de mi formación académica, ha sido un gusto tomar clases con cada uno de ustedes y aprender de sus conocimientos.

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

A las mamás de todos los bebés que nos permitieron el uso de las muestras de sangre para este estudio.

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

RESUMEN

Los neonatos son una población muy susceptible a infecciones por patógenos intracelulares, que a menudo son la causa de una alta tasa de mortalidad. Las células de cordón umbilical tienen una naturaleza tolerante, y muestran una respuesta pobre para generar memoria inmunológica.

Los linfocitos T CD8⁺ son los encargados de eliminar a las células infectadas, por ende a los reservorios de los patógenos intracelulares. Estas células en neonatos han mostrado estar enriquecidas en la expresión de un grupo de genes asociados a tolerancia descritos en un modelo murino, sugiriendo que existe un programa de tolerancia conservado entre especies.

En este trabajo evaluamos el efecto de la estimulación a través del TCR en presencia y ausencia de la Interleucina-12 en la transcripción de un grupo de genes asociados a tolerancia en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos humanos por medio de la técnica RT-qPCR.

Se observó que la IL-12 tiene la capacidad de aumentar la expresión de algunos de estos genes, en particular los relacionados con ciclo celular, mientras que redujo considerablemente la expresión de otros, asociados a transporte vesicular y citoesqueleto. En las células de adulto, la estimulación en presencia de la IL-12 también aumentó la expresión de genes asociados a ciclo celular, pero no tuvo un efecto inhibitorio sobre los otros genes. Se necesitan más de estas muestras para poder concluir dicho efecto de manera apropiada.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Inmunidad	1
1.1.1 La inmunidad innata.....	2
1.1.2 La inmunidad adaptativa.....	2
1.1.3 La inmunidad humoral	3
1.1.4 La inmunidad celular	3
1.2 Los linfocitos T.....	4
1.3 Linfocitos T CD8+.....	4
1.3.1 Linfocitos T citotóxicos (células Tc1)	5
1.3.2 Células Tc2.....	6
1.3.3 Células Tc9.....	6
1.3.4 Células Tc17.....	7
1.3.5 Células Supresoras	7
1.4 Activación de linfocitos T CD8+	9
1.4.1 Primera señal: reconocimiento del antígeno por el TCR.....	9
1.4.2 Segunda señal: moléculas coestimuladoras.....	10
1.4.3 Tercera señal: citocinas	11
1.5 IL-12.....	11
1.6 Tolerancia.....	13
1.6.1 Tolerancia central.....	14
1.6.2 Tolerancia periférica.....	15
1.7 Inmunidad neonatal	18
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	19
2.1 Antecedentes	19
2.2 Objetivo general.....	26
2.3 Objetivos particulares	26
2.4 Hipótesis.....	26
3. METODOLOGÍA.....	27

3.1	Diseño de cebadores para cDNA.....	27
3.2	Purificación de linfocitos T CD8+ vírgenes	27
3.3	Estimulación de linfocitos T CD8+ vírgenes.....	28
3.4	Extracción de RNA	28
3.5	Análisis por RT-qPCR	28
4.	RESULTADOS	29
4.1	Diseño de cebadores	29
4.2	Purificación de Linfocitos T CD8+	30
4.3	Curvas estándar.....	31
4.4	Estimulación de linfocitos T CD8+ y extracción de RNA.....	34
4.5	Evaluación de la transcripción de genes asociados a tolerancia.....	34
5.	DISCUSIÓN.....	43
6.	CONCLUSIONES	45

ABREVIATURAS

NK= Célula asesina natural

BCR = Receptor de células B

TCR= Receptor de células T

APC= Células presentadoras de antígenos

MHC= Complejo principal de histocompatibilidad

IFN= Interferón

TNF= Factor de necrosis tumoral

IL= Interleucina

PBMCs= Células mononucleares de sangre periférica

CBMCs= Células mononucleares de sangre de cordón

TABLAS

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados para RT-qPCR

FIGURAS

Figura 1. Mapa de calor de niveles de transcripción de grupos de genes diferencialmente expresados en células T CD8 TCR GAG vírgenes, de memoria, tolerantes, rescatadas y retolerizadas.

Figura 2. Purezas de linfocitos T CD8+ de Adulto y Neonato

Figura 3. Expresión de CD45RO en linfocitos T CD8+ de Adulto

Figura 4. Curvas estándar de cebadores utilizados para evaluar la transcripción de genes asociados a tolerancia

Figura 5 Transcripción del gen *CAPG* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonato

Figura 6 Transcripción del gen *SEC13* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonato

Figura 7. Transcripción del gen *TFDP1* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonato

Figura 8. Transcripción del gen *BIRC5* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos

Figura 9. Transcripción del gen *BUB1* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos

Figura 10. Transcripción del gen *IGF1R* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos

Figura 11. Transcripción del gen *SGO1* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos

Figura 12. Transcripción del gen *CDK1* en linfocitos T CD8+ de Adultos.

Figura 13. Transcripción del gen *RBBP4* en linfocitos T CD8+ de Adultos

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunidad

Históricamente el término inmunidad ha hecho referencia a la protección contra enfermedades infecciosas, sin embargo las células y moléculas que conforman el sistema inmunitario también responden frente a sustancias extrañas no infecciosas. Esto desencadena una respuesta inmunitaria, que en ocasiones genera daño tisular y enfermedades. La respuesta inmunitaria es una reacción hacia los componentes de microbios, así como también hacia macromoléculas y sustancias químicas que son reconocidos por los linfocitos o por los anticuerpos como extrañas. A las sustancias que desencadenan una respuesta inmune se les conoce como “antígenos” [1].

El sistema inmunitario está compuesto por células y moléculas que responden conjunta y coordinadamente en la defensa contra sustancias extrañas. La inmunidad se divide en innata y adaptativa, varían en velocidad y especificidad de la reacción. [2]

La inmunidad innata y la adaptativa mantienen una estrecha comunicación, principalmente a través de las células dendríticas y las citocinas. Las células dendríticas se encargan de desencadenar la respuesta adaptativa, a través de la presentación de antígenos a los linfocitos T. Las citocinas son un grupo de proteínas secretadas principalmente por las células del sistema inmune que regulan y coordinan muchas de sus funciones, como crecimiento, activación y diferenciación

celular [1]. Las interleucinas son un tipo de citocina con funciones inmunomoduladoras que originalmente se vieron expresadas por leucocitos, tienen efectos proinflamatorios y antiinflamatorios, así como también función parácrina y autócrina [3].

1.1.1 La inmunidad innata

La inmunidad innata provee una defensa inmediata y es la primera línea de defensa contra los patógenos. Se conforma por barreras físicas y químicas, como mucosas y epitelios y por distintas estirpes celulares. Así encontramos células fagocíticas, como macrófagos y neutrófilos; células dendríticas; linfocitos citolíticos naturales (NK); y proteínas sanguíneas, como las que conforman el sistema del complemento, péptidos antimicrobianos y algunas moléculas que median la inflamación. Esta inmunidad es capaz de discriminar entre moléculas propias y extrañas, reacciona ante estructuras comunes y compartidas entre grupos de microbios conocidos como “patrones moleculares asociados a patógenos” que no están en las células del huésped, pero no es capaz de distinguir diferencias sutiles entre ellos. [1], [2]

1.1.2 La inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa es una respuesta que surge tiempo después de la innata pero es específica hacia cada antígeno. Actúa aún con más fuerza en un segundo encuentro ante el mismo microbio, lo que se conoce como “memoria”. Está compuesta por linfocitos B y T, las únicas células del cuerpo que expresan receptores específicos para antígeno (BCR y TCR, respectivamente). Cuando un linfocito reconoce su antígeno específico prolifera considerablemente. Todos los

linfocitos descendientes expresarán el receptor de forma clonal, es decir, todos reconocerán al mismo antígeno. [1]

La inmunidad adaptativa se divide en dos, la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Cabe decir que en ambos tipos de inmunidad participan tanto linfocitos T como linfocitos B. La diferencia es que el principal mecanismo efector para la eliminación del patógeno por la inmunidad humoral se encuentra en el suero mismo. En cambio, en la inmunidad celular, son los macrófagos y los linfocitos citotóxicos los que eliminan al patógeno.

1.1.3 La inmunidad humoral

La inmunidad humoral es la principal defensa contra microorganismos extracelulares y sus toxinas. Está compuesta por anticuerpos producidos por las células B, los cuales tienen la función de reconocer, neutralizar y marcar a los antígenos para su eliminación posterior [1].

1.1.4 La inmunidad celular

La inmunidad celular está mediada por los linfocitos T, que se encargan de eliminar células infectadas, dañadas o tumorales; y los reservorios de la infección, como son bacterias y virus que algunas veces sobreviven dentro de los fagocitos. La inmunidad celular contribuye a la eliminación de microbios intracelulares principalmente, pero algunos linfocitos T también cooperan en la destrucción de los microbios extracelulares al reclutar a los leucocitos encargados de su eliminación [1].

1.2 Los linfocitos T

Los precursores de los linfocitos T surgen de la médula ósea, migran hacia el timo, donde maduran para salir como células vírgenes. Los linfocitos T clásicos expresan receptores clonales para el antígeno que se denominan $\alpha\beta$. Existen dos subgrupos de linfocitos T, los linfocitos T citotóxicos que expresan principalmente la proteína CD8 y los linfocitos T cooperadores que expresan la proteína CD4. Existen otros tipos de linfocitos T que se encuentran en menor cantidad, como son los $\gamma\delta$ y los NKT [1].

1.3 Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8+ son linfocitos T que expresan la molécula CD8 en su superficie y se diferencian en células citotóxicas o células de memoria después de su activación. La activación se logra cuando una célula presentadora de antígenos (APC) les presenta un péptido dentro del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I), junto con señales de co-receptores y citocinas co-estimuladoras. Una vez que se les presenta un antígeno ocurre un proceso de activación en el que el linfocito sufre una expansión clonal y adquiere un fenotipo efector, conocido como respuesta primaria. La mayoría de estos descendientes morirán por apoptosis después de cierto tiempo, proceso conocido como contracción, sin embargo una pequeña porción de esta población con función efectora permanecerán como células T de memoria. Estas células mantienen su capacidad de reconocer al antígeno en un segundo reencuentro, conocido como respuesta secundaria, que es más rápida y fuerte.

Las condiciones en las que son activados los linfocitos T CD8+ influyen en el destino de su diferenciación en distintas subpoblaciones. Dependiendo del tipo de señal que reciben, se expresan factores de transcripción que inducen la adquisición de los diferentes fenotipos efectores [4].

1.3.1 Linfocitos T citotóxicos (células Tc1)

Los linfocitos T citotóxicos son la subpoblación de linfocitos T CD8+ mejor caracterizados. Participan en la eliminación de patógenos intracelulares y pueden matar a las células infectadas por distintos mecanismos. Puede ser, a través del ligando Fas (FasL) que interacciona con el receptor Fas de las células infectadas o dañadas desencadenando la vía extrínseca de muerte celular. También pueden liberar moléculas citotóxicas como perforina y granzimas. Estas células también secretan citocinas como IFN- γ y el factor de necrosis tumoral TNF- α , estas desencadenan señalizaciones que pueden activar a la vía innata y la adaptativa, acelerando el proceso de eliminación de los patógenos intracelulares por medio de la activación de macrófagos o células NK. Su diferenciación en células Tc1 se ve fuertemente influido por la Interleucina-2 (IL-2) y la Interleucina-12 (IL-12). Tras la eliminación del patógeno la mayoría de las células efectoras morirán por apoptosis, sin embargo una pequeña parte de células activadas permanecerán por más tiempo estableciendo la población de memoria. La diferenciación de las células Tc1 hacia efectoras o de memoria es dictada por factores transcripcionales como T-bet, Eomes, Blimp-1, BCL6, Id2, e Id3; mientras que T-bet es el factor transcripcional firma de células efectoras Eomes es de las de memoria. El balance de estos

factores depende de señales del ambiente como las citocinas, proteínas Wnt, contacto célula-célula y la fuerza de la unión TCR-MHC [4].

1.3.2 Células Tc2

Las células Tc2 secretan IL-4 IL-5 e IL-13 y expresan el factor transcripcional GATA3 como firma. Su función es controlar la respuesta inflamatoria de los macrófagos y favorecer una respuesta mediada por anticuerpos. Pueden estar involucradas en las alergias por secretar las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que favorecen la función de células cebadas y eosinófilos y la producción de Inmunoglobulina E, [4].

1.3.3 Células Tc9

Las células Tc9 son linfocitos T CD8+ intraepiteliales de intestino que producen IL-9, IL-10, bajos niveles de granzima B e IFN- γ por lo que son poco citotóxicos. Presentan marcadores como PD-1 y el receptor de quimiocinas CCR6. Los factores transcripcionales STAT6 e IRF4 son importantes para la producción de IL-9, así como también la presencia de IL-4 en conjunto con el factor de crecimiento tumoral TGF- β . Estas células inhiben la activación de los linfocitos T CD4+ específicos de antígeno de una manera dependiente de IL-10 previniendo la inflamación en el intestino delgado mediada por linfocitos T CD4+. Debido a su fuerte producción de IL-9 también se han asociado con una capacidad antitumoral y a la propagación de las células Th2, un tipo celular que está relacionado con alergias [4], [5].

1.3.4 Células Tc17

Las células Tc17 son productoras de las citocinas IL-17 e IL-21, expresan los factores de transcripción ROR γ t, ROR α y el receptor para IL-23. La diferenciación hacia este fenotipo es determinado por las citocinas IL-6 o IL-21 junto con TGF- β . Las células Tc17 han sido detectadas en enfermedades autoinmunes, por su papel en la activación de los neutrófilos los cuales pueden aumentar la inflamación y llegar a causar daño tisular, y hay una fuerte correlación de su presencia con la progresión de la enfermedad [4].

1.3.5 Células Supresoras

Las células T CD8+ pueden ser supresoras de las respuestas inmunes mediadas por células T CD4+, otras células T CD8+ activadas o por células dendríticas [1].

El subtipo de linfocitos T CD8+ supresores restringidos por las moléculas de MHC clase Ib no clásico (Qa-1 en ratones y HLA-E en humanos) reconoce específicamente péptidos en conjunto con el MHC clase Ib, expresado por linfocitos TCD4+ activados. Suprimen a las células T autorreactivas mediante mecanismos dependientes de perforina. La IL-15 es una citocina importante para la formación de esta subpoblación y muestran un fenotipo CD44^{hi}CD122+Ly49+. Surgen en etapas tardías durante la respuesta inmune y se ha visto que previenen la autoinmunidad [4].

Otro tipo de células T CD8+ supresoras se han observado que son restringidas por el MHC clase Ia. Producen IL-10 y suprimen la producción de IFN- γ en las células T [4].

En un modelo autoinmune de diabetes se encontraron linfocitos T CD8+ reguladores que reconocen autoantígenos y suprimen las respuestas de células autorreactivas mediante mecanismos dependientes de perforina, IFN- γ y de indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) [4].

Existe otro tipo de células supresoras con fenotipo CD8+FoxP3+ que se ha observado previenen el rechazo a aloinjertos. Estas suprimen las respuestas de células T restringidas por el MHC clase I [4].

El fenotipo CD8+CD28- es restringido por el MHC clase I y presenta actividad supresora al inhibir la función de las células presentadoras de antígenos. La supresión ocurre a través de contacto directo entre la célula supresora y la APC. Inducen la expresión de los receptores inhibidores ILT3 e ILT4 en la superficie celular de la APC. La expresión de estos receptores conduce a la incapacidad de las APCs para iniciar la activación de las células T cooperadoras [6].

Por último, también existe un fenotipo CD8+HLA-DR+ con actividad supresora ejercida por las moléculas inhibidoras CTLA-4 y PD-1, por lo que depende de contacto directo [7].

1.4 Activación de linfocitos T CD8+

La activación de linfocitos vírgenes y su diferenciación a un fenotipo efector ocurren a través del TCR, que reconoce al antígeno presentado a través del MHC clase I de las APCs (primera señal). También se necesitan moléculas coestimuladoras (segunda señal) y citocinas (tercera señal) para alcanzar completamente su potencial efector. Si la activación del linfocito ocurre en presencia únicamente de la primera señal, la célula se puede volver anérgica, es decir que no se enciende la respuesta inmunitaria[1], [8]

1.4.1 Primera señal: reconocimiento del antígeno por el TCR

La presentación del antígeno por APCs (principalmente por las células dendríticas) a través del MHC I hacia el TCR es indispensable como primera señal para la activación de los linfocitos TCD8+, ya que asegura que la respuesta será específica al antígeno. Una interacción fuerte y prolongada entre TCR-MHC asociado a péptido produce una óptima expansión y diferenciación, mientras que exposiciones cortas pueden ocasionar respuestas truncadas. La avidez de los linfocitos a unirse a APCs que expresan complejos de MHC con péptidos depende de la afinidad del TCR hacia los péptidos-MHC y de la cantidad de TCR que se expresan en la superficie celular. Se han observado más oligómeros de TCR en células de memoria comparados con las células vírgenes, viéndose implicado en mayor sensibilidad de las células de memoria hacia los antígenos que las células vírgenes [8].

1.4.2 Segunda señal: moléculas coestimuladoras

Para que el linfocito virgen prolifere, además de las señales inducidas por el antígeno también requiere de señales que se encuentran en las APC. Las moléculas que proporcionan estas señales son conocidas como moléculas coestimuladoras, y se encuentran en grandes cantidades en las células dendríticas activadas. Las principales señales coestimuladoras son de la familia B7/CD28 y de la familia TNF/TNFR, los inhibidores de estas moléculas coestimuladoras limitan la expansión de los linfocitos. La familia B7/CD28 es la mejor caracterizada, las moléculas CD28 son los receptores que se expresan en la superficie de los linfocitos T y sus moléculas ligando (coestimuladoras) son B7-1 y B7-2 que se encuentran en las células dendríticas activadas. Las señales inducidas por CD28 participan en la expresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-XL que promueven la proliferación de los linfocitos, mayor actividad metabólica y producción de la interleucina 2 (IL-2). En ausencia de coestimuladores los linfocitos T que se encuentran ante antígenos mueren por apoptosis [1], [8].

A pesar de que los linfocitos T sean completamente activados hay casos en que terminan siendo disfuncionales. El agotamiento es un ejemplo de disfunción efectora en los linfocitos. Las infecciones crónicas causadas por estimulación crónica de antígeno y la persistencia de inflamación pueden llevar a los linfocitos a un estado de agotamiento. Inicialmente el linfocito T CD8+ es responsivo pero conforme progresa la infección pierde la capacidad de proliferar y producir IL-12, después deja de producir TNF α y IFN- γ . La pérdida de esta función efectora

coincide con el aumento de expresión de receptores inhibidores de coestímulos, principalmente el receptor PD-1. [9]

1.4.3 Tercera señal: citocinas

El ambiente inflamatorio, es decir, la producción de citocinas proinflamatorias por la inmunidad innata (tercera señal) es necesario para una adecuada activación, sobrevivencia, proliferación y establecimiento de los linfocitos T CD8+ de memoria. La interleucina 12 (IL-12) y el interferón tipo I (IFN I) son citocinas proinflamatorias importantes en el proceso de expansión en respuesta a patógenos [8].

1.5 IL-12

La Interleucina 12 es una citocina proinflamatoria producida principalmente por células dendríticas y fagocitos. Es una proteína heterodimérica (p70) compuesta por una cadena de 35 kDa, conocida como p35, y una cadena de 40 kDa, conocida como p40.[10].

El receptor de la IL-12 (IL-12R), es expresado principalmente por los linfocitos T CD8+ y los NK. Está compuesto por dos cadenas, la IL-12R β 1 y la IL-12R β 2 y la expresión de ambas cadenas en linfocitos T CD8+ es inducida tras la activación a través del TCR [10].

La presencia de la IL-12 como tercera señal durante la activación de los linfocitos T CD8+ vírgenes es crucial para generar el fenotipo efector citolítico. Se ha observado que se puede inducir su ampliación clonal en presencia de altos niveles de antígeno y de la segunda señal, pero en ausencia de la tercera señal se observó que dichos

linfocitos no alcanzan la actividad efectora citolítica, incluso que pueden volverse tolerantes [11].

La IL-12 induce una mayor y más prolongada expresión del receptor de IL-2R α (CD25) en linfocitos T CD8+, por lo que son más responsivos a niveles bajos de IL-2, citocina inductora de proliferación [11]. Además también se ha observado que los linfocitos vírgenes estimulados con la señal 1, señal 2 y la IL-12 como tercera señal, regulan al alza la expresión de Bcl-3, una proteína miembro de la familia I κ B, las cuales están involucradas en la proliferación, posiblemente por la regulación positiva de genes antiapoptóticos y la represión de los proapoptóticos. Mientras que en los linfocitos que no fueron activados en la presencia de la IL-12 no presentaron dicha regulación al alza de Bcl-3 [12].

Las primeras señales de sobrevivencia en los linfocitos vírgenes son inducidos a través del TCR y moléculas coestimuladoras, los cuales promueven proliferación temprana por la expresión de proteínas antiapoptóticas. Pero a cierto tiempo después de haber iniciado la activación estas señales disminuyen y los linfocitos pueden empezar a morir. Es entonces cuando Bcl-3 parece ser un factor importante de sobrevivencia para las células previamente activadas, ya que es cuando se observa su mayor expresión [12].

En un estudio realizado en nuestro laboratorio por Gutierrez-Reyna *et al.* se exploró el papel de la IL-12 en la activación de las células T CD8+ neonatales y adultas. Los resultados sugieren la contribución de las señales de la IL-12 a la maduración de las células neonatales y a la activación completa en ambas poblaciones celulares.

Las señales de esta citocina, tanto en las células de neonato como en las de adulto, aumentaron la expresión de genes clave asociados con la activación, citotoxicidad, inflamación y el control de la inflamación excesiva. Particularmente en las células de neonato sólo cuando se sometieron a estimulación de TCR+IL-12 se vio aumentada significativamente la expresión de genes que están involucrados predominantemente en la señalización celular, el citoesqueleto y el transporte y metabolismo celular; también se observó que los genes asociados con la inmadurez de los linfocitos T CD8+ redujeron su expresión.

En conjunto, los resultados de dicho estudio señalan que la IL-12 es una tercera señal importante que induce la reprogramación transcripcional en las células T CD8+ neonatales, favoreciendo su maduración y funcionalidad. [13].

1.6 Tolerancia

La tolerancia inmunitaria se define como la ausencia de respuesta del sistema inmunitario ante un antígeno, ya sea propio o extraño. Como se mencionó antes, el sistema inmune es capaz de distinguir entre lo propio y lo extraño, y es indispensable que pueda responder ante lo extraño pero no a los antígenos propios. La respuesta en contra de antígenos propios genera enfermedades autoinmunes en las que el propio sistema inmunitario ataca a los órganos y tejidos propios causando lesiones. De modo que debe ser capaz de reconocer antígenos propios pero no responder ante ellos, por lo que la tolerancia también debe ser específica ante antígeno. Para que los linfocitos sepan distinguir entre lo propio de lo extraño pasan por procesos de maduración en distintas etapas, conocidas como tolerancia central

y tolerancia periférica, para asegurar que los linfocitos que reconocen con avidez los antígenos propios sean suprimidos antes de salir a la periferia.

1.6.1 Tolerancia central

Cuando los linfocitos aún son inmaduros y se encuentran en el timo, se les presentan antígenos propios a través de las APCs. Si los timocitos reconocen antígenos propios, son sometidos a selección negativa, es decir, son eliminados por apoptosis; si no los reconocen son eliminados por ser células no funcionales (muerte por abandono); finalmente el reconocimiento débil del antígeno lleva a la selección positiva, en la que el timocito puede salir del timo como célula virgen. Debido a que en el timo se presentan principalmente antígenos propios, los linfocitos que son específicos de antígeno suelen ser autorreactivos. Los factores que determinan el que un linfocito sea sometido a selección negativa dependen de que se encuentren con el antígeno propio, ya sea porque es expresado en el timo o porque llegó ahí a través de la sangre, y de la afinidad del TCR hacia el antígeno. En el timo se encuentran las células epiteliales medulares tímicas, que expresan antígenos de tejidos periféricos bajo el control de la proteína reguladora autoinmunitario (AIRE). La proteína AIRE participa en la reestructuración de la cromatina y actúa como un regulador transcripcional que promueve la expresión de antígenos que normalmente no lo harían en el timo. Sin embargo algunos linfocitos TCD4+ que son autorreactivos y se encuentran con el antígeno en el timo no son eliminados sino que se diferencian hacia un fenotipo regulador, estos salen del timo y suprimen las respuestas ante antígenos propios en la periferia. No se conoce qué

es lo que determina que algunos linfocitos autorreactivos sean eliminados mientras que otros son diferenciados a reguladores [1]. No se han reportado células supresoras CD8+ del timo, éstas se diferencian en la periferia.

1.6.2 Tolerancia periférica

A pesar de los mecanismos que existen en el timo para evitar que linfocitos autorreactivos salgan a órganos linfoides periféricos. A veces, algunos linfocitos logran evadir la selección negativa, ya sea porque en el timo no se encontraron con su antígeno específico o porque estos se expresan en etapas posteriores. Es por eso que existen mecanismos de tolerancia periférica, que pueden ser anergia (falta de respuesta funcional), supresión por parte de los linfocitos T reguladores y la eliminación (muerte celular) de los linfocitos autorreactivos.

Las células anérgicas no tienen la capacidad de responder al antígeno y permanecen días o semanas en estado quiescente. Anteriormente se describió que para que se lleve a cabo una activación completa de los linfocitos se necesita de las tres señales, es decir la presentación del antígeno en conjunto con coestímulos y el ambiente proinflamatorio. Es probable que los antígenos propios sean presentados a los linfocitos específicos sin las otras señales, provocando la anergia. Se cree que varias vías participan en el mantenimiento del estado anérgico, como que la transducción de señales del TCR es bloqueado en las células anérgicas, o que el reconocimiento de antígenos propios pueden desencadenar la degradación de proteínas asociadas al TCR por medio de ubiquitina ligasas. Por último también se conoce la participación de los receptores inhibidores de la familia de CD28 (CTLA-

4 y PD-1), que se unen a las moléculas B7 y se encargan de bloquear los coestímulos en los linfocitos que reconocen antígenos propios y así evitar su activación completa. [1]

Los linfocitos T CD4⁺ reguladores, mencionados anteriormente, son importantes para el mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio en la periferia, ya que se ha observado que la deficiencia en estas células está relacionado con enfermedades autoinmunes. El fenotipo mejor caracterizado de estas células se identifica por expresar altas cantidades de la cadena α del receptor para la interleucina 2 (CD25) y expresar el factor de transcripción FoxP3, el cual es crucial para su desarrollo. Por lo tanto, estas células son CD4⁺ Foxp3⁺CD25^{hi}. También suelen expresar altas cantidades de CTLA-4 en su superficie, necesario para su función supresora. Estos linfocitos suprimen las respuestas inmunitarias por los siguientes mecanismos:

Producción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β . A pesar de que los linfocitos T reguladores necesitan de TGF- β para su desarrollo, esta misma citocina tiene un efecto inhibitorio en la proliferación y activación de linfocitos T. Del mismo modo, IL-10, una citocina producida por los linfocitos T reguladores, tiene actividad supresora en muchas de las funciones de los macrófagos y células dendríticas activadas como la producción de IL-12.

Consumo de IL-2. Debido a que los linfocitos T reguladores expresan altas cantidades del receptor para la IL-2 pueden consumir mucha de esta citocina y

privar a las demás células dependientes de este factor de crecimiento, evitando su proliferación.

Por último, el CTLA-4 expresado en los linfocitos T reguladores se une al B7 de las APC lo que disminuye su capacidad para estimular a los linfocitos T, dirigiéndolos a la anergia. [1]

Además de los mecanismos de tolerancia anteriores, finalmente está el de la eliminación de linfocitos T mediante la muerte celular apoptótica, que puede ser por la vía intrínseca o mitocondrial así como también por la vía extrínseca o vía del receptor mortal. Cuando las células son privadas de señales de sobrevivencia o de coestímulos dejan de producir proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-XL y la mitocondria se vuelve permeable, dejando salir al citocromo c y otros factores que desencadenan la muerte celular intrínseca. Por otro lado, el estímulo repetido de los linfocitos T promueve la expresión de los receptores de muerte Fas (CD95) y su ligando (FasL), en donde la unión de Fas con FasL en linfocitos vecinos inducen la activación de caspasas iniciadoras que posteriormente activan a las caspasas ejecutoras, culminando en la apoptosis facilitada por receptores de muerte o vía extrínseca.[1]

Hay factores que pueden influir en la tolerancia ante los antígenos propios, por ejemplo, si el tiempo al que son expuestos los linfocitos T específicos a su antígeno es prolongado y además no recibe señales coestimuladoras, es probable que el linfocito se vuelva anérgico o se diferencie en regulador. Los antígenos propios son

presentados principalmente por células dendríticas tisulares, las cuales permanecen en un estado inmaduro y expresan pocos coestimuladores.[1]

Cuando hay respuestas inmunitarias exacerbadas, es posible romper la tolerancia y promover reacciones autoinmunitarias, por eso es importante que se mantenga un equilibrio entre la inmunidad y la tolerancia para evitar respuestas inmunitarias inadecuadas.

1.7 Inmunidad neonatal

Los neonatos son una población susceptible a infecciones intracelulares que a menudo son la causa de una alta tasa de mortalidad. Las células de cordón umbilical tienen una naturaleza tolerante, pues producen altas cantidades de IL-10 y cantidades menores de TNF- α , IFN- γ e IL-12 comparado con los adultos [14]–[16]

Los linfocitos T CD8+ neonatales necesitan ser activados en presencia de la IL-12 para alcanzar una proliferación productiva y una diferenciación hacia el fenotipo efector citolítico [17]. El gen de la subunidad p35 de la IL-12 es fuertemente reprimido en células dendríticas de neonato, mientras que el gen de la subunidad p40 no se ve afectado, la falta del heterodímero funcional p70 de la IL-12 podría ser la causa de la respuesta deteriorada de los linfocitos T CD8+ neonatales para producir IFN- γ [18].

La respuesta pobre por parte del sistema inmune neonatal para generar memoria inmunológica requiere de constantes refuerzos de vacunas para poder mantener inmunizados a los neonatos contra ciertos patógenos. La respuesta a vacunas en

neonatos tiene una tendencia de polarización de los linfocitos T CD4+ hacia el fenotipo Th2 en lugar de Th1, [16], [19]. Se sugiere que la respuesta inmune de memoria Th1 deteriorada en los neonatos puede deberse parcialmente a los bajos niveles de producción de IL-12p70 en las células de cordón. La baja producción de esta citocina se sigue observando a lo largo de la infancia, es hasta después de los 12 años de edad que se alcanzan los niveles de producción observados en células de adulto [20].

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Antecedentes

En 2012 Schietinger *et al.* crearon un modelo murino tolerante doble transgénico, en el cual tenían una cepa de ratón que expresaba un TCR específico para el epítipo GAG (TCR_{GAG}) de un antígeno del virus FMuLV. También tenían otra cepa de ratón que expresaba selectivamente el transgen GAG en hepatocitos bajo el control del promotor de albúmina (Alb:GAG). Estas dos cepas fueron cruzadas y se obtuvo el modelo doble transgénico, pues expresaban el TCR_{GAG} y el epítipo GAG al mismo tiempo. De los timocitos que expresaban el TCR específico de GAG, solo algunos eran eliminados en el timo, mientras que la mayor parte salían a la periferia. Sin embargo, a diferencia de los linfocitos de memoria y de los vírgenes, los que expresaban el TCR_{GAG} eran incapaces de proliferar en respuesta a inmunización con el antígeno GAG. Además se esperaba que la avidéz del TCR por el antígeno específico de dichos linfocitos causara reacciones autoinmunes en el hígado, pero no se observó daño tisular en dicho órgano.

Reportes previos del mismo equipo de trabajo mostraron que forzando a las células tolerantes a proliferar in vitro con interleucina 15 (IL-15) exógena se suprimía la tolerancia. Posteriormente sometieron a proliferación homeostática in vivo mediada por linfopenia a los linfocitos tolerantes que fueron transferidos a una cepa wild type de ratón y a otra cepa que expresa el antígeno GAG. Se observó mayor proliferación de linfocitos en los ratones que expresan el antígeno propio, en comparación con el wild type. El rescate de tolerancia mediado por linfopenia fue transiente, pues los linfocitos son retolerizados al reestablecerse los números de linfocitos, incluso en ausencia del tolerógeno GAG. Desarrollaron un análisis de microarreglo para linfocitos T CD8+ vírgenes, de memoria, tolerantes, rescatados y retolerizados, en donde observaron clusters de genes diferencialmente expresados en cada tipo de linfocitos. Los clusters nombrados como 9 y 13 fueron identificados como representativos de los linfocitos tolerantes. Estos clusters contienen reguladores negativos de señalización y proliferación celular, proteínas de división celular y de proliferación, factores de transcripción y fosfatasas. Entre los genes más sobreexpresados se encontraron a *lag3*, un correceptor inhibitorio; genes moduladores del ciclo celular, división celular, ensamblaje de nucleosomas, mitosis y de la replicación del DNA. Cuando las células tolerantes fueron rescatadas por linfopenia, la marca genética de tolerancia fue regulada a la baja y en su lugar se observó una marca muy similar a la de linfocitos de memoria, que contiene genes que codifican para moléculas de actividad efectora como *Infg*, *Prf1* y *Gzmm*. Esto sugiere que la falta de actividad efectora en células tolerantes se debe a la expresión específica de genes asociados a tolerancia y a la carencia de la expresión de los

genes asociados a rescate. Las células retolerizadas presentaron un programa de marcas genéticas muy similar al de tolerancia, lo que sugiere que las células “recuerdan” el programa de tolerancia preestablecido en el primer encuentro con su antígeno específico. Los genes involucrados en los clusters de tolerancia manifiestan que hay factores que regulan la expresión de genes, más allá de la secuencia del DNA, sino que puede deberse a la metilación del DNA, modificación de histonas, organización de nucleosomas y por RNA no codificantes. [21]

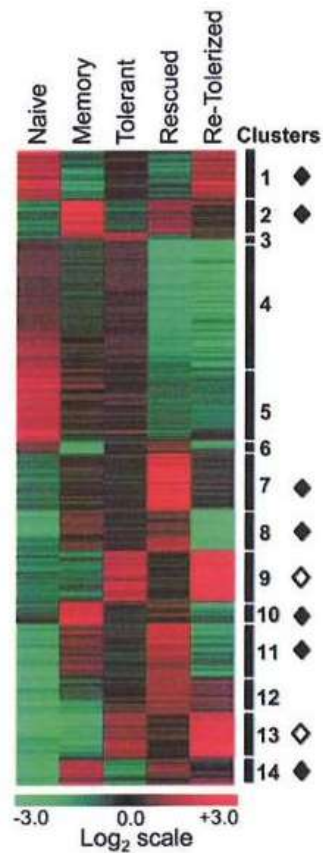


Figura 14. Mapa de calor de niveles de transcripción de grupos de genes diferencialmente expresados en células T CD8 TCR GAG vírgenes, de memoria, tolerantes, rescatadas y retolerizadas. Los clusters de genes específicos de tolerancia (9 y 13) se muestran con diamantes abiertos. La expresión más alta se presenta en rojo y la expresión más baja en verde [21]

En estudios posteriores realizados por Galindo-Albarrán *et al.* en nuestro laboratorio en el 2016, se analizaron el transcriptoma y los perfiles epigenéticos de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. Encontraron que existen genes diferencialmente expresados entre ambas poblaciones, mientras que las células neonatales mostraron enriquecimiento en vías asociadas con el ciclo celular, maduración celular y de inflamación tipo innato, los linfocitos T CD8⁺ de adulto presentaron enriquecimiento en las vías de señalización del receptor de células T (TCR), de citotoxicidad y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). En

condiciones basales, las células neonatales proliferaban homeostáticamente más que las células de adulto, en cambio cuando se sometían a estímulo de TCR fueron las células de adulto las que proliferaron más [22].

Los clusters de tolerancia encontrados por Schietinger fueron comparados con los genes enriquecidos en los linfocitos T CD8+ de neonatos y adultos humanos del estudio en el laboratorio. Se observó que las células neonatales estaban enriquecidas en la expresión de los genes de los clusters de tolerancia del modelo murino, sugiriendo que existe un programa de tolerancia conservado entre especies [23].

En este proyecto seleccionamos algunos de los genes pertenecientes a los clusters asociados a tolerancia para evaluar el nivel de su expresión en linfocitos T CD8+ de adultos y neonatos humanos a nivel basal, después de la activación por el TCR y en presencia de la IL-12. Se presentan a continuación las características de los genes que evaluamos:

BIRC5: es un gen que codifica una proteína inhibidora de apoptosis. Es regulador negativo que evita la muerte celular apoptótica. Se expresa en tejidos fetales pero raramente es detectado en tejidos adultos normales. La sobreexpresión de *BIRC5* se correlaciona con un fenotipo resistente a apoptosis en células de leucemia mieloide crónica. Es conocido como un antígeno que puede activar el reconocimiento de células tumorales por linfocitos T CD8+ [24].

BUB1: es un gen que codifica para una cinasa serina/treonina que es un punto de control mitótico. Es esencial para el ensamblaje del huso mitótico y la correcta alineación cromosómica, así como también es importante en la definición de la localización de SGO1, y por lo tanto afecta la cohesión de las cromátidas hermanas. Es un gen blanco del factor transcripcional NFAT y es dependiente de Itk, una cinasa involucrada en la activación de linfocitos.[25]

CAPG: Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas reguladoras de actina. La proteína codificada contribuye al control de la motilidad basada en actina en las células no musculares bloqueando de forma reversible los extremos de púas de actina. Puede desempeñar un papel en la regulación de estructuras citoplasmáticas y / o nucleares. Esta proteína ha sido propuesta como biomarcador en el desarrollo de algunos tipos de cánceres.[26]

CDK1: es un gen que codifica una cinasa serina/treonina reguladora del ciclo celular, es una subunidad del factor promotor de fase M, esencial para las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular eucariota. Esta proteína se ha observado en niveles altos en linfocitos T CD8+ infectados con VIH. [27]

IGF1R: es un gen que codifica para un receptor tirosina cinasa del factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF1), está involucrado en el crecimiento celular y supervivencia, y en la vía de señalización de PI3K-AKT. La activación de esta vía inhibe la apoptosis y estimula la síntesis de proteínas. Este receptor se expresa en linfocitos T CD4+ y CD8+ tras su activación [28].

RBBP4: este gen codifica una proteína nuclear que está presente en complejos que participan en la acetilación de histonas, ensamblaje y remodelación de cromatina y en la represión transcripcional por desacetilación de histonas. Se une directamente a la proteína retinoblastoma para regular la proliferación celular. Esta proteína se expresa en niveles bajos en linfocitos T CD4+ autorreactivos a los islotes pancreáticos en ratones [29].

SEC13: la proteína codificada por este gen es un componente del retículo endoplásmico y del complejo del poro nuclear. Participa en la biogénesis de vesículas recubiertas por COPII. Los niveles reducidos de SEC13 en ratones causa defectos inmunológicos como: niveles bajos de MHC I y II en macrófagos, niveles de expresión bajos de INF- γ e IL-6 por linfocitos T estimulados y altos niveles de TGF- β [30].

SGO1: la proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de proteínas Shugoshin. Evita la escisión prematura de la cohesina centromérica durante la profase mitótica al inhibir la fosforilación de la subunidad STAG2 de cohesina. En ratones defectuosos de Sgo1 se ha observado una baja producción de marcadores de activación en linfocitos T, tales como CD8, IL-1 β , IL-6, IFN- α [31].

TFDP1: este gen codifica un factor de transcripción que se heterodimeriza con E2F para aumentar su actividad de unión a DNA y promover la expresión de genes regulados por E2F que están involucrados en la progresión del ciclo celular de la

fase G1 a la S. La actividad reducida de E2F/TFDP1 contribuye a la falta de expresión de EZH2, una histona metiltransferasa que reprime la expresión del gen *HOXA10* en la línea celular LOUCY (células T de leucemia linfoblástica aguda humana) [32].

2.2 Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión de genes asociados a tolerancia y a ciclo celular (*BIRC5*, *BUB1*, *CDK1*, *CAPG*, *IGF1R*, *RBBP4*, *SEC13*, *SGO1* y *TFDP1*) en linfocitos T CD8+ de neonato y adulto humano en estado basal y en condiciones normales y fuertes (+IL-12) de estimulación..

2.3 Objetivos particulares

1. Diseñar cebadores para los nueve genes escogidos.
2. Purificar linfocitos T CD8+ vírgenes de neonatos y adultos humanos con una pureza por encima del 90 % y estimularlos en presencia y ausencia de IL-12.
3. Evaluar la transcripción de los nueve genes por la técnica de RT-qPCR.

2.4 Hipótesis

Los genes asociados a tolerancia se encuentran más expresados en linfocitos T CD8+ de neonato en condiciones basales en comparación con los de adulto y la expresión disminuirá con el estímulo CD3/CD28/IL-12, salvo en los genes que participan en la división celular.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño de cebadores para cDNA

Los cebadores para los genes se diseñaron con la herramienta “Primer-BLAST” de NCBI considerando el salto de exón (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Con el programa en línea “MFE primer” se corroboró que los cebadores son específicos de producto [33]

3.2 Purificación de linfocitos T CD8+ vírgenes

Se obtuvieron paquetes de concentrados leucocitarios de sangre periférica de adultos sanos. La sangre de cordón umbilical se obtuvo de neonatos de término nacidos por parto natural justo después del parto y antes de ser expulsada la placenta. Todo aprobado por el convenio con el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, el Hospital J. Parres de Cuernavaca y el Hospital General de Temixco. A partir de estas muestras, en el mismo día de la captura, se purificaron Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) y Células Mononucleares de Sangre de Cordón (CBMCs) mediante un gradiente de densidad con Ficoll. Posteriormente se siguió con una etapa de adherencia, con el que se busca eliminar los monocitos. Para eliminar el resto de células que no son linfocitos T CD8+ se usó el kit RosetteSep Human CD8+ T Cell Enrichment Cocktail (StemCell technologies). Finalmente las células de memoria en adulto se eliminaron por medio de selección negativa haciendo uso de los anticuerpos CD44 y CD45RO (marcadores de memoria) asociados a esferas magnéticas. La pureza de las muestras de linfocitos T CD8+ vírgenes se evaluó por citometría de flujo.

3.3 Estimulación de linfocitos T CD8+ vírgenes

Cada muestra de linfocitos T CD8+ vírgenes de neonatos y adultos fue dividida en tres cantidades equivalentes de células para realizar los diferentes estímulos. Un estímulo se usó como control en el que no se le agregó ningún anticuerpo (Sin Estímulo). En el segundo se activaron las células a través del TCR con anticuerpos de ratón anti-CD3 humano, anti-CD28 humano y anti-IgG de ratón a una concentración final de 1 ug/ml (CD3/CD28). El tercer estímulo fue a través del TCR/CD28 más una tercera señal, con anticuerpos de ratón anti-CD3 humano, anti-CD28 humano y anti-IgG a una concentración final de 1 ug/ml e IL-12 recombinante con una concentración final de 10 ng/ml. Las células se estimularon durante 36 horas a 37°C con 5% de CO₂.

3.4 Extracción de RNA

Tras la estimulación de los linfocitos TCD8+ se les extrajo el RNA total utilizando el método de Trizol (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA con oligo-dT y la Transcriptasa reversa RevertAid (Thermo Scientific™).

3.5 Análisis por RT-qPCR

La transcripción de cada uno de los genes de interés se evaluó mediante la técnica de La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR) con el método de SYBR Green. La expresión de los genes se cuantificó de forma relativa con el método de la curva estándar y fue normalizada con la expresión del gen de

referencia Beta-2 microglobulina (*B2M*). Para la elaboración de las curvas estándar de cada par de cebadores se hicieron diluciones seriadas de cDNA, los datos obtenidos de las curvas de amplificación se graficaron para obtener la ecuación de la recta con la que posteriormente se calculó la concentración relativa de cada gen.

4. RESULTADOS

4.1 Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se realizó con el programa Primer-BLAST y se utilizaron para evaluar la transcripción por RT-qPCR de los genes asociados a tolerancia. En la Tabla 1 se muestran la lista de cebadores con sus características.

Gen	No. Acceso	Secuencia Primer Forward	Secuencia Primer Reverse	Longitud Producto (pb)
<i>BUB1</i>	NM_004336.5	TCCTTCAGATGCTTGAAGCCCA	ACAGAGGGGATGACAGGGTTC	285
<i>SEC13</i>	NM_001136026.3	GAGACCTGGAGCAGCCAC	ATCTGGGCGTCGTGAATCAT	268
<i>SGO1</i>	NM_001199251.3	GGCCAAGGTATCGTTCTGGAC	TCCTTGCCATCTTTTGCCTTA	136
<i>TFDP1</i>	NM_007111.5	TCTGCCAGTGACCTGACCA	AGCCGAATCTGAAGTGGGGA	181
<i>IGF1R</i>	NM_000875.5	CACAAGTTGAGGATCAGCGAG A	CCTGTTTTGGCCTGGACATAGA	175
<i>RBBP4</i>	NM_005610.3	ACAAGGAAGCAGCCTTCGAC	TCACTGTCGTAGTGTGACGC	295
<i>CDK1</i>	NM_001786.5	TAAGCCGGGATCTACCATACCC	CCTGGAATCCTGCATAAGCACA	258
<i>CAPG</i>	NM_001747.4	GGCTGGAAGGAAGACGAACC	TGACTGCTGGCCTATCCACA	252
<i>BIRC5</i>	NM_001168.3	AGGACCACCGCATCTCTACA	TGTTCTCTATGGGGTCGTCA	187
<i>B2M</i>	NM_004048.4	AGCCCAAGATAGTTAAGTGGGA TCG	TCCAAATGCGGCATCTTCAAAC C	71

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para RT-qPCR

4.2 Purificación de Linfocitos T CD8+

La purificación de las muestras se realizó mediante las técnicas mencionadas anteriormente en la metodología. Las tinciones extracelulares de los marcadores CD3 y CD8 se realizaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3-PE y anti-CD8-FITC. En la Figura 2 se muestran ensayos representativos de las purezas de las poblaciones de linfocitos T CD8+ de adultos y de neonatos en donde se observa una pureza por encima del 92%.

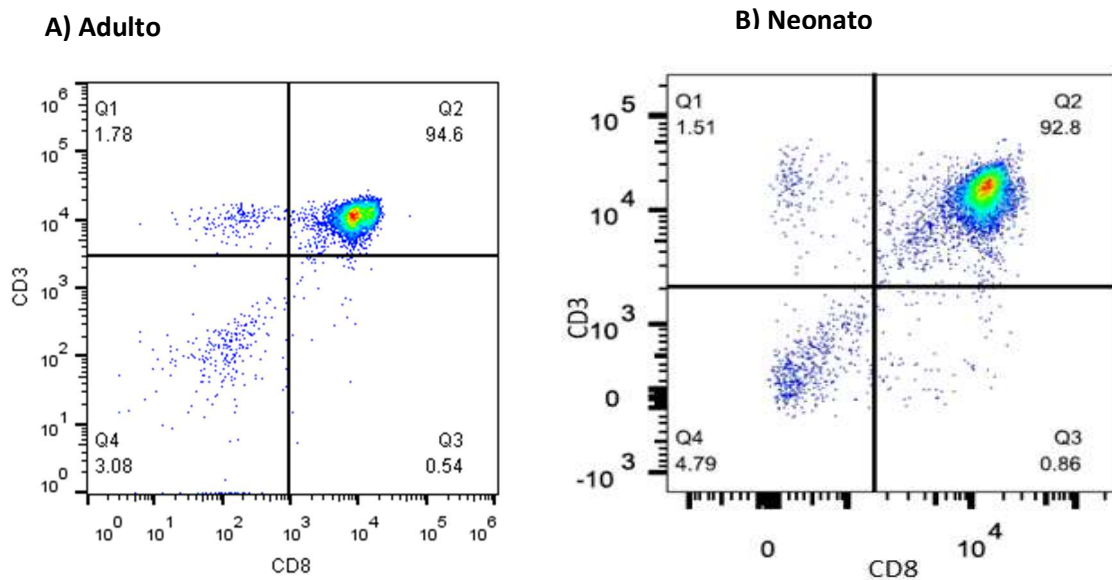


Figura 15. Purezas de linfocitos T CD8+ de Adulto y Neonato. Se analizó la pureza de cada muestra por citometría de flujo logrando obtener purezas por arriba del 92%. En el panel A) se observan la pureza de un ensayo representativo de los linfocitos T CD8+ de adultos y en el panel B) las de neonatos. En el eje X se muestran las células que expresan el marcador de superficie CD8, en el eje Y se muestran las células que expresan el marcador de superficie CD3.

Para analizar la eficiencia con la que se eliminaron las células de memoria se tiñó con anti-CD45RO-FITC. En la figura 3 se muestra la expresión de CD45RO en los linfocitos T CD8+ vírgenes de un ensayo representativo de adulto, menos del 3% de las células son positivas para dicho marcador.

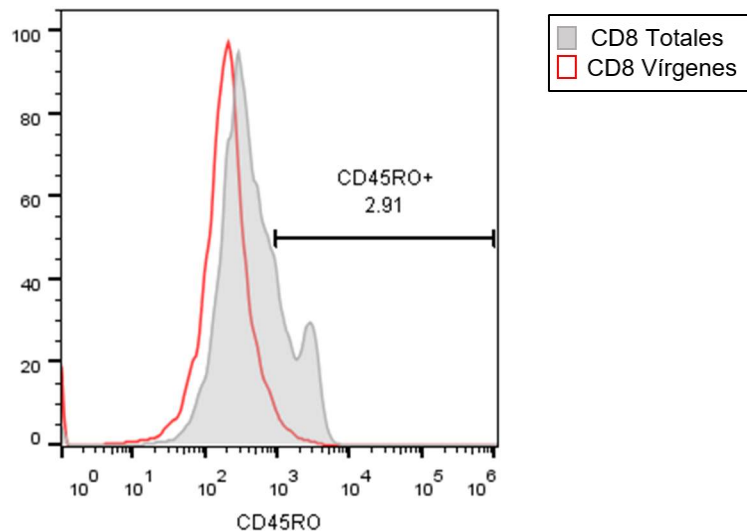
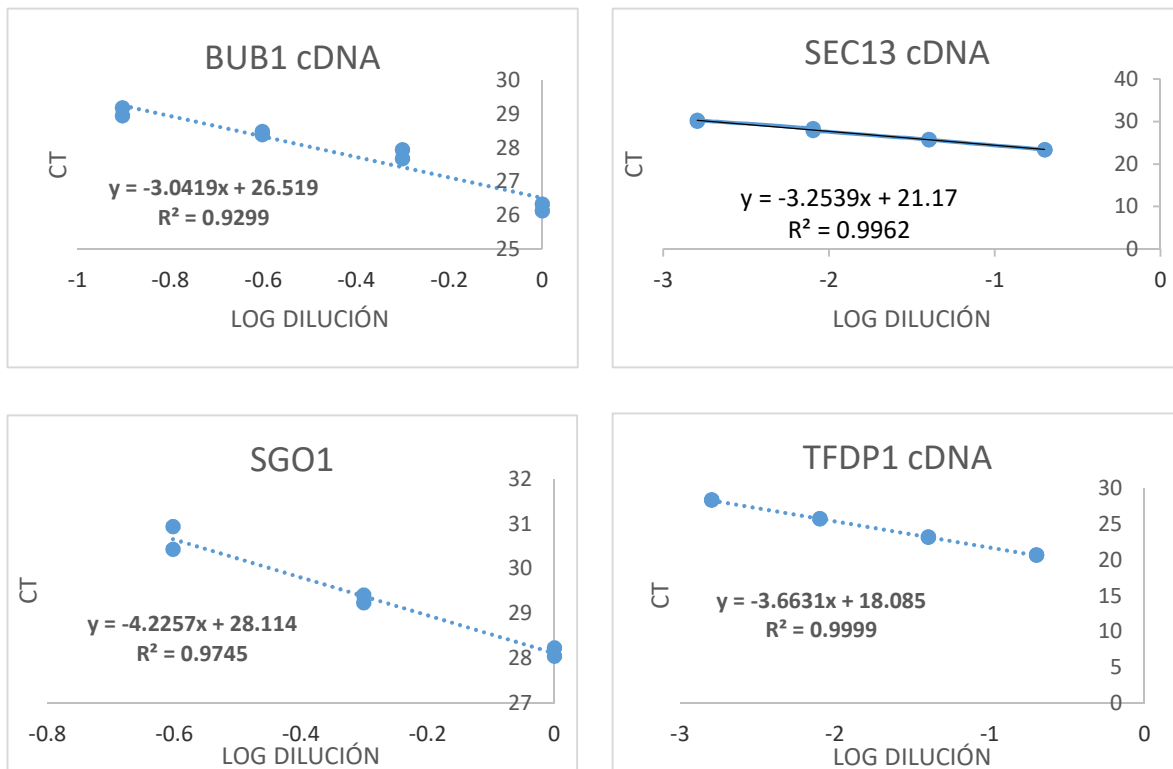


Figura 16. Expresión de CD45RO en linfocitos T CD8+ de Adulto. Histograma representativo de CD45RO-FITC de los linfocitos T CD8+ de adultos. En rojo se observan los linfocitos T CD8+ vírgenes y en gris los linfocitos T CD8+ totales.

4.3 Curvas estándar

Para poder evaluar la expresión de genes por PCR en tiempo real se deben establecer las condiciones óptimas de amplificación para cada par de cebadores mediante curvas estándar. Se realizaron curvas estándar para los siguientes genes: *BUB1*, *SEC13*, *SGO1*, *TFDP1*, *IGF1R*, *RBBP4*, *CDK1*, *CAPG*, *BIRC5* y como gen control se usó *B2M*. Las secuencias y datos de los cebadores de *BIRC5* y *B2M*

fueron recopilados de proyectos anteriores en nuestro laboratorio desarrollados por Oscar López y José Sánchez, respectivamente. En la Figura 4 se muestran las ecuaciones de la recta que se obtuvieron a partir de las curvas de amplificación de cada par de cebadores. Estas ecuaciones se utilizaron para calcular la concentración relativa de cDNA de cada gen en las células. Para cada curva estándar se calculó la R^2 que nos da información sobre la reproducibilidad del experimento y en todos los casos fue mayor a 0.92.



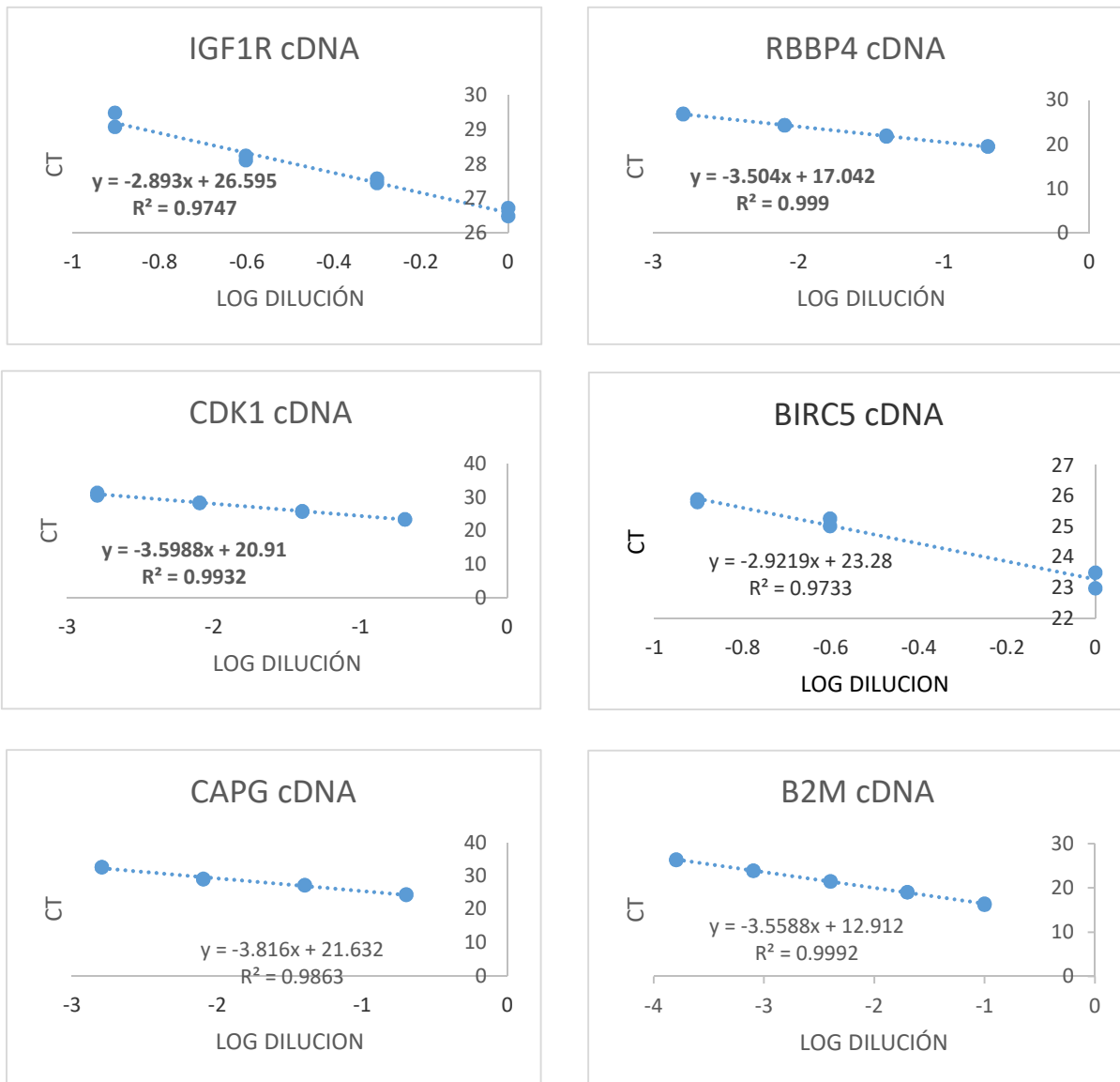


Figura 17. Curvas estándar de cebadores utilizados para evaluar la transcripción de genes asociados a tolerancia. En cada gráfica se muestra la ecuación de la recta respectiva de cada gen y su valor de R².

4.4 Estimulación de linfocitos T CD8+ y extracción de RNA

Después de que se obtuvieron los linfocitos T CD8+ vírgenes de adulto y neonato se hicieron los tres estímulos de activación (Sin Estímulo, CD3/CD28 y CD3/CD28/IL-12) por 36 horas como se menciona en la metodología. Posteriormente se guardaron las células en Trizol y se les extrajo el RNA total, se cuantificó y se prosiguió con la síntesis de cDNA a partir del RNA obtenido de las diferentes muestras para evaluar la expresión de los genes asociados a tolerancia.

4.5 Evaluación de la transcripción de genes asociados a tolerancia

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación por RT-qPCR de la transcripción de genes asociados a tolerancia en los linfocitos T CD8+ de neonatos y adultos que se sometieron a los tres diferentes estímulos. Cabe mencionar que no se pudieron completar las muestras debido a que durante la pandemia el acceso a la sangre en hospitales fue difícil. Prorrogué mi residencia un semestre, pero aun así, dado que trabajamos con los hospitales, fue peligroso en algunos periodos acceder a las muestras, particularmente de neonatos, por lo que no se completaron.

CAPG (Proteína reguladora de actina CAP-G): este gen relacionado en la motilidad celular presentó mucha diversidad en los niveles de expresión en las dos muestras de adulto, cabe mencionar que se intentó evaluar en un tercer adulto pero no se logró la amplificación de este gen, mientras que para los neonatos, sólo se pudo capturar una muestra. A nivel basal se nota una mayor expresión de *CAPG* en las

células neonatales que en las de adulto. A pesar de que los estímulos parecen no haber afectado la transcripción en adultos, es interesante notar que en las células de neonato el estímulo de TCR (CD3/CD28) incrementó la expresión pero el estímulo con IL-12 la redujo hasta niveles más bajos que los basales (Figura 5).

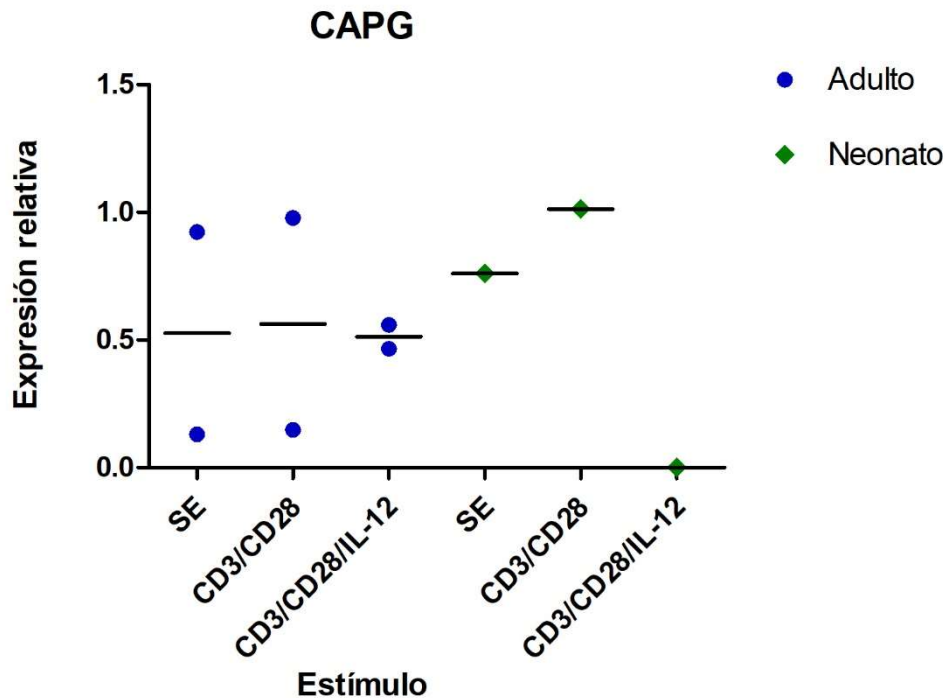


Figura 18 Transcripción del gen *CAPG* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonato. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con barras horizontales.

SEC13 (Componente del complejo de recubrimiento COPII): gen que participa en la biogénesis de vesículas recubiertas por COPII. De manera similar que el gen anterior, los niveles de expresión mostraron una dispersión muy grande, pero en conjunto se puede observar que los niveles de expresión en adultos tienden a mantenerse con los estímulos. Mientras que en las células de neonato se aprecia

que los estímulos bloquean la expresión de *SEC13*, este efecto es más remarcado en el estímulo con la IL-12. Además es interesante notar que el nivel basal en el neonato es más alto que en las células de adultos (Figura 6).

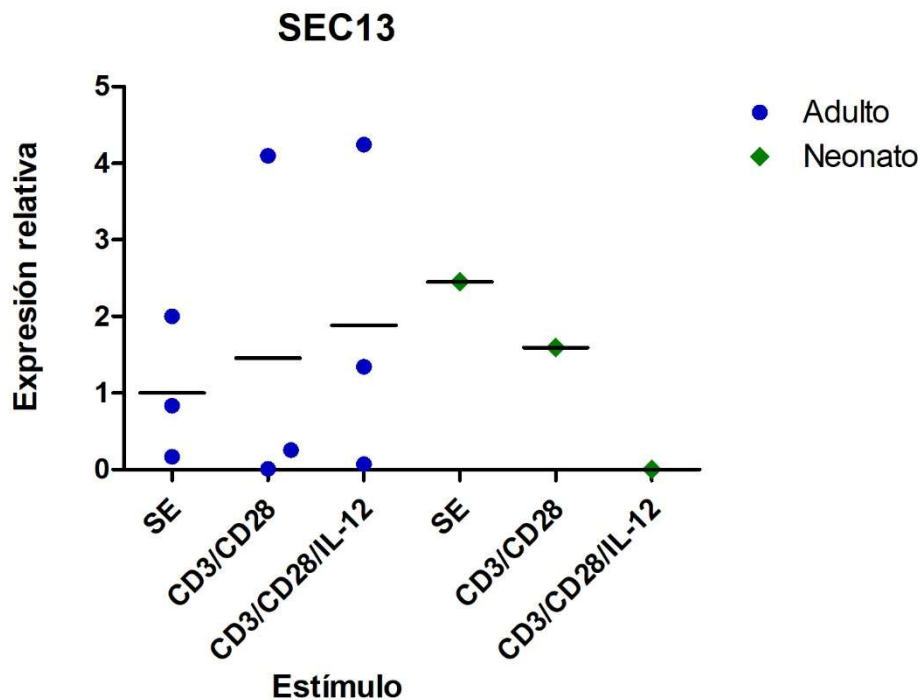


Figura 19 Transcripción del gen *SEC13* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonato. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con líneas horizontales.

TFDP1 (Factor de transcripción Dp-1): gen asociado en el control de la progresión del ciclo de la fase G1 a la S. La expresión de este gen en los linfocitos T CD8+ de adultos mostró un ligero incremento con los estímulos de CD3/CD28 que fue el

mismo con la IL-12. En la muestra de células neonatales, la expresión aumentó con el estímulo CD3/CD28 y con el estímulo fuerte de IL-12 disminuyó a niveles por debajo de los basales (Figura 7).

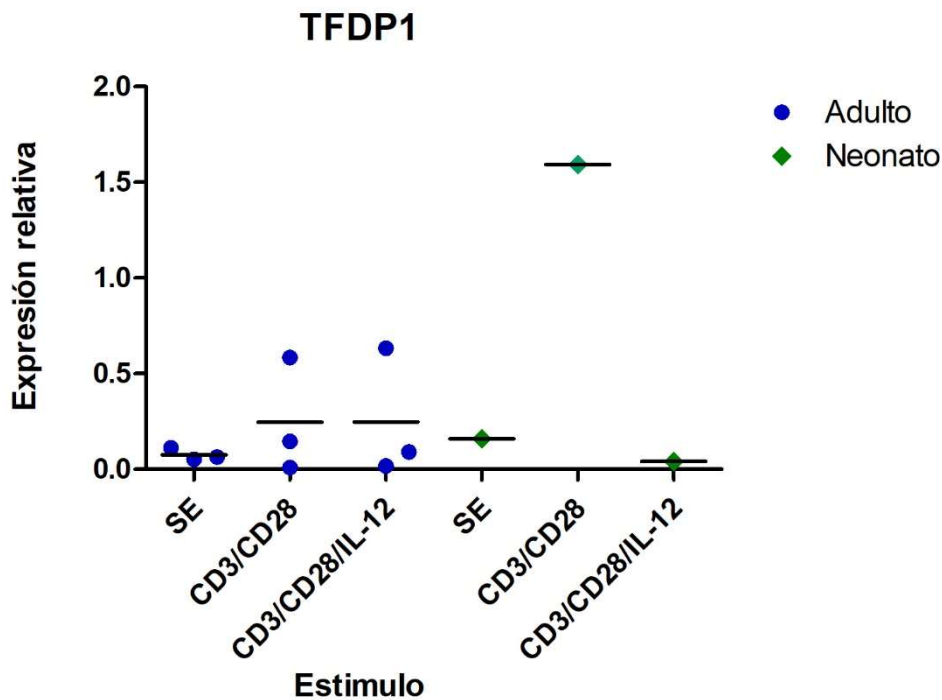


Figura 20. Transcripción del gen *TFDP1* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonato. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con líneas horizontales.

BIRC5 (Proteína 5 que contiene repetición IAP baculoviral): Proteína multitarea que tiene funciones duales en la promoción de la proliferación celular y la prevención de la apoptosis. Este gen pudo evaluarse en tres muestras de células neonatales y tres de adulto, aunque la dispersión fue alta en las muestras de adulto estimuladas con CD3 y CD28, en general mostró un incremento en su expresión en respuesta a la

estimulación en presencia y ausencia de IL-12, alcanzando niveles más altos en las células neonatales (Figura 8).

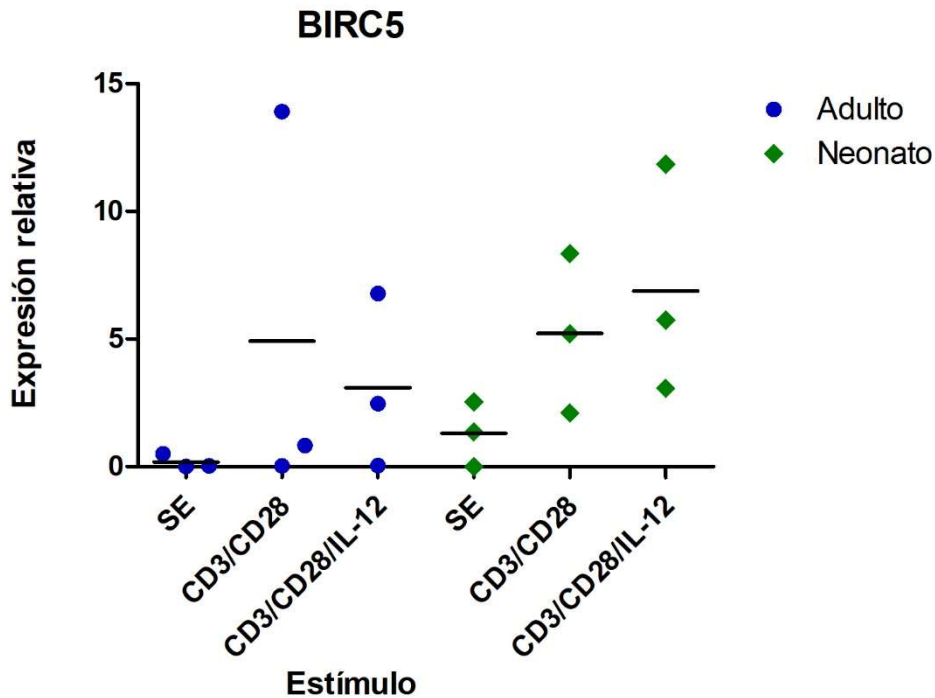


Figura 21. Transcripción del gen *BIRC5* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con líneas horizontales.

BUB1 (Punto de control mitótico Serina/treonina-proteína quinasa): la proteína codificada realiza 2 funciones cruciales durante la mitosis: es esencial para la señalización del punto de control del ensamblaje del huso y para la alineación correcta de los cromosomas. La expresión de este gen se vio incrementada con el

estímulo de CD3+CD28 pero aún más en presencia de la IL-12 de forma similar en ambas poblaciones celulares (Figura 9).

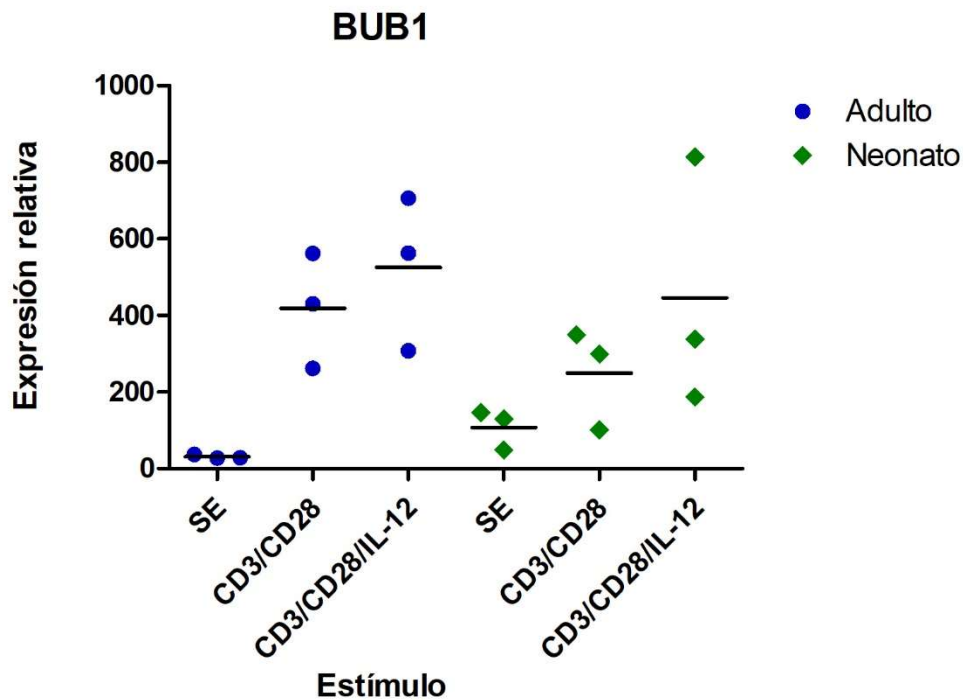


Figura 22. Transcripción del gen *BUB1* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con líneas horizontales.

IGF1R (Receptor de factor de crecimiento 1 similar a la insulina): el IGF1R activado está involucrado en el crecimiento celular y el control de la supervivencia. Este gen mostró patrones de expresión similares en ambas muestras de células, se observó que los estímulos reprimen su expresión y la presencia de la IL-12 remarca más este efecto en los linfocitos T CD8+ de neonatos (Figura 10).

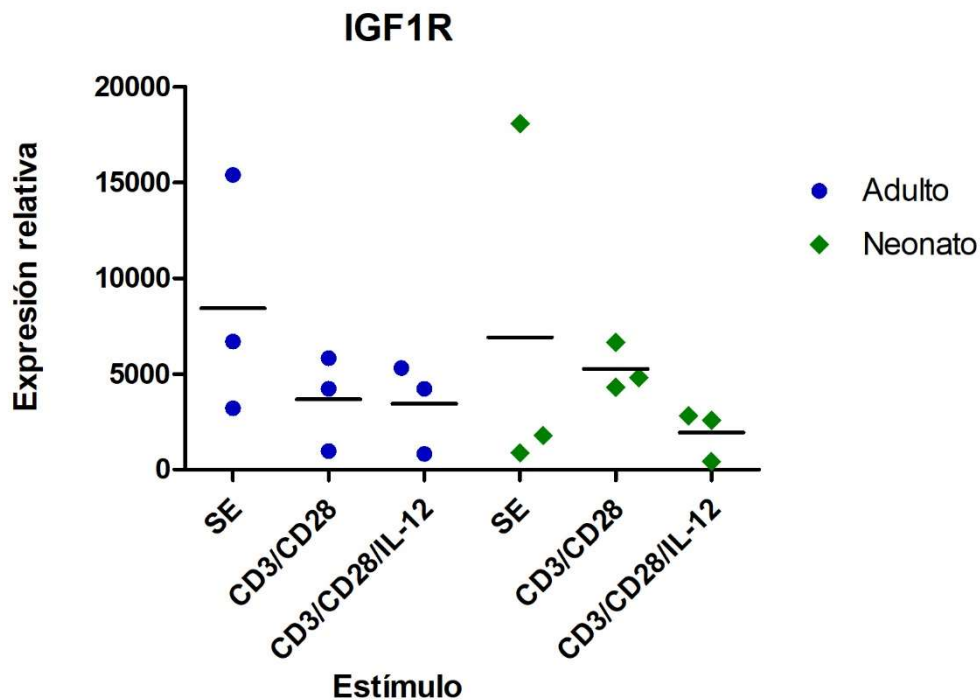


Figura 23. Transcripción del gen *IGF1R* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con líneas horizontales.

SGO1 (Shugoshina 1): gen asociado a la regulación del ciclo celular, esencial para la segregación cromosómica adecuada durante la mitosis. Este gen aunque mostró dispersión alta en respuesta a los estímulos en las células de adulto, se puede observar que su expresión aumenta en niveles similares en ambas poblaciones al someterse a los estímulos, tanto en presencia como en ausencia de la IL-12, pero puede notarse también que los niveles basales de expresión son más altos en la población celular de recién nacidos que en la de los adultos (Figura 11)

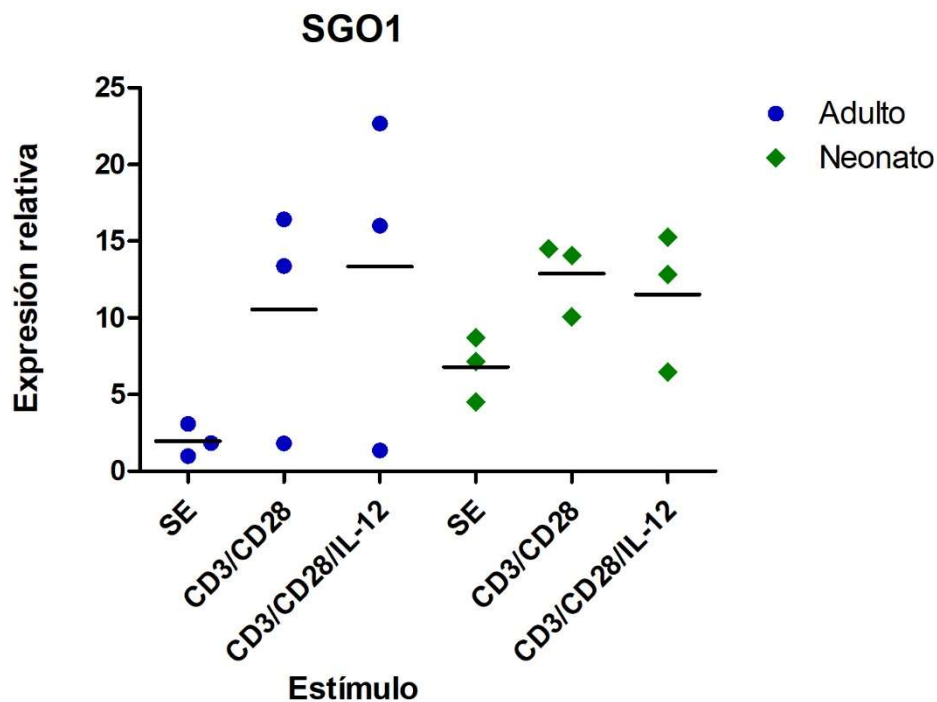


Figura 24. Transcripción del gen *SGO1* en linfocitos T CD8+ de Adultos y Neonatos. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con líneas horizontales.

A continuación se presentan otros dos genes que se analizaron pero la muestra de células neonatales no alcanzó para evaluarlos, por lo que solo se muestran los resultados obtenidos en los linfocitos T CD8+ de adultos..

CDK1 (Quinasa dependiente de ciclina 1): desempeña un papel clave en el control del ciclo celular eucariota, promueve la transición G2-M y regula el progreso de G1 y la transición de G1-S. Este gen evaluado en células T CD8+ de adulto mostró un incremento en su expresión al recibir los estímulos, llegando a niveles similares en presencia y en ausencia de la IL-12 (Figura 12).

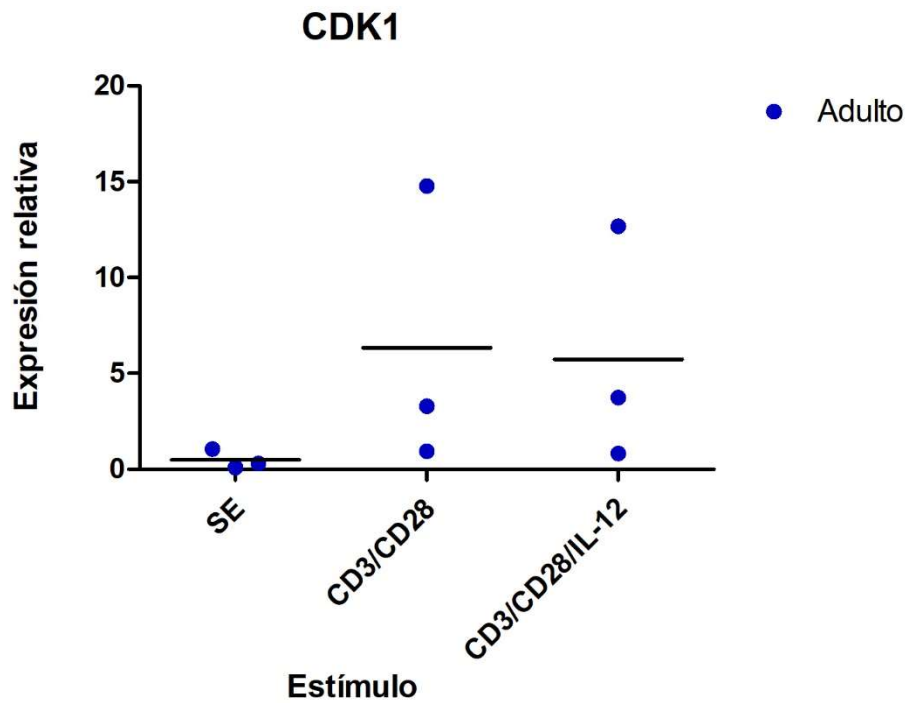


Figura 25. Transcripción del gen *CDK1* en linfocitos T $CD8^+$ de Adultos. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con líneas horizontales.

RBBP4 (Proteína de unión al retinoblastoma 4): la proteína codificada está presente en complejos de proteínas implicados en la acetilación de histonas, el ensamblaje y remodelación de cromatina y la represión transcripcional. Al evaluar la expresión de este gen en las células de adultos, pareció que los estímulos no lograron un efecto en sus niveles de transcripción, a pesar de la alta dispersión en los datos los promedios de cada muestra son similares (Figura 13).

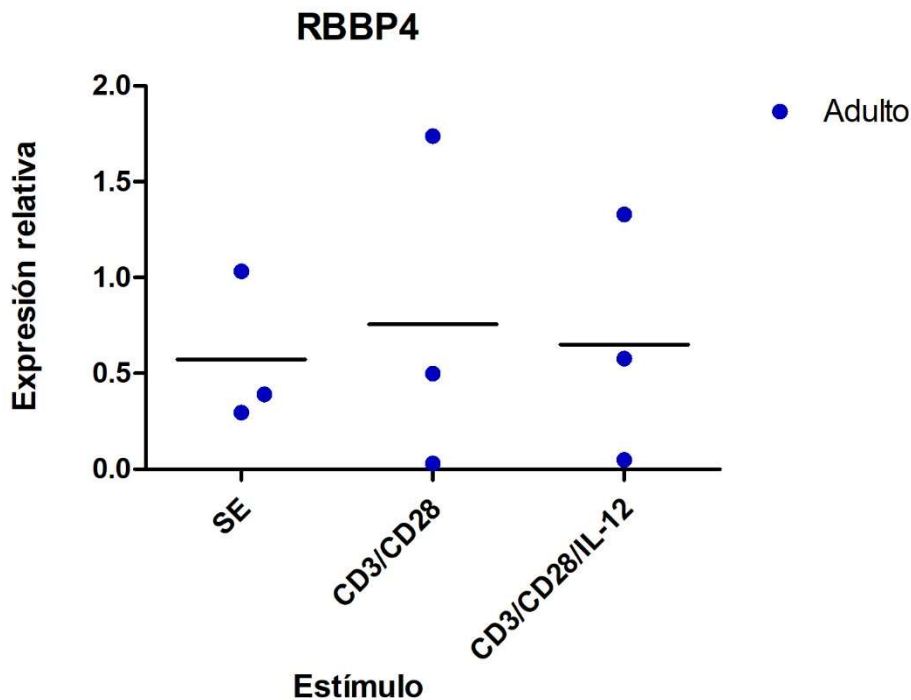


Figura 26. Transcripción del gen *RBBP4* en linfocitos T CD8+ de Adultos. Las cantidades relativas de cDNA fueron normalizadas con respecto de las cantidades de expresión de cDNA del gen control *B2M*. El promedio de cada grupo de datos es representado con barras horizontales.

5. DISCUSIÓN

Es claro que se necesitan más muestras para reducir la alta dispersión y poder hacer análisis estadístico de datos y así poder conocer de manera clara las diferencias de expresión entre las células neonatales y de adultos. Sin embargo, pudimos observar que en muchos de estos genes asociados a un clúster de tolerancia encontrado en un modelo murino, el estímulo con la IL-12 generó en la muestra neonatal una disminución de la expresión (*CAPG*, *SEC13*, *TFDP1* e *IGF1R*). En aquellos que no se notó dicho efecto cabe recordar que son genes que participan en el control del

ciclo celular (*BUB1*, *BIRC5* y *SGO1*), de los cuales no se esperaba el mismo comportamiento que los genes anteriores. Lo que sí se pudo observar de estos últimos genes, como se esperaba, es que sus niveles basales de expresión son más altos en las células neonatales que en las de adultos. Debido a que se sugiere están asociados a tolerancia inmune no es de extrañar que se encuentren en mayor cantidad en los neonatos, quienes se caracterizan por tener un fenotipo tolerante.

Se sabe que las células T CD8⁺ de neonatos presentan funciones y fenotipos distintos a las de adultos, adaptadas a la condición neonatal, en la que una inmunidad muy fuerte no permitiría una transición suave al nacimiento y la exposición repentina a muchos antígenos nuevos [16]. En un trabajo recientemente publicado por nuestro laboratorio, se encontró que la IL-12 induce una reprogramación epigenética y transcripcional en las células T CD8⁺ neonatales. La presencia de esta citocina durante la estimulación de dicha población celular incrementó la expresión de genes relacionados con activación y señalización celular. Así como también se observó el cierre de cromatina y disminución de expresión de genes inflamatorios tipo innatos, asociados a su inmadurez. En conjunto se observó que la IL-12 contribuye a la maduración de las células neonatales [13].

De acuerdo con los resultados anteriores, en mi trabajo encontramos que el estímulo con la IL-12 en los linfocitos T CD8⁺ neonatales tuvo dos funciones en los genes elegidos, por un lado, disminuyó su expresión y por otra la aumentó. De cualquier manera, faltaron replicados para poder concluir para todos los genes.

¿Cómo es que estos genes participan en la tolerancia? Aunque no hemos identificado el mecanismo por el cual ocurre este proceso, podemos proponer que, debido a que varios de ellos son reguladores del ciclo celular podrían tener una función represora de genes necesarios para la maduración y diferenciación celular, así como también podrían regular el citoesqueleto y tráfico vesicular de forma específica en la población neonatal. Sin embargo se necesitan hacer más estudios sobre el tema para poder elucidar el mecanismo molecular por el que se establece la tolerancia inmune en neonatos. En un estudio del laboratorio, se encontró que la vía canónica de Wnt pudiera participar en este proceso. En ese estudio se encontró que la vía canónica de Wnt se asocia a distintos complejos protéicos en las células T CD8+ de neonatos y adultos y que esos complejos dirigen a las células neonatales hacia proliferación homeostática, mientras que en adulto más bien a funciones efectoras [34].

6. CONCLUSIONES

Los resultados observados sugieren que la IL-12 es una tercera señal necesaria para alcanzar un efecto contundente en la expresión de algunos genes en las células neonatales, ya sea regulándolos al alza o reprimiéndolos. Pero debido a la heterogeneidad que existe entre individuos, se necesitan más muestras para poder corroborar que es un efecto causado en esa población por la fuerte estimulación.

Entre los genes que evaluamos, la mayoría de los que participan en mitosis aumentaron su expresión, mientras que otras funciones de transporte vesicular y citoesqueleto, el estímulo en presencia de la IL-12 disminuyó su expresión. Para aquellos que participan directamente en mitosis (salvo un gen) más bien este estímulo fuerte aumentó su expresión.

Se necesitan más muestras y evaluar otros genes para poder concluir el trabajo de manera adecuada.

Referencias

- [1] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, "Inmunología celular y molecular," 8° Edición., 2015.
- [2] J. Parkin and B. Cohen, "An overview of the immune system," *Lancet*, vol. 357, no. 9270, pp. 1777–1789, 2001.
- [3] Justiz Vaillant AA and Q. A., "Interleukin." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499840/>.
- [4] H. W. Mittrücker, A. Visekruna, and M. Huber, "Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, vol. 62, no. 6, pp. 449–458, 2014.
- [5] S. Y. Chang *et al.*, "Circulatory Antigen Processing by Mucosal Dendritic Cells Controls CD8+ T Cell Activation," *Immunity*, vol. 38, no. 1, pp. 153–165, 2013.
- [6] A. I. Colovai *et al.*, "Regulatory CD8 + CD28 - T Cells in Heart Transplant Recipients," vol. 37, no. 212, pp. 31–37, 2003.
- [7] A. Machicote, S. Belén, P. Baz, and L. A. Billordo, "Human CD8 + HLA-DR + Regulatory T Cells , Similarly to Classical Immune Responses via PD-1 / PD-L1 Axis," vol. 9, no. November, pp. 1–13, 2018.
- [8] J. M. M. den Haan, R. Arens, and M. C. van Zelm, "The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells," *Immunol. Lett.*, vol. 162, no. 2, pp. 103–112, 2014.
- [9] A. Schietinger and P. D. Greenberg, "Tolerance and exhaustion: Defining mechanisms of T cell dysfunction," *Trends Immunol.*, vol. 35, no. 2, pp. 51–60, 2014.
- [10] G. Trinchieri, "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 2, pp. 133–146, 2003.
- [11] J. M. Curtsinger, D. C. Lins, and M. F. Mescher, "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: Dissociating proliferation and development of effector function," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 9, pp. 1141–1151, 2003.
- [12] J. O. Valenzuela, C. D. Hammerbeck, and M. F. Mescher, "Cutting Edge: Bcl-3 Up-Regulation by Signal 3 Cytokine (IL-12) Prolongs Survival of Antigen-Activated CD8 T Cells," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 2, pp. 600–604, 2005.
- [13] D. Y. Gutiérrez-Reyna *et al.*, "IL-12 Signaling Contributes to the Reprogramming of Neonatal CD8+ T Cells," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. June, pp. 1–14, 2020.
- [14] E. Liu, H. K. W. Law, and Y. L. Lau, "Tolerance associated with cord blood transplantation may depend on the state of host dendritic cells," *Br. J. Haematol.*, vol. 126, no. 4, pp. 517–526, 2004.

- [15] E. Rainsford and D. J. Reen, "Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation," *Br. J. Haematol.*, vol. 116, no. 3, pp. 702–709, 2002.
- [16] M. Prabhudas *et al.*, "Challenges in infant immunity: Implications for responses to infection and vaccines," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 3, pp. 189–194, 2011.
- [17] M. J. Mccarron and D. J. Reen, "Neonatal CD8+ T-cell differentiation is dependent on interleukin-12," *Hum. Immunol.*, vol. 71, no. 12, pp. 1172–1179, 2010.
- [18] S. Goriely *et al.*, "Deficient IL-12(p35) Gene Expression by Dendritic Cells Derived from Neonatal Monocytes," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 3, pp. 2141–2146, 2001.
- [19] B. Adkins, C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, "Neonatal adaptive immunity comes of age," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 7, pp. 553–564, 2004.
- [20] J. W. Upham *et al.*, "Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 12, pp. 6583–6588, 2002.
- [21] A. Schietinger, J. Delrow, R. Basom, J. Blattman, and P. Greenberg, "Rescued Tolerant CD8 T Cells Are Preprogrammed to Reestablish the Tolerant State," *Science (80-.)*, vol. 335, no. 6069, pp. 723–727, 2012.
- [22] A. O. Galindo-Albarrán *et al.*, "CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response," *Cell Rep.*, vol. 17, no. 8, pp. 2151–2160, 2016.
- [23] M. A. Santana, A. O. Galindo-Albarrán, A. Hernández-Mendoza, and S. Spicuglia, "Human Neonatal CD8 T Cells are Upregulated in Tolerance-Associated Genes." 2014.
- [24] H. J. Sohn *et al.*, "Simultaneous in vitro generation of CD8 and CD4 T cells specific to three universal tumor associated antigens of WT1, survivin and TERT and adoptive T cell transfer for the treatment of acute myeloid leukemia," *Oncotarget*, vol. 8, no. 27, pp. 44059–44072, 2017.
- [25] K. E. M. Blomberg *et al.*, "Transcriptional signatures of Itk-deficient CD3+, CD4+ and CD8+ T-cells," *BMC Genomics*, vol. 10, pp. 1–19, 2009.
- [26] D. P. Yun *et al.*, "Actin-capping protein CapG is associated with prognosis, proliferation and metastasis in human glioma," *Oncol. Rep.*, vol. 39, no. 3, pp. 1011–1022, 2018.
- [27] H. Imamichi *et al.*, "The CD8+ HLA-DR+ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls," vol. 42, no. 10, pp. 1–23, 2012.
- [28] F. B. Stentz and A. E. Kitabchi, "De novo emergence of growth factor receptors in activated human CD4+ and CD8+ T lymphocytes," *Metabolism*, vol. 53, no. 1, pp. 117–122, 2004.
- [29] G. J. Berry *et al.*, "Genome-Wide Transcriptional Analyses of Islet-Specific CD4 + T Cells Identify Idd9 Genes Controlling Diabetogenic T Cell Function," *J. Immunol.*, vol. 194, no. 6, pp. 2654–2663, 2015.
- [30] T. G. Moreira *et al.*, "Sec13 Regulates Expression of Specific Immune Factors Involved in Inflammation In Vivo," *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–14, 2015.

- [31] H. Y. Yamada *et al.*, "Systemic chromosome instability in Shugoshin-1 mice resulted in compromised glutathione pathway, activation of Wnt signaling and defects in immune system in the lung," *Oncogenesis*, vol. 5, no. 8, pp. e256–e256, 2016.
- [32] S. Nagel *et al.*, "Polycomb repressor complex 2 regulates HOXA9 and HOXA10, activating ID2 in NK/T-cell lines," *Mol. Cancer*, vol. 9, pp. 1–12, 2010.
- [33] K. Wang *et al.*, "MFEprimer-3.0: Quality control for PCR primers," *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. W1, pp. W610–W613, 2019.
- [34] G. N. Hernández-Acevedo *et al.*, "Protein complexes associated with β -catenin differentially influence the differentiation profile of neonatal and adult CD8+ T cells," *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 10, pp. 18639–18652, 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CEDILLO BAÑOS ALEJANDRA** con número de matrícula **20154012839** cuyo título es:

“Evaluación de la expresión de genes asociados a tolerancia en linfocitos T CD8+ de neonatos y adultos humanos”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**.

Cuernavaca, Mor a 26 de mayo del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

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

DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAÉZ PADILLA
DRA. SONIA DÁVILA RAMOS
DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DR. RAMON A. GONZÁLEZ GARCIA CONDE
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2021-05-26 10:02:11 | Firmante

ArpPsUJ+AbGU9KcpzXdm8unnrTKAm+6WdHghd/1pJvA65lvhBfPpl7NT/3QRlUmGRXepj4rOWoExHSA3q5DjsCrBRUK6F2h8VOuJEsGHXevLb5Ysdfv19IGP4TmBC4QWprPLmn8zjob3TrhsqKwAe00usmu9UXauiq1sAjnQhNT5jVGVQVZ0zrKzmzGlioajllrwhMvAP+B9ogNCilrfsACglPaGZ0LVzVLaRbHCSqoO1YQHipFqshEjkuVJ3zJTrkf8tuA8URjkrme415oW17EL/Ckm7K1FrvfEC5bmqbJn9yS0wQCzSxjRZnLLLhDNjA8b5KOV5B4S0z3wvdQubQ==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2021-05-26 10:08:02 | Firmante

0IHIntb33y/2dRZ4zmjS0TByWzzlii26HUPVLKIBvD0DjWrB851BbiTbcF1vVj9inXweMHCQbCTIa8AcoKQueDi9sBiYU0/CR2X6jHTgdpUpCTxyMtl/IClHBSZ5OcWvF8bpVcZmKPEa+EcvwqoPZREqyPCGHpn/Td0LVyxNfkmYgT1gcQeM3H65aLnYWH/8Wt2dvnOQvVAOKMEZtKwDTJ2BIZxbLb71NrZHkZgfnqwwh6Hz4DRJ+WInbHhwg1bMeHdWM0/YxGBYRl/Zz6IEdb4BICQvVhjKKop7sR/LW1uyOWvqYNAX0Q1nnXVcEE4k+j5GxeH+kS6E3+Rjg==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2021-05-26 10:48:36 | Firmante

RNjvnM1Sn2gpFHFITNHS1eWfSiQEhc4TdTMfmUY7tL1tjmkBLEuxjEeyblvFoQqzLr0CKOBLjTi8ptixMQbyZ0ph0tBmUmOi/F1F8cxnaqzC0Be6mG6WsBvVq568B122NmXE09hbc7Pe1r6afjyyUllLhWORNE5B6DQja8w2/qmt8FziUyTuvMqFplgySDWMxXUNfylyhsfAjaQw2Xs76Bu8jBcNM4tNJd1U9czpl16M+EwV6SKghayY/8OB87LFAp8eqYOZfvf3sxDJd69HMpM1WeJmFyQEGvWyl75BADRbraPtNFPpG9GMzjOLVqukn9QA8yx0fLTOYHrS6A==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-05-26 12:15:38 | Firmante

tRh6yT4Z60UGdQPXle6v5t8d3WALmkTYgBMLDYVnnMhCHPNs6ozFUqd9WGV3ZtuYropmddMxCgGIFBxrkxDLPYrzd0H0NkJeZnHT9vpuVbt0ujc+wW9fw5ttccV7RuW+584mFvpos32dMm8KqDFHOMpm1emLhvuMhDT2ocfJuZ47qU2467LhYYAyknvpvq7dip+ZWeNTCgTr3p8dt7g3WvkrRdf+gnx11rjLVVnnINNVxdlofATXiCUCoUZqzQvGdlBkxwTPwiGDYJgUY2bLXhk67d9N4tBxXweDmflOkCo1X0BJuS1+VWL0j44exak30AWT04I9Lgk6AvcZnKw==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2021-05-27 12:54:03 | Firmante

Noqo8iP3411TKmTLJ8CtHuMJNz0eDD+EJKLLR6vasK65zhuQ6OjxIndy4mpSB1blAoHM3cAHnilaR12Z6mawkTEz3PaA29DhmLmvEGEwo0pqcobRespkV451rG1UgPDoaYxlXhfWtW92DnDZ44jpaCy2+W/GnhMjDmgFLFwFNfOLfUoVM/dSxFg2ic4GXemY+F86C8b9K7LwA9LXLMlLcCTdlvRGTYdvtUWUMIID3aMKQ4h363RyEE3Qiv8CA2Lj2igMHalCb9ksm9VS67sNgPpliRzi+XldZvUoRB0JNKv50QGYppY0V6Hn8FDzJlbQjLe0GMW3K32mvATQdNhlA==

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



30BXMU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/uWoGdRfzStIIP5sxDJ9MR4ZaDouRJGpL>

