



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo 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. **GÓMEZ GÓMEZ OFELIA** con número de matrícula **20114003198** cuyo título es:

“Efecto de la inhibición de Lef1 con siRNAs sobre la activación de linfocitos T CD8”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias (Bioquímica y Biología Molecular)**.

Cuernavaca, Mor a 03 de noviembre del 2020

Atentamente
Por una universidad culta

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

DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA
DRA. MARÍ ANGÉLICA SANTANA CALDERON
DRA. YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY
DR. RAMON ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE
DR. SONIA DAVILA RAMOS

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

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2020-11-03 14:03:31 | Firmante

Ht8He3Ubx2sTLnSsSPx5crQpYnwVUt+uebMyai134i3tG2aOJ/FzulwKvB2Qtwh3esszQmAMmkE5JDOtrC7n1jjsMtTc7k8SfgbVSQL0qL35zdWJeExoAwKpYZWYPKVxHNtXUrcntTk77ddo8cgkKTC9s/ZSeNULFyIXdiX8pB7o1VCwINSSsubfQg3Kim2M48mbfY15ofrWKpvPlm9aOw79oxMKByspAdyolpBRk1bZM6o9kYJoN7/X8GYIH8EHYjycGUCY9Yrsy58CGZhu4wr8h/77SpknaN42frmamjORkzqCcnPvkQquJ0KW3BrBTmUuB1+m7aV4bY6qww==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2020-11-03 14:25:27 | Firmante

0w61uhRi7WB3/+M58WnJmr9RPJdl1lcsdCNc+SShLayv1MY67il9PvgEyadzTcLjH7iv2JVBAze8mjajsqG0sNQMtO6Gqwy5wtmXU1dc7JRxfOxa4D0LWvRzPCYOZAX4QWqGGrphi/JqXkSlcAuW9t54PYmjrU2OqfS02jj3T3O3kVwisgGfyeyqYHZAAP26aWeR96kxDiV13+fUblvT7S+o6gvHADOB2DV7M6iGtA7ugAmNO8zsgPgt/FrmISGfrcCuEp6CKsS0cTQJBMtK/KW7vzqsE9bVmHyDYqQe+n4LF+LGCd40sfUAH02UL5jkE+5FGAfznpSBgwQNuHw==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2020-11-03 15:55:31 | Firmante

nUUURsDPFncnOX98dB3m51rFnhHh0VJDU3Vw4I7opVYcO8j8V2I71ka5BWb6Wm3d1PR3WSjFD4SGbYhmCw91T7OU9KE/0HR4GTtOPMEsPM2V9CnQleEAeilpDYathMor9MHTeuEnD5e32PK3ZkFck5yDzfsS+oLeYaJdelyG5Pk5zQpf5u2PT7fpMz0ytlmUvvs9FTGD6vM2pUUIYBv/239andDHI/JGnrMyte0TIAMLgVOVdCRZhfCICNFm2xREURxKxYaPuuYzjVLWjAxZaEG+H/4gArhe/tHnrUpkxTBwrzqFgq7ZDcO4vanLi0HrDDu3bgCPfkfubv2nLqA3Q==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2020-11-04 09:27:14 | Firmante

PLDAnpfdGwO26+frYc/YHsmIhfKu8levXsl2Pub4KYd5dDdyvncelNyG+FSLQX3o7iInV9M6OYOObfK8CFqtPMKMF51TdAZSV/vZUdxnsMn2hZbsh93qRzXzvrVcHaoqTLktkTEyAwOY9dFAeCtF78IPtHZRTWU+EG3G4tQgrmt80xv8dz7R7YjHgMM8x0hdjm5GP2222W9r03zUvbjJNg5SEzzNkW30tJoXNKEZpO2oCnyJfJfleDy/MuMiGkg6vKH2xsmFr72cegXZgF4G6jcPyw9ZAb+HCZfDt5Nn0ePmh15FzzTvneyU8cl7Fn3vdcPOU298wfnv+W1nw20iw==

YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY | Fecha:2020-11-05 18:45:30 | Firmante

bdlU8eUd33hLIm8Qp33/kJjovwUC0L+o/zylG7bQPg815007M1jfkELp6HolTECX6b2iBIVpepBAuP2urYbVZgzhYjhsFP7YpFerX466fkGgXa2W2EnIUHmSHGTTZttbThi7EYQC4NfS17w3LZGGdB+ftbDOAWOIOHDas+nuchHLAQ/KHC3IL85Vpb47Rtla22mUaETNjUFBx96749x8l/Sgts1PHDqwjD/QhUYpbKzZbcqJl3SRt0an4s6fb1qXA10Pi5++QeFzZBR20RniJIRE306Q0xMZjUBhXssUGkMw/41t2nLOfPnqMXdp1EejJazZJgkFzZMTNhoFAqw==

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



xRo7ap

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3uLWyhxgl5TSyexguo7FfrjDNwRN0k8>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS

Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular
Efecto de la inhibición de Lef1 con siRNAs sobre la
activación de linfocitos T CD8

T E S I S

QUE PRESENTA

OFELIA GOMEZ GOMEZ

Para obtener el Grado de
LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dra. María Angélica Santana Calderón
Centro de Investigación en Dinámica Molecular, UAEM

Sinodales:

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Armando Hernández Mendoza
Centro de Investigación en Dinámica Molecular,
UAEM

Cuernavaca, Morelos

Febrero del 2020

Miembros del comité.

Dra. Angélica Santana Calderón.

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay.

Dr. Armando Hernández Mendoza.

Dr. Ramón González García Conde.

Dra. Sonia Dávila Ramos.

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de inmunología del Centro de Investigación de Dinámica Celular (CIDC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

La alumna Ofelia Gomez Gomez fue apoyada a través de una beca de CONACYT en el proyecto con clave CB2015-2571188 a cargo de la Dra. Angélica Santana Calderón.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por el apoyo que me han brindado toda la vida, especialmente a mi madre y mi hermana Vanessa que han compartido conmigo su tiempo y su cariño.

Agradezco a la Dra. Angelica Santana Calderon por toda la calidez que como persona y como mi tutora me ha brindado, a todo su grupo de investigación por su amabilidad, y Jose por su apoyo en los momentos que tuve dudas y siempre estuvo ahí con paciencia para explicarme.

Agradezco especialmente a Amadeo David De la Vega Parra por ser la inspiración y la fuerza que he necesitado en los momentos más cruciales de mi vida, por ser la paz en mi camino.

Por ultimo dedico esta última parte de alegrías y bellos momentos de este mi trayecto a Nadia Ivonne que fue una chispa que mantenía encendida mi esperanza.

Solitudinem fecerunt, pacem appellarunt.

(Crearon un desierto, lo llamaron paz.)

Resumen

Lef1 (factor de unión a potenciador linfático 1) es una proteína de 48 kD que en humanos es codificada por gen *lef1*, se expresa en linfocitos B y T. Lef1 pertenece a una familia de proteínas reguladoras que comparten homología con el grupo de alta movilidad de la proteína-1 (HMG1). Es un factor de transcripción que media una respuesta nuclear a las señales de Wnt interactuando con β -catenina. En presencia de Wnt y dado otros eventos celulares Lef y Tcf dan lugar a la activación transcripcional de genes. En ausencia de Wnt, Lef y Tcf en unión con Groucho y CBP reprimen la transcripción. Se ha visto que en linfocitos T CD8⁺ neonatales se encuentran sobre expresados estos factores transcripcionales y genes de la vía de Wnt/ β -catenina. Investigaciones recientes indican que la vía de β -catenina tiene un papel antagonista a la vía del TCR, así como investigaciones realizadas en el laboratorio de inmunología celular del CIDC mostraron que silenciamiento de Tcf aumenta la expresión de IL-2 y CD69 en linfocitos T CD8⁺. Dichos sucesos nos llevaron a la pregunta ¿el silenciamiento de Lef 1 aumentará la activación de linfocitos T CD8⁺ ?

En este trabajo evaluamos el efecto del silenciamiento de Lef 1 en linfocitos de neonatos y adultos, a través de los niveles de transcripción por qPCR de IL-2 y la expresión de CD69 por citometría de flujo. Se logró el silenciamiento de Lef1. Sugerimos que el silenciamiento de Lef induce una mayor activación de PBMCs. En conjunto nuestros resultados y antecedentes del laboratorio sugieren que tanto como LEF/TCF ejercen una modulación en la activación de linfocitos T.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Inmunidad.....	1
1.2 Inmunidad innata.....	2
1.2.1 Inmunidad adaptativa.....	4
1.3 Linfocitos T.....	6
1.3.1 Linfocitos T CD8.....	7
1.3.2 Activación de linfocitos T CD8 ⁺	9
1.3.3 Umbral de activación.....	10
1.4 Vía de Wnt/ β -catenina.....	12
1.4.1 Tcf1 y Lef1.....	13
1.5 RNAi.....	15
1.5.1 siRNA.....	17
2. ANTECEDENTES.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares.....	22
6. MATERIALES Y METODOS.....	23
6.1 Procedencia de las muestras.....	23
6.2 Separación de PBMCs y CBMCs.....	23
6.3 Purificación de linfocitos T CD8.....	25
6.4 Transfección celular.....	27
6.5 Estimulación celular.....	28
6.6 Obtención de RNA.....	29
6.7 Síntesis de cDNA.....	30
6.9 Evaluación de la transfección.....	31
6.10 Análisis de activación celular por medio de la expresión de IL-2.....	31
7. RESULTADOS.....	31
7.1 Purificación celular.....	31
7.2 Diseño del siRNA contra <i>lef1</i>	32
7.3 Control de transfección.....	34

7.4	Transfección del siRNA específico.....	35
7.5	Efecto del siRNA sobre la activación en CBMCs y PBMCs.....	38
8.	DISCUSIÓN.....	40
9.	CONCLUSIONES.....	42
10.	PERSPECTIVAS.....	42
11.	REFERENCIAS.....	43
12.	APÉNDICE.....	49
12.1	Apéndice 1.....	49
12.2	Apéndice 2.....	56
12.3	Apéndice 3.....	61

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

APC: Células presentadoras de antígenos

ARN: Ácido ribonucleico

CBMCs: Células mononucleares de cordón umbilical

CD28: Glicoproteína de la familia de las inmunoglobulinas

CD40: Proteína coestimuladora de las células presentadoras de antígeno

CD69: Lectina transmembrana de tipo C humana

CDS: Regiones de secuencia codificante

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocitos T citotóxicos.

DAG: Diacilglicerol

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño celular

DNA: Ácido desoxirribonucleico

GATA-3: Factor de transcripción codificado en humanos por el gen gata3

GDP: Guanosín difosfato

GSK-3: Glucógeno sintasa quinasa 3

GTP: Guanosín trifosfato

HDAC: Desacetilasas de histonas

HMG1: Proteína 1 del grupo de alta movilidad

HSP: Proteínas de choque térmico

IFN- γ : Interferón gamma

IgE: Inmunoglobulina E

IL: Interleucina

IP3: Inositol trifosfato.

ITAM: Motivo de activación inmunoreceptor basado en tirosina

Lck: Proteína tirosina quinasa específica de leucocitos

Lef 1: Factor de unión al potenciador linfoide 1

MHC I: Complejo de histocompatibilidad clase I

MHC II: Complejo de histocompatibilidad clase II

miRNAs: microRNAs

mRNA: RNA mensajero

NK: Asesina natural

NLR: Receptores tipo NOD

PAMP: Patrones moleculares asociados a microorganismos

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PIP2: Fosfatidilinositol bisfosfato

PKC: Proteína quinasa C

PLC γ 1: Fosfolipasa C específica para fosfoinositida

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

qPCR: PCR cuantitativa o PCR en tiempo real

RISC: Complejo de Silenciamiento inducido por ARN

RNAi: Interferencia de RNA

S1RP1: Receptor para la 1-fosfato de esfingosina

siRNA: ARN interferente pequeño

Src: Protooncogén tirosina-proteína quinasa

STAT 1: Transductor de señal y el activador de la transcripción 1

STAT 4: Transductor de señal y el activador de la transcripción 4

T CD4⁺: Linfocitos T o cooperadores

T CD8⁺: Linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos

T-bet: Regulador maestro de la diferenciación de células T helper

TCF: Factor de transcripción 7

TCR: Péptido por el receptor de linfocitos T

TFG- β : Factor de crecimiento transformante beta

TH1: Linfocito T helper

TLR: Receptores tipo Toll

UTR: Región no traducida

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de los siRNAs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de muerte celular por CTL

Figura 2. Activación de linfocitos T CD8.

Figura 3. Vía canónica de Wnt/ β -catenina

Figura 4. Dominio de identidad de la familia TCF/LEF

Figura 5. Mecanismo de RNAi mediado por la proteína Argonata 2

Figura 6. Perfil transcripcional de linfocitos T CD8 de neonatos y adultos

Figura 7. Purificación de sangre para la obtención de PBMCs o CBMCs

Figura 8. Purificación de PBMCs o CBMCs por RosetteSep

Figura 9. Mecanismo de acción de Dharmafect.

Figura 10. Pureza de linfocitos de dos muestras de adultos humanos

Figura 11. Dot plot de la transfección con siRNA asociado a fluoresceína

Figura 12. Gel de agarosa al 1% de la transfección

Figura 13. Niveles de expresión de LEF/ GAPDH

Figura 14. Niveles de expresión de CD69

Figura 15. Niveles de expresión de IL-2

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Inmunidad.

El estado de resistencia contra patógenos (natural o adquirido) de los organismos multicelulares se conoce como inmunidad. Esta resistencia está conformada por órganos, moléculas, células y vías de señalización que interactúan en una red dinámica para ofrecerle al hospedero un estado de homeostasis. A tal conjunto dinámico se le denomina sistema inmune (Abbas *et.al.*, 2012).

Después de su nacimiento, los neonatos pasan de un ambiente básicamente tolerante, donde se encuentran protegidos por los anticuerpos de su madre, a un ambiente que presenta varios retos inmunológicos. No existe inmunidad celular pasiva, por lo que son más sensibles a patógenos intracelulares, en general la respuesta inmune neonatal en comparación con la de un adulto presenta diferentes características, como un sesgo mayor hacia la inmunidad innata, desarrollo de respuestas a patógenos más lentas, número bajo de células de memoria, respuesta disminuida a vacunas, entre otras (Marchant y Goldman 2005; Cuenca *et.al.*, 2013; Schmiedeberg *et.al.*, 2016).

El sistema inmune se encuentra dividido por su funcionalidad en dos: el sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del organismo contra patógenos, brinda una respuesta rápida, con especificidad enfocada a grupos de patógenos y presenta una respuesta similar en

cada exposición al patógeno. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo brinda una respuesta tardía, específica para cada patógeno y genera memoria, en consecuencia, en encuentros posteriores con el mismo patógeno genera una respuesta más fuerte, eficiente y rápida. Pese a sus diferencias, el sistema inmune innato y adaptativo trabajan de manera conjunta; en esta dinámica, el sistema inmune innato activa al sistema inmune adaptativo, mientras que el sistema inmune adaptativo responde potenciando la respuesta del sistema inmune innato durante la infección. De esa manera, el sistema inmune brinda una protección a el organismo (Kuby *et.al.*, 2014).

1.2 Inmunidad innata.

La inmunidad innata proporciona barreras físicas como el epitelio y las mucosas, barreras químicas como péptidos antimicrobianos y pH ácido en el epitelio. Estos son mecanismos que existen antes de una infección para prevenirla. También cuenta con células y moléculas que brindan diferentes tipos de protección. Los fagocitos como los neutrófilos o macrófagos digieren y eliminan por mecanismos enzimáticos y estallido respiratorios a células y patógenos. Las proteínas plasmáticas como el sistema del complemento, cuya unión a células o bacterias genera lisis y opsonización. Además, la unión de estas proteínas a receptores celulares específicos puede desencadenar inflamación y secreción de moléculas inmunorreguladoras. Las células cebadas, basófilos y eosinófilos secretan gránulos que permiten la destrucción en particular de parásitos. Las células asesinas

naturales (NK) distinguen células sanas de células infectadas por medio del complejo de histocompatibilidad clase I (MHC I) para su posterior destrucción. El MHC I está expresado en todas las células nucleadas del organismo, cuando las NK encuentran células que han perdido este complejo o patógenos que crean un complejo similar, liberan sus gránulos citotóxicos y provocan su muerte. Las células dendríticas forman un puente funcional entre el sistema inmune innato y el adaptativo. Reciben este nombre debido a sus características morfológicas, y capturan patógenos para presentarlos en sus membranas péptidos del antígeno acoplado en su MHC; esta presentación la realizan para la activación de las células T, que al reconocer el péptido por el receptor de linfocitos T (TCR) se activan para ejecutar una respuesta inmunológica.

El sistema inmune innato hace el reconocimiento de patógenos microbianos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés Pattern recognition receptor) como receptores tipo toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores de lectinas, pentraxinas, colectinas y ficolinas, por mencionar algunos. El reconocimiento de patógenos es llevado a cabo por características conservadas en los microorganismos. Los patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMP, del inglés pathogen-associated molecular patterns), pueden ser de orígenes distintos, ácidos nucleicos ARN y DNA en virus y bacterias respectivamente, proteínas como la quitina, componente celular de la pared celular de hongos; entre otras moléculas sintetizadas por microorganismos que no sintetizadas por mamíferos. También reconocen patrones moleculares asociados a daño celular

(DAMP, damage associated macromolecular patterns) y proteínas como las HSP y el ácido úrico. La especificidad del sistema inmune innato en el reconocimiento está dado por moléculas firma de grupos de microorganismos que poseen semejanzas entre ellos, esto debido a que los receptores del sistema inmunitario innato están codificados en la línea germinal, teniendo un repertorio de aproximadamente 10^3 patrones moleculares (Abbas *et.al.*, 2012; Iwasaki, 2015; Kuby *et.al.*, 2014).

1.2.1 Inmunidad adaptativa.

El sistema inmune adaptativo está compuesto por dos tipos de linfocitos: los linfocitos B que se generan en el bazo y los linfocitos T que se generan en el timo. Estas células poseen características especiales como: diversidad, especificidad, memoria, expansión clonal y tolerancia hacia elementos propios del organismo.

El sistema inmune adaptativo posee un alta especificidad que está determinada por el reconocimiento de porciones específicas de proteínas, polisacáridos o macromoléculas pertenecientes a patógenos; dichas porciones se llaman epítomos. El sistema inmune adaptativo posee una alta gama de receptores que reconocen distintos epítomos; esta rica variedad surge a partir de una cantidad limitada de genes en la línea germinal que codifican para los receptores de linfocitos, que gracias a un proceso de recombinación somática genera una amplia variedad de receptores para antígenos de entre 10^7 y 10^9 .

Para su funcionamiento el sistema inmune adaptativo requiere de la colaboración de células presentadoras de antígenos (APC) que juegan un papel muy importante

al advertir a células linfoides de la presencia de patógenos. Cuando los linfocitos reconocen el patógeno al que son afines, en un contexto de alarma inmunológica, se activan, proliferan y se diferencian. La proliferación les permite generar más copias de células que reconozcan específicamente el mismo patógeno, con el objetivo de eliminar eficazmente la propagación de patógenos. En su diferenciación las células pueden llegar a ser células efectoras o de memoria. La memoria inmunológica es la información que se almacena de un patógeno a consecuencia de la exposición de éste con el sistema inmune; su principal función es brindar una respuesta más rápida, intensa y de larga duración contra exposiciones futuras.

Los linfocitos T son células que efectúan mecanismos celulares para el aumento de la respuesta inmune, su coordinación o para la eliminación directa de células infectadas. Se dividen en dos grupos: los linfocitos T CD4⁺ cooperadores y los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Ambos linfocitos reconocen antígenos por medio de las células presentadoras de antígenos (APC) en una interacción entre el receptor de linfocitos (TCR) y el complejo de histocompatibilidad clase I para las células T CD8⁺ y clase II para las T CD4⁺

Los linfocitos B se generan en el hígado fetal y la médula espinal, y para ser células funcionales necesitan ser activadas ya sea de manera independiente o dependiente de células T. Dicha activación los lleva a proliferar, diferenciarse a células plasmáticas o de memoria. Además, son las células plasmáticas las encargadas de producir anticuerpos que unirán específicamente a el patógeno por

el cual han sido activadas, opsonizándolo para su posterior eliminación (Abbas *et.al.*, 2012; Kuby *et.al.*, 2014).

1.3 Linfocitos T.

Las dos clases principales de linfocitos T son los linfocitos T CD4⁺ cooperadores y T CD8⁺ citotóxicos. Los linfocitos T CD4⁺ (como dice su nombre) cooperan en la respuesta inmunitaria coordinando la activación y proliferación de linfocitos T CD8⁺, el aumento de la actividad de macrófagos y la producción de anticuerpo por las células B plasmáticas. Los linfocitos T CD4⁺ se diferencian en tres principales subgrupos. Los linfocitos TH1 son activados por IL-12 e IFN- γ y en defensa a microbios intracelulares; las señales pueden ser obtenidas por medio de células dendríticas, macrófagos y linfocitos NK. Esta diferenciación se da por la activación de factores transcripciones STAT1, STAT4 y el factor firma T-bet. Los linfocitos TH1 producen IFN- γ y que medía funciones como la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos tipo IgG3. Los linfocitos TH2 son activados por IL-4 en defensa de helmintos y alérgenos. Estas señales pueden provenir de células cebadas, basófilos y eosinófilos; además, tienen como factor firma a GATA-3, y producen IL-4, que participa en la producción de IgE, IL-5 e IL-13 que juegan un papel en la activación de eosinófilos y secreción de mucosas respetivamente. Los linfocitos TH17 son el subgrupo activado por citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 y TFG- β , que desencadenan diferenciación por el factor transcripcional ROR γ t

en respuesta a bacterias extracelulares y hongos; siendo sus funciones efectoras guiadas por IL-17 e IL-22 implicadas en funciones de inflamación y de barrera.

Las citocinas producidas por cada subgrupo promueven la polarización de éstos, inhibiendo la diferenciación de otros subtipos (Abbas *et.al.*, 2012) (Kuby *et.al.*, 2014).

1.3.1 Linfocitos T CD8.

Los linfocitos T CD8⁺ son las células que eliminan principalmente patógenos intracelulares, cuya eliminación consiste en la muerte de células infectadas por medio de mecanismos apoptóticos relacionados con vías de señalización de las caspasas pro-apoptóticas.

Los linfocitos T CD8⁺ se encuentran circulando por la linfa en un recorrido por los ganglios linfáticos del cuerpo, hasta encontrar el antígeno al que son afines. Dicho encuentro es precedido por un mecanismo denominado presentación de antígeno, evento en el cual las células presentadoras de antígenos (APC) muestran péptidos del antígeno asociado a el complejo de histocompatibilidad clase I a el receptor de linfocitos T (TCR) de los linfocitos T CD8⁺. Esta activación está complementada con la unión de señales co-estimuladoras de receptores de membrana como CD28, así como de señales mediadas por citocinas. Una vez activados los linfocitos, la expresión de receptores en la membrana se ve alterada. En las primeras horas de la activación los linfocitos T aumentan la expresión de CD69, esta proteína se une

al receptor para la 1-fosfato de esfingosina llamado S1RP1 y reduce su expresión en la superficie impidiendo la migración de los linfocitos de los nodos linfáticos. De esta manera, los linfocitos permanecen en los nodos linfáticos con la finalidad de recibir señales posteriores de proliferación y diferenciación, por otra parte la activación lleva a el aumento en la expresión del receptor CD25, que responde a la citocina IL-2 estimulando la supervivencia, proliferación y diferenciación de los linfocitos T activados. Pasadas entre 24 y 48 horas después de la activación ocurre una expresión del ligando para CD40, evento que marca el comienzo de la capacitación de sus funciones efectoras, terminando con la expresión de CTLA-4, inhibidor de la activación que juega un papel como regulador. Los linfocitos generados por este proceso se denominan T CD8⁺ efectoras o CTL.

La interacción del TCR de los CTL con el MHC I de células infectadas provoca la activación de funciones efectoras en los linfocitos T CD8⁺ que llevan a la muerte celular por dos mecanismos independientes (figura 1). El principal mecanismo es la liberación de proteínas citotóxicas granzima y perforina asociadas a serglucina en gránulos que se endocitan por las células blanco. También hay la formación de poros en la membrana por la perforina. En el citosol, la perforina facilita la liberación de granzimas, mientras que las granzimas activan caspasas como la caspasa 3 pre-apoptótica y Bid de la familia Bcl-2, que desencadenan la vía mitocondrial de la apoptosis. El segundo mecanismo de muerte celular se da mediante el ligando de Fas (FasL) que se une al receptor de apoptosis Fas. Esta interacción activa caspasas y ambos mecanismos llevan a la célula a apoptosis. Durante la muerte de

células infectadas, las células T CD8⁺ no se ven afectadas, posiblemente por la especificidad durante el contacto célula-célula impide la difusión de los gránulos liberados y por enzimas proteolíticas como la catepsina, que elimina estas moléculas efectoras en las CTL (Abbas *et.al.*, 2012).

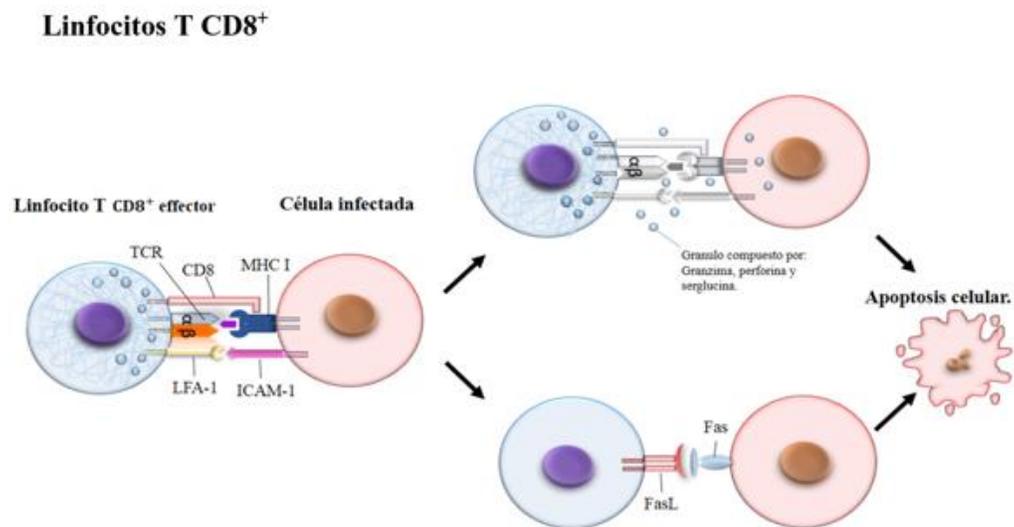


Figura 1. Mecanismo de muerte celular por CTL.

1.3.2 Activación de linfocitos T CD8⁺.

La activación es el conjunto de eventos de señalización que conducen a la supervivencia, proliferación celular, reordenamiento del citoesqueleto, cambios en la expresión génica y un aumento de la actividad metabólica. Cuando los linfocitos T CD8⁺ encuentran a su antígeno específico, mostrado por una APC mediante el contacto directo entre el TCR y MHC I, existe una agrupación de los elementos de activación en balsas lipídicas. El reconocimiento del antígeno asociado a el MHC I por el TCR induce la fosforilación de las ITAM por Lck cinasa de la familia de Src, la

fosforilación de las ITAM las convierte en un buen lugar de acoplamiento para la tirosina cinasa ZAP-70 de la familia Syk. Cada ITAM posee dos tirosinas; ambas deben estar fosforiladas para el acoplamiento de ZAP-70. Enseguida ZAP-70 fosforila a LAT, proteína de andamio en la que se unen PLC γ 1, Ras y factores de intercambio de GTP/GDP. PLC γ 1 activada hidroliza a PIP2 de la membrana para generar IP3, que estimula el aumento en la concentración de calcio citosólico y DAG, que activa a PKC. Todos estos eventos llevan a la activación de factores transcripcionales que conllevan a la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para la expansión clonal, la diferenciación y las funciones efectoras del linfocito (figura 2) (Abbas *et.al.*, 2012).

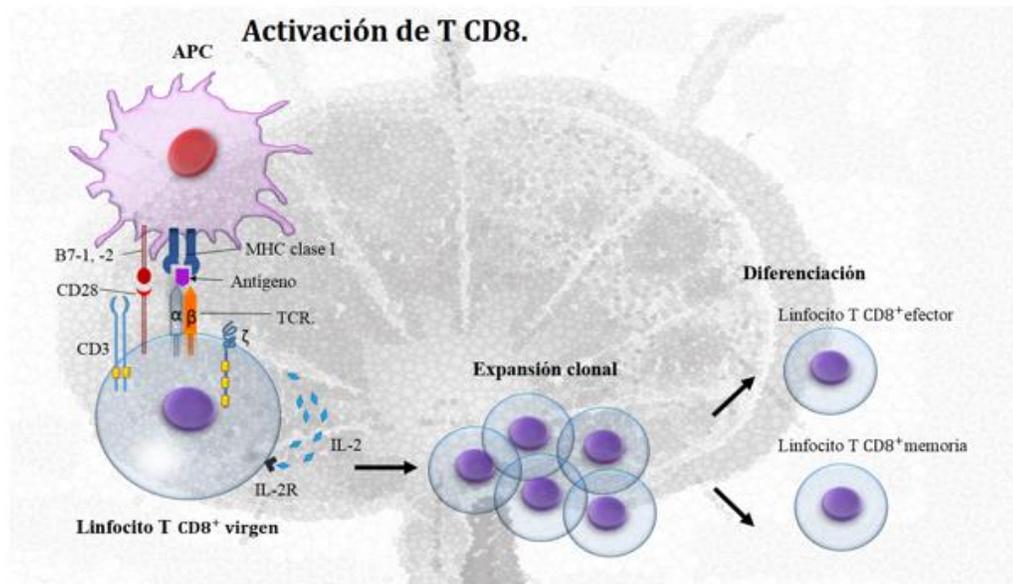


Figura 2. Activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T CD8.

1.3.3 Umbral de activación.

La activación de un linfocito T CD8⁺ es una respuesta de dependencia multifactorial en la que no solamente un estímulo genera la activación, sino el conjunto de señales positivas o negativas controlan la respuesta celular célula. El balance entre las señales positivas y negativas genera un umbral de activación en el que se necesita una suma ponderada de señales que inhiban las señales negativas para que la célula se active (Santa y Esquivel, 2006). La activación de las células T es controlada por reguladores negativos, los más conocidos son los receptores inhibidores del reconocimiento del MHC como CTLA-4, algunas moléculas como el factor de crecimiento tumoral (TGF- β) y la IL-10 muy bien conocido como un factor de inhibición de la síntesis de citosinas (Walunas *et.al.*, 2011; Filippi *et.al.*, 2008; Zhenmin *et.al.*,2008; Freeman *et.al.*, 2012; Ye *et.al.*, 2007). También generan señales negativas la tirosina quinasa inhibidora de Src que se encuentra en el comienzo de la señalización de la vía del TCR en la fosforilación de ITAM, entre otras.

Para superar estas inhibiciones se necesitan la acumulación de señales positivas como ZAP-70 y la fosforilación de PKB. Las señales positivas generan un cambio en la expresión de genes y el metabolismo que conlleva a cambios en la actividad e identidad celular (Abbas *et.al.*, 2012; Santana y Esquivel, 2006). Como señales negativas algunas investigaciones previas han reportado a la vía de Wnt/ β -catenina como una vía antagonista a la vía del TCR, lo conocido hasta ahora es que β -catenina propicia la fosforilación deficiente de la proteína de andamio LAT en el

residuo Y132, proteína perteneciente a la vía de activación del TCR. Esto se asocia con una fosforilación defectuosa en PLC γ y en la incorporación de calcio. Esos sucesos llevan a una producción de IL-2 disfuncional (Driessens *et.al.*, 2011).

1.4 Vía de Wnt/ β -catenina.

La vía de Wnt/ β -catenina es una vía altamente conservada a través de la evolución. Se encuentra involucrada en procesos de regulación, diferenciación, proliferación, muerte celular, auto-renovación de células madre hematopoyéticas, migración celular y otras vías de desarrollo in vivo (Huelsenken *et.al.*, 2002; MacDonald *et.al.*, 2009; Clevers, 2006; Teo y Kahn, 2010). En el sistema inmune la vía de Wnt está implicada en el control de la proliferación de células progenitoras, decisiones de destino celular de las células madre, desarrollo de células T, activación de células T reguladoras, diferenciación a memoria de las células T CD8⁺ y la maduración de células dendríticas (Staal *et.al.*, 2008).

La vía de Wnt se encuentra relacionada con la activación de linfocitos T y presenta una función antagonista a la activación del TCR (Driessens *et.al.*, 2011). La vía canónica de señalización de Wnt comienza por proteínas Wnt que forman parte de una numerosa familia de glucoproteínas de secreción que se unen a los receptores Frizzled y LRP5/6. La unión de Wnt a sus receptores recluta a Dvl que es activada por fosforilación, la activación de Dvl provoca la disociación del complejo GSK-3/Axin que conduce a la inhibición de GSK3 β y ésta inhibe la activación del

complejo de destrucción de β -catenina (Huelsenken *et.al.*, 2002). Cuando β -catenina se acumula en el citoplasma, es translocada a el núcleo donde su asociación a los factores transcripcionales Tcf1 y Lef1 cambia la expresión génica, al liberar co-represores Groucho (figura 3) (Daniels *et.al.*, 2005).

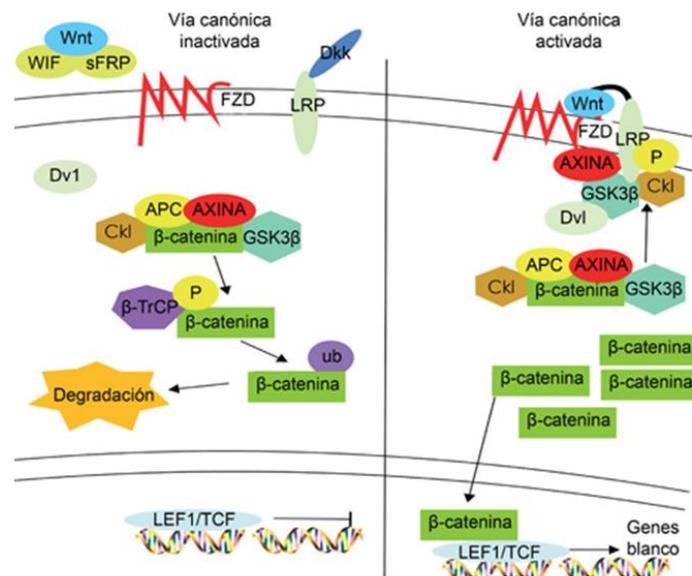


Figura 3. Vía canónica de de Wnt/ β -catenina. En la parte izquierda se muestra la vía el ausencia de Wnt y en la parte derecha la unión de Wnt a su receptor.

1.4.1 Tcf1 y Lef1.

Tcf1 y Lef1 son factores transcripcionales involucrados en el punto terminal de la vía de Wnt. En mamíferos existen cuatro ortólogos de Tcf1/Lef1, que presentan cinco dominios conservados, el dominio HMG que es un motivo peptídico de residuos básicos con secuencias específicas de afinidad al DNA, el dominio de

unión a β -catenina en el extremo amino terminal, el dominio C Clam de unión a DNA, pequeño dominio básico enriquecido con cisteína y residuos aromáticos en el extremo carboxilo termina. Se tiene la idea que su función está relacionada con la regulación de genes dianas específicos. También está el dominio Gro/TLE en el que se unen los corepresores transcripcionales Groucho/TLE, reprimiendo objetivos de la vía de Wnt. Finalmente, el dominio basic tail que funciona como una señal de localización nuclear y dominio GBS implicado en la unión de β -catenina (Cadigan y Waterman, 2012).

Tcf1 y Lef1 tienen un papel fundamental en la maduración de linfocitos T, específicamente entre el paso de dobles negativos a dobles positivos, en el desarrollo temprano y la decisión de linaje de células T CD8⁺, en la cual Tcf1 y Lef1 tienen un papel de desacetilasas de histonas (HDAC) que aumentan la interacción de proteínas-DNA mediante la desacetilación de lisinas. Estudios muestran que la pérdida de Lef1/Tcf1 no puede ser compensada con otros miembros de la familia HDAC y ambos factores son esenciales para establecer la identidad de células T CD8⁺ en una regulación genética y epigenética conferida por la actividad HDAC (Steinke y Xue, 2014; Xing *et.al.*, 2016).

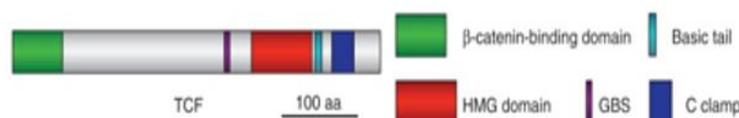


Figura 4. Dominios de identidad de la familia TCF/LEF.

1.5 RNAi.

El mecanismo de RNAi (interferencia de RNA) es una supresión de genes por medio de una secuencia de RNA. Existen algunos tipos de RNA que inducen la degradación del transcrito en animales (Pratt y MaeRae, 2009; Huntzinger *et.al.*, 2011). Moléculas de RNA como miRNAs (microARNs) y siRNAs (small interfering RNA) provocan interferencia de RNA mediante un complejo de proteínas denominado *RISC* (*Complejo de Silenciamiento inducido por ARN*). Mientras los miRNAs necesitan ser procesados por una ribonucleasa llamada Dicer para interactuar con RISC, los siRNAs se unen directamente a estos, siendo el principal intermediario del silenciamiento por RNAi dirigiendo específicamente la división de mRNA objetivos complementarios a la secuencia del siRNA en un proceso comúnmente utilizado por la célula para la defensa celular contra patógenos (Khvorova *et al.*, 2003; Elbashir *et.al.*, 2001; Tang G *et.al.*, 2005; Paddison *et.al.*, 2002). Las proteínas Argonautas son el núcleo de los complejos RICS y están compuestas de varios dominios: Dominio N-terminal, dominio paz, dominio MID (middle: medio) y dominio PIWI (Sontheimer *et.al.*, 2004; Hutvagner *et.al.*, 2008). La estructura de las proteínas Argonautas es bilobulada con dominios MID y PIWI a un lado de los N-terminal y los dominios PAZ al otro. El dominio PIWI adopta un plegamiento similar al de la RNasa H, dominio que brinda la capacidad de corte del mRNA (Höck *et al.*, 2008). Las proteínas Argonautas no se distribuyen al azar si no que concentran en los centros de descomposición de mARN que se conocen como cuerpos citoplasmáticos (Sen and Blau, 2005). La interacción de siRNAs a la región 3' UTR

(3' no codificante) del mRNA se asocia a proteínas Argonautas 1,3 y 4 que conducen a una represión de la traducción por impedimento estérico (Huntzinger *et.al.*, 2011). Más sin embargo el siRNA que se asocia a CDS (regiones de secuencia codificante) completamente, el mRNA se escindirá por la actividad endonúcleolítica de la proteína Argonauta 2 (figura 5) (Meister G *et.al.*, 2004).

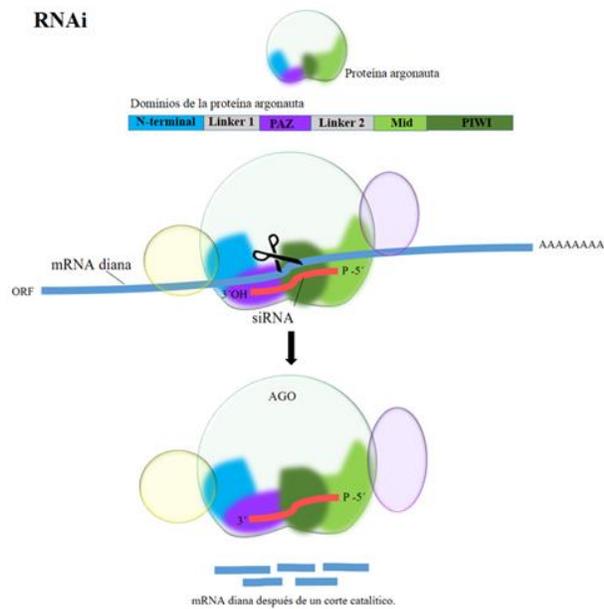


Figura 5. Mecanismo de RNAi mediado por la proteína Argonauta 2.

1.5.1 siRNA

La eficacia de las moléculas de siRNA depende de varios factores, incluyendo la disponibilidad del blanco, estructura secundaria del mRNA, posición de coincidencia y características intrínsecas de siRNA y mRNA (Yoshinari *et.al.*, 2004), que logran mediante la aplicación de un buen método de diseño. El diseño del siRNA es un paso crítico, debido a que pequeños cambios en la secuencia de nucleótidos pueden afectar la función del siRNA (Amarzguioui *et.al.*, 2004).

Las características generales de la región blanco del mRNA son, la exclusión de SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) como diana para el diseño del siRNA, debido a que puede causar variaciones con la eficiencia del silenciamiento en diferentes líneas celulares (Schwarz *et.al.*, 2006; Pei y Tuschl, 2006;). Evitar considerar partes intrónicas y extremos 5'UTR o 3'UTR como sitios de diseño de siRNA, debido a que son más propensas a regulación por proteínas. La solución está en elegir regiones alrededor de 50-100 nucleótidos río abajo del codón de inicio en el marco de lectura abierto del gen diana. Estudios recientes han demostrado que la accesibilidad del sitio diana debido a las estructuras secundarias del mRNA es otro determinante funcional del siRNA y cualquier variación en el emparejamiento de bases parciales en el sitio diana que influyen en la funcionalidad del siRNA. Para abordar este problema se pueden analizar las estructuras secundarias mediante software de acceso libre en la red (Luo y Chang, 2004).

Para las características del siRNA existe una gran controversia en la longitud. Mientras algunos autores sostienen que han obtenido buenos resultados con

siRNAs de hasta 29 pares de bases, algunos otros afirman que el empleo de siRNAs pequeños de entre 19 a 25 pares de bases puede conducir a una unión más específica (Elbashir *et.al.*, 2001). Sin embargo los siRNAs más pequeños son mejores para usar en células de mamífero, ya que los siRNA más largos pueden inducir una respuesta inmune (Addison PJ *et.al.*, 2002). Otra de las características bastante obvia pero vale la pena resaltar es la especificidad del siRNA mediante una búsqueda BLAST. El contenido de GC para un buen siRNA debe ser de entre 36 a 52% , esto debido a que un bajo contenido de GC conduce a una unión inespecífica y débil, mientras que un alto contenido en GC puede presentar dificultades en el desenrollado del dúplex siRNA por helicasa y el complejo RISC. Además los siRNAs más funcionales tienen una región inestable (menor contenido en GC). Esta inestabilidad interna aumenta la funcionalidad del complejo RISC, gracias al buen desensamble del mRNA. Este panorama general nos permite comprender y abordar determinadas especificidades para el diseño de un siRNA. A si mismo también existen características en regiones específicas, que permiten que un siRNA tenga mayor probabilidad de éxito en ser un efectivo silenciador (Ui-Tei *et.al.*, 2004; Jagla *et.al.*, 2005; Shabalina *et.al.*, 2006).

2. ANTECEDENTES.

El sistema inmune neonatal tiene múltiples factores que afectan la respuesta inmunológica. Trabajos en el laboratorio mostraron que las células T CD8⁺ neonatales tienen un sesgo hacia la inmunidad innata y una baja función efectoras. Se encontraron una serie de factores de transcripción diferencialmente expresados entre las células T CD8⁺ de adulto y neonato, entre ellos, los que factores de transcripción Lef1 y Tcf1, que se encuentran sobre expresados en linfocitos T CD8⁺ neonatales, en comparación a los adultos (figura 6). Esta sobreexpresión podría marcar el alto umbral de activación que se ha reportado para las células neonatales (Galindo-Albarrán *et.al.*, 2016).

Análisis del silenciamiento de TCF1 en nuestro laboratorio mostraron que el silenciamiento de TCF1 en los linfocitos neonatales se vio asociado a un aumento en los niveles de IL-2 y CD69 (Tesis de licenciatura de Andrea Castillo). Esto sugiere que la activación de los linfocitos es aumentada en ausencia del factor transcripcional TCF. Investigaciones del mismo laboratorio han arrojado la que la expresión diferencial de factores de transcripción podría estar relacionado con las diferencia en la actividad de linfocitos T CD8⁺ de neonatos en comparación con los adultos.

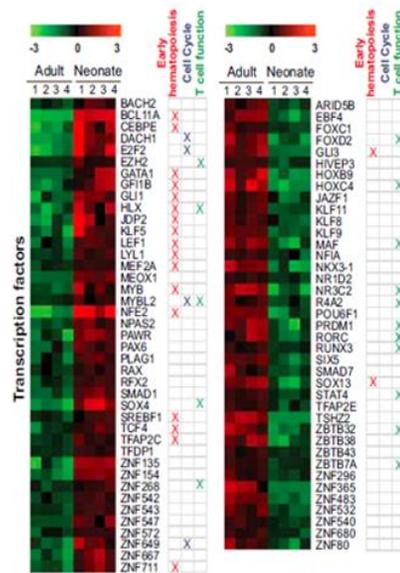


Figura 6. Perfil transcripcional de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

3. JUSTIFICACIÓN.

El sistema inmune neonatal no suele brindar una protección eficiente contra enfermedades infecciosas. La falta de una respuesta robusta genera la susceptibilidad del organismo a invasiones de patógenos y una respuesta deficiente a vacunas (PrabhuDas *et.al.*, 2011), por lo que enfermedades en esta etapa de la vida pueden resultar mortales. Actualmente enfermedades como la neumonía y la influenza tipo B, causadas por estreptococos y virus respectivamente, son causas principales de muertes en niños menores de 5 años (Bosch et al., 2013). Siendo los neonatos una población más susceptible, no existen vacunas para los lactantes contra determinados patógenos como para el virus sincitial respiratorio (LVSR)

que es el causante de muchas muertes en lactantes, y las vacunas que existen para proteger las poblaciones de niños y neonatos contra diferentes patógenos con frecuencia generan una memoria inmunológica sesgada, que puede ser nociva, aunque los anticuerpos generen una protección a corto plazo (Hurwitz, 2012).

Durante el embarazo y la lactancia, es el sistema inmune de la madre quien proporciona la defensa contra patógenos por los anticuerpos que pasan por la placenta, el calostro y la leche materna. Sin embargo, no existe inmunidad celular pasiva y el neonato debe enfrentarse por sí solo a patógenos intracelulares de su nuevo entorno (Cuenca *et.al.*, 2013). Es claro que existe una diferencia en la funcionalidad del sistema inmune neonatal y el sistema inmune de un adulto. Dichas diferencias son las responsables de la alta susceptibilidad de los neonatos a infecciones. Algunas de estas diferencias son la exposición limitada de antígenos en el útero de la madre que conlleva a la dependencia del sistema inmune innato para la protección, bajos niveles de células de B y T de memoria, la presencia de linfocitos B transitorias con un papel de células B vírgenes, disminución de los perfiles de expresión de IFN e IL-12p70 contrastado con el aumento de IL-10, IL-17 e IL-23 (Basha *et.al.*, 2014). Esto disminuyen la respuesta de los linfocitos TH1, que son los encargados de la eliminación de patógenos intracelulares, dando como resultado una mayor susceptibilidad a infecciones intracelulares y la disminución de respuestas a vacunas (PrabhuDas, *et.al.*, 2011). Este trabajo se enfoca en estudiar la posible regulación negativa por Lef1 de la activación de las células T y con esto

establecer como diana esta vía, para disminuir el umbral de activación de los linfocitos T CD8⁺ neonatales.

4. HIPÓTESIS.

La activación de los linfocitos T CD8⁺ neonatales es aumentada por el silenciamiento de Lef1, como encontramos para Tcf1.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto del silenciamiento de Lef1 en la activación de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

5.2 Objetivos particulares.

Diseñar un siRNA específico para Lef1.

Lograr la transfección celular.

Inhibir la expresión de Lef1 mediante siRNAs por el método de lipofección.

Analizar el efecto de la inhibición de Lef1 en células T CD8⁺ neonatales y de adulto.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Procedencia de las muestras.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron a partir de paquetes leucocitarios de sangre de adulto, donada por el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea de Cuernavaca. Las células mononucleares de sangre de cordón (CBMCs) se obtuvieron del cordón umbilical de partos vaginales del Hospital General Parres de Cuernavaca, con consentimiento informado de las madres.

6.2 Separación de PBMCs y CBMCs.

La separación de PBMCs y CBMCs se realizó mediante un gradiente de densidad empleando Ficoll-Hypaque, polisacárido que permite la obtención de capas celulares de menor a mayor densidad por centrifugación. En un tubo Falcón estéril se agregaron 10 ml de Ficoll-Hypaque, mientras que en otro tubo Falcon se mezclaron 20 ml de sangre con 10 ml de PBS (phosphate buffered saline) 1X. A continuación, el tubo que contenía la mezcla de sangre diluida se vertió lentamente en el tubo con Ficoll-Hypaque, teniendo cuidado de no romper el gradiente formado. Enseguida, se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a 20°C sin desaceleración, con lo cual se obtuvieron cuatro fases (figura 7). En esta separación la fase superior contiene plasma, debajo de esta se encuentra una fase blanca que contiene células mononucleares, seguida de una fase de Ficoll-Hypaque y finalmente una fase de

células de mayor densidad, principalmente eritrocitos y neutrófilos. Se recuperaron las células mononucleares y se transfirieron a un tubo Falcon nuevo. Posteriormente se realizaron dos lavados de las células con 40 ml de PBS 1X, centrifugando a 1400 rpm durante 10 minutos a 20°C con desaceleración. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en seco, se añadió 1 ml de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) adicionado con 5% SFB (suero fetal bovino) para realizar el conteo celular en la cámara Neubauer. Las células se dejaron incubando toda la noche a 37°C, 5% de CO₂ a una concentración de 8×10^6 células por mililitro. Esto permitió la eliminación de los monocitos, mediante la adherencia de estos grupos celulares al plástico. Al día siguiente se recuperaron las células en un tubo falcón, realizando lavados a la caja Petri con el medio que contenían, con la finalidad de obtener las células que no se adhirieron. Se centrifugo a 1400 rpm durante 10 minutos a 20°C con desaceleración, se eliminó el sobrenadante y el sedimento de resuspendió en 5 ml de medio RPMI adicionado con 5% de SFB. Se realizó nuevamente el conteo celular en la cámara Neubauer para utilizar estas células o proceder a la purificación de linfocitos T CD8⁺. Cuando se realizó la obtención de linfocitos T CD8⁺, se guardó 1 ml de eritrocitos con 4 ml de medio RPMI adicionado con 5% de SFB en una caja Petri a 37 °C, 5% de CO₂.

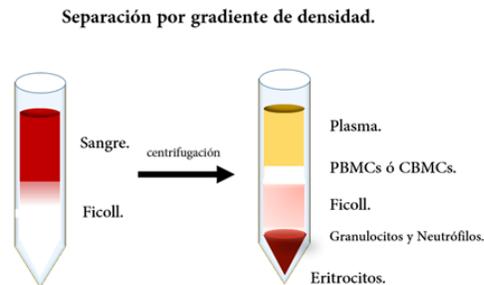


Figura 7. Purificación de sangre para la obtención de PBMCs o CBMCs.

6.3 Purificación de linfocitos T CD8.

Los linfocitos T CD8⁺ se purificarán mediante el uso de RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail (Stemcell technologies), método de selección negativa en el cual poblaciones distintas a células T CD8⁺ se unen a complejos tetraméricos de anticuerpos que reconocen componentes de membrana como CD4, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66B, CD123, TCR γ/δ y glicoforina A (presente en los glóbulos rojos), formando una especie de rosetas densas que se van al fondo en un gradiente de ficoll. El procedimiento fue el siguiente, una vez realizado el conteo celular de PBMCs o CBMCs, se adicionaron 5 ml de eritrocitos con medio RPMI suplementado con 5% de SFB apartados la noche anterior, más 1 ml de RPMI adicionado con 5% de SFB para el lavado de la caja de Petri que contenía los eritrocitos. Se obtuvo un volumen final de 10 ml de la mezcla eritrocitos-PBMCs-RPMI (o CBMCs según sea el caso). Enseguida, se adicionaron 110 μ l de RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail por cada 3×10^8 de células. Se

realizó una incubación en agitación leve por 40 minutos a temperatura ambiente, después de la cual se agregaron a otro tubo que contenía 10 ml de Ficoll-Hypaque, sin romper el gradiente formado. Después, se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a 20 ° C sin desaceleración. El uso de un medio de formación de gradiente de densidad (Lymphoprep o Ficoll-Hypaque compatible con RossetteSep Enrinhment kit) generó interfaces descritas en la figura 6. Se extrajo la fase blanca de células T CD8⁺. Finalmente, se realizó un lavado de las células con 40 ml de PBS 1X, centrifugando a 1400 rpm durante 10 minutos a 20°C con desaceleración. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en seco. Se añadió 1 ml de medio RPMI adicionado con 5% SFB .Se realizó el conteo celular en la cámara Neubauer (figura 8).

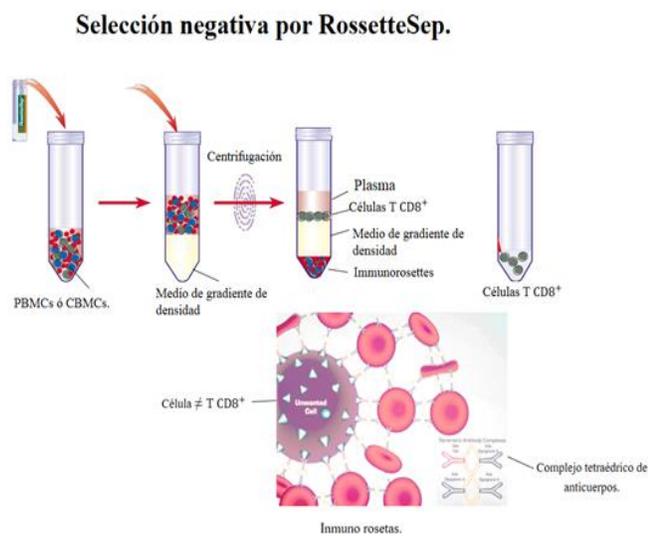


Figura 8. Purificación de PBMCs o CBMCs por RossetteSep

6.4 Transfección celular.

Para la transfección se utilizó DharmaFECT1, agente utilizado para la lipofección. Transporta siRNAs en liposomas catiónicos que entran a las células por medio de endocitosis (figura 9). El endosoma se rompe en el citoplasma liberando el material genético. El siRNA expuesto en el citosol se une al complejo RISC para degradar los ARNm blancos mediante un mecanismo de corte. La transfección se realizó en PBMCs, CBMCs, CD8 totales y vírgenes, dependiendo del rendimiento obtenido en las purificaciones. Para la utilizar las células se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos a 20°C con desaceleración, se retiró el medio RPMI adicionado con 5% SFB. Para eliminar todo el rastro del suero se procedió a realizar un lavado con 40 ml de PBS 1X, después el sobrenadante se retiró y el sedimento se re suspendió en seco, para posteriormente añadirle 1 ml de medio RPMI libre de suero. Las células fueron distribuidas en una placa de 96 pozos, 4×10^5 células por pozo en 5 μ l, añadiéndoles 33 μ l de medio de transfección. La preparación del medio de transfección se realizó utilizando 2 tubos eppendorf de 1.5 ml, añadiendo en uno 22 μ l de la solución de siRNA 5 μ M con 11 μ l de medio libre de suero y en el otro 1 μ l de DharmaFECT con 32 μ l de medio libre de suero, ambos tubos se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación se transfirió el tubo que contenía la solución del siRNA al tubo que contenía el Dharmafect, se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado el

tiempo de incubación se añadió el medio de transfección, se llevó a un volumen final por pozo de 250 μ l con medio libre de suero y se dejó en incubación por 36 horas a 37°C en atmosfera de 5 % de CO₂. Pasado un periodo de 24 horas se suplemento el medio al 2% con FBS. Al término del tiempo las células fueron recuperadas. Finalmente, se procedió a realizar la activación celular o fueron preparadas para la extracción de RNA con la finalidad de evaluar el silenciamiento de *lef1*.

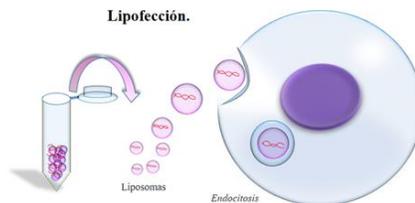


Figura 9. Mecanismo de acción del Dharmafect. Los liposomas catiónicos ingresan a la membrana celular.

6.5 Estimulación celular.

La estimulación celular se realizó por la unión cruzada con α -CD3 y α -CD28, seguido de un anticuerpo secundario para asemejar la activación celular de células T. Se partió de 4×10^6 células para la estimulación celular antes de la transfección con una pérdida aproximada de 30% debido muerte celular. Después de obtener las células transfectadas se centrifugó a 1500 rpm 5 min a 4°C, se retiró el

sobrenadante y las células fueron re suspendidas en 0.5 ml de medio RPMI adicionado con 5% de SFB. Se agregaron los anticuerpos α -CD3 (especificaciones) y α -CD28 (especificaciones) en una concentración de 1 μ g/ml, se incubó 30 minutos. Pasada la incubación se adicionó anticuerpo *anti-mouse* IgG (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) ZyMax™ Grade) en una concentración de 1 μ g/1ml. Se realizaron análisis de expresión y citometría de flujo.

6.6 Obtención de RNA.

Para la extracción de RNA total se utilizó el método Trizol-Cloroformo. Para la cual, después de la transfección o la activación las células se dejaron en 1 ml de Trizol una noche a -80°C. Al día siguiente se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitó por vortex 1 min. Para obtener las fases de los distintos componentes celulares se centrifugó a 11500 rpm por 15 min a 4° C. Se recuperó la fase superior incolora teniendo cuidado de no tocar la fase blanca (DNA). Se agregó 500 μ l de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm, 20 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se recuperó el sedimento. Se realizó un lavado con etanol al 75% frío. Se secó el pellet celular y se resuspendió en agua libre de RNAsas. Para medir la concentración del RNA obtenido se utilizó el kit Qubit (Invitrogen Q32866).

6.7 Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA, se realizó el protocolo del kit Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptasa (Thermo Scientific #EP0441).

6.8 Análisis por citometría de flujo.

Con el fin de medir la eficiencia en la purificación de linfocitos T CD8⁺, se realizó el marcaje con el anticuerpo T CD8⁺ (Tonbo Biosciences dilución: 1:8 en Facs Juice 1X) y α -CD3 (Tonbo Biosciences dilución: 1:8 en Facs Juice) para verificar la pureza de la población de linfocitos T T CD8⁺ neonatales y de adultos. Para teñir las células con anticuerpos se agregó 10 μ l de los anticuerpos mencionados, se incubó 30 minutos en hielo. Para prevenir uniones inespecíficas, se realizaron dos lavados con Facs Juice 1X, 5 minutos a 1500rpm y 4°C. Finalmente se dejaron las células fijadas en 300 μ l de paraformaldeído 1X.

Para el análisis de la activación en células transfectadas activadas y no activadas, se utilizó el marcaje con el anticuerpo CD69 (GeneTex dilución: 1:8 en Facs Juice) .CD69 se expresa en la membrana celular después de 4 horas aproximadamente de la activación lo cual nos permitió verificar si el silenciamiento de LEF1 permite una mejor activación de linfocitos T CD8⁺ neonatales. Se siguió el protocolo anterior para tinción de anticuerpos.

6.9 Evaluación de la transfección.

El análisis de la transfección se realizó con un siRNA inespecífico marcad con fluoresceína en el citómetro de flujo. Para el control del silenciamiento de *lef1*, evaluamos la concentración de mRNA por medio de qPCR de *lef1*.

6.10 Análisis de activación celular por medio de la expresión de IL-2.

La falta de buenos rendimientos en la obtención de células vírgenes y totales nos llevó a relizar los análisis de activación en PBMCs y CBMCs. Durante la activación una de las principales moléculas tempranas es IL-2, que actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T y activador de la proliferación de linfocitos B, la medición de la expresión de ésta se realizó por RT-qPCR.

7. RESULTADOS

7.1 Purificación celular.

Para los experimentos de silenciamiento de *lef1* en adultos se realizaron con linfocitos T CD8+ totales y vírgenes, se obtuvieron purezas arriba del 90% y se eliminaron las células de memoria que tienen el marcador CD5RO como puede observarse para dos muestras en la figura X.

Porcentaje de linfocitos T CD8 vírgenes de adulto por citometría de flujo.

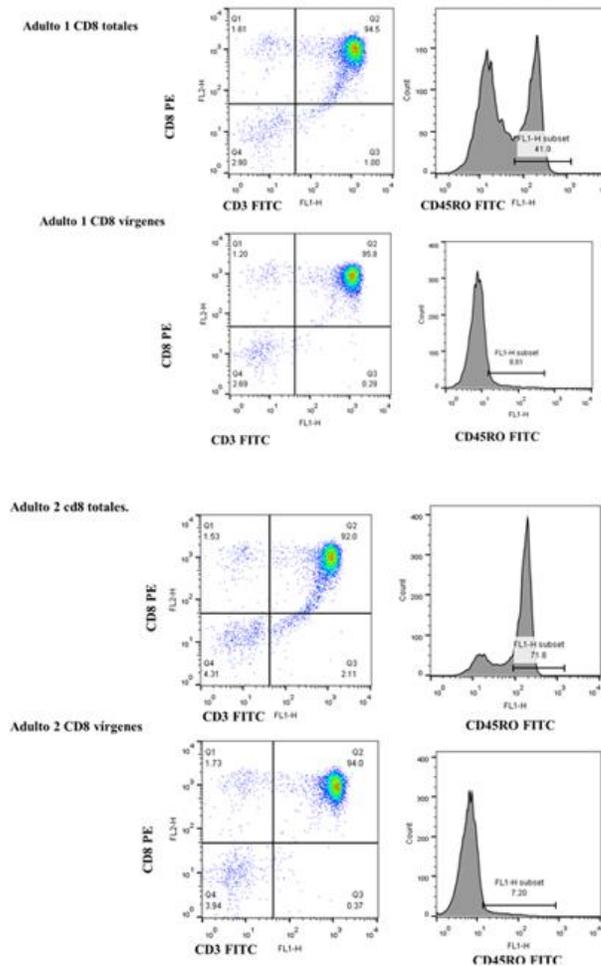


Figura 10. Pureza de linfocitos de dos muestras de adultos humanos.

7.2 Diseño del siRNA contra *lef1*.

El diseño del siRNA se realizó en las regiones intrónicas, excluyendo a las regiones 5' y 3'. Con la finalidad de realizar un diseño de siRNA contra *lef1*, que fuera específico para las todas isoformas de Lef1, se realizó una selección de las regiones de intrones (Apéndice 1) que compartían en común las cuatro isomorfias del gen.

Se procedió a generar un análisis de las conformaciones de los mRNA de las partes de los intrones, con la finalidad de analizar los detalles termodinámicos del plegamiento para escoger regiones accesibles. Para esto se utilizó la plataforma The mfold Web Server de la universidad de Albany. Se tomaron en cuenta aquellas regiones del mRNA en las que se presentaban loops y se les sobre valoro a aquellas regiones que se encontraban entre al menos 2 loops (Apéndice 2). Dadas estas condiciones se utilizaron las plataformas siRNA at whitehead y Invivo gen siRNA Wizard v3.1 para el diseño del siRNA y el Scrambled respectivamente. La selección de plataformas se realizó mediante la búsqueda bibliográfica y una evaluación de distintas plataformas como: Invivo gen siRNA Wizard v3.1, siRNA at whitehead, genScript, Dharmacos RNAi, siDirect versión 2.0. La evaluación de las plataformas se llevó a cabo mediante la generación de un programa en Python que evaluó los valores ideales de un siRNA (Apendice 3). Se generaron las siguientes secuencias de siRNAs de 21 nucleótidos como se muestra en la siguiente tabla.

	Lef1	Scrambled
FWS	GAAUGUCGUUGCUGAGUGUAC	GUCGGCUUGCGAUUGUAAUUA
RVS	ACACUCAGCAACGACAUUCGC	AUUACAAUCGCAAGCCGAGAG

Tabla 1. Secuencia de los siRNAs

Los siRNAs fueron sintetizados por Sigma Genosys.

7.3 Control de transfección.

Para evaluar la eficiencia de la transfección, se utilizó siRNA control asociado a fluoresceína (FIT-C, 5 μ M en buffer de siRNAs), obteniendo rendimientos del 5 al 12 % en la transfección, en células de adultos humanos, se realizaron más experimentos tanto en neonatos como en adultos pero debido a la muerte celular y a fallas en el equipo de citometría de la UAEM (datos del citómetro) no se logró visualizar efectivamente las poblaciones transfectadas con el siRNA fluorescente. Los datos que a continuación se presentan fueron obtenidos en el Cytometry-FACSCanto ii V87500122 del IBT de la UNAM.

Porcentaje de transfección en PBMCs por citometría de flujo.

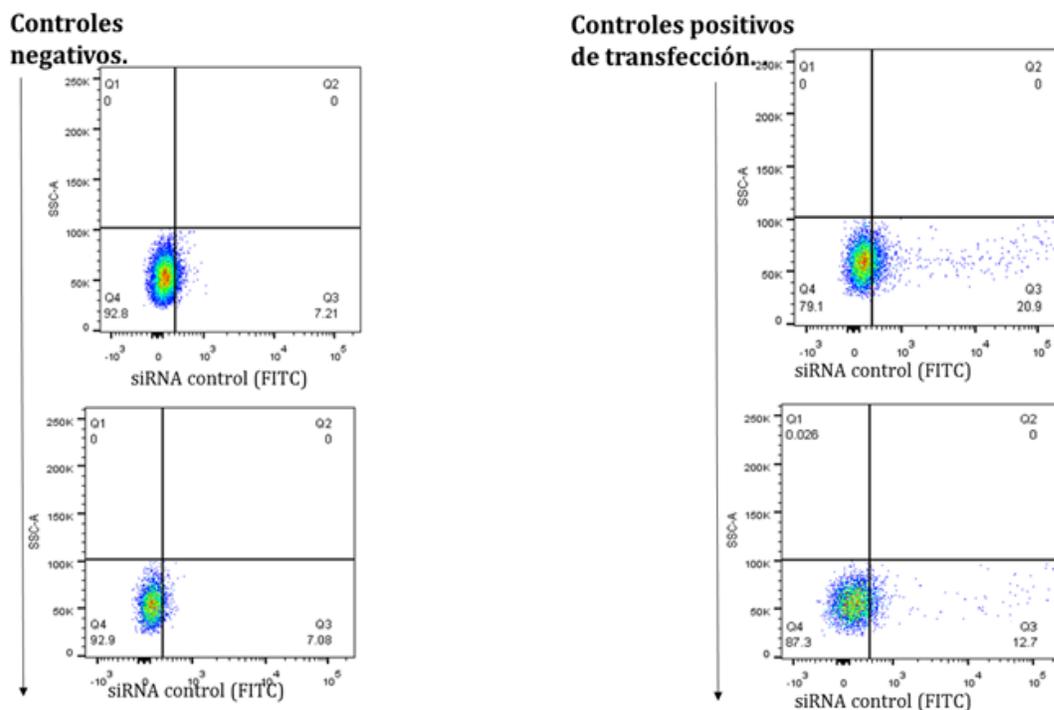


Figura 11. Dot plot de la transfección con siRNA asociado a fluoresceína (FITC-A) datos analizados en el Cytometry-FACSCanto ii V87500122. a) Imagen A; muestra controles negativo de transfección. b) La imagen B perteneciente a una muestra tratada con siRNA fluorescente muestra un ligero movimiento de la población transfectada hacia valores positivos de tinción con FITC-A. c) repetición del experimento anterior.

7.4 Transfección del siRNA específico.

Para confirmar la estabilidad del ARN, se corrió un gel de agarosa al 1% como se muestra en la imagen. Debido a las pocas concentraciones obtenidas de ARN de la mayoría de los experimentos solo se corrió un gel de agarosa, en células sometidas a transfección. Hecho que quisimos verificar debido también al número mínimo de células con las que se trabajó (aproximadamente 3 millones de células).

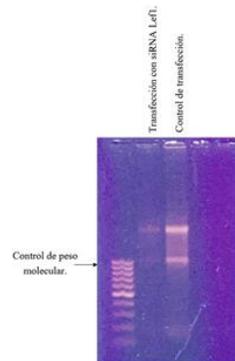


Figura 12. Gel de agarosa a el 1% . De izquierda a derecha a) control peso molecular b) transfección con siRNA contra Lef c) Control de transfección.

Para evaluar el silenciamiento del gen Lef1 con el siRNA diseñado, se realizó la medición del ARNm por medio de qPCR en T CD8⁺ virgenes de adulto y CBMCs, con estandarizados anteriormente en el laboratorio. Se analizó la expresión de Lef1 utilizando como gen de referencia GAPDH.

Cómo puede observarse en la ilustración (figura 13), se logró un notable silenciamiento de Lef1 con el siRNA diseñado tanto en células de neonato como en células de adulto. El siRNA scrambled nos generó algo de silenciamiento sobre las células transfectadas, sin embargo, el siRNA específico nos generó un silenciamiento mayor en todas las muestras transfectadas.

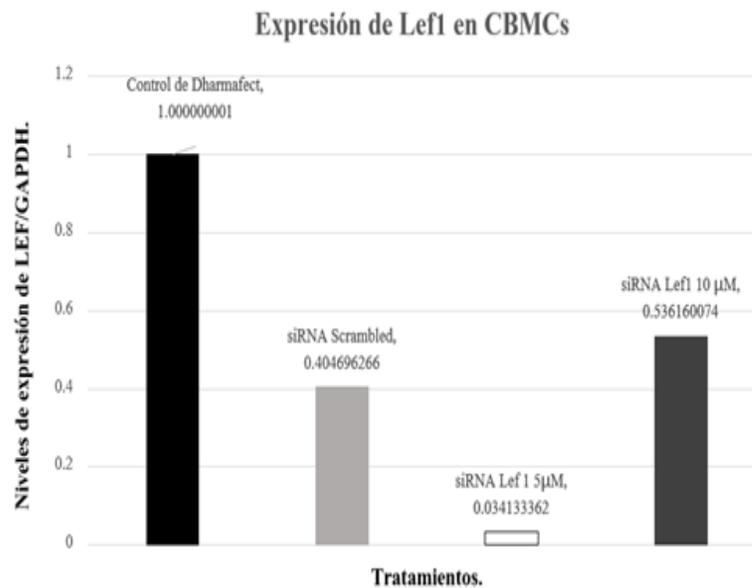
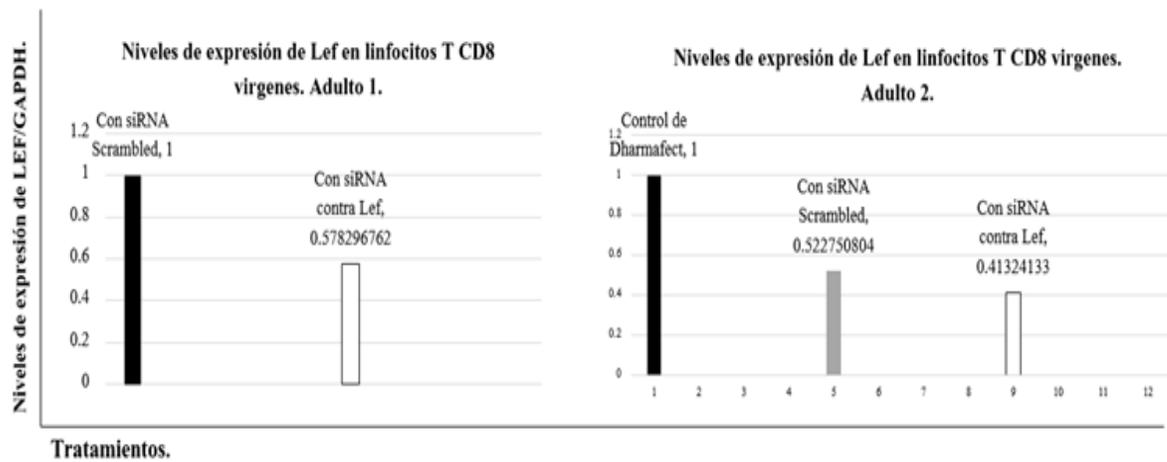


Figura 13. Niveles de expresión de Lef/GAPDH. En la imagen se muestran los distintos tratamientos de la transfección, observándose un eficiente silenciamiento de Lef en presencia de 5μM del siRNA contra Lef, mientras que al aumentar la concentración a 10μM del mismo, el silenciamiento se vuelve menos eficiente.

7.5 Efecto del siRNA sobre la activación en CBMCs y PBMCs.

Para evaluar la activación tras el silenciamiento de *lef1*, se analizaron moléculas de activación temprana. La expresión de CD69 en la membrana y la expresión de IL-2 por evaluación de su transcrito.

En la ilustración (figura 14) se muestran los resultados de la evaluación de CD69. Se puede observar que tras el silenciamiento de Lef en PBMCs, la activación dio como resultado un incremento en la expresión de CD69. No se realizó una medición de CD69 en CBMCs debido a la falta de reactivo necesario para realizar dicha medición.

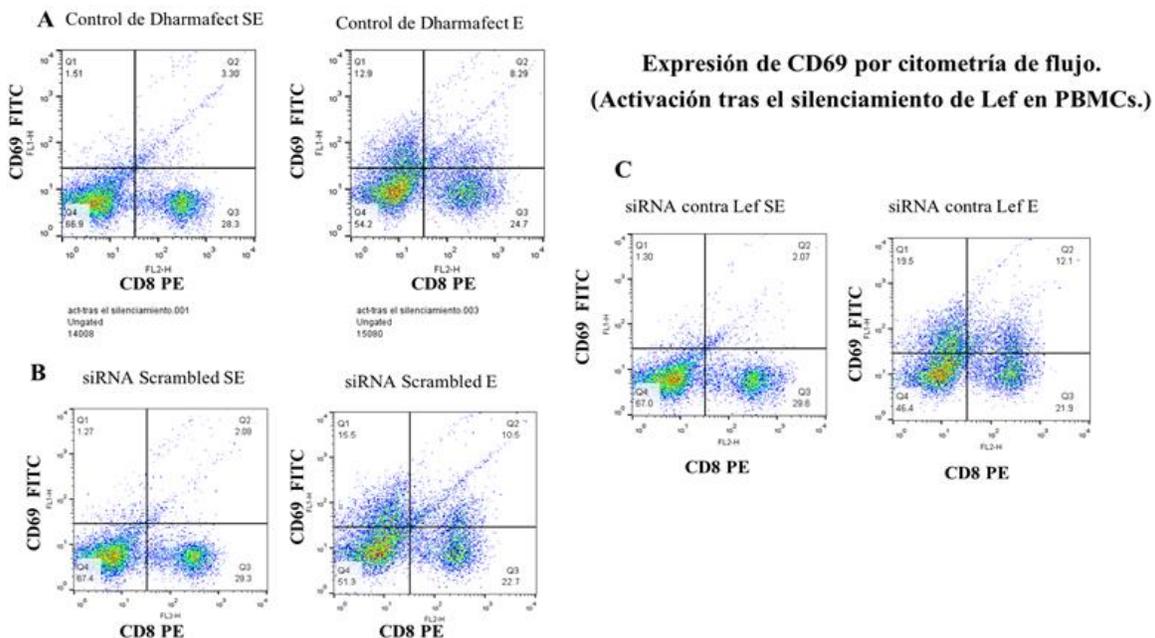


Figura 14. Niveles de expresión de CD69.

En la figura 15 la evaluación de IL-2, se observó un aumento en la expresión de IL-2 en PBMC y una disminución en las CBMC dio como resultados preliminares un aumento en la expresión de IL-2 y CD69. Mientras que en CBMCs se observó una disminución de IL-2.

Estos resultados son muy preliminares, ya que se realizó una sola evaluación.

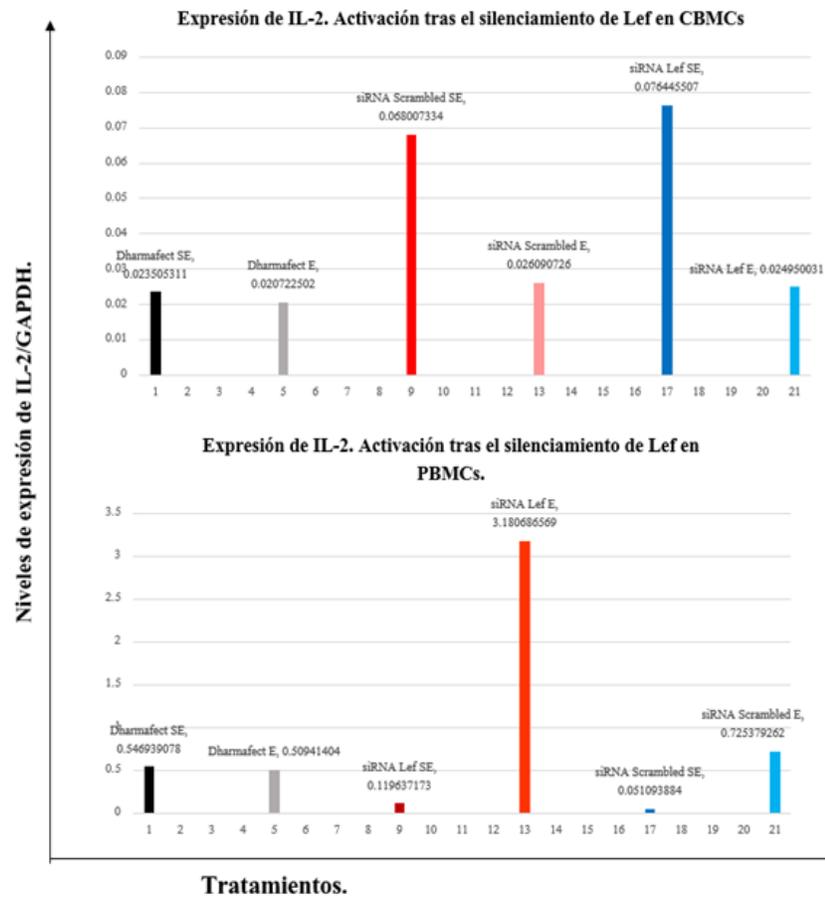


Figura 15. Niveles de expresión de IL-2.

8. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos en la activación de linfocitos humanos tras el silenciamiento del factor transcripcional de Lef1. Para lograr este objetivo fue necesario el diseño de un siRNA específico para todas las isoformas de Lef1. La eficiencia de transfección fue muy baja y no se pudo evaluar

ya que tuvimos problemas con la accesibilidad al citómetro de flujo ya que estas muestras no se fijan. Sin embargo, en todas las preparaciones celulares se encontró un silenciamiento de Lef. Lamentablemente nuestro siRNA scramble tuvo algún efecto en la expresión de Lef, por lo que resta volver a diseñar un siRNA scramble. Cuando evaluamos el efecto del siRNA de Lef, observamos como para el caso del siRNA para Lef1 que realizó una compañera del laboratorio previamente, que la activación de las PBMC aumentó, tanto en la expresión de IL-2 como de CD69. Esto indica, que los mismos factores transcripcionales dependientes de la vía canónica de WNT son antagonistas a la activación por el TCR. Esto podría deberse a que genes responsivos a estos factores tienen un efecto negativo sobre la activación celular o que la actividad deacetilasa de histonas de estos factores sobre genes que responden a la vía de wnt y a la del TCR pudieran permanecer cerrados. De cualquier forma, cabe señalar que nuestros experimentos no son conclusivos.

Las diferencias del silenciamiento de Lef sobre la expresión de IL-2 en neonatos y adultos, reveló que mientras en adultos el silenciamiento de Lef1 favorece la expresión de esta citocina, en neonatos se ve disminuida. Fue sorprendente que el silenciamiento de Lef tuviera efectos contrarios en linfocitos neonatales, pero no podemos asegurar este resultado, ya que fue en una sola evaluación.

9. CONCLUSIONES

El siRNA diseñado en el laboratorio produce un silenciamiento de Lef1.

Logramos la purificación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos

Se sugiere que el silenciamiento de Lef induce una mayor activación de PBMC

En conjunto nuestros resultados y antecedentes del laboratorio sugieren que tanto como LEF/TCF ejercen una modulación en la activación de linfocitos T, aunque los resultados con Lef no son conclusivos.

10. PERSPECTIVAS

Realizar repeticiones de nuestros resultados preliminares, con la finalidad de concluir el papel que tiene Lef1 sobre la activación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes.

Realizar del doble silenciamiento de LEF1/TCF1 en linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adulto.

Realizar un enfoque multifactorial de las moléculas implicadas en la activación y las moléculas que se encuentran regulando a estas, mediante un enfoque matemático y computacional dinámico que nos permitan encontrar hazas de regulación entre este sistema multifactorial.

11. REFERENCIAS

1. Abbas. (2012). Cellular and Molecular Immunology. Vol 7th ed.
2. Amarzguioui, M. and Prydz, H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 316 (4), 1050-1058.
3. Basha, S., Surendran, N. and Pichichero, M. (2014). Immune responses in neonates. *Expert Rev. Clin. Immunol*, 10(9), 1171–1184.
4. Bosch, A.A., Biesbroek, G., Trzcinski, K., Sanders, E.A. and Bogaert, D. (2013). Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *Plos Pathogens*, 9 (1), e1003057.
5. Cadigan, K. M. and Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4 (11), 1-22.
6. Castillo, A. (2016). Efecto de la transfección de siRNAs contra TCF y LEF en linfocitos T de neonatos y adultos humanos. 1-50.
7. Clevers, H. (2006). Wnt/beta-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*. 127 (3), 469-480.
8. Cuenca, A. G., Wynn, J. L., Moldawer, L. L. and Levy, O. (2014). Role of Innate Immunity in Neonatal Infection. *Am J Perinatol*, 30 (2), 105-112.

9. Daniels, D.L. and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*, 12 (4), 364-371.
10. Driessens, G., Zheng, Y., Locke, F., Cannon, J.L., Gounari, F. and Gajewski, T.F. (2011). β -Catenin Inhibits T Cell Activation by Selective Interference with Linker for Activation of T Cells–Phospholipase C- γ 1 Phosphorylation. *J Immunol*, 186 (2), 784-790.
11. Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15 (2), 188-200.
12. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411 (6836), 494-498.
13. Filippi, C. M., Juedes, A. E., Oldham, J. E., Ling, E., Togher, L., Peng, Y., Flavell, R.A. and Herrath, M. G. V. (2008). Transforming Growth Factor- β Suppresses the Activation of CD8⁺ T-Cells When Naïve but Promotes Their Survival and Function Once Antigen Experienced. *Diabetes*, 57 (10), 2684–2692.
14. Freeman, B. E., Hammarlund, E., Raué, H. P. and Slifka, M. K. (2012). Regulation of innate CD8⁺ T-cell activation mediated by cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (25), 9971-9976.
15. Galindo, A. O., López, O. H., Gutiérrez, D. Y., Rodríguez., O., Sánchez, J.A., Ramírez, O., Bergon, A., Llorca, B., Holota, H., Imbert, J., Hernández, A., Ferrier, P., Carillo, E., Velencia, A., Spicuglia, S. and Santana, M. A.

- (2016). CD8⁺ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Reports*, 17 (8), 2151-2160.
16. Höck, J. and Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9 (2), 210.
17. Huelsken, J. and Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 115 (21), 3977-3978.
18. Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12 (2), 99-110.
19. Hurwitz, J. L. (2011). Respiratory syncytial virus vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 10 (10), 1415–1433.
20. Hutvagner, G. and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (1), 22-32.
21. Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16 (4), 343-353.
22. Jagla, B., Aulner, N., Kelly, P.D. and Rothman, J.E. (2005). Sequence characteristics of functional siRNAs. *RNA*, 11 (6), 864-872.
23. Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115 (2), 209-216.
24. Kuby. (2007). Immunology. Vol 2nd ed.
25. Luo, K. Q. and Chang, D. C. (2004). Using a hydrogen-bond index to predict the gene-silencing efficiency of siRNA based on the local structure of mRNA. *Biochem Biophys Res Comms*, .320 (2), 622.

26. MacDonald, B. T., Tamai, K. and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17 (1), 9-16.
27. Marchant, A. and Goldman, M. (2005). T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin Exp Immunol*, 141 (1), 8-10.
28. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15 (2), 185-197.
29. Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16 (8), 948-958.
30. Pei, Y. and Tuschl, T. (2006). On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods*, 3 (9), 670-676.
31. PrabhuDas, M., Adkins, B., Gans, H., King, C., Levy, O., Ramilo, O. and Siegrist, C.A. (2011). Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol*, 12 (3), 189-194.
32. Pratt, A. J. and MacRae, I. J. (2009). The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *J Biol Chem*, 284 (27), 17897–17901.
33. Santana, M. A. and Esquivel, F. (2006). Cell Biology of T Cell Activation and Differentiation. *International Review of Cytology*, 250, 217-274.
34. Schmiedeberg, K., Krause, H., Röhl, F.W., Hartig, R., Jorch, G. and Brunner, M. C. (2016). T Cells of Infants Are Mature, but Hyporeactive Due to Limited Ca²⁺ Influx. *Plos One*, 11 (11), 127.

35. Schwarz DS, Hutvagner G y Zamore PD. (2006). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115 (2), 199-208.
36. Schwarz, D. S., Ding, H., Kennington, L., Moore, J. T., Schelter, J., Burchard, J., Linsley, P. S., Aronin, N., Xu, Z. and Zamore, P. D. (2006). Designing siRNA That Distinguish between Genes That Differ by a Single Nucleotide. *Plos Genetics. Plos Genet*, 2 (9), 140.
37. Sen, G.L. and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 7 (6), 633-636.
38. Shabalina, S. A., Spiridonov, A. N. and Ogurtsov, A. Y. (2006). Computational models with thermodynamic and composition features improve siRNA design. *BMC Bioinformatics*, 7, 65.
39. Sontheimer E. J. (2005). Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2), 127-138.
40. Staal, F.J.T., Luis, T.C. and Tiemessen, M.M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol*.8 (8), 581-593.
41. Steinke, F.C. and Xue. H.H. (2014). From inception to output, Tcf1 and Lef1 safeguard development of T cells and innate immune cells. *Immunol Res*, 59 (1-3), 45-55.
42. Teo, J,L. and Kahn, M.(2010). The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev*. 62(12),1149-1155.

43. Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R. and Saigo, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 32 (3), 936–948.
44. Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B. and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1 (5), 405-413.
45. Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B. and Bluestone, J.A. (2011). Pillars article: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 187 (7), 3466-3474.
46. Xing, S., Li, F., Zeng, Z., Zhao, Y., Yu, S., Shan, Q., Li, Y., Philips, F. C., Maina, P.K., Qi, H. H., Liu, C., Zhu, J., Pope, R. M., Musselman, C., Zeng, C., Weigun, P., Xue, H. H. (2016). Tcf1 and Lef1 transcription factors establish CD8⁺ T cell identity through intrinsic HDAC activity. *Nature Immunology*, 17 (6), 695–703.
47. Ye, Z., Huang, H., Hao, S., Xu, S., Yu, H., Van Den Hurk, S., and Xiang, J. (2008). IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 27 (12), 1031-1038.
48. Yoshinari, K., Miyagishi, M. and Taira, K. (2004). Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted región. *Nucleic Acids Res*, 32 (2), 691–699.

12. APÉNDICE

12.1 Apéndice 1.

A continuación se muestran las regiones de intrones de las isoformas de Lef y el la secuencia blanco establecida para el diseño del siRNA.

Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF1), transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001130713.2

GenBank Graphics

>NM_001130713.2:1190-2305 Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF1), transcript variant 2, mRNA

ATGCCCAACTCTCCGGAGGAGGTGGCGGCGGGGGGGACCCGGA

CTGCGCCACGGACGAGATGA

TCCCCTTCAAGGACGAGGGCGATCCTCAGAAGGAAAAGATCTTCGCCGAGAT

CAGTCATCCCGAAGAGGA

AGGCGATTTAGCTGACATCAAGTCTTCCTTGGTGAACGAGTCTGAAATCATCC

CGGCCAGCAACGGACAC

GAGGTGGCCAGACAAGCACAAACCTCTCAGGAGCCCTACCACGACAAGGCC
AGAGAACACCCCGATGACG
GAAAGCATCCAGATGGAGGCCTCTACAACAAGGGACCCTCCTACTCGAGTTA
TTCCGGGTACATAATGAT
GCCAAATATGAATAACGACCCATACATGTCAAATGGATCTCTTTCTCCACCCAT
CCCGAGAACATCAAAT
AAAGTGCCCGTGGTGCAGCCATCCCATGCGGTCCATCCTCTCACCCCCCTCA
TCACTTACAGTGACGAGC
ACTTTTCTCCAGGATCACACCCGTCACACATCCCATCAGATGTCAACTCCAAA
CAAGGCATGTCCAGACA
TCCTCCAGCTCCTGATATCCCTACTTTTTATCCCTTGTCTCCGGGTGGTGTG
GACAGATCACCCACCT
CTTGGCTGGTTTTCCCATCATATGATTCCCGGTCCTCCTGGTCCCCACACAAC
TGGCATCCCTCATCCAG
CTATTGTAACACCTCAGGTCAAACAGGAACATCCCCACACTGACAGTGACCTA
ATGCACGTGAAGCCTCA
GCATGAACAGAGAAAGGAGCAGGAGCCAAAAAGACCTCACATTAAGAAGCCT
CTGAATGCTTTTATGTTA
TACATGAAAGAAATGAGAGCGAATGTCGTTGCTGAGTGTACTCTAAAAGAAAG
TGCAGCTATCAACCAGA
TTCTTGGCAGAAGGTGGCATGCCCTCTCCCGTGAAGAGCAGGCTAAATATTAT
GAATTAGCACGGAAAGA

AAGACAGCTACATATGCAGCTTTATCCAGGCTGGTCTGCAAGAGACAATTATG
GTAAGAAAAAGAAGAGG
AAGAGAGAGAACTACAGGAATCTGCATCAGGTACAGGTCCAAGAATGACAG
CTGCCTACATCTGA

**Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF1), transcript
variant 3, mRNA**

NCBI Reference Sequence: NM_001130714.2

GenBank Graphics

>NM_001130714.2:1190-2350 Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1
(LEF1), transcript variant 3, mRNA

ATGCCCAACTCTCCGGAGGAGGTGGCGGCGGCGGGGGGACCCGGA
CTGCGCCACGGACGAGATGA
TCCCCTTCAAGGACGAGGGCGATCCTCAGAAGGAAAAGATCTTCGCCGAGAT
CAGTCATCCCGAAGAGGA
AGGCGATTTAGCTGACATCAAGTCTTCCTTGGTGAACGAGTCTGAAATCATCC
CGGCCAGCAACGGACAC
GAGGTGGCCAGACAAGCACAAACCTCTCAGGAGCCCTACCACGACAAGGCC
AGAGAACACCCCGATGACG

GAAAGCATCCAGATGGAGGCCTCTACAACAAGGGACCCTCCTACTCGAGTTA
TTCCGGGTACATAATGAT
GCCAAATATGAATAACGACCCATACATGTCAAATGGATCTCTTTCTCCACCCAT
CCCGAGAACATCAAAT
AAAGTGCCCGTGGTGCAGCCATCCCATGCGGTCCATCCTCTCACCCCCCTCA
TCACTTACAGTGACGAGC
ACTTTTCTCCAGGATCACACCCGTACACATCCCATCAGATGTCAACTCCAAA
CAAGGCATGTCCAGACA
TCCTCCAGCTCCTGATATCCCTACTTTTTATCCCTTGTCTCCGGGTGGTGTTG
GACAGATCACCCCACCT
CTTGGCTGGTTTTCCCATCATATGATTCCCGGTCCTCCTGGTCCCCACACAAC
TGGCATCCCTCATCCAG
CTATTGTAACACCTCAGGTCAAACAGGAACATCCCCACACTGACAGTGACCTA
ATGCACGTGAAGCCTCA
GCATGAACAGAGAAAGGAGCAGGAGCCAAAAAGACCTCACATTAAGAAGCCT
CTGAATGCTTTTTATGTTA
TACATGAAAGAAATGAGAGCGAATGTCGTTGCTGAGTGTACTCTAAAAGAAAG
TGCAGCTATCAACCAGA
TTCTTGGCAGAAGGTGGCATGCCCTCTCCCGTGAAGAGCAGGCTAAATATTAT
GAATTAGCACGGAAAGA
AAGACAGCTACATATGCAGCTTTATCCAGGCTGGTCTGCAAGAGACAATTATG
GTAAGAAAAAGAAGAGG

AAGAGAGAGAACTACAGGAATCTGCATCAGGTGGAAAACGAAGCTCATTCC
CAACGTGCAAAGCCAAGG
CAGCGACCCCAGGACCTCTTCTGGAGATGGAAGCTTGTTGA

**Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF1), transcript
variant 4, mRNA**

NCBI Reference Sequence: NM_001166119.1

GenBank Graphics

>NM_001166119.1:518-1429 Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1
(LEF1), transcript variant 4, mRNA

ATGGCAGAGGTGGCCAGACAAGCACAAACCTCTCAGGAGCCCTACCACGACA
AGGCCAGAGAACACCCCG
ATGACGGAAAGCATCCAGATGGAGGCCTCTACAACAAGGGACCCTCCTACTC
GAGTTATTCCGGGTACAT
AATGATGCCAAATATGAATAACGACCCATACATGTCAAATGGATCTCTTTCTCC
ACCCATCCCGAGAACA
TCAAATAAAGTGCCCGTGGTGCAGCCATCCCATGCGGTCCATCCTCTCACCC
CCCTCATCACTTACAGTG
ACGAGCACTTTTCTCCAGGATCACACCCGTACACATCCCATCAGATGTCAAC
TCCAAACAAGGCATGTC

CAGACATCCTCCAGCTCCTGATATCCCTACTTTTTATCCCTTGTCTCCGGGTG
GTGTTGGACAGATCACC
CCACCTCTTGGCTGGTTTTCCCATCATATGATTCCCGGTCCTCCTGGTCCCCA
CACAACCTGGCATCCCTC
ATCCAGCTATTGTAACACCTCAGGTCAAACAGGAACATCCCCACACTGACAGT
GACCTAATGCACGTGAA
GCCTCAGCATGAACAGAGAAAGGAGCAGGAGCCAAAAAGACCTCACATTAAG
AAGCCTCTGAATGCTTTT
ATGTTATACATGAAAGAAATGAGAGCGAATGTCGTTGCTGAGTGTACTCTAAA
AGAAAGTGCAGCTATCA
ACCAGATTCTTGGCAGAAGGTGGCATGCCCTCTCCCGTGAAGAGCAGGCTAA
ATATTATGAATTAGCACG
GAAAGAAAGACAGCTACATATGCAGCTTTATCCAGGCTGGTCTGCAAGAGAC
AATTATGGTAAGAAAAAG
AAGAGGAAGAGAGAGAACTACAGGAATCTGCATCAGGTACAGGTCCAAGAA
TGACAGCTGCCTACATCT
GA

**PREDICTED: Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF1),
transcript variant X2, mRNA**

NCBI Reference Sequence: XM_005263047.1

GenBank Graphics

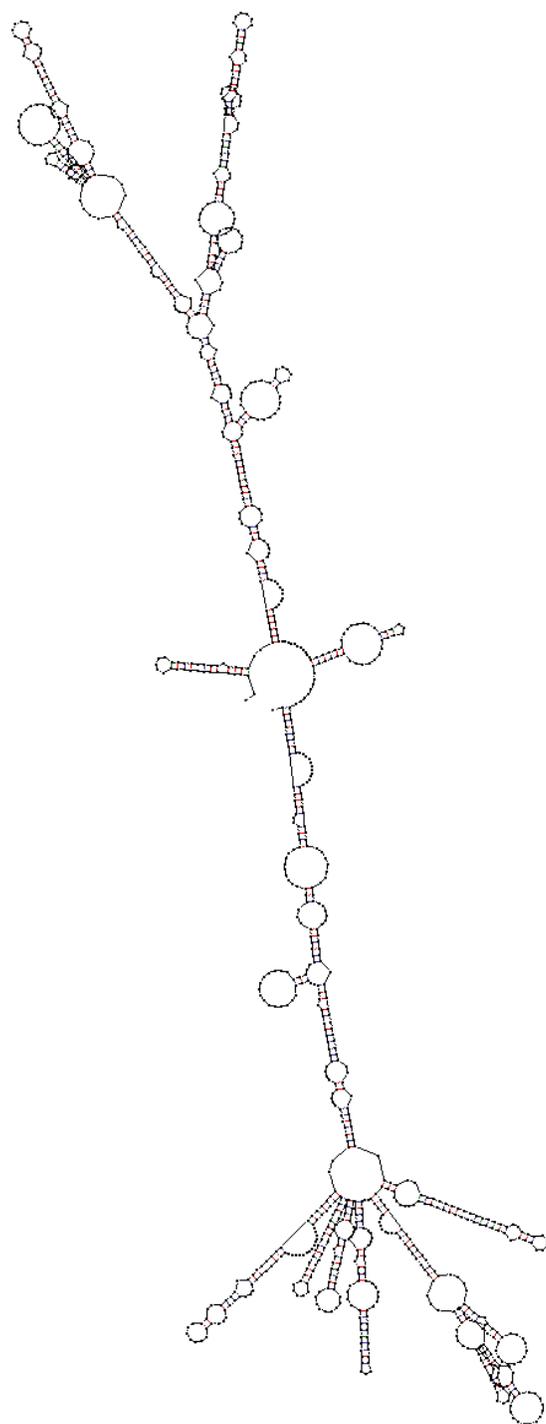
>XM_005263047.1:22-1062 PREDICTED: Homo sapiens lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF1), transcript variant X2, mRNA

ATGGCAGAGGTGGCCAGACAAGCACAAACCTCTCAGGAGCCCTACCACGACA
AGGCCAGAGAACACCCCG
ATGACGGAAAGCATCCAGATGGAGGCCTCTACAACAAGGGACCCTCCTACTC
GAGTTATTCCGGGTACAT
AATGATGCCAAATATGAATAACGACCCATACATGTCAAATGGATCTCTTTCTCC
ACCCATCCCGAGAACA
TCAAATAAAGTGCCCGTGGTGCAGCCATCCCATGCGGTCCATCCTCTCACCC
CCCTCATCACTTACAGTG
ACGAGCACTTTTCTCCAGGATCACACCCGTACACATCCCATCAGATGTCAAC
TCCAAACAAGGCATGTC
CAGACATCCTCCAGCTCCTGATATCCCTACTTTTTATCCCTTGTCTCCGGGTG
GTGTTGGACAGATCACC
CCACCTCTTGGCTGGCAAGGTCAGCCTGTATATCCCATCACGGGTGGATTCA
GGCAACCCTACCCATCCT
CACTGTCAGTCGACACTTCCATGTCCAGGTTTTCCCATCATATGATTCCCGGT
CCTCCTGGTCCCCACAC
AACTGGCATCCCTCATCCAGCTATTGTAACACCTCAGGTCAAACAGGAACATC
CCCACACTGACAGTGAC

CTAATGCACGTGAAGCCTCAGCATGAACAGAGAAAGGAGCAGGAGCCAAAAA
GACCTCACATTAAGAAGC
CTCTGAATGCTTTTATGTTATACATGAAAGAAATGAGAGCGAATGTCGTTGCT
GAGTGTACTCTAAAAGA
AAGTGCAGCTATCAACCAGATTCTTGGCAGAAGGTGGCATGCCCTCTCCCGT
GAAGAGCAGGCTAAATAT
TATGAATTAGCACGGAAAGAAAGACAGCTACATATGCAGCTTTATCCAGGCTG
GTCTGCAAGAGACAATT
ATGGTAAGAAAAAGAAGAGGAAGAGAGAGAACTACAGGAATCTGCATCAGG
TGGAACGAAGCTCATT
CCCAACGTGCAAAGCCAAGGCAGCGACCCCAGGACCTCTTCTGGAGATGGA
AGCTTGTTGA

12.2 Apéndice 2.

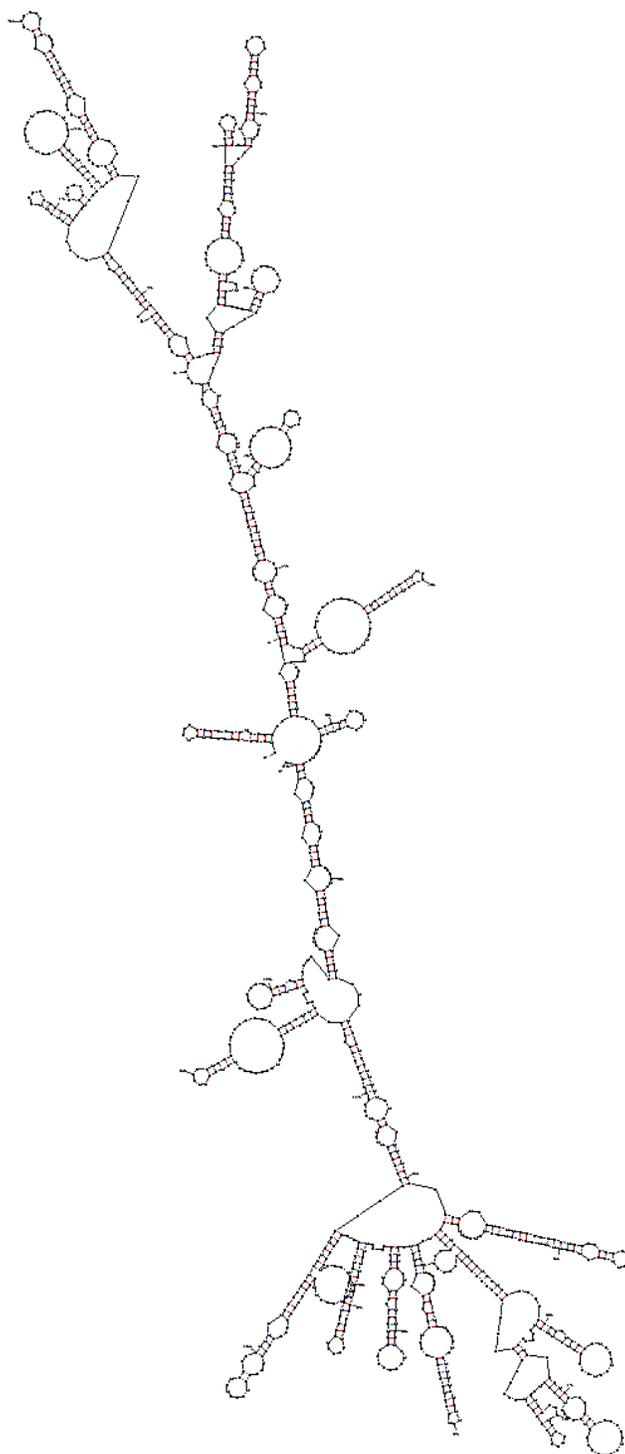
Estructuras secundarias generadas en The mfold Web Server.



dG = -254.60 RNA 1

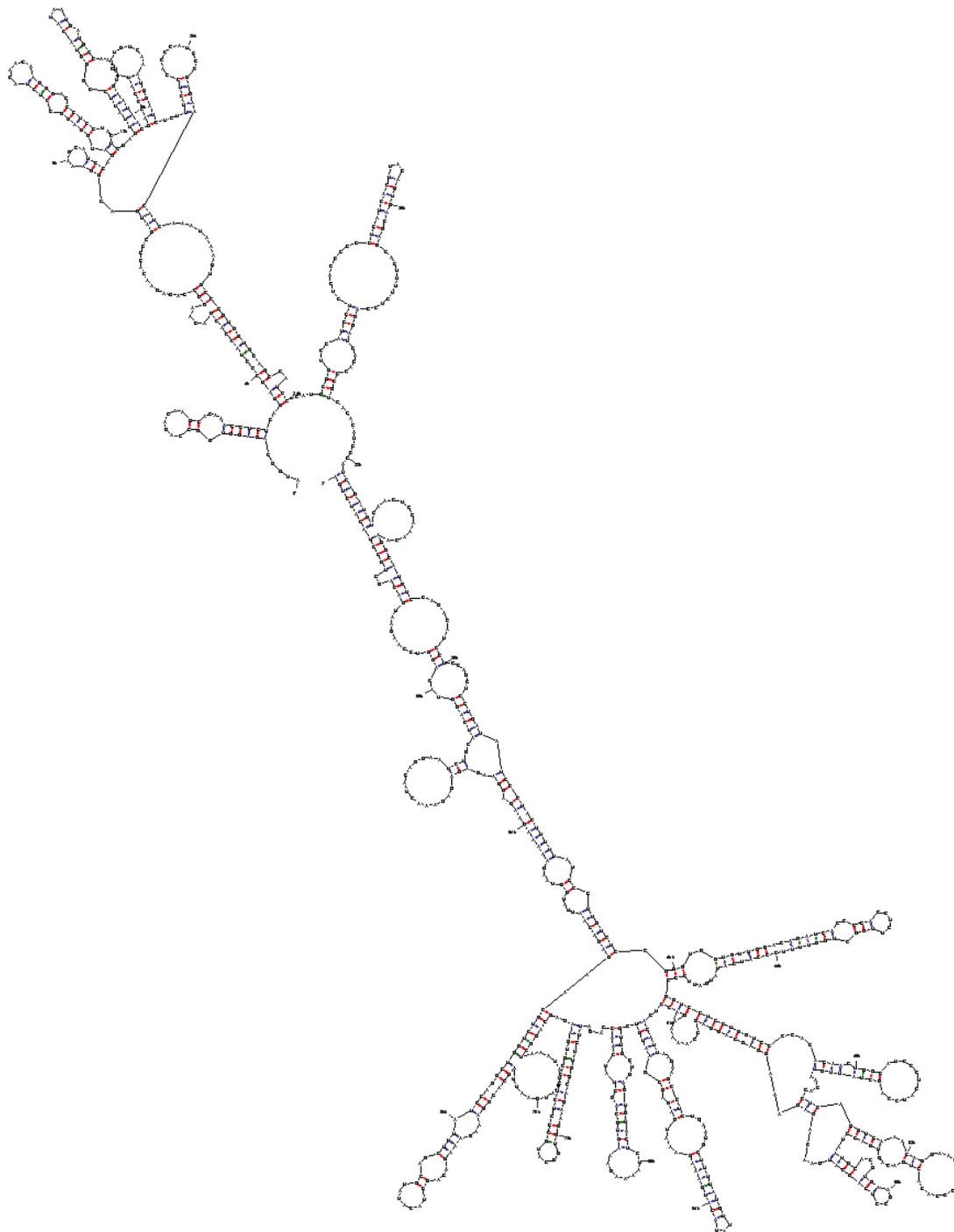
Output of sir_graph (9)
mfold_util 4.7

Created Fri Sep 1 00:16:33 2017



Output of sir_graph (9)
mfold_util 4.7

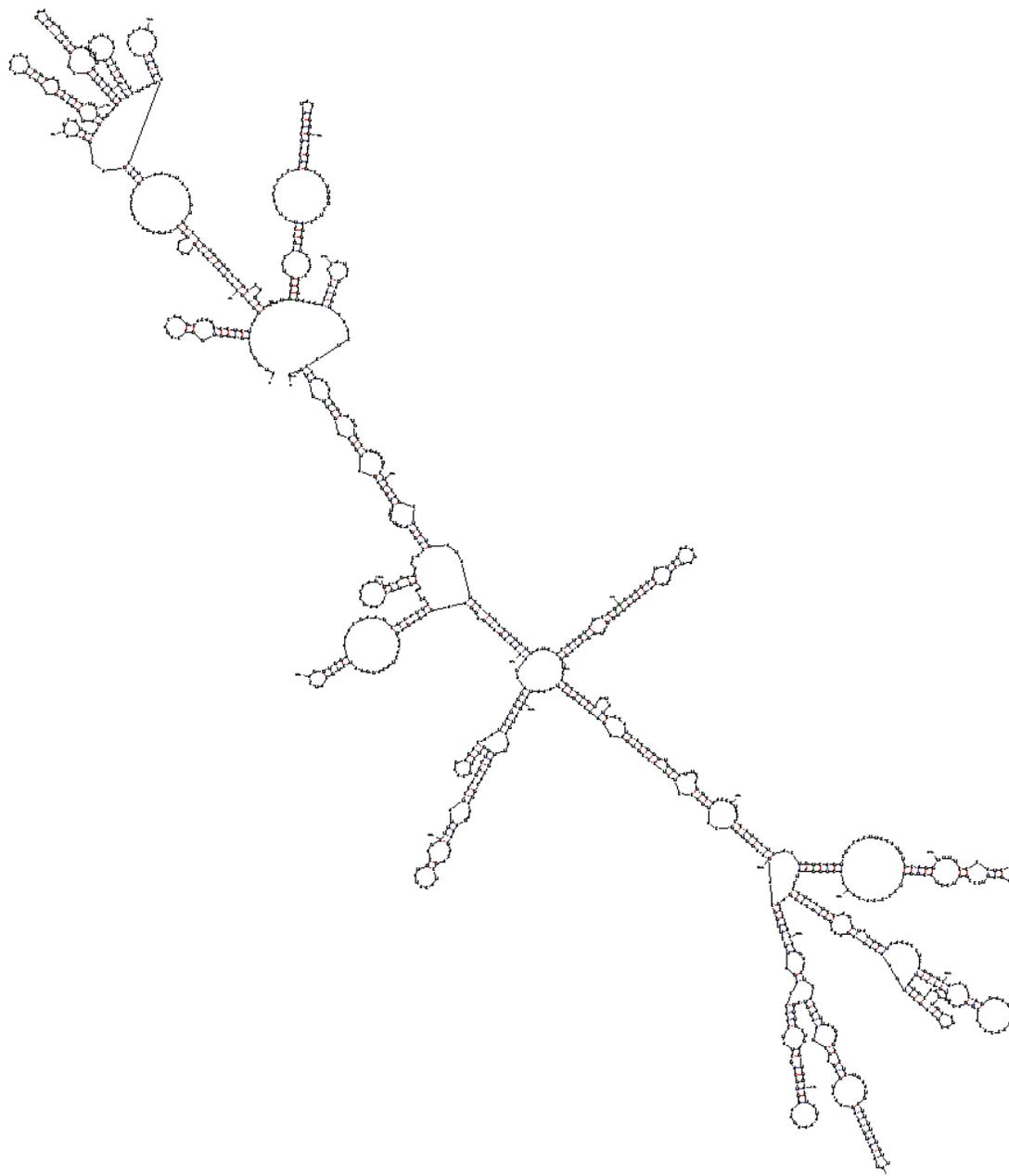
Created Fri Sep 1 00:18:37 2017



$dG = -184.00$ *lef 3*

Output of sir_graph (9)
mfold_util 4.7

Created Fri Sep 1 00:20:25 2017



$dG = -217.60$ *lef 4*

12.3 Apéndice 3.

Código del programa de Python para la evaluación de siRNAs.

```
def por(n):
```

```
    i=0
```

```
    k=0
```

```
    l=len(n)
```

```
    while i<l:
```

```
        if ((n[i]=="G") or (n[i]=="C")):
```

```
            k+=1
```

```
            i+=1
```

```
        else:
```

```
            i+=1
```

```
    return (100.0*k/(l))
```

```
def Ran(n):
```

```
    if (30<=por(n) and por(n)<=52 ):
```

```
        return "Positivo"
```

```
else:  
    return "Negativo"
```

```
def U3(n):
```

```
    if n[2]=="U":  
        return "Positivo"  
    else:  
        return "Negativo"
```

```
def A6(n):
```

```
    if n[5]=="A":  
        return "Positivo"  
    else:  
        return "Negativo "
```

```
def A10(n):
```

```
    if n[9]=="A":
```

```
        return "Positivo"
```

```
    else:
```

```
        return "Negativo"
```

```
def VP(n):
```

```
    j=2
```

```
    if U3(n)=="Positivo":
```

```
        j+=1
```

```
    if A6(n)=="Positivo":
```

```
        j+=1
```

```
    if A10(n)=="Positivo":
```

```
        j+=1
```

```
    if Ran(n)=="Positivo":
```

```
        j+=1
```

```
    if j==6:
```

```
        return "Ideal"
```

```
    else:
```

```
return j
```

```
def Lim(n):
```

```
    i=19
```

```
    while (n[i]=="G" or n[i]=="C" or n[i]=="A" or n[i]=="U"):
```

```
        i+=1
```

```
    return n[0:i]
```

```
def F(n):
```

```
    if ((n[0]=="A") or (n[0]=="U")):
```

```
        return ('{:^30}{:^60}'.format(Lim(line), 'Descartada por tener A-U en  
posicion 1'))
```

```
    elif (n[12]=="C"):
```

```
        return ('{:^30}{:^60}'.format(Lim(line), 'Descartada por tener C en posicion 13'))
```

```
    elif ((n[18]=="G") or(n[18]=="C")):
```

```

        return ('{:^30}{:^60}'.format(Lim(line), 'Descartada por tener G-C en
posicion 19'))

```

```

else:

```

```

        return

```

```

('{:^30}{:^18}{:^18}{:^15}{:^15}{:^15}{:^15}{:^15}'.format(Lim(line),por(n),100-
por(n),U3(n),A6(n),A10(n),Ran(n),VP(n)))

```

```

print('{:^30}{:^18}{:^18}{:^15}{:^15}{:^15}{:^15}{:^15}'.format('Secuencia', '% de G-
C', '% de A-U', 'U en 3', 'A en 6', 'A en 10', 'G-C en (30-52)%', 'Valor'))

```

```

file = open('lectura.txt', 'r')

```

```

for line in file:

```

```

    print (F(Lim(line)))

```