



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINAMICA CELULAR

**Evaluación de la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- κ B en
linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos humanos.**

TESIS

Que presenta:

L.C. LINDA AIMARA KEMPIS CALANIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Directora de la Tesis:

Dra. María Angélica Santana Calderón

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM)

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINAMICA CELULAR

Evaluación de la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- κ B en linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos humanos.

TESIS

Que presenta:

L.C. LINDA AIMARA KEMPIS CALANIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Directora de la Tesis:

Dra. María Angélica Santana Calderón

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM)

Sinodales:

Dra. Delia Vanessa López Guerrero

(Facultad de Nutrición, UAEM)

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

(Facultad de Medicina)

Dr. Raúl Peralta Rodríguez

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM)

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2018

INDICE

1. Introducción	8
1.1 Señalización a través del TCR.	9
1.2 Vía mediada por calcio.	10
1.3 Vía mediada por la proteína cinasa C.....	10
1.4 Vía mediada por MAPK	12
1.5 Vía de PI3K.....	14
1.6 Factores de transcripción en linfocitos T	15
1.7 TLR5 como molécula accesoria en linfocitos T.....	17
1.8 Inmunidad neonatal.....	21
2. Antecedentes	23
3. Hipótesis:.....	24
4. Objetivos:	24
5. Metodología:.....	25
5.1 Purificación de linfocitos	25
5.2 Purificación de CD4 vírgenes.....	26
5.3 Tinción de marcadores en membrana plasmática.....	27
5.4 Tinción de proteínas intracelulares.....	27
5.5 Citometría de flujo	28
5.6 Estimulación de las células.....	28
5.7 Citometría de imágenes	29
6. Resultados	29
6.1 Purificación de linfocitos T CD4+.....	29
6.2 Obtención de linfocitos CD4 vírgenes.	30
6.3 Medición de p65 fosforilado (p-p65) y total por citometría de flujo.....	31
6.4 Medición de PKC θ fosforilada (PKC thr538) por citometría de flujo.....	34
6.5 Medición de PKC θ total por citometría de flujo.....	36
6.6 Estimulación de p-PKC θ y PKC θ por flagelina y TCR en linfocitos CD4+ de adultos	37
6.7 Estimulación de p-cJun por flagelina y TCR en células de neonato y adulto	40
6.8 Estimulación de p-P65 y P65 total por flagelina y TCR en linfocitos CD4+ de adultos.....	43

6.9 Análisis de p65 por citometría de imágenes	46
6.10 Análisis de p65 mediante la segmentación nuclear y citoplasmática.....	50
7. Discusión	55
8. Bibliografía	58

RESUMEN

Los neonatos tienen una vulnerabilidad a infecciones causadas por virus y bacterias intracelulares. Diversos factores contribuyen a este hecho, se ha reportado que los linfocitos T CD4 neonatales tienen una expresión baja de citocinas efectoras y necesitan un umbral de activación mucho más alto que las células de adulto para ser activadas. Los linfocitos T CD4 son importantes en la respuesta inmunológica ya que coordinan la activación de otras células para llevar a cabo la eliminación de los antígenos. Para que se lleve a cabo la activación del linfocito es necesaria la activación de tres factores transcripcionales AP-1, NFAT, NF- κ B. Se ha propuesto para las vacunas, adyuvantes que puedan ayudar a mejorar la respuesta inmune de los neonatos. Entre los adyuvantes en prueba para vacunas, se encuentran los ligandos de los receptores tipo toll (TLRs). En este proyecto se evaluó el efecto de la flagelina (ligando de TLR5) combinado con la señal del TCR(CD3) sobre la activación de los factores transcripcionales AP1 y NF- κ B en adultos y neonatos, se encontró que había un aumento de activación de NF- κ B y AP1 en adultos y neonatos utilizando un estímulo CD3/Flagelina en comparación del sin estimular. También se evaluó en muestras de adultos el efecto de flagelina en la vía de señalización de PKC θ y se encontró que los estímulos combinados (CD3/Flagelina, CD3/CD28) inducen un aumento significativo en la fosforilación y activación de PKC θ . Estos resultados son alentadores para poder seguir con los estudios del uso de flagelina como un posible adyuvante en los neonatos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angélica Santana, por toda su confianza, por todo el esfuerzo que ha puesto en guiarme en mi formación académica y su apoyo incondicional en ayudarme a crecer en todos los aspectos. Por ser una maravillosa persona.

A mis sinodales a la Dra. Vanessa por todas sus valiosas aportaciones y a el Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz por sus consejos.

A la Biól. Erika Isabel Melchy Pere por toda su paciencia y apoyo técnico.

Al Biól. Oscar Ramírez Pliego por su ayuda en el laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio, por siempre apoyarme y darme ánimos.

A mi Toni por todo su amor.

A mis amigas y amigos que siempre están ahí cuando más los necesito por todo lo que me han brindado por su comprensión y cariño. A Pao, Rebe y Sara por seguir creciendo conmigo.

A mi familia que me apoya y me quieren, a mi hermanita por ser mi corazón con patas. A mis abuelos, tíos y tías que siempre están cuidándome y que la distancia nunca ha sido impedimento para que los lleve siempre en mi corazón. Y en especial a mi mamá quien dio todo para que yo llegara a este momento, en el que sé que lo tengo todo.

Y por último a todos mis perros que, aunque algunos ya no están conmigo, me hacen feliz con tan solo recordarlos.

FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización del TCR.

Figura 2. Vía de señalización de TLR5.

Figura 3. Purificación de linfocitos CD4 de adultos y neonatos.

Figura 4. Expresión de CD45RO.

Figura 5. Evaluación de p65 fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de adultos y neonatos.

Figura 6. Evaluación de p65 total en linfocitos CD4 vírgenes de adultos y neonatos.

Figura 7. Estimulación de PKC θ fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de adulto y neonato.

Figura 8. PKC θ total en linfocitos CD4 vírgenes de adulto y neonato.

Figura 9. Estimulación de PKC θ fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de 3 adultos.

Figura 10. Estimulación de PKC θ fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de 3 adultos.

Figura 11. Estímulos con flagelina en linfocitos CD4 vírgenes de adultos.

Figura 12. Estímulos con flagelina en linfocitos CD4 de neonatos.

Figura 13. Estimulación de P65 fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de 3 adultos.

Figura 14. Estimulación de P65 total en linfocitos CD4 vírgenes de 3 adultos.

Figura 15. Procedimiento para el análisis de translocación nuclear con el software IDEAS.

Figura 16. Análisis de translocación nuclear de p65 utilizando el software IDEAS.

Figura 17. Programa de segmentación nuclear y citoplasmática.

Figura 18. Análisis nuclear y citoplasmático utilizando ImageJ.

Figura 19. Máscara binaria citoplasmática.

Figura 20. Función de translocación.

Figura 21. Histogramas de translocación nuclear de p65 en adulto y neonato.

1. Introducción

Los linfocitos son las células encargadas de la inmunidad adaptativa. Existen distintos tipos de linfocitos: los linfocitos B, que secretan anticuerpos, y los linfocitos T, cuya función se ejerce a través de citocinas y de contacto celular. Los linfocitos T clásicos reconocen antígenos peptídicos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentados por las células presentadoras de antígenos (APC). Los linfocitos T se subdividen en dos conjuntos: los linfocitos T cooperadores (Th) que coordinan la respuesta inmune y los linfocitos T citotóxicos (CTL) que expresan gránulos citotóxicos y pueden matar a células infectadas. Los linfocitos T cooperadores expresan una proteína de superficie llamada CD4 y reconocen antígenos presentados por las moléculas de MHC II en la superficie de las APC. Los linfocitos T citotóxicos expresan la proteína llamada CD8 y pueden reconocer antígenos presentados por moléculas de MHC I.¹²

Este proyecto se centra sobre los linfocitos T CD4+, los cuales cooperan con otras células para la eliminación de patógenos y ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos de mejor calidad y subtipo específico.

La activación de los linfocitos T necesita de dos señales, la señal específica mediada por el receptor de antígenos (TCR) y la señal de alarma inmunológica, que puede estar dada por moléculas de superficie o moléculas solubles (citocinas). En este trabajo vamos a activar a nuestras células mediante el TCR y el receptor tipo Toll 5 (TLR5), que puede dar esa segunda señal a los linfocitos T.

1.1 Señalización a través del TCR.

El receptor de células T (TCR) es el responsable de reconocer al péptido antigénico presentado por el MHC. En la figura 1 se muestra una representación simplificada de la vía de señalización del TCR. Una señalización adecuada lleva a la activación de las células, mediante la inducción de tres principales factores transcripcionales: el factor nuclear NF- κ B, la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear de células T (NFAT). Estos tres factores colaboran para promover la expresión de moléculas que son cruciales para la función de la célula y la activación celular. No sólo es importante la activación de cada uno de ellos sino de un balance adecuado en la activación de los tres.^{3 4}La sobre activación de NFAT, por ejemplo, puede conducir a anergia y la falta de su estimulación, no permite la proliferación adecuada de los linfocitos T. Asimismo, la baja de activación de AP-1 o de NF- κ B no permite la transcripción adecuada de citocinas.

El receptor de células T (TCR) es un complejo constituido por dos cadenas variables ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$), dos dímeros de proteínas CD3 y la cadena ζ . Las primeras moléculas que son reclutadas en los linfocitos T después de la interacción MHC-TCR son Lck y Fyn, que son miembros de la familia de las cinasas SRC (SFK). Estas cinasas fosforilan una región basada en tirosinas (ITAM) de las cadenas ζ y CD3. La fosforilación de los dominios ITAMs permite el reclutamiento de ZAP70 a la cadena ζ donde es fosforilado y activado por Lck. Activado, ZAP70 fosforila residuos de tirosina sobre el adaptador LAT (Linker for activation of T cells). LAT permite ensamblar numerosas proteínas de la vía de señalización del TCR. Entre estas

proteínas están los Intercambiadores de nucleótidos de Guanina (GEFs) (sos y vav) que activan a las proteínas G pequeñas RAS y RHO y la fosfolipasa PLC γ 1, que es fosforilada y activada por SLP76 y SAP70. Una vez activo, PLC γ 1 cataliza el rompimiento del fosfolípido PIP2 en la membrana plasmática, para generar dos segundos mensajeros: Inositoltrifosfato(IP3) y Diacil glicerol (DAG).^{4,5,6} De esta manera es como se inician dos vías de señalización, una que es iniciada por el IP3 y la otra la iniciada por el DAG, y que son conocidas como vía mediada por calcio y vía mediada por la proteína cinasa C (PKC).^{7,8}

1.2 Vía mediada por calcio.

Cuando el IP3 es reconocido por un receptor de los canales en el retículo endoplásmico, facilita la liberación del calcio Ca²⁺ de este compartimento intracelular. La entrada de Ca²⁺ de fuentes extracelulares y un aumento en su concentración celular estimula a calmodulina, lo cual permite activar a la fosfatasa calcineurina y cinasa CaMKII. La calcineurina desfosforila entonces proteínas NFAT. La desfosforilación de NFAT expone su señal de localización nuclear y, por tanto, media su actividad de importación y de la transcripción nuclear. La inactivación de NFAT se produce a través de la fosforilación de varias cinasas, que inducen su re-localización citoplasmática.^{9,3}

1.3 Vía mediada por la proteína cinasa C

La familia de las PKC consiste de 12 proteínas, PKC θ pertenece a la subfamilia de las PKC novel, que se activan por señales de DAG, pero no por calcio. Es la forma más importante en la activación de los linfocitos T y es reclutada al centro de la

sinapsis (IS) inmunológica, por la interacción indirecta con el receptor co-estimulador CD28. PKC θ es una serina/treonina cinasa que es altamente regulada por fosforilación en múltiples sitios. GLK media la fosforilación de PKC θ en la T538, que junto con la autofosforilación en la S676 y en la S695, permiten la activación de la enzima. La actividad de PKC θ también puede ser regulada por el incremento intracelular de DAG. DAG se une al dominio C1 de PKC θ confiriendo una interacción de alta afinidad entre PKC θ y la membrana. Róo abajo de la señalización mediada por PKC θ , se encuentra la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1.¹⁰

NF- κ B esta generalmente en una forma inactiva en el citoplasma, donde su señal de localización nuclear (NLS) está cubierta por proteínas inhibitorias (I κ B). Existen dos inhibidores, I κ B- α e I κ B- β , que en condiciones de reposo están unidas a los dímeros de NF- κ B, enmascarando así su NLS, previniendo de esta forma el desplazamiento de NF- κ B al núcleo. PKC θ regula la actividad de NF- κ B a través del efecto sobre IKK-I κ B α . IKK media la fosforilación de I κ B α y marca a la proteína para su degradación, exponiendo la señal de NLS de NF- κ B, lo que permite su translocación nuclear.^{10,11}

Algunas de las moléculas que interaccionan con PKC θ e IKK son CARD (caspase activation and recruitment domain), MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) y CARMA1 (domain-containing protein-1).

PKC θ fosforila a CARMA1, lo que promueve que CARMA1 se asocie con Bcl10 (B-cell lymphoma/leukemia 10) y MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue 1). Esto permite el reclutamiento de un complejo trimolecular CARMA1-Bcl10-MALT1 que

promueve la activación de I κ K. También se ha encontrado que PKC θ se asocia directamente con miembros del complejo de IKK.^{11,12}

Otro factor transcripcional regulado por PKC θ es AP-1. AP-1 es un dímero que comunmente está formado por proteínas Jun y Fos. La síntesis *De novo*, fosforilación y desfosforilación de las proteínas Jun y Fos regulan la actividad de AP-1. PKC θ puede regular la activación de AP-1 mediante la activación de vías mediadas por MAPKs que describo a continuación.¹³

1.4 Vía mediada por MAPK

Como mencioné anteriormente, la activación del TCR lleva a la fosforilación de la proteína andamio LAT. Sobre LAT también se ensamblan proteínas que llevan a la activación de Ras, mediante la activación del intercambiador de nucleótidos (SOS) que permite que se active por unión a GTP. Ras-GTP es un activador alostérico de las MAPKs. La familia de las MAPKs está constituida por numerosos miembros, que se activan en cascada. Entre las moléculas que son reclutadas en respuesta a la activación de Ras, se encuentra Raf-1. Al unirse Raf-1 (MAPKKK) con Ras-GTP esta cinasa se activa y fosforila al segundo miembro de la cascada, MEK (MAPKK). Finalmente se activan las MAPKs, entre las cuales están ERK1/2. ERK fosforila a una proteína llamada Elk, la cual estimula la transcripción de Fos, uno de los componentes del factor de transcripción AP-1.^{10,1} De manera paralela a la activación de Ras, las señales del TCR reclutan al intercambiador de nucleótidos Vav. Al intercambiar el GDP de Rac por GTP, Vav activa a Rac, induciendo un cambio conformacional de Rac y la activación de una cascada de MAPKs paralela a la de Ras. En este caso, el blanco principal es la MAP cinasa JNK (Jun Kinase). Cuando

JNK se encuentra en su forma activa, es capaz de fosforilar a Jun, el otro componente del factor de transcripción AP-1.^{2,14}

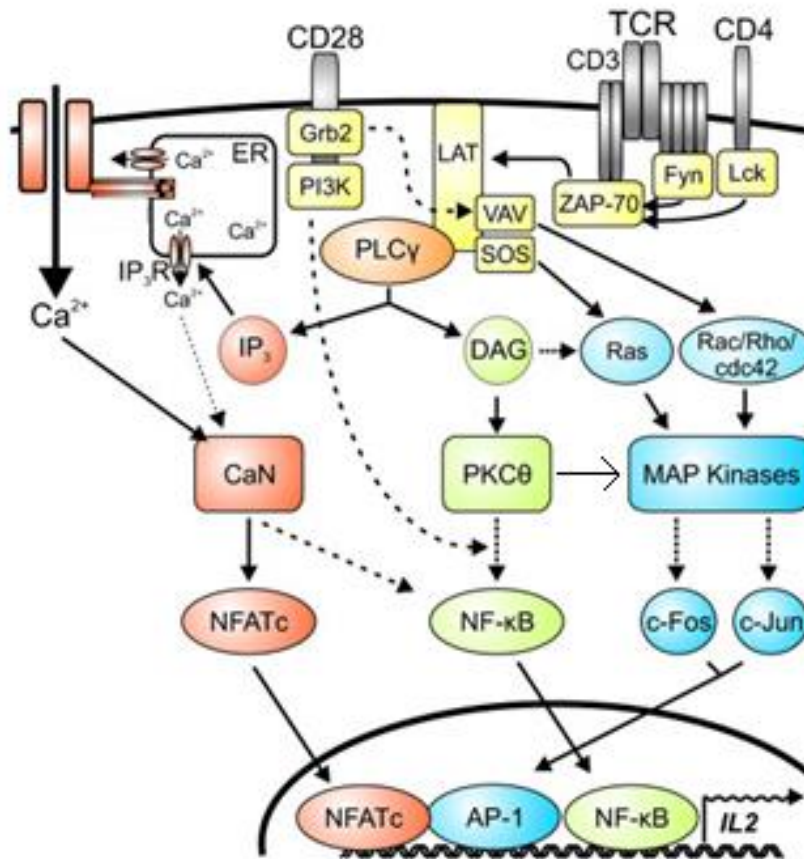


Figura 1. Vía de señalización del TCR

Recientemente se ha demostrado un nuevo papel de PKC-θ dentro del núcleo. Se encontró que PKCθ tiene un dominio NLS y análisis *in silico* han revelado que AKT1, HABP4, CHD3 y TCLA1 podrían mediar su transporte al núcleo. Se encontró que PKC-θ se une a la cromatina formando un complejo nuclear que se activa mediante la interacción con otras proteínas nucleares, incluyendo la ARN polimerasa II, la

histona cinasa MSK-1, la desmetilasa LSD-1, y la molécula adaptadora 14-3-3ζ. Este complejo activo se une en regiones reguladoras de un grupo de genes que incluye a IL-2. PKC-θ ha sido asociada con la expresión de genes involucrados en la generación de linfocitos T CD4+ de memoria, lo cual se encuentra asociado a que PKCθ pueda translocar al núcleo donde interacciona con p65 y lo retiene en el núcleo. Esto es importante mencionarlo, ya que en células T neonatales hay una disminución en la generación de linfocitos T de memoria. ^{15,16}

1.5 Vía de PI3K

Esta cinasa se induce en la vía del TCR, porque es reclutada a la cola intracelular del receptor CD28, donde es activada. Además, participa en otras vías de señalización, como la del receptor TLR5, el cual se mencionará más adelante. Esta proteína tiene la función de activar el ciclo celular y promover cambios en el metabolismo que son indispensables para la activación de los linfocitos T. ^{3,17}

PI3K convierte el PIP2 en PIP3. La interacción de PIP3 con enzimas que tienen dominios PH (pleckstrin homology) permite una rápida transducción de señales. PIP3 activa itk el cual lleva a la fosforilación y activación de PLCγ, misma que lleva a la activación de los dos factores transcripcionales NF-κB y NFAT. ¹⁷

Otra cinasa dependiente de PIP3 es PDK1, que es necesaria para la fosforilación y activación de una cinasa importante llamada Akt. Una vez activada, Akt fosforila dianas cruciales y contribuye a la supervivencia de la célula de varias formas. La fosforilación realizada por Akt lleva a la inactivación de BAD, una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2, y la inhibición del factor de transcripción FoxO1, que

es un miembro de la familia de factores de transcripción Fox (Forkhead box) el cual juega un papel central en la regulación de la diferenciación y la activación de los linfocitos CD4+.^{18,19}

Otro blanco indirecto es mTOR, que al estar activado fosforila e inhibe a 4EBP (Factor eucariótico de iniciación 4E), activa la p70 ribosomal S6K1 resultando en el incremento de traducción de proteínas y la alta regulación de la glucólisis, a través de GLUT1 promoviendo el crecimiento y la división celular.²⁰

1.6 Factores de transcripción en linfocitos T

El factor nuclear de la cadena K de células B (NF- κ B), el factor activador de proteína 1 (AP1) y el factor nuclear de células T (NF-AT) tienen como función la de activar la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune.¹

NF- κ B

Factor nuclear de la cadena K de células B (NF- κ B/rel).

NF- κ B (factor nuclear de la cadena Kappa en células B) fue caracterizado por primera vez como un factor específico de células B, ya que se une a una secuencia localizada en el promotor de la cadena ligera de las inmunoglobulinas. Ahora se sabe que NF- κ B es una familia de factores que se encuentran en todos los tipos celulares y está implicada en la activación de multitud de genes en respuesta a inflamación, infección y otras situaciones de stress, que requieren una rápida reprogramación de la expresión génica.²¹

Los factores de transcripción NF- κ B son reguladores críticos de la inmunidad, las respuestas al estrés, la apoptosis y la diferenciación. En los mamíferos, hay cinco miembros de la familia del factor de transcripción NF- κ B: RelA (p65), RelB y c-rel, y las proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) y NF- κ B2 (p100), que se procesan en p50 y p52, respectivamente. Los miembros de esta familia se asocian entre sí para formar dímeros, pudiendo formar 15 tipos de dímeros diferentes. Todas las proteínas NF- κ B comparten un dominio de homología Rel responsable de la unión al ADN y de su dimerización.²²

Estas proteínas pueden estar formando distintos complejos siendo el más común durante una respuesta rápida en linfocitos T p50/p65. Este factor puede participar en la transcripción de la IL-2 y de su receptor y de un amplio número de genes de citocinas, entre otros.^{23,21}

AP-1

La proteína activadora 1 (AP-1) es un factor transcripcional que se encuentra en muchos tipos celulares. Es un complejo dimérico que comprende miembros de las familias de proteínas JUN, FOS, FRA, ATF y MAF. El complejo puede por ello formarse a partir de diferentes combinaciones de heterodímeros y homodímeros, y dicha combinación determina el conjunto de genes regulados por AP-1.²⁴

Las proteínas AP-1 se conocen como proteínas básicas de cremalleras de leucina porque dimerizan a través de un motivo de cremalleras de leucina y contienen un dominio básico para la interacción con el esqueleto del ADN. La estructura canónica del dímero consiste en dos hélices α paralelas que forman un espiral dentro de otro

espiral (o coiled-coil). Entre las proteínas AP-1 más abundantes en mamíferos están c-Jun y c-Fos.²⁵

Son capaces de regular la transcripción de un alto número de genes, incluyendo el de IL-2 y otras citocinas.

NFAT

Factor nuclear de células T activadas

Factores transcripcionales inducibles en linfocitos T.

La familia NFAT se compone de cinco miembros: NFAT1 (también conocido como NFATp o NFATc2), NFAT2 (también conocido como NFATc o NFATc1), NFAT3 (también conocido como NFATc4), NFAT4 (también conocido como NFATx o NFATc3) y NFAT5. Cuatro de estas proteínas están reguladas por la señalización del calcio a excepción de NFAT5 que no es regulado por proteínas dependientes de calcio. Las proteínas NFAT que se expresan regularmente por las células T son NFAT1 y NFAT2. El primero es el principal factor de respuesta aguda al aumento de calcio intracelular. En gran parte el NF-AT necesita de la cooperación de AP-1 para activar los genes donde actúa, debido a motivos de doble unión en muchos promotores.^{9, 26,27}

1.7 TLR5 como molécula accesoria en linfocitos T

Los receptores de la inmunidad innata son parte de la primera línea de defensa y protección contra los patógenos. La superficie de células de la inmunidad innata contiene múltiples receptores incluyendo a receptores de reconocimiento de

patrones moleculares (PRR, del inglés Pattern Recognition Receptors), que reconocen firmas moleculares de patógenos (PAMPs, Pathogen associated macromolecular patterns). Estos receptores se unen específicamente al patógeno, generando una respuesta inflamatoria. Los PRRs pueden reconocer la presencia de moléculas conservadas de microorganismos, incluyendo proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas y ácidos nucleicos. También son capaces de reconocer moléculas de daño de tejidos, conocidas como DAMPs (Damage Associated Macromolecular Patterns).^{28,29}

El reconocimiento de PAMPs puede activar a las células dendríticas, las cuales inician una respuesta inmune adaptativa.

Los humanos expresan 10 TLRs (TLR1 a TLR10), mientras que en ratones se han identificado doce TLRs (TLR1 a TLR9 y TLR11 a TLR13). Se han determinado los ligandos para todos los TLR excepto el TLR10 de humanos. En el ratón TLR12, TLR13, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 se encuentran en la membrana, donde reconocen componentes moleculares situados en la superficie de los patógenos. TLR2 es un heterodimero que se une a TLR1, TLR6, y TLR10 para reconocer componentes de la pared celular de las bacterias y hongos, TLR5 reconoce a la flagelina de bacterias móviles. Por el contrario, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran en vesículas intracelulares, donde reconocen ácidos nucleicos.³⁰

La activación de los TLRs por sus ligandos conduce a la inflamación, aumento de la función de las células inmunes y mejora el reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección, favoreciendo entonces la eliminación del patógeno.^{1,2}

Los receptores tipo Toll tienen una región exterior que contiene muchas repeticiones ricas en leucinas (LRR) un dominio transmembranal y un dominio interior llamado dominio TIR. La unión del TLR a su ligando es específico desencadena una cascada de reacciones a partir del dominio TIR, por medio de dos vías de señalización. La vía dependiente de MYD88 y la vía independiente de MYD88, las cuales permiten la activación de factores nucleares que participan en la respuesta inmune. En la vía dependiente de MYD88, después de la estimulación, el dominio intracelular de los TLR interactúa con MAL y se recluta la molécula adaptadora MyD88. En el caso de TLR5 no se requiere MAL ya que MyD88 se une directamente al dominio intracelular de TLR5. A este complejo se unen IRAK4 e IRAK1. IRAK1 es fosforilado por sí mismo y por IRAK4 para activar a TRAF6. Una vez activado, TRAF6 interactúa con el complejo TAB2/3 para activar a TAK1, que participa en la activación de IKK, que a su vez fosforila a I κ B, marcándolo para ubiquitinación y degradación. Esto permite la activación de NF- κ B. TAK1 además activa la cascada de MAPKs, que llevan a la activación de AP-1. Por otra parte, MYD88 activa a BCAP (B cell adapter for PI3K) la cual participa en la activación de PI3K, PI3K es reclutado a la membrana plasmática donde tiene acceso PIP2 resultando en la producción de PIP3, esto causa el reclutamiento de PDK-1 lo cual permite la subsecuente activación de Akt y la activación de NF- κ B.

La mayoría de los estudios que examinan funciones mediadas por TLRs están centrados en las APC, donde se ha reportado que los ligandos de TLRs al identificar al patógeno, generan una respuesta inflamatoria estimulando la producción de

citocinas, aumento de la superficie de receptores coestimuladores y maduración celular.^{31,30}

Sin embargo, también las células T expresan a TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9. Los ligandos para TLR3, TLR4 y TLR9 no tienen aparente influencia sobre la proliferación y activación de células T de adultos tanto en la ausencia y presencia de la estimulación de TCR. La activación simultánea de TLR2 o TLR5 junto con las señales del TCR conducen a la coestimulación de la activación y proliferación mediada por el TCR, la expresión de receptores de superficie y la liberación de citocinas.³²

En este proyecto nos enfocaremos en el TLR5 como molécula accesoria en los linfocitos T.³³

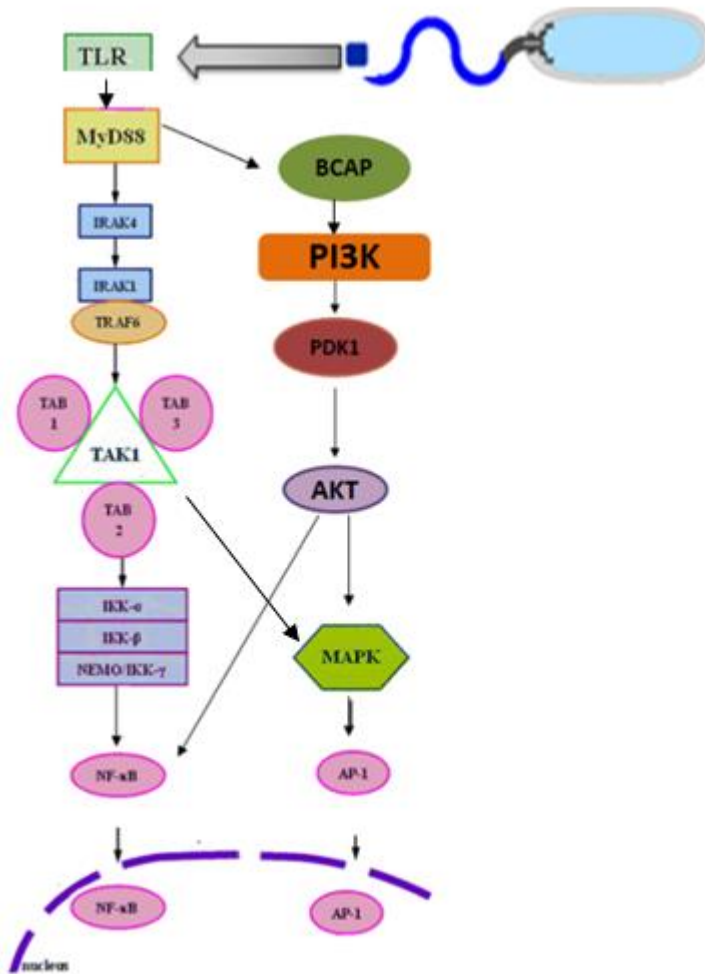


Figura 2. Vía de señalización de TLR5

1.8 Inmunidad neonatal

Pese a los avances en medicina y tecnología, aproximadamente 4 millones de niños menores de 6 meses mueren cada año en el mundo por infección. Las muertes por infección constituyen a un alto porcentaje en las muertes neonatales mundiales.³⁴

Aunque el sistema inmune de un recién nacido a término (después de 37 semanas) permite algo de protección contra enfermedades infecciosas, existe una respuesta deficiente para una gama de patógenos y vacunas, resultando en una alta susceptibilidad a enfermedades graves.³⁴

Los neonatos tienen una exposición limitada a antígenos en el útero para inducir la inmunidad adaptativa. Por esto, se cree que son muy dependientes de su sistema inmune innato para la protección contra infecciones y de los anticuerpos maternos. La sensibilidad de los recién nacidos a las enfermedades infecciosas puede ser debida en parte a un bajo nivel de respuesta de los linfocitos T de los recién nacidos. Las infecciones con patógenos intracelulares suelen ser más graves o más prolongadas en los neonatos. Esto sugiere que las respuestas inmunes mediadas por células T son diferentes en etapas tempranas de la vida.¹⁶

Los linfocitos T CD4+ coordinan la respuesta a patógenos intracelulares. Existen tres grandes tipos de células T efectoras aceptados globalmente. Las células Th1, encargadas de coordinar la eliminación de patógenos intracelulares, las células Th2, que se encargan de la eliminación de helmintos y las células Th17, que coordinan la eliminación bacterias y hongos extracelulares. Se ha reportado que en células T CD4 de cordón umbilical (CB), en comparación con células sangre periférica de adulto (APB) presentan una baja producción de citocinas, en particular las citocinas firma del fenotipo Th1, IFN- γ . Asimismo, las APC producen menos IL-12, que también se requiere para la diferenciación Th1, es menor en los neonatos. En cambio, la producción de la citocina IL-13 del perfil Th2 y las citocinas

inmunosupresoras están aumentadas en las células neonatales, que son más sensibles a ser anérgicas o a entrar en apoptosis.

La importancia de las vías de señalización por calcio o por PKC θ en las células neonatales es controversial. Por una parte, un estudio de transcriptoma de células T CD4+ de CB resaltó que durante la activación de estas células, los genes transcripcionalmente dependientes del factor NFAT presentan una disminución en la expresión en neonatos respecto a células de adulto, sugiriendo una baja activación de NFAT³⁵. Sin embargo, otro estudio mostró que durante la activación de células T CD4+ de neonato y adulto, la señalización por calcio de los linfocitos neonatales es más alta que en células de adulto, mientras que encontraron una deficiente activación de AP-1 en los neonatos.³⁶

Se ha propuesto para las vacunas adyuvantes que puedan ayudar a mejorar la respuesta inmune de los neonatos. Entre los adyuvantes en prueba para vacunas, se encuentran los ligandos de los receptores tipo toll (TLRs).³⁰

Estudios *in vitro* en células T humanas, de nuestro laboratorio y otros apoyan fuertemente la hipótesis de que la flagelina puede estimular directamente a los linfocitos T CD4+ y CD8+. (Tesis de Maestría. L. en C. Labastida.C.R.2013, Tesis de Maestría. L. en C. Rodríguez.J.O.2013)

2. Antecedentes

En estudios previos de nuestro laboratorio, encontramos que el TLR5 es uno de los TLR que más se transcribe en linfocitos T tanto de adultos y neonatos (Tesis de

licenciatura. Otoniel R.J.2010). Al realizarse la activación del TLR5 con flagelina, se encontró que se inducía la activación de NF- κ B tanto en linfocitos T tanto de adultos y neonatos (Tesis de Maestría. Otoniel R.J.2013). También se demostró que la flagelina induce a la producción de IFN γ en los linfocitos T CD4+ neonatales (Tesis de Maestría. Rosario L. C.2013).

La diferencia en la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- κ B en adultos y neonatos pudiera ser responsable de la baja producción de citocinas en las células neonatales y las señales de TLR5 pudieran permitir una activación más equilibrada de estos factores

3. Hipótesis:

Se espera encontrar niveles disminuidos en la activación por el TCR de AP-1 y NF- κ B en las células T CD4+ de neonatos y que las señales de TLR5 sean capaces de reestablecer el balance en la activación de los mismos.

4. Objetivos:

General:

Evaluar la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- κ B en linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos no estimulados o estimulados a través del TCR y/o TLR5 (flagelina).

Particulares:

1. Evaluar por citometría de flujo la activación de AP-1 mediante la fosforilación de c-Jun en linfocitos T CD4+ vírgenes de sangre de cordón umbilical y sangre periférica de adulto después de la estimulación del TLR5 y/o el TCR
2. Evaluar por citometría de flujo la activación de NF- κ B en linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos, después de la activación de las células a través del TCR y/o TLR5.
3. Evaluar por citometría de imágenes la translocación nuclear de NF- κ B en linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos, después de la activación de las células a través del TCR y/o TLR5.

5. Metodología:

5.1 Purificación de linfocitos

Las muestras de sangre neonatal se obtuvieron del cordón umbilical, después del nacimiento del neonato y antes de la expulsión de la placenta, para evitar la contaminación con sangre de la madre. La sangre se colectó en tubos estériles con EDTA para evitar la coagulación y se procesó el mismo día. Las células T se obtuvieron mediante gradiente de ficoll hypaque (Sigma Aldrich) que es un polisacárido hidrofílico altamente ramificado que genera un gradiente de densidad que separa a las células mononucleadas de los eritrocitos, plaquetas y granulocitos. Se realizó una dilución 1:1 en relación sangre: PBS 1X en tubo de 50 ml estéril, en otro tubo estéril se agregó el ficoll hypaque, se utilizaron 10 ml de ficoll hypaque para un volumen mayor de 20 ml de sangre diluida. En seguida cuidadosamente,

sin romper las fases entre la sangre y el ficoll hypaque, se vertió la sangre diluida en el tubo que contenía el ficoll hypaque. Se centrifugó durante 30 minutos a 1500 rpm (433 g aprox.) y 16 °C con desaceleración cero. Posteriormente a la centrifugación se tomó la interfase, se guardaron los eritrocitos (a 2ml de eritrocitos se le agregaron 3 ml de medio) en la incubadora, ya que se utilizan para la purificación de los linfocitos T CD4+ mediante una selección negativa con el kit RosetteSep. Se lavaron las células obtenidas en la interface con PBS 1X, y se centrifugó a 1600 rpm por 10 minutos a 16 °C con desaceleración nueve, se decantó el sobrenadante. Un procedimiento de adherencia a plástico nos permitió eliminar los monocitos. Los linfocitos CD4+ fueron posteriormente purificados con el kit RosetteStep (STEMCELL lot. 12D43628).

5.2 Purificación de CD4 vírgenes

Los linfocitos CD4 se separaron de todas las demás células mononucleadas mediante el uso del RosetteSep por selección negativa. El cual es un coctel de complejos de anticuerpos que reconocen a CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, 29 CD66b, TCR γ/δ conjugados por la región Fc a anticuerpos contra la glicoforina A, una proteína de membrana de los eritrocitos. Mediante un segundo gradiente de densidad con el ficoll hypaque se eliminaron a las células que fueron reconocidas por estos complejos y se obtuvieron poblaciones de células T CD4+ con más de 94 % de pureza. Para la eliminación de células de memoria se utilizó la depleción de CD45RO y CD44 (marcadores de células de memoria), mediante el uso de mAb que se acoplaron durante toda la noche a perlas magnéticas (20 μ l de Protein A/G Magnetic, Pierce) a razón de 3 μ g/ml de los anticuerpos. Estas perlas son

nanopartículas magnéticas que pueden ser recubiertas con anticuerpos contra un antígeno de superficie en particular, ya que están recubiertas de las proteínas A y G que unen la región Fc de los anticuerpos. Esto hace que las células que expresan este antígeno puedan unirse a las perlas magnéticas. Después, la solución de células se colocó en un campo magnético fuerte. En este paso, las células que estaban unidas a las nanopartículas permanecieron pegadas, mientras que los linfocitos T CD4+ vírgenes pudieron ser recolectados.

5.3 Tinción de marcadores en membrana plasmática

Para cada tinción se usaron 1×10^6 células. Se lavaron las células con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en seco. Se agregó el 1er anticuerpo (para realizar el análisis de pureza un anti-CD4 (OKT4 Biolegend9 y un anti-CD3 (OKT3 TOMBO). Se dejó 30 min en hielo en la oscuridad. Después se lavó con 1 ml de PBS y se fijaron las células con 40 μ l de paraformaldehído al 10% en solución de FACS Juice el cual es PBS con 2% de suero.

5.4 Tinción de proteínas intracelulares

Se fijaron las células directamente en medio con Paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron las células 3500 rpm (1000g aprox) por 5min y se retiró el sobrenadante. El pellet se vortexeó y se le agregó 1 ml de Metanol 100% frío para permeabilizar la membrana plasmática. Se centrifugaron las células 3500 rpm por 5min y se retiró el sobrenadante para realizar un lavado con PBS. Se agregó el 1er anticuerpo (se utilizó para las tinciones de

phospho-PKC θ el anticuerpo phospho Thr538, rabbit) y se incubó 30 minutos. Después se lavó con 1 ml de PBS. Cuando fue necesario se agregó un segundo anticuerpo (para p-PKC θ fue un anti-rabbit-Dyl488) que reconoce específicamente al primero y se incubó 30 minutos en hielo en la oscuridad. Finalmente se volvió a realizar un lavado con PBS y se fijaron las células con 40 μ l de paraformaldehído al 10% en solución de FACS juice.

5.5 Citometría de flujo

Se analizaron las células fijadas en un citómetro de flujo FACScanto. La citometría es una técnica que permite analizar a las características de una población celular conforme un haz de laser incide sobre cada célula. El programa para adquirir los datos fue DIVA. El análisis de los datos se llevó a cabo con la ayuda del programa FlowJoX. Los valores de fluorescencia obtenidos se analizaron con Microsoft Excel y PRISMA.

5.6 Estimulación de las células

Se realizaron los estímulos para el TCR con anticuerpos monoclonales a una concentración de 1 μ g/ml. Se utilizó un anticuerpo anti-CD3 humano, entrecruzado con un segundo anticuerpo anti-mouse IgG (goat antimouse IgG, Biolegend). La estimulación de TLR5 se realizó con flagelina (FLA-ST ultrapure, InvivoGen) a una concentración de 50 ng/ml.

5.7 Citometría de imágenes

Se tiñeron intracelularmente los linfocitos T CD4+ con un anticuerpo primario contra p65 ((A)sc-109 rabbit, santa cruz) y se utilizó un anticuerpo secundario anti-rabbit-Dyl488). Se tiño también con 500 ml de DAPI (1µg/20ml), se realizaron 3 lavados con Facs juice, después se guardaron en 50µl de PBS. Se analizaron las células fijadas en un clitómetro de imágenes AMNIS, el análisis de los datos se llevó a cabo con el software IDEAS y usando un programa generado en ImageJ.

6. Resultados

6.1 Purificación de linfocitos T CD4+

Se purificaron los linfocitos T CD4+ a partir de sangre periférica de muestras de adultos. Se lograron obtener linfocitos T CD4+ con una pureza superior al 92%. La pureza de cada muestra fue evaluada mediante la técnica de citometría, realizando tinciones de membrana para CD3(FL2) y CD4(FL4), usando anticuerpos monoclonales anti-CD3-PE y anti-CD4-APC. En la figura 1 se muestra la pureza de obtenida en un adulto y un neonat

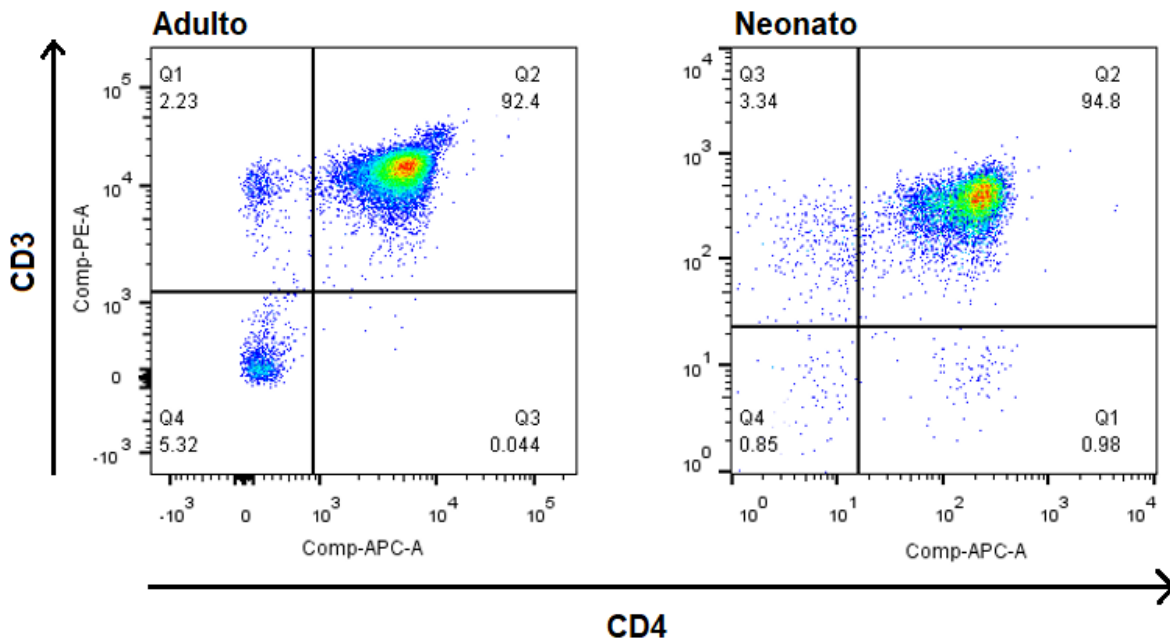


Figura 3. Purificación de linfocitos CD4 de adultos y neonatos. Se muestra la pureza representativa de los linfocitos T CD4 de un adulto a) y un neonato b). En el eje X se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula CD4, en el eje Y se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula CD3. El porcentaje de pureza se obtiene de las células que expresan ambas moléculas.

6.2 Obtención de linfocitos CD4 vírgenes.

Una vez obtenida la población de linfocitos CD4 totales se eliminaron los linfocitos de memoria mediante el uso de perlas magnéticas acopladas a CD45RO y CD44. Para medir la eficiencia con la que se eliminaron los linfocitos de memoria se tiñó con un anti-CD45RO (FITC). En la figura 4 se muestra la expresión de CD45RO en linfocitos CD4 totales y en linfocitos CD4 vírgenes en dos experimentos independientes de 2 adultos.

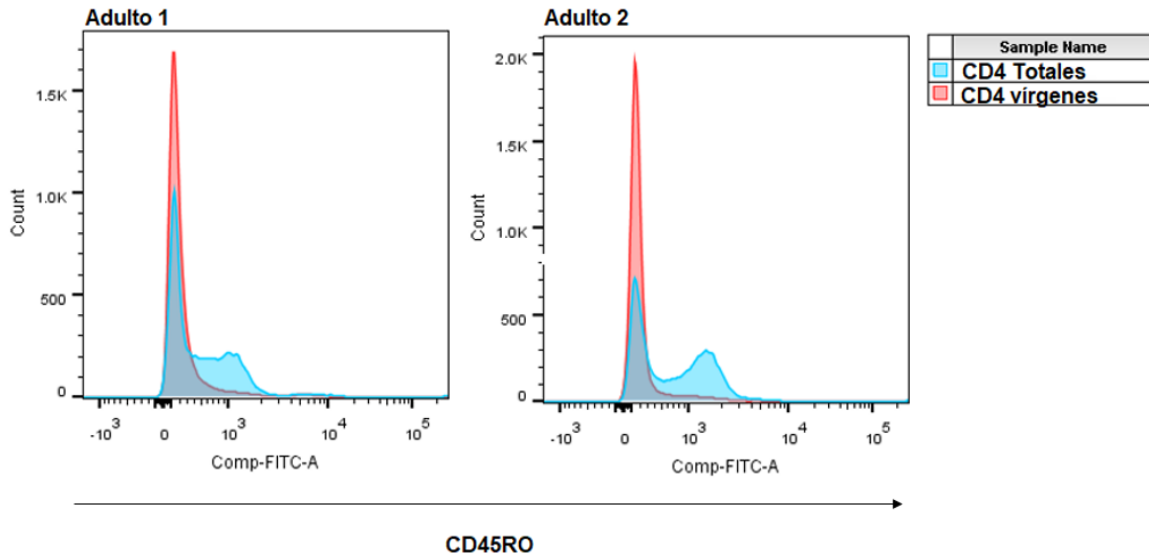


Figura 4. Expresión de CD45RO. En el histograma azul se muestra la población CD45RO de linfocitos CD4 totales y la población CD45RO positiva en linfocitos CD4 vírgenes se muestra en el histograma rojo.

6.3 Medición de p65 fosforilado (p-p65) y total por citometría de flujo.

Para el análisis de la activación de NF- κ B se obtuvieron linfocitos T CD4+ vírgenes de adultos y neonatos, los cuales fueron estimulados a una concentración de 1 μ g/ml de cada uno de los anticuerpos contra CD3 y CD28 y se entrecruzaron con un segundo anticuerpo. Se tiñeron con un anti p-p65 para ser analizados por citometría de flujo. Se evaluó la proteína p65 que es un monómero que conforma al heterodímero de NF- κ B (p50-p65). Este es el heterodímero que se activa en respuesta a estrés celular y que funciona como activador de la transcripción inmediata. La concentración relativa de p-p65 se determinó mediante la intensidad media de fluorescencia de la población positiva. Se observó que la cinética de

activación de p-p65 fue diferente en las muestras de adultos y neonatos. En la muestra de adultos, se obtuvo un incremento a partir de los 15 minutos (histograma en color azul) en comparación con el tiempo 0 que se mantuvo hasta 1h y después bajó paulatinamente. En cambio, en el neonato p-p65 aumentó solo a los 60 minutos en comparación con el tiempo 0. No fue posible medir más tiempos por la menor cantidad de células de neonato que se obtienen por muestra.

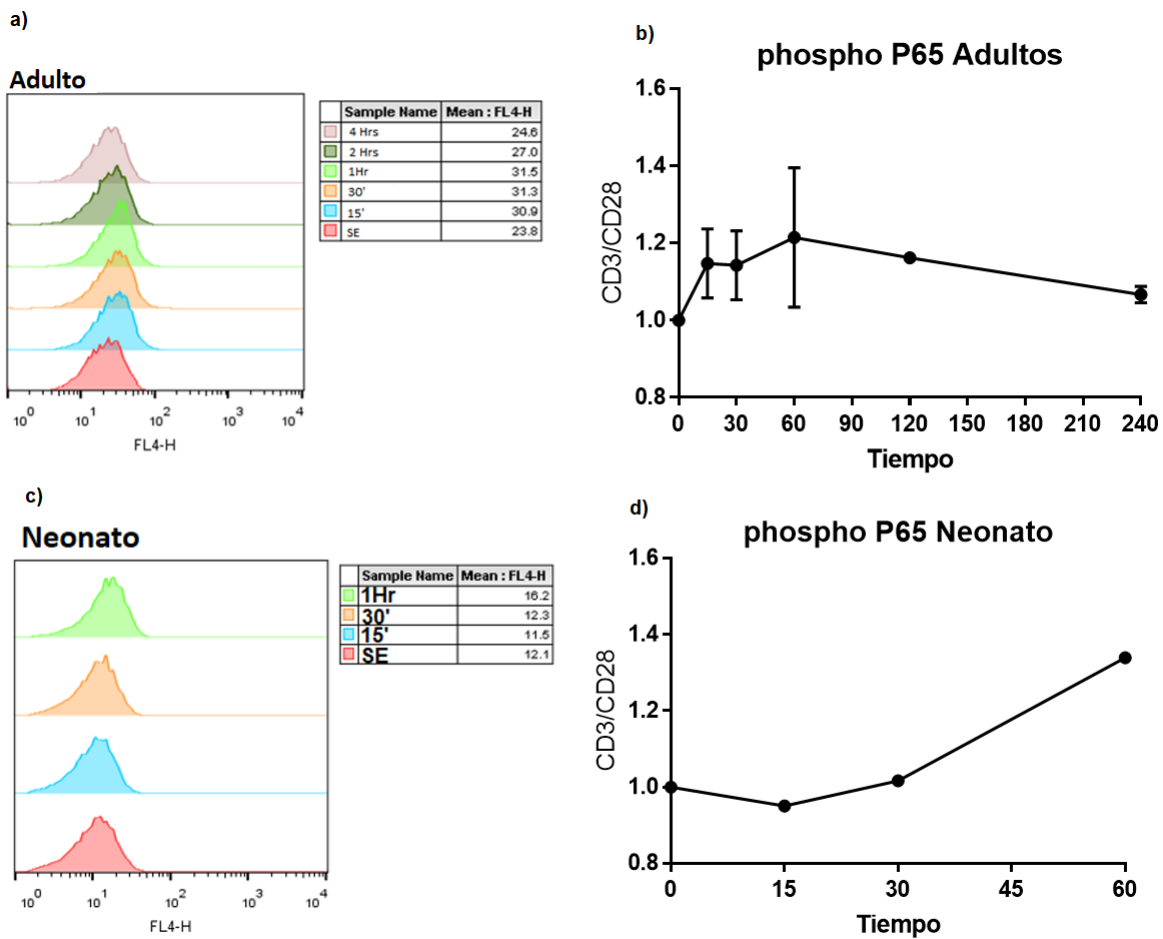
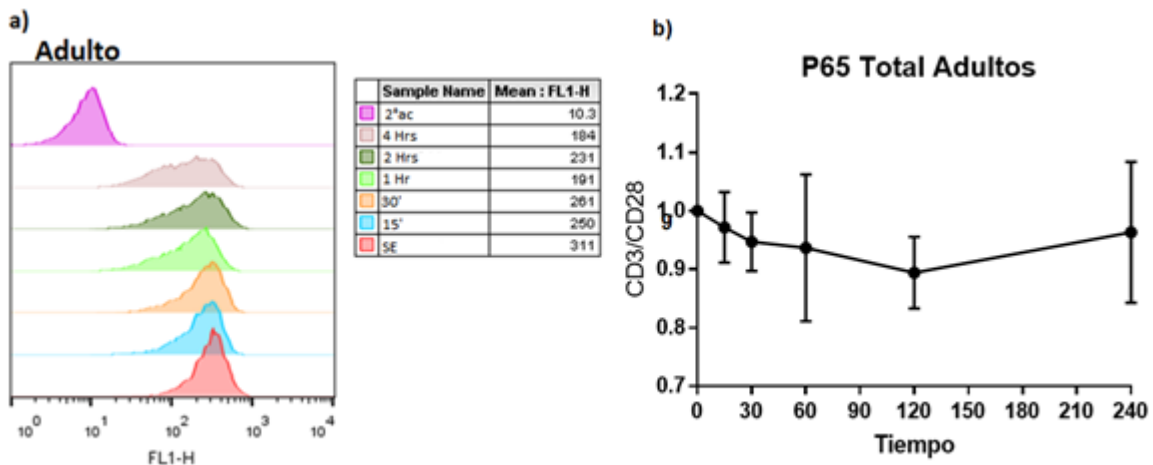


Figura 5. Evaluación de p65 fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de adultos y neonatos. a), c) Histogramas representativo de un adulto y neonato b), d) se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder

analizarla activación de p-p65 en respuesta a el estímulo CD3/CD28 en distintos tiempos. En adultos se analizaron dos muestras y en los neonatos solo una. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

Para el análisis de la activación de p65 total se obtuvieron linfocitos T CD4+ vírgenes de adultos y neonatos, los cuales fueron estimulados y teñidos en las mismas muestras que para el análisis de p65 fosforilado, pero ahora se hizo la tinción con un anti p65 total. Se observó que, con la activación p65 se mantuvo prácticamente estable (histograma en color azul), mientras que en el neonato el p65 total aumento desde los 15 minutos y disminuyo a los 60 minutos.



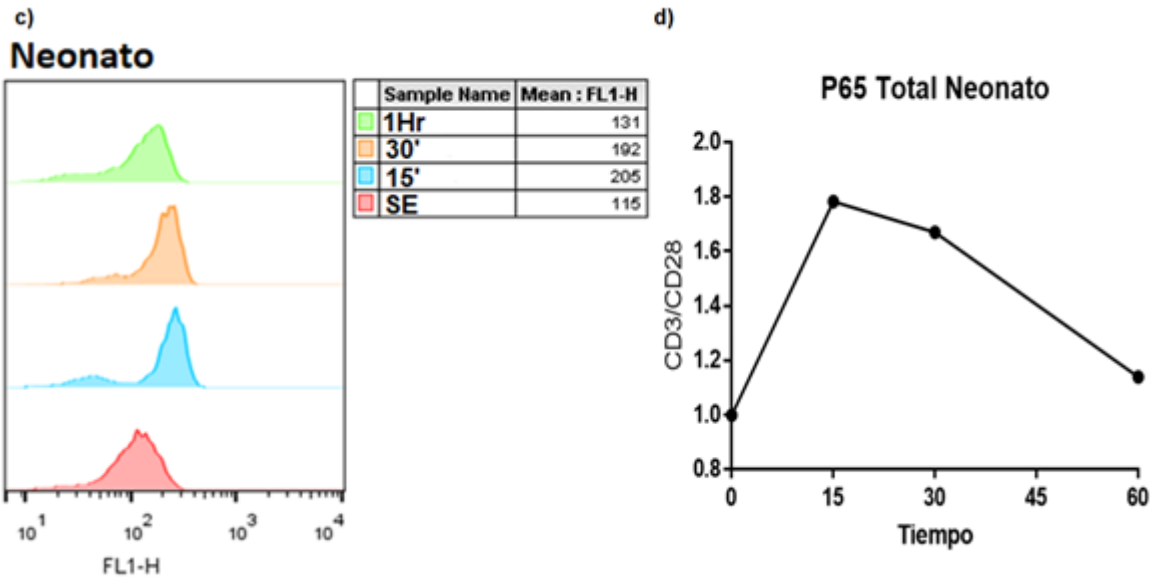


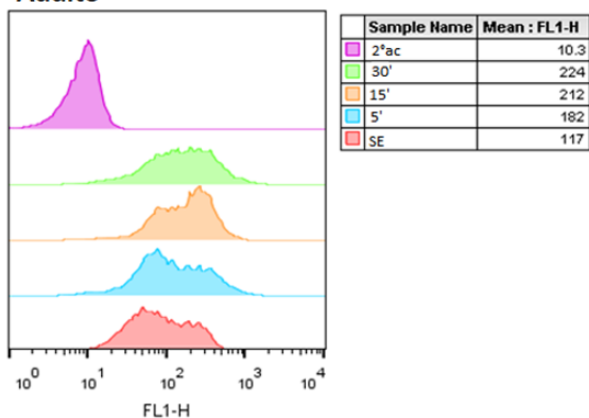
Figura 6. Evaluación de p65 total en linfocitos CD4 vírgenes de adultos y neonatos. a), b) Histogramas representativos de un adulto y neonato c), d) se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizar p65 total en respuesta a el estímulo CD3/CD28 en distintos tiempos. En adultos se analizaron dos muestras y en los neonatos solo una. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

6.4 Medición de PKC θ fosforilada (PKC thr538) por citometría de flujo.

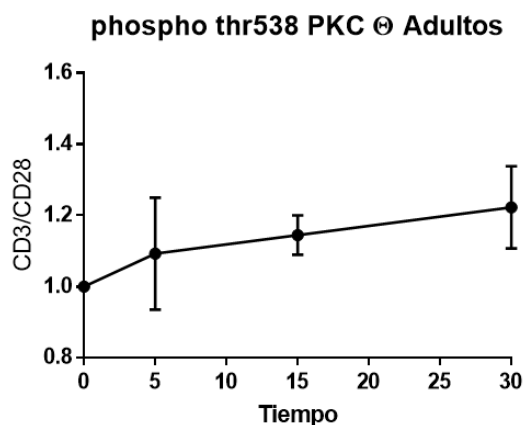
Se decidió analizar la cinasa PKC θ debido a su importancia en la activación en la cascada de señalización del TCR. Para esto se realizó una cinética de activación de PKC θ con estímulos de CD3/CD28 en diferentes tiempos. Se obtuvieron linfocitos T CD4+ vírgenes de adultos y neonatos, los cuales se estimularon a una concentración de 1 μ g/ml de CD3/CD28 y fueron teñidos con un anti phospho thr538 PKC θ , para ser analizados por citometría de flujo. Se analizó PKC θ fosforilada en la thr538 ya que esta fosforilación permite su activación. Para medir la concentración

de p-PKC θ se determinó la intensidad media de fluorescencia de la población positiva. Como muestra la figura 7, en linfocitos de adulto se observó la activación de p-PKC θ a partir de los 5 minutos (histograma en color azul). A los 30 minutos fue el tiempo en el que se observó el pico con mayor aumento en comparación con el tiempo 0, mientras que en los neonatos a los 15 minutos se observó el pico con mayor aumento en comparación del tiempo 0.

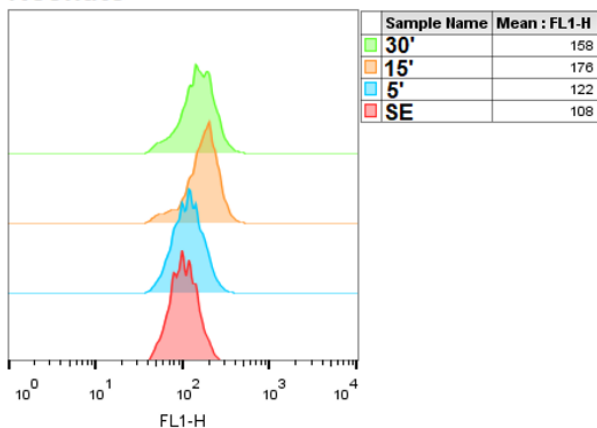
a)
Adulto



b)



c)
Neonato



d)

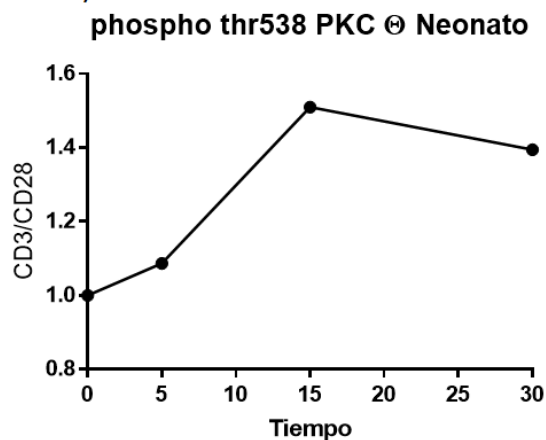
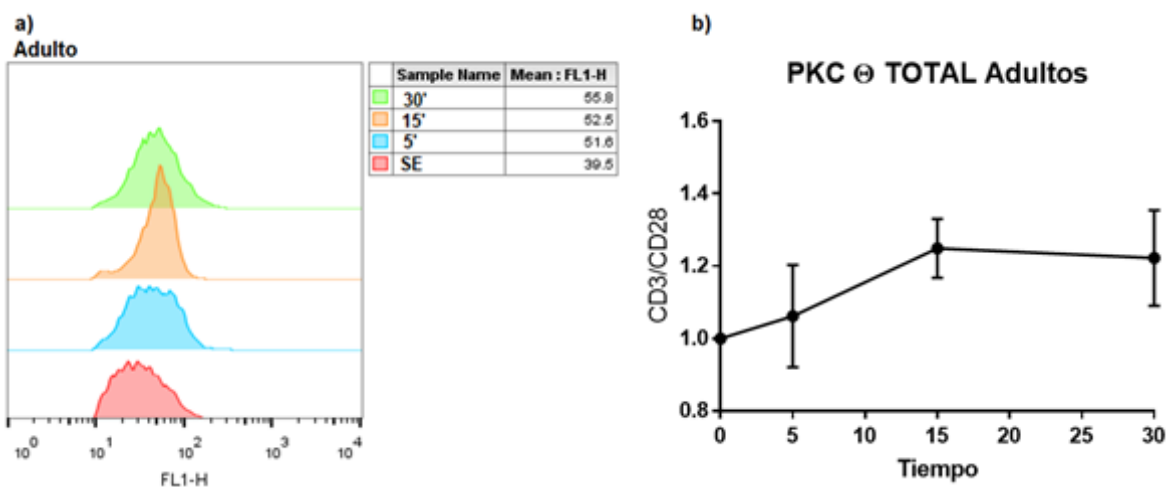


Figura 7. Estimulación de PKC θ fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de adulto y neonato. a), c) Histogramas de adulto y neonato b), d) se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizarla activación de PKC θ thr538 en respuesta a el estímulo CD3/CD28 en distintos tiempos. En adultos se analizaron dos muestras y en los neonatos solo una. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

6.5 Medición de PKC θ total por citometría de flujo.

Para el análisis de PKC θ total se realizaron estímulos con CD3/CD28 en diferentes tiempos de estimulación en linfocitos T CD4+ vírgenes de 3 adultos y mediante citometría de flujo se determinó PKC θ total con un anticuerpo específico para PKC θ . Se observó que con la activación PKC θ total aumento a partir de los 15 minutos (histograma en color azul) en las muestras de adultos y en la muestra de un neonato más bien disminuyó.



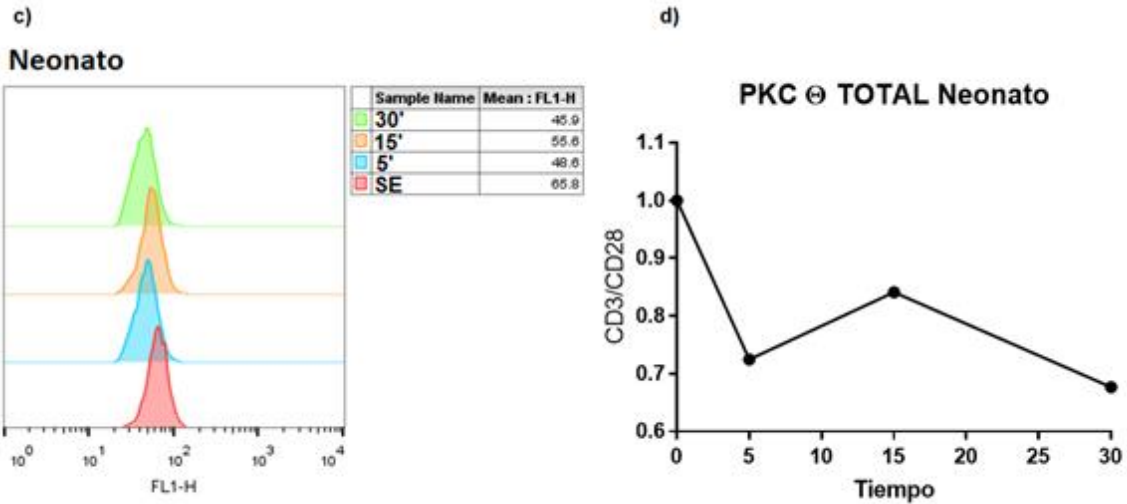


Figura 8. PKCθ total en linfocitos CD4 vírgenes de adulto y neonato. a) Histogramas de adulto y neonato **b)** se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizar el PKCθ total en respuesta a el estímulo CD3/CD28 en distintos tiempos. En adultos se analizaron 3 muestras en los neonatos solo una. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

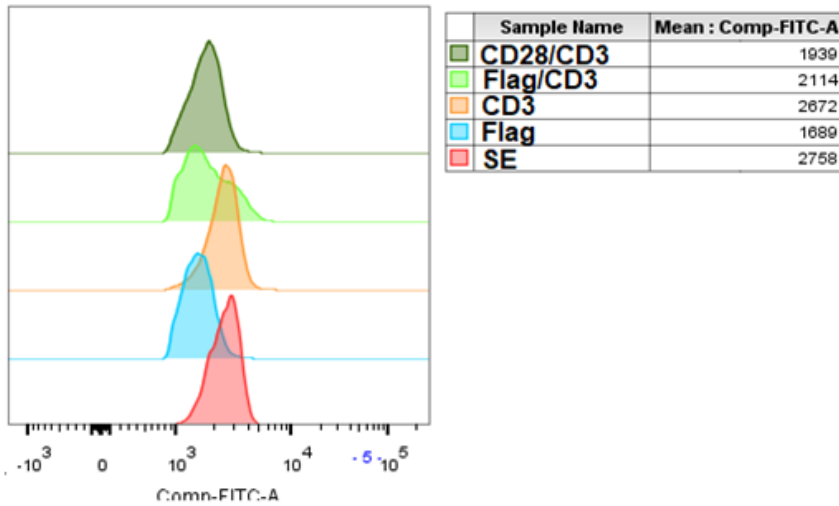
6.6 Estimulación de p-PKCθ y PKCθ por flagelina y TCR en linfocitos CD4+ de adultos

Una vez que pudimos determinar que el tiempo óptimo de estimulación mediante CD3/CD28 que inducía la activación de p-PKCθ era a los 30 minutos, se realizaron los estímulos de flagelina en comparación con la activación de CD3/CD28. Se obtuvieron linfocitos T CD4+ vírgenes de tres adultos, en los cuales se realizaron los siguientes estímulos a los 30 min con: flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3/CD28. Los linfocitos fueron teñidos con un anticuerpo anti- p-PKCθ para ser analizados por citometría de flujo (histogramas mostrados en la figura). Se puede

observar en la figura 9b que en adultos el estímulo CD3/Flagelina (barra azul) demuestran valores significativamente altos en la fosforilación de PKC θ en comparación con las células sin estimular, al igual que con el estímulo CD3/CD28 (barra morada).

a)

Adulto



b) phospho thr538 PKC θ Adultos

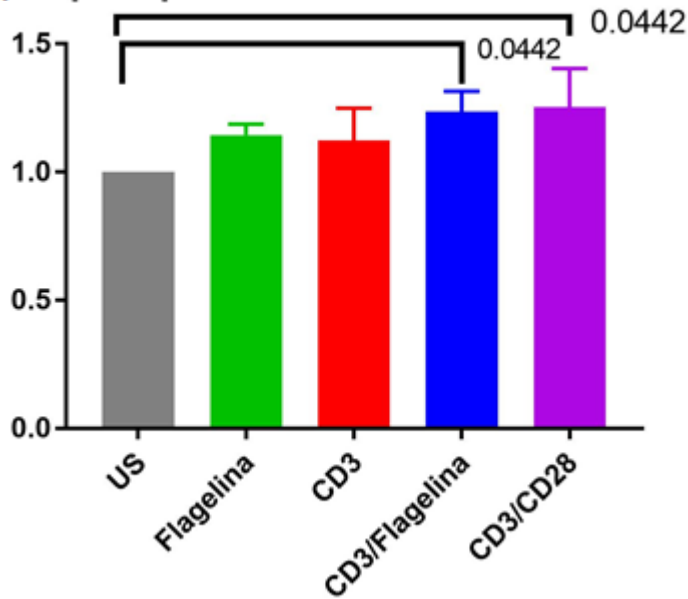
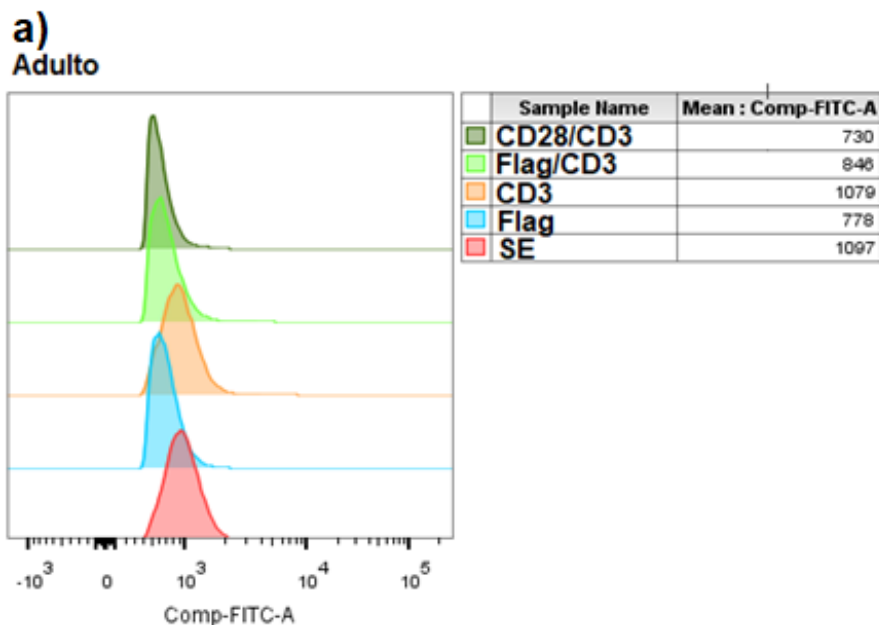


Figura 9. Estimulación de PKC θ fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de 3adultos. a) Histogramas de un adulto **b)** se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizarla activación de PKC θ thr538 en respuesta a estímulos con: flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3/CD28 a los 30 minutos. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

También se analizó el efecto de estos mismos estímulos en PKC θ total. Con los linfocitos T CD4+ vírgenes de los 3 adultos, se evaluó la presencia de la proteína PKC θ total con un anticuerpo anti-PKC θ para ser analizados por citometría de flujo (histogramas mostrados en la figura 10). Se puede observar en la figura 10b que en adultos el estímulo CD3/Flagelina (barra azul) es el único estímulo que demuestran valores significativamente altos en la fosforilación de PKC θ en comparación con las células sin estimular.



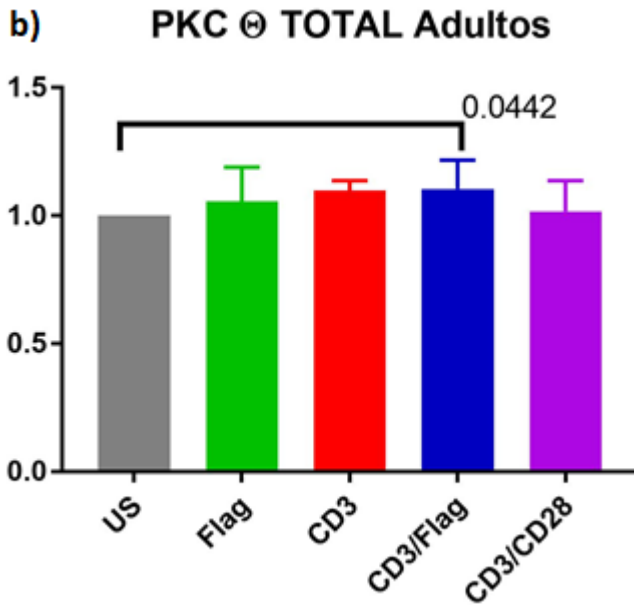


Figura 10. Estimulación de PKC θ fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de 3 adultos. a) Histogramas de un adulto b) se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizarla activación de PKC θ total en respuesta a estímulos con: flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3/CD28 a los 30 minutos. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

6.7 Estimulación de p-cJun por flagelina y TCR en células de neonato y adulto

Durante mi tesis de licenciatura, se realizaron los estímulos de flagelina y la activación mediante el TCR, entrecruzando con anticuerpos anti-CD3, para analizar el efecto de la activación en p-cJun, pudimos determinar que la flagelina inducía la activación de p-cJun(phospho-cjun) a 90 y 180 minutos. Para esto, se obtuvieron

linfocitos T CD4+ vírgenes de 4 adultos, en los cuales se realizaron los siguientes estímulos con: flagelina a los 90 y 180 minutos, CD3 a los 90 y 180 minutos, flagelina + CD3 a los 90 y 180 minutos. Los linfocitos fueron teñidos con un anti- p-cJun para ser analizados por citometría de flujo. Se puede observar que en adultos el estímulo CD3/Flagelina los 180 minutos (segunda barra azul) tuvo valores significativos en el aumento de p-cJun en comparación con las células sin estimular, al igual que con el estímulo CD3/CD28 a los 180 minutos (segunda barra morada).

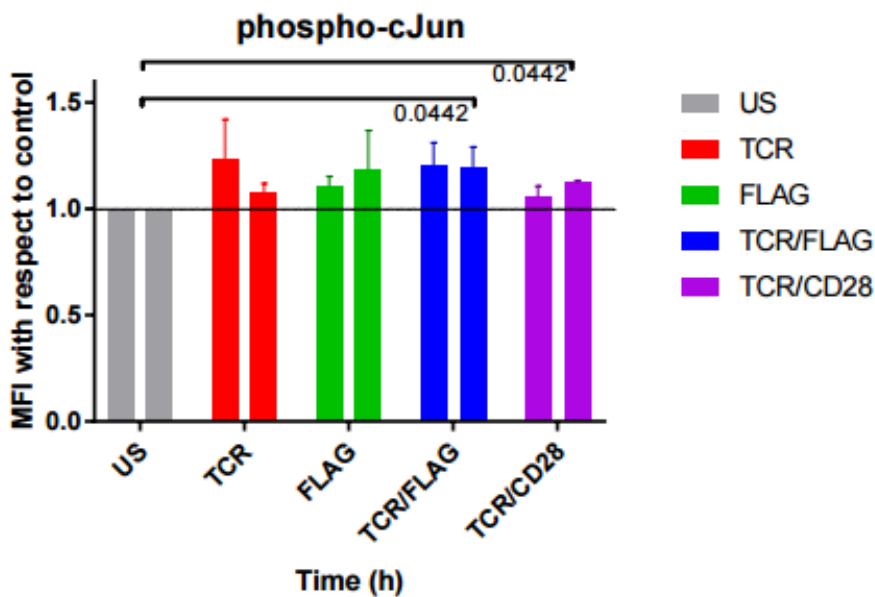
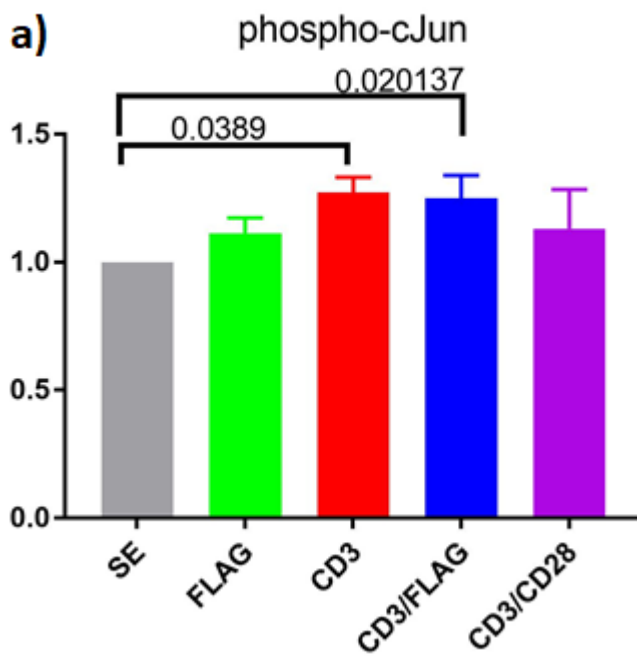


Figura 11. Estímulos con flagelina en linfocitos CD4 vírgenes de adultos. Se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizarla activación de p-cjun en respuesta a estímulos con: flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3/CD28 a los 90 y 180 minutos. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

Para la evaluación en neonatos, se realizaron los estímulos de flagelina y la activación sobre el TCR entrecruzando con anticuerpos anti-CD3 para analizar el

efecto de la activación en p-cJun. Se obtuvieron linfocitos T CD4+ vírgenes de 4 neonatos, en los cuales con 3 muestras se realizaron los siguientes estímulos a los 90 y con una muestra a los 180 minutos con: flagelina, CD3 y flagelina + CD3. Los linfocitos fueron teñidos con un anti- p-cJun para ser analizados por citometría de flujo. Se puede observar que en neonatos el estímulo con CD3 y CD3/Flagelina a los 90 minutos tuvo valores significativos en el aumento de p-cjun en comparación con el sin estímulo (figura 12 a). Mientras que aunque solo se pudo realizar experimento en los 180 minutos se observó un comportamiento similar a los 90 minutos



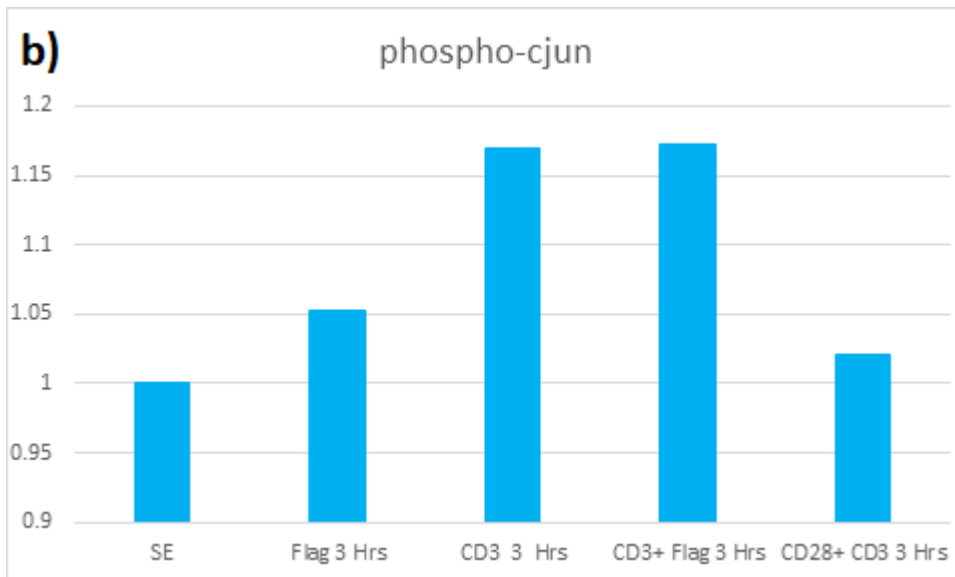


Figura 12. Estímulos con flagelina en linfocitos CD4 de neonatos. Se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizarla activación de p-cjun en respuesta a estímulos con: flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3/CD28 a los 90 y 180 minutos. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

6.8 Estimulación de p-P65 y P65 total por flagelina y TCR en linfocitos CD4+ de adultos

Se analizó el efecto en p-P65 en linfocitos T CD4+ vírgenes de 3 adultos. Se realizaron los siguientes estímulos a los 60 min con: flagelina, CD3, flagelina + CD3 y CD3 + CD28. Los linfocitos fueron teñidos con un anticuerpo anti-p-P65 para ser analizados por citometría de flujo (histogramas mostrados en la figura13). Se puede observar que en los 3 adultos que con los estímulos combinados se indujo un aumento de p-P65 y observamos que con CD3/Flagelina en (barra azul) es el único

estímulo que demuestran valores significativamente altos en la fosforilación de P65 en comparación con las células sin estimular.

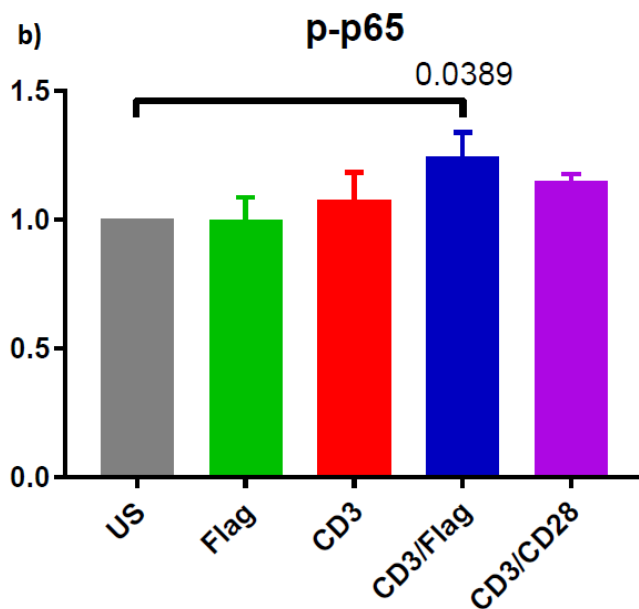
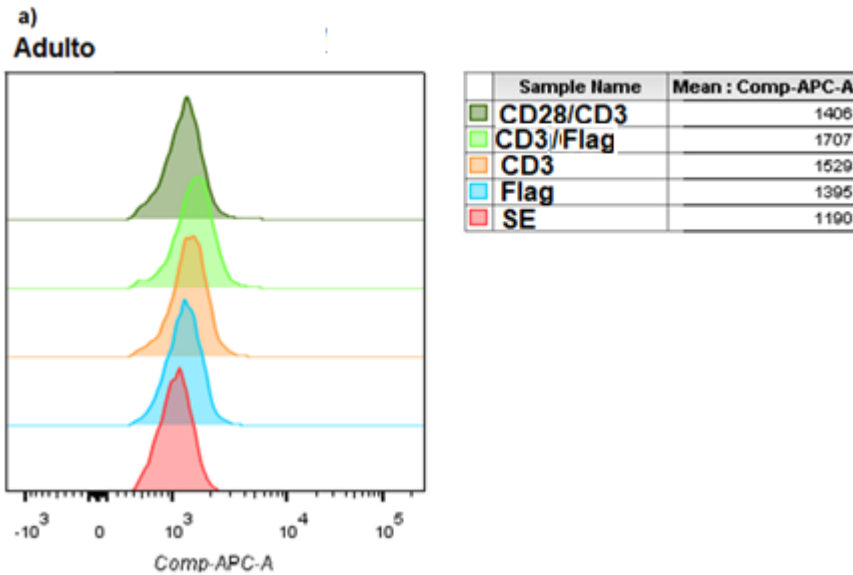
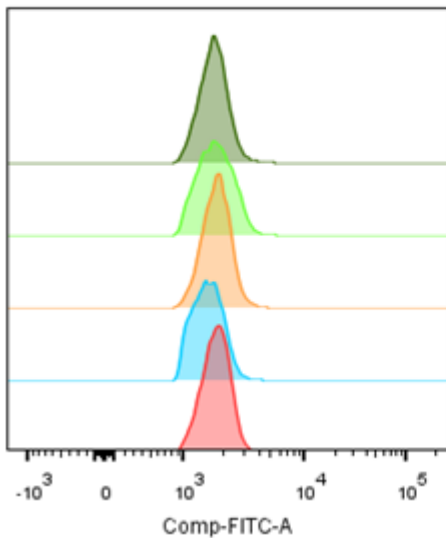


Figura 13. Estimulación de P65 fosforilado en linfocitos CD4 vírgenes de 3 adultos. a) Histogramas de un adulto b) se graficaron los datos de la variación de

intensidad media de fluorescencia para poder analizarla activación de p-P65 en respuesta a estímulos con: flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3/CD28 a los 60 minutos.

Se analizó el efecto en el P65 total en linfocitos T CD4 vírgenes de 3 adultos, se realizaron los siguientes estímulos a los 60 minutos con: flagelina, CD3, flagelina + CD3 y CD3 + CD28. Los linfocitos fueron teñidos con un anticuerpo anti-P65 para ser analizados por citometría de flujo (histogramas mostrados en la figura 14). Se puede observar que en los adultos la cantidad de P65 se mantuvo estable, con una ligera disminución en el estímulo con la flatelina sola.

a)
Adulto



	Sample Name	Mean : Comp-FITC-A
■	CD28/CD3	1912
■	Flag/CD3	1999
■	CD3	1995
■	Flag	1720
■	SE	1972

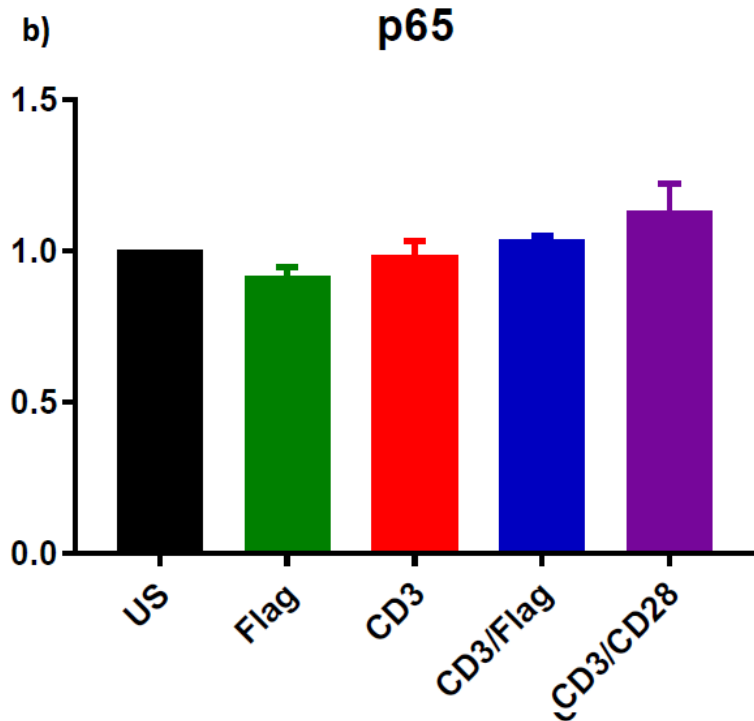


Figura 14. Estimulación de P65 total en linfocitos CD4 vírgenes de 2 adultos.

a) Histogramas de un adulto b) se graficaron los datos de la variación de intensidad media de fluorescencia para poder analizarla activación de P65 en respuesta a estímulos con: flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3/CD28 a los 60 minutos.

6.9 Análisis de p65 por citometría de imágenes

La activación de NF κ B lleva a la translocación al núcleo, por lo que para complementar el análisis de citometría de flujo, realizamos una evaluación de la translocación de p65 por citometría de imágenes en las que se marcaron las células con un anticuerpo anti-p65 y el colorante DAPI para teñir núcleos. Se utilizaron muestras de un adulto y un neonato. Las imágenes de células individuales se adquirieron utilizando el Amnis. Las células que pasan por el Amnis se iluminan en

diferentes direcciones por los láseres de campo claro, la luz emitida desde la célula se enfoca a través de un lente y se transmite a un elemento de descomposición espectral, que divide la luz en 6 bandas espectrales situadas a través de un dispositivo CCD. Por lo tanto, cada objetivo tiene 6 imágenes que pueden analizarse individualmente o con respecto al otro. Una vez recolectadas las imágenes el software IDEAS proporciona una amplia selección de características para el análisis de imágenes. Una característica es descrita por una expresión matemática que contiene información cuantitativa y posicional sobre la imagen. Una característica se aplica a ubicaciones específicas de una imagen mediante el uso de una máscara, la cual identifica píxeles dentro de la región de interés de la imagen. Después de realizar la compensación con controles de un solo color, se realizó el análisis con el software IDEAS. Las imágenes con mejor enfoque (figura 15a) fueron seleccionadas en la región R1, después fueron seleccionadas las imágenes de una sola célula en la región R2 (figura 15b) y se seleccionaron las células positivas para ambos colores DAPI y p65(FITC) región R3 (figura 15c). La región en la que hay translocación de $\text{NF}\kappa\text{B}$ es la región R4 y esta es calculada por la aplicación utilizando la intensidad dentro de las máscaras generadas de DAPI y FITC, con la característica de similaridad (la cual utiliza la correlación de Pearson) (figura 15d, e).

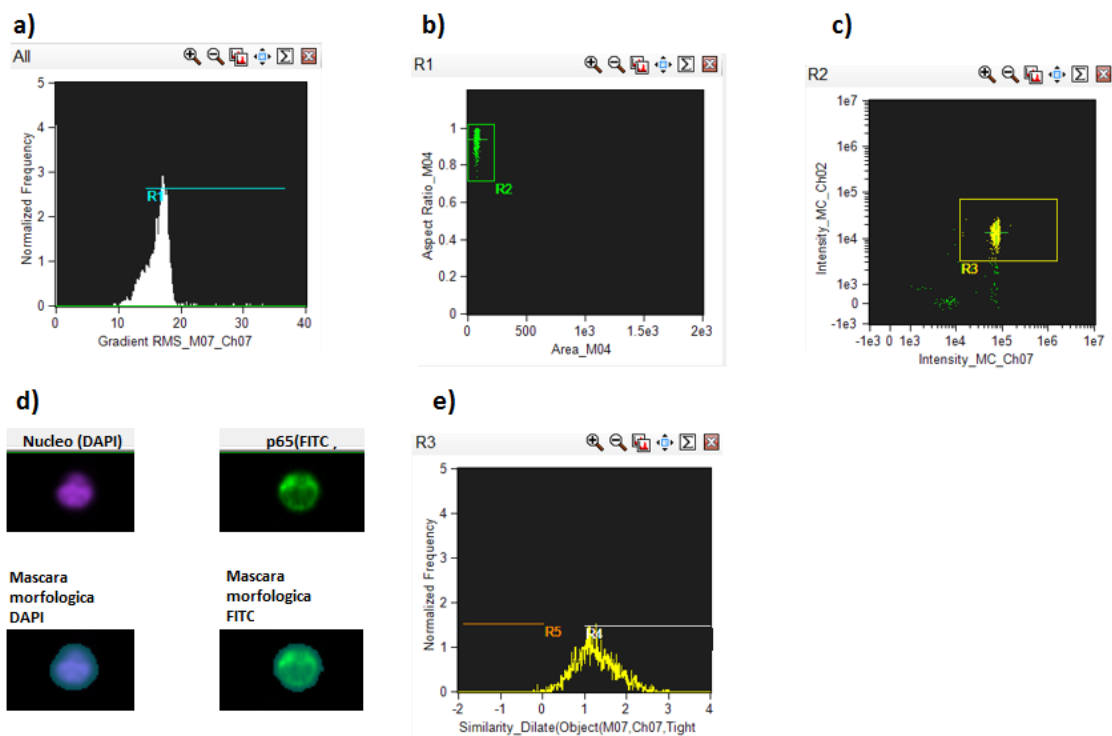


Figura 15. Procedimiento para el análisis de translocación nuclear con el software IDEAS. a) Se seleccionó la región con las células con mejor enfoque **R1** **b)** después se seleccionaron las imágenes con una sola célula, **c)** para después elegir a las células que son positivas para DAPI y FITC **d)** mascarar morfológicas de DAPI y FITC **e)** el programa calcula la región de células en que p65 transloca al núcleo utilizando la característica de similaridad.

Se realizaron los estímulos con flagelina, CD3, CD3/Flagelina y CD3+CD28, a tiempos de 60', ya que este fue el tiempo donde se observó mayor presencia de p65 en las cinéticas de citometría de flujo presentadas previamente. Las muestras fueron pasadas al citómetro de imágenes y se analizaron utilizando la aplicación IDEAS mencionada anteriormente. Se graficaron los porcentajes de translocación de p65 con los diferentes estímulos(figura16).

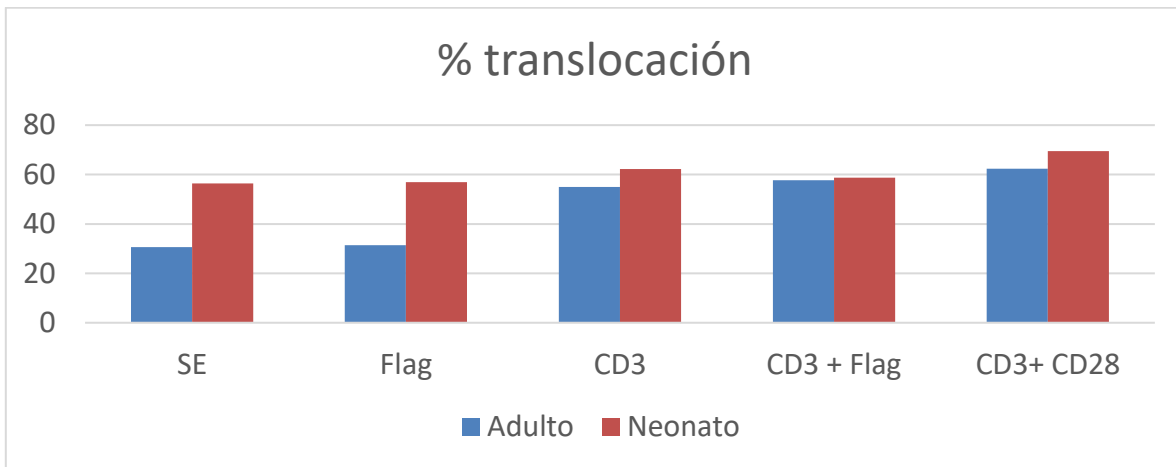
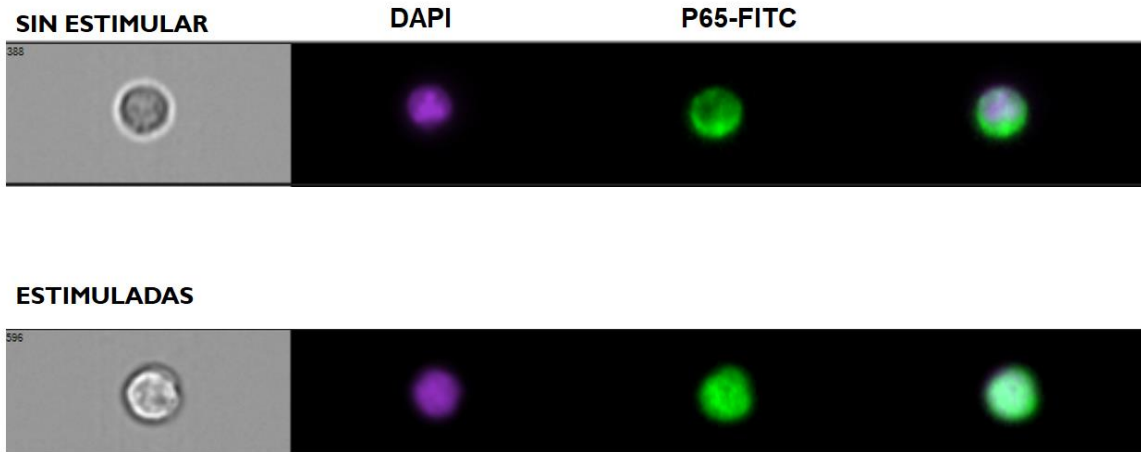
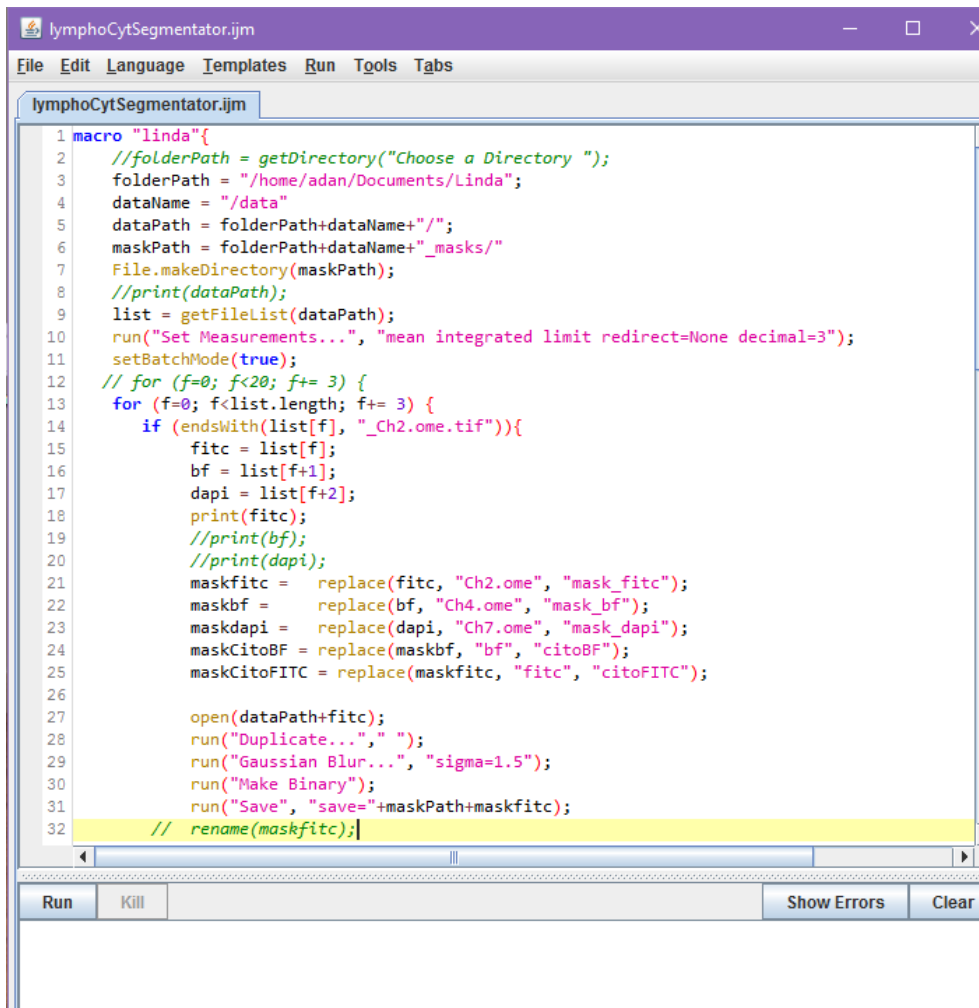


Figura 16. Análisis de translocación nuclear de p65 utilizando el software IDEAS. a) Grafica de p65 con estímulos de flagelina, CD3, CD3/Flagelina, CD3+CD28 en linfocitos CD4 vírgenes de adulto y neonato.

En los adultos se observó un aumento en la translocación nuclear de p65 con los diferentes estímulos en comparación del sin estimular. En las células de neonato, se encontró que desde el punto sin estimular había más de un 50% de células con NFkB translocado, que sólo aumentó con el estímulo de CD3 + CD28.

6.10 Análisis de p65 mediante la segmentación nuclear y citoplasmática.

La aplicación IDEAS solo toma la correlación de la intensidad de DAPI y FITC para definir la translocación nuclear, por lo tanto, se decidió realizar otro tipo de análisis, en el que se generó una imagen que representa una segmentación nuclear y citoplasmática de la célula. Se analizó la intensidad de p65(FITC) en el núcleo y el citoplasma. Esto se realizó utilizando el programa ImageJ (figura 17). Primero fueron exportadas las imágenes con mejor enfoque y positivas para DAPI y FITC. Se generó un programa (figura 17) para generar las imágenes de núcleo y citoplasma. Primero se realizó un filtro Gaussian Blur (figura 18b) para quitar el ruido de la imagen y definir los bordes de la región de interés; después se creó una máscara binaria que define la región de interés y el fondo (figura 18c), esto fue aplicado sobre la imagen de DAPI, para obtener la máscara binaria de la región nuclear. Para obtener la máscara binaria del citoplasma, primero se obtuvo la máscara binaria de FITC y se le sustrajo la máscara binaria del núcleo (figura 19). Una vez obtenidas las máscaras binaria nuclear y citoplasmática se usaron para obtener la intensidad de p65 en el núcleo y citoplasma.



```
1 macro "linda"{
2 //folderPath = getDirectory("Choose a Directory ");
3 folderPath = "/home/adan/Documents/Linda";
4 dataName = "/data"
5 dataPath = folderPath+dataName+"/";
6 maskPath = folderPath+dataName+"_masks/"
7 File.makeDirectory(maskPath);
8 //print(dataPath);
9 list = getFileList(dataPath);
10 run("Set Measurements...", "mean integrated limit redirect=None decimal=3");
11 setBatchMode(true);
12 // for (f=0; f<20; f+= 3) {
13 for (f=0; f<list.length; f+= 3) {
14     if (endsWith(list[f], "_Ch2.ome.tif")){
15         fitc = list[f];
16         bf = list[f+1];
17         dapi = list[f+2];
18         print(fitc);
19         //print(bf);
20         //print(dapi);
21         maskfitc = replace(fitc, "Ch2.ome", "mask_fitc");
22         maskbf = replace(bf, "Ch4.ome", "mask_bf");
23         maskdapi = replace(dapi, "Ch7.ome", "mask_dapi");
24         maskCitoBF = replace(maskbf, "bf", "citoBF");
25         maskCitoFITC = replace(maskfitc, "fitc", "citoFITC");
26
27         open(dataPath+fitc);
28         run("Duplicate...", "");
29         run("Gaussian Blur...", "sigma=1.5");
30         run("Make Binary");
31         run("Save", "save="+maskPath+maskfitc);
32         // rename(maskfitc);
```

The screenshot shows the Icy software interface with a macro editor window titled 'lymphoCytSegmentator.ijm'. The macro code is displayed in a text area with line numbers from 1 to 32. The code defines a macro named 'linda' that processes a list of files. It sets a folder path to '/home/adan/Documents/Linda' and a data name to '/data'. It creates a mask path and a directory for masks. It then iterates through a list of files, processing those ending in '_Ch2.ome.tif'. For each file, it extracts the base name and the next two files in the list. It performs several string replacements to create mask names (e.g., 'mask_fitc', 'mask_bf', 'mask_dapi', 'maskCitoBF', 'maskCitoFITC'). The macro then opens the file, duplicates it, applies a Gaussian blur with a sigma of 1.5, makes it binary, and saves it to the mask path. The final line of the macro is commented out: '// rename(maskfitc);'. The interface includes a menu bar (File, Edit, Language, Templates, Run, Tools, Tabs) and a control panel at the bottom with buttons for 'Run', 'Kill', 'Show Errors', and 'Clear'.

Figura 17. Programa de segmentación nuclear y citoplasmática

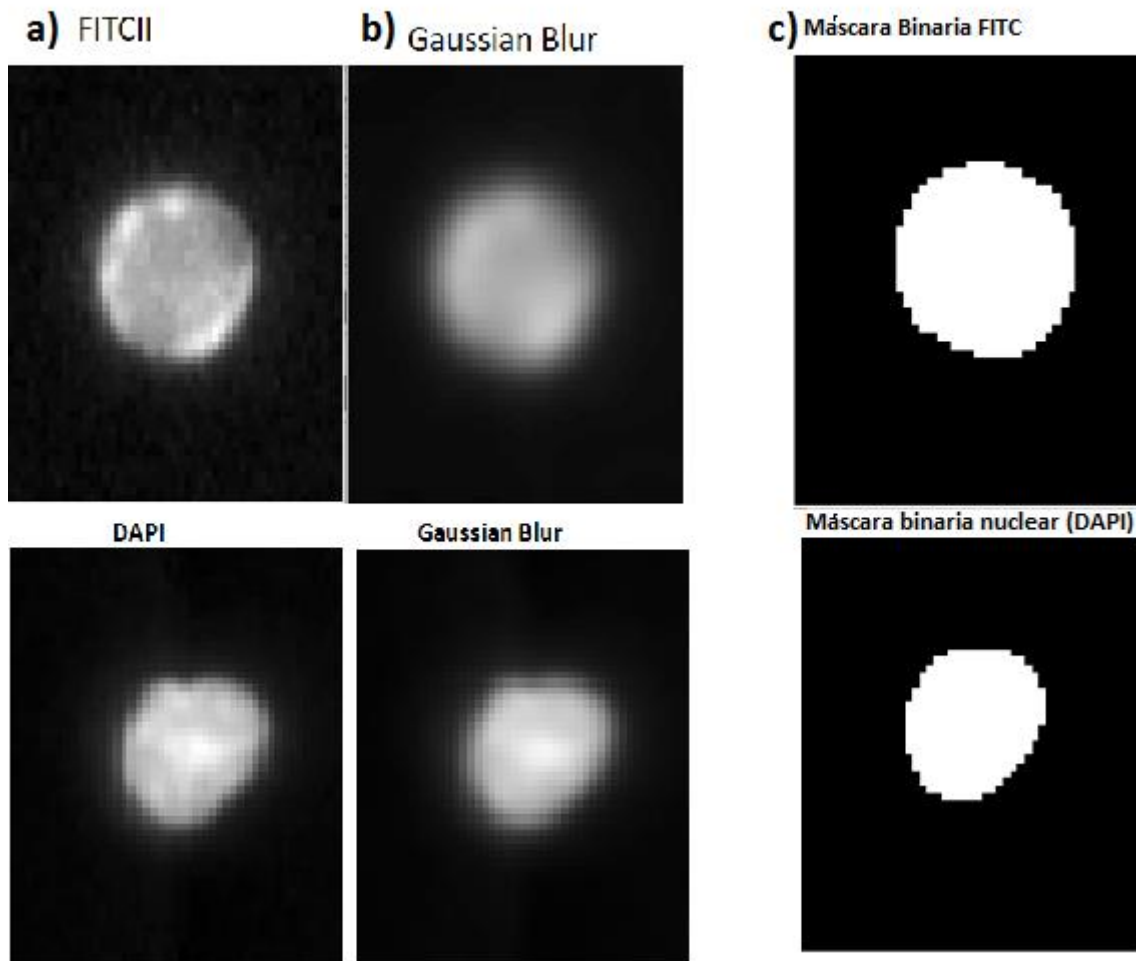
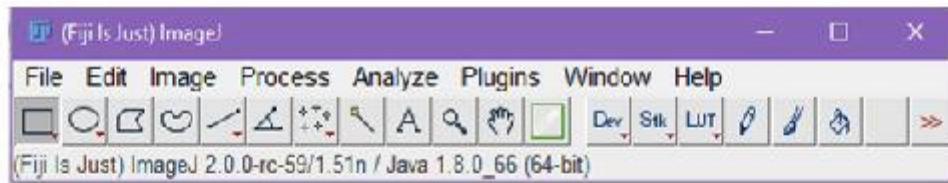


Figura 18. Análisis nuclear y citoplasmático utilizando ImageJ a) Análisis nuclear y citoplasmático utilizando ImageJ b) se aplica un filtro Gaussian Blur a las imágenes de DAPI y FITC(p65) c) se genera una máscara binaria.

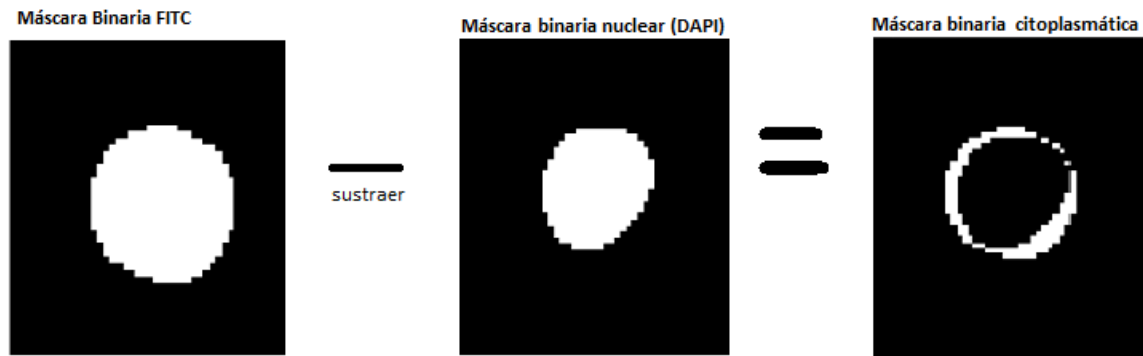


Figura 19. Máscara binaria citoplasmática

Los resultados obtenidos fueron analizados con R, donde se generó una función para poder medir la translocación (figura 11) donde:

- si la intensidad del citoplasma es igual a la intensidad nuclear el valor será mayor de 1,
- si la intensidad del citoplasma es mayor a la intensidad nuclear el valor será de menor que 1 y
- si la intensidad del citoplasma es menor a la intensidad nuclear el valor será de mayor 1.

Se muestran los histogramas obtenidos de muestras de linfocitos T CD4+ de adulto y neonato con estímulos combinados de CD3/CD28 y CD3/Flagelina. Se observó una mayor translocación nuclear con los estímulos de CD3/CD28 en muestras de adulto en comparación del CD3/Flagelina Figura 21 y en neonatos hay una mayor translocación nuclear con los estímulos CD3/Flagelina en comparación de CD3/CD28 figura 22.

```

RStudio
File Edit Code View Plots Session Build Debug Profile Tools Help
Go to file/function Addins
lymphoCytColocCalculator.R*
1 transloc<-function(x, y){
2   exp(1- x/y)
3 }
4
5 x<-MV$FITC. cytFITC ← Intensidad citoplasmática
6 y<-MV$FITC. nu ← Intensidad nuclear
7

```

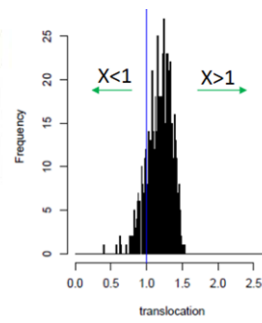


Figura 20. Función de translocación

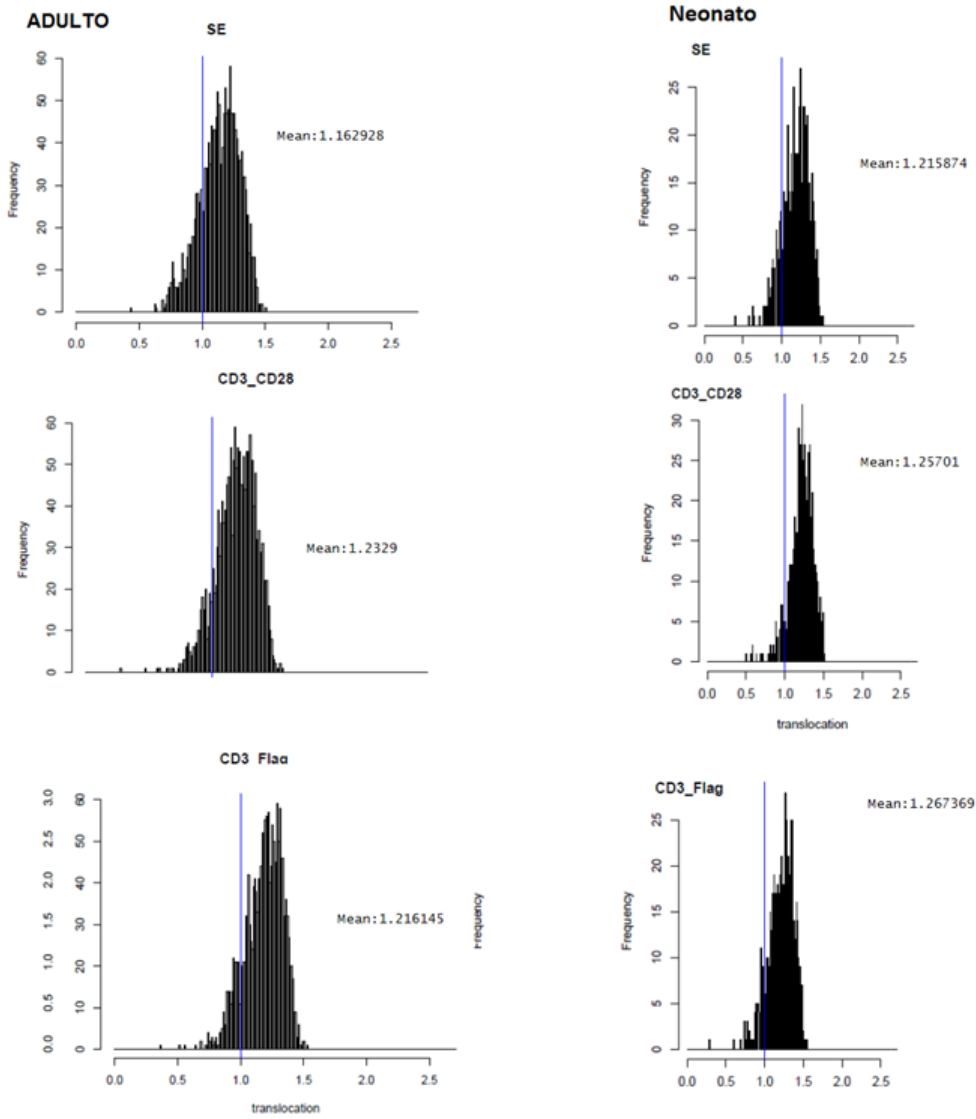


Figura 21. Histogramas de translocación nuclear de p65 en adulto y neonato.

7. Discusión

Logramos obtener cinéticas de activación de p65 y PKC θ en Linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos estimulados mediante CD3/CD28. Al realizar las cinéticas, pudimos observar diferencias en la activación de estas moléculas entre células de adultos y neonatos. Con respecto a p-p65, observamos un aumento en su activación desde tiempos tempranos en células de adulto, en comparación con las células de los neonatos, que tienen una activación más tardía. Para PKC θ sucede lo contrario a p65, p-PKC θ se activa en tiempos más tardíos en los adultos. Estas diferencias podrían ser debidas a las diferencias en la expresión de los genes que participan en la señalización por el TCR en adultos y neonatos. Se ha reportado que en linfocitos CD4+ de neonatos existe una menor expresión y activación de PLC γ 1 cuando se realizan estimulaciones con CD3 o con Pervanadato, estímulo que requiere Tirosinas Cinasas, esto también se relaciona con una baja expresión de Lck y ZAP70 en comparación de linfocitos CD4+ de adultos. También se ha reportado una deficiente expresión de CD154(CD40L) y CD69 en respuesta a la activación con CD3/CD28 o PMA/IONO lo cual está relacionado con los niveles bajos de calcio intracelular libre en células de cordón.^{37,38}

Asimismo, probamos el efecto que tiene el TLR5 como señal coestimuladora (utilizando flagelina) para activar a los factores transcripcionales AP1 y NF- κ B y la treonina cinasa PKC θ en linfocitos T CD4+. En este punto, logramos observar mediante citometria que para AP1 (p-cjun) se induce una activación significativa

utilizando los estímulos combinados CD3/Flagelina a los 90 minutos. Por falta de acceso a muestras neonatales (después del terremoto), NF- κ B y p-PKC θ solo se analizaron en citometría de flujo en linfocitos T CD4+ de adultos, donde observamos un aumento significativo en la activación utilizando los estímulos combinados.

Una mejor manera de evaluar la activación de NF- κ B es midiendo su translocación nuclear, que pudimos realizar en una muestra de adulto y una de neonato utilizando la citometría de imágenes, para lo cual usamos el programa del equipo, que fue validado en macrófagos, células que tienen una región citoplasmática mucho más grande que los linfocitos. Para realizar un mejor análisis de nuestras células, generamos un programa que separó de manera más clara la región citoplasmática y nuclear. Se observó que el estímulo de flagelina y CD3 aumentó la translocación de NF- κ B al núcleo. Sin embargo, este estímulo no superó al estímulo de CD3/CD28 en el adulto, mientras que, en el neonato, que tienen un nivel basal alto de NF- κ B nuclear, el estímulo de flagelina y CD3 aumenta la translocación de NF- κ B al núcleo en mayor medida que el estímulo CD3/CD28.

En cuanto a la activación de PKC θ , en adultos se logra inducir a su activación por estímulos de TLR5/TCR, esto se correlaciona con el aumento de la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- κ B, en neonatos se observó que la señal del TLR5/TCR permitió la activación de AP-1 y la translocación nuclear de NF- κ B, se esperaría observar que esta señal induzca la activación de PKC θ en neonatos .

Estos resultados apoyan a la idea de que la flagelina pudiera ser importante en la activación de NF- κ B en los linfocitos T CD4+ neonatales. Lo cual podría proponer a

la flagelina como un posible adyuvante en los neonatos (Tesis de Doctorado. Labastida.C.R.)

Nuestro trabajo fue importante para sentar las bases de un buen análisis de la translocación nuclear de factores transcripcionales por citometría de imágenes y citometría de flujo. El uso de las técnicas y análisis que logramos establecer, permitirán hacer una evaluación mucho más clara del balance en la activación de factores transcripcionales y su efecto en la inmunobiología de las células neonatales.

8. Bibliografía

1. Abbas AK, Inmunología Celular y Molecular 6a edición
2. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Inmunología de Kubby 6a edición
3. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):591-619.
doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
4. Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(4):257-269.
doi:10.1038/nri3403.
5. Nel AE. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(5):758-770.
doi:10.1067/mai.2002.124259.
6. Rossy J, Williamson DJ, Gaus K. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol.* 2012;3(June):1-6. doi:10.3389/fimmu.2012.00167.
7. Pfeifhofer C, Kofler K, Gruber T, et al. Protein kinase C theta affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med.* 2003;197(11):1525-1535. doi:10.1084/jem.20020234.
8. Freeley M, Long A. Regulating the Regulator: Phosphorylation of PKC θ in T

- Cells. *Front Immunol.* 2012;3(August):1-2. doi:10.3389/fimmu.2012.00227.
9. Baine I, Abe BT, Macian F. Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling. *Immunol Rev.* 2009;231:225-240. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00817.x.
 10. Gruber T, Pfeifhofer-Obermair C, Baier G. PKC θ is necessary for efficient activation of NF κ B, NFAT, and AP-1 during positive selection of thymocytes. *Immunol Lett.* 2010;132(1-2):6-11. doi:10.1016/j.imlet.2010.04.008.
 11. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-734. doi:10.1038/nri910.
 12. Phetsouphanh C, Kelleher AD. The Role of PKC- θ in CD4⁺ T Cells and HIV Infection: To the Nucleus and Back Again. *Front Immunol.* 2015;6(July):1-7. doi:10.3389/fimmu.2015.00391.
 13. Physician AMA, Award R. From the. *RadioGraphics.* 1992;175(March):577-596.
 14. Herbein G, Varin A, Fulop T. NF- κ B, AP-1, Zinc-deficiency and aging. *Biogerontology.* 2006;7(5-6):409-419. doi:10.1007/s10522-006-9056-4.
 15. Li J, Hardy K, Phetsouphanh C, et al. Nuclear PKC- θ facilitates rapid transcriptional responses in human memory CD4⁺ T cells through p65 and H2B phosphorylation. *J Cell Sci.* 2016;129(12):2448-2461. doi:10.1242/jcs.181248.

16. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(9):1171-1184.
doi:10.1586/1744666X.2014.942288.
17. Charvet C, Canonigo AJ, Becart S, et al. Vav1 Promotes T Cell Cycle Progression by Linking TCR/CD28 Costimulation to FOXO1 and p27kip1 Expression. *J Immunol*. 2006;177(8):5024-5031.
doi:10.4049/jimmunol.177.8.5024.
18. Dupage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(3):149-163.
doi:10.1038/nri.2015.18.
19. Hedrick SM, Michelini RH, Doedens AL, Goldrath AW, Stone EL. FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(9):649-661. doi:10.1038/nri3278.
20. Mi W, Ye Q, Liu S, She Q-B. AKT inhibition overcomes rapamycin resistance by enhancing the repressive function of PRAS40 on mTORC1/4E-BP1 axis. *Oncotarget*. 2015;6(16). doi:10.18632/oncotarget.3920.
21. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):1-14.
doi:10.1101/cshperspect.a000034.
22. O'Shea JM, Perkins ND. Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 4):603-608.

doi:10.1042/BST0360603.

23. Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(3):1-14.
doi:10.1101/cshperspect.a000158.
24. Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins: Redundancy and specificity. *Oncogene.* 2001;20(19 REV. ISS. 2):2378-2389. doi:10.1038/sj.onc.1204381.
25. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature.* 1992;356:801-804.
doi:10.1038/356801a0.
26. Bandukwala HS, Oberdoerffer S, Li Z, Schmidt V, Hogan PG. Correction for Sharma et al., Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(41):17235-17235.
doi:10.1073/pnas.1114486108.
27. Lewis RS. CALCIUM SIGNALING MECHANISMS IN T LYMPHOCYTES. 2001;(Figure 1):497-521.
28. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2(8):675-680.
doi:10.1038/90609.
29. Jeannin D, David C, Gascan H, et al. Direct Stimulation of Human T Cells via

- Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- γ Production by Memory CD4⁺ T Cells 1. *J Immunol Ref J Immunol Clevel Heal Sci Libr*. 2005;175:1551-1557. doi:10.4049/jimmunol.175.3.1551.
30. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009;113(7):1399-1407. doi:10.1182/blood-2008-07-019307.
31. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (80-)*. 2002;296(5573):1655-1657. doi:10.1126/science.296.5573.1655.
32. Lopez-Yglesias a. H, Zhao X, Quarles EK, et al. Flagellin Induces Antibody Responses through a TLR5- and Inflammasome-Independent Pathway. *J Immunol*. 2014;192(4):1587-1596. doi:10.4049/jimmunol.1301893.
33. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. *J Immunol*. 2010;185(10):5677-5682. doi:10.4049/jimmunol.1002156.
34. Prabhudas M, Adkins B, Gans H, et al. Challenges in infant immunity: Implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol*. 2011;12(3):189-194. doi:10.1038/ni0311-189.
35. Manicassamy S, Sadim M, Ye RD, Sun Z. Differential roles of PKC-theta in the regulation of intracellular calcium concentration in primary T cells. *J Mol Biol*. 2006;355(3):347-359. doi:10.1016/j.jmb.2005.10.043.
36. Palin AC, Ramachandran V, Acharya S, Lewis DB. Human Neonatal Naive

CD4+ T Cells Have Enhanced Activation-Dependent Signaling Regulated by the MicroRNA miR-181a. *J Immunol.* 2013;190(6):2682-2691.

doi:10.4049/jimmunol.1202534.

37. Jullien P, Cron RQ, Dabbagh K, et al. Decreased CD154 expression by neonatal CD4+T cells is due to limitations in both proximal and distal events of T cells activation. *Int Immunol.* 2003;15(12):1461-1472.

doi:10.1093/intimm/dxg145.

38. Miscia S, Di Baldassarre a, Sabatino G, et al. Inefficient phospholipase C activation and reduced Lck expression characterize the signaling defect of umbilical cord T lymphocytes. *J Immunol.* 1999;163(5):2416-2424.

doi:ji_v163n5p2416 [pii].