



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

"Evaluación de cambios en el metabolismo en función de la activación celular en células T CD4+ de neonatos y adultos humanos"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL:

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA

Mayra Joselin Gutiérrez Marín

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Angélica Santana Calderón

DIRECTORA EXPERIMENTAL

M. en C. Linda Aimara Kempis Calanis

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2023

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

*"Evaluación de cambios en el metabolismo en
función de la activación celular en células T CD4+
de neonatos y adultos humanos"*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL :

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA

Mayra Joselin Gutiérrez Marín

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Angélica Santana Calderón

COMITÉ SINODAL

PRSEIDENTE: DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA

SECRETARIO: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

SUPLENTE: DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA

SUPLENTE: DR. OTONIEL RODRÍGUEZ JORGE

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Marissa y Tomás, por ser mi inspiración, por enseñarme a caminar por la vida con cada uno de sus consejos. Por los sacrificios y desvelos, por su apoyo incondicional. Por creer en mí. Por entregar su vida para hacer de la mía algo mejor.

A mi hermano Emiliano que ha sido fundamental en mi vida y que mi mundo es mejor por la alegría que él le da.

A mis abuelitas, Eva y Ana gracias por apoyarme en mis decisiones y proyectos que he emprendido en la vida, siempre serán mis segundos padres. A mi abuelito Pedro que siempre está en mi corazón y lo recuerdo en todo momento.

A mi prima Jessica Pérez Gutiérrez que no solo es mi prima sino mi hermana, siempre confío fielmente en mí, de principio a fin, me brindo su tiempo y habla para poder continuar en este proyecto.

A las autoridades y personal de Servicios de Salud Morelos, de las unidades: Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, Hospital General de Cuernavaca, Hospital General de Temixco y la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación por las facilidades otorgadas para la realización de muestreo en campo. Esto se realizó mediante el Convenio de Colaboración SSM-UAEM DVA/0385/2022, con expediente 1372/1706.

A la Dra. Angelica Santana por todo su apoyo, por ser una persona y ser humano increíble. Gracias por haberme abierto la posibilidad de entrar a trabajar en su laboratorio. Gracias por ser mi tutora y por la confianza que me brindo.

A la M en C. Linda Kempis y el Dr. Otoniel Rodríguez por las innumerables y extensas discusiones y planteos que mantuvimos cada vez que me encontraba con resultados que iban en contra de mi lógica. Gracias por haberme ayudado, por darme la mano siempre que la necesitaba.

A todos mi compañeros del laboratorio: Carlos, Ale y Yari por su ayuda cotidiana en el trabajo del laboratorio. Por poder discutir problemas técnicos o mecánicos. Gracias por su apoyo moral y académico.

A las enfermeras y médicos del Hospital General de Temixtco Mor., *Enfermera María de la Luz Delgado* por facilitar la obtención de muestras de sangre de cordón umbilical. Al personal del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea por la obtención de paquetes de agregados leucocitarios.

Gracias a mis amigos, compañeros e investigadores de la facultad de ciencias por hacer de esta una aventura y experiencia increíble.

1. Resumen

Los recién nacidos poseen una respuesta inmune tolerante adaptada a la vida dentro del útero, donde no han sido expuestos a agentes extraños, lo que hace que los recién nacidos sean altamente susceptibles a las infecciones causadas por virus y bacterias intracelulares. Se estima que el 24% de los 2.1 millones de muertes neonatales anuales en todo el mundo son el resultado de infecciones.

Entre los factores que afectan la inmunidad en los recién nacidos, se ha propuesto que cambios en las vías metabólicas de las células inmunes pudieran afectar la respuesta inmune neonatal. La respuesta inmune requiere de cantidades significativas de energía durante breves períodos de tiempo. Esa energía se emplea en la secreción de citocinas, quimiocinas y ampliación clonal. Cambios en el metabolismo celular son necesarios para poder atender estas demandas y pueden afectar y cambiar la naturaleza de estas respuestas.

Estudios realizados en nuestro laboratorio, aunado a investigaciones y artículos ya publicados, han demostrado que las células neonatales tienen un enriquecimiento en la expresión de genes relacionados con la glucólisis aerobia. Es basándonos en esta información, que sale nuestra pregunta de investigación: ¿Los cambios en la expresión de genes en la vía de la glucólisis alteran el metabolismo de los linfocitos T CD4+?

En un acercamiento a evaluar el metabolismo celular, evaluamos la expresión del receptor de insulina, transportador de glucosa Glut1 y transportador de lactato, así como la captación de glucosa. La puesta a punto de todos estos experimentos tomó más tiempo de lo esperado, por lo que nuestros resultados no son concluyentes, sin embargo se pudieron establecer los mejores tiempos para la evaluación de estos parámetros.

ÍNDICE

<u>1. RESUMEN</u>	<u>5</u>
<u>2. INTRODUCCIÓN</u>	<u>9</u>
2.1 LINFOCITOS T	11
2.2 ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4+	12
2.3 DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4+	14
2.4 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LOS ESTADOS DE ACTIVACIÓN	14
2.5 INMUNIDAD NEONATAL.....	18
<u>3. ANTECEDENTES</u>	<u>19</u>
<u>4. JUSTIFICACIÓN.....</u>	<u>22</u>
<u>5. HIPÓTESIS.....</u>	<u>23</u>
<u>6. OBJETIVOS.....</u>	<u>23</u>
<u>7. METODOLOGÍA.....</u>	<u>24</u>
7.1 PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS, CULTIVO CELULAR Y ADHERENCIA DE LINFOCITOS T CD4+	24
7.2 PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ VÍRGENES.....	25
7.3 ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS.....	26
7.4 TINCIÓN DE MARCADORES EN MEMBRANA PLASMÁTICA	26
7.5 TINCIÓN DE KITS METABÓLICOS	27
7.6 TINCIÓN DE PROTEÍNAS METABOLICAS INTRACELULARES	28
7.7 CITOMETRÍA DE FLUJO	29
7.8 ANÁLISIS DE DATOS	29
<u>8. RESULTADOS</u>	<u>30</u>
8.1 ESTANDARIZACIÓN DEL KIT DE ENSAYO DE ABSORCIÓN DE GLUCOSA 2-NBDG EN PBMC TOTALES DE ADULTO .	30
8.2 PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+	32
8.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS T CD4+ VÍRGENES	33
8.4 MARCADOR DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CD4+ VÍRGENES.....	34
8.5 EXPRESIÓN DE MARCADORES METABOLICOS EN CÉLULAS PBMC DE ADULTOS	35
8.6 EXPRESIÓN DE MARCADORES METABOLICOS EN CBMC DE NEONATOS	38
8.6.1 COMPARACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES METABOLICOS EN CÉLULAS PBMC VS CBMC.....	41
8.7 Puesta a punto de la técnica para medir absorción de glucosa en células T CD4+ y PBMCs vírgenes en adultos.....	43
8.8 ABSORCIÓN DE 2-NBDG EN CÉLULAS CBMC DE NEONATOS.....	51
8.8.1 COMPARACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA EN CÉLULAS PBMC VS CBMC.....	55

<u>9. DISCUSIÓN.....</u>	<u>56</u>
<u>10. CONCLUSIÓN.....</u>	<u>60</u>
<u>11. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>61</u>
<u>12. ANEXOS</u>	<u>67</u>

ABREVIATURAS

APC: célula presentadora de antígeno.

CBMC: células mononucleares de sangre de cordón umbilical.

CTL: linfocito T citotóxico.

CTLA4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FAO: oxidación de ácidos grasos.

FAS: síntesis de ácidos grasos.

IFN: interferón.

IL: interleucina.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

OXPPOS: fosforilación oxidativa.

PBMC: células mononucleares de sangre periférica.

PBS: tampón fosfato salino.

TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

TCR: receptor de linfocitos T.

RPMI: medio Roswell Park Memorial Institut (usado para cultivos celulares).

SDS: dodecilsulfato sódico.

SFB: suero fetal bovino (usado para cultivos celulares).

2. Introducción

Los neonatos tienen una alta vulnerabilidad a infecciones causadas por virus y bacterias intracelulares, siendo la población más propensa a morir a causa de infecciones, de acuerdo con datos del Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, (UNICEF) [11]. A pesar de los avances en la lucha contra las enfermedades infantiles, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de muerte de niños menores de 5 años. El 45% de las muertes en esta población corresponden a muertes neonatales y de éstas, el 24% son muertes debidas a infecciones [5]

Las infecciones mediadas por patógenos intracelulares son particularmente peligrosas en los recién nacidos, debido a que no hay inmunidad pasiva (tipo de inmunidad que es conferida por la transferencia de anticuerpos o células efectoras) de linfocitos T. Los neonatos tienen una exposición limitada a los antígenos dentro del útero y prácticamente carecen de memoria inmunológica, por lo tanto, el sistema inmune adaptativo del neonato es virgen [5]. Además, las células T neonatales tienen sus propias características, adaptándose a las necesidades particulares del período neonatal [5]. La comprensión de la función de las células T neonatales sigue siendo limitada.

Las células encargadas de coordinar los distintos tipos de respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T CD4⁺. Estas células se encuentran en proporción similar en la sangre de adulto y neonato. Sin embargo, los linfocitos T CD4⁺ neonatales presentan características fenotípicas y funcionales distintas a las de los adultos, aunque son capaces de responder adecuadamente ante algunos retos antigénicos fuertes [6].

Las células T vírgenes no son capaces de realizar funciones inmunológicas hasta que son activadas. La activación de los linfocitos T necesita de tres señales, la primera señal es la presentación de antígeno por el MHC a través del TCR (lo cual le da especificidad a la reacción). La segunda señal es a través de moléculas

coestimuladoras que se unen a su receptor en la superficie de la célula T. La tercera señal es a través de las citocinas proinflamatorias como el interferón tipo 1 (IFN) y la interleucina 12 (IL-12) [3].

Cuando los linfocitos T se activan, necesitan aumentar su actividad metabólica para hacer frente a las crecientes demandas de la respuesta celular. Tras la activación por el antígeno y los coestimuladores, las células T aumentan el transporte de glucosa y cambian su producción de energía generada por la fosforilación oxidativa mitocondrial a la glucólisis, incluso en presencia de abundante oxígeno, un fenómeno conocido como *glucólisis aeróbica*. Esto se describió por primera vez en células tumorales [15], pero ahora se reconoce como un mecanismo importante, utilizado por muchas células en proliferación. Las señales coestimuladoras del receptor de células T conducen a una reprogramación metabólica que implica la regulación positiva de la glucólisis, el metabolismo mitocondrial y la síntesis de lípidos. La función efectora de las células T se ha relacionado estrechamente con el metabolismo en varios estudios y puede tener un papel que desempeñar en las respuestas sesgadas de las células T de los neonatos [13].

Este proyecto se centró en los linfocitos T CD4⁺. El objetivo de este proyecto fue evaluar los cambios en la expresión de tres moléculas de superficie (receptor de insulina, transportador de glucosa Glut1 y transportador de lactato) y el consumo de glucosa de las células T CD4⁺ de neonatos y adultos humanos, en estado basal, y después de su activación.

2.1 Linfocitos T

La respuesta inmune está constituida por dos ramas, la inmunidad innata, encargada de las respuestas inmediatas a un reto antigénico y la inmunidad adaptativa, constituida por los linfocitos. La respuesta innata está constituida por barreras físicas y químicas, fagocitos, células linfoides innatas, granulocitos y fagocitos. La inmunidad adaptativa se desarrolla en días y está adaptada a un reto inmunológico particular.

Los linfocitos son las únicas células capaces de reconocer de forma específica antígenos, y por ello son las principales células de la inmunidad adaptativa. La población total de linfocitos consta de muchos clones, cada uno con un receptor para el antígeno y especificidad únicos. Los dos principales subgrupos de linfocitos son los linfocitos B y los linfocitos T, y difieren en sus receptores para el antígeno y en sus funciones [2].

Los linfocitos B y T surgen de un precursor común en la médula ósea. El desarrollo del linfocito B se produce en la médula ósea, mientras que los precursores de los linfocitos T migran al timo y maduran en él. Después de madurar, los linfocitos B y T abandonan la médula ósea o el timo, entran en la circulación y pueblan los órganos linfáticos periféricos (*ver figura 1*).

Los linfocitos T tienen la capacidad de reconocer específicamente mediante el receptor de células T (TCR), a péptidos antigénicos de patógenos particulares, presentados por el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés), para que de esta manera apropiada pueda llevarse a cabo su eliminación [1].

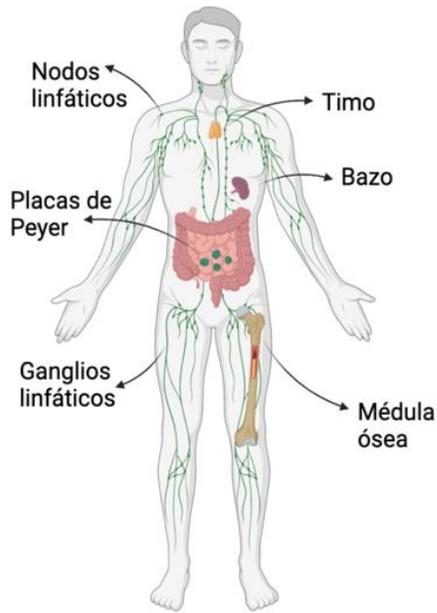


Figura 1. Órganos primarios y secundarios del sistema inmunitario. Los órganos del sistema inmunitario pueden dividirse en los órganos generadores, o primarios (médula ósea y timo), donde maduran los linfocitos, y los órganos periféricos, o secundarios (ganglios linfáticos, bazo y partes de los sistemas inmunitarios mucoso y cutáneo), donde los antígenos activan a los linfocitos vírgenes. Creado usando biorender.com

Los linfocitos T se subdividen en dos conjuntos con base a sus funciones. 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 citotóxicos expresan la proteína llamada CD8 y pueden reconocer antígenos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I). Los linfocitos T citotóxicos destruyen las células infectadas y las células tumorales, además, secretan citocinas que activan a los macrófagos e inducen una respuesta inflamatoria [1].

Los linfocitos T cooperadores (Th) expresan una proteína de superficie llamada CD4 y reconocen antígenos presentados por las moléculas de MHC-II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Las células T CD4⁺ efectoras son las coordinadoras de la respuesta inmune adaptativa, ya que regulan la función de los macrófagos para fagocitar a los microbios o reparar tejidos, se comunican con los linfocitos B para regular el tipo de inmunoglobulina que se debe secretar y pueden activar otros linfocitos, granulocitos y células linfoides [1].

2.2 Activación de los linfocitos T CD4+

El reconocimiento del complejo péptido-MHC en la superficie de una APC por el receptor de antígenos (TCR) en las células T, inicia la cascada de señalización que da lugar a las respuestas de los linfocitos T. Durante ese encuentro, también reconocen señales proporcionadas por coestimuladores expresados en la APC. Los coestimuladores mejor conocidos son miembros de la familia del B7 que son reconocidos por los receptores de la familia del CD28 expresados en los linfocitos T. La expresión de coestimuladores B7 en las APC aumenta por el encuentro con los microbios, lo que proporciona un mecanismo de generación de respuestas óptimas contra los microorganismos patógenos infecciosos [2]. Algunos miembros de la familia CD28, en particular CTLA4, inhiben las respuestas de los linfocitos T, generando la necesidad de un umbral de activación en los linfocitos, para permitir que las señales positivas sobrepasen a las de inhibición. Las respuestas de los linfocitos frente al antígeno y los coestimuladores incluyen cambios en la expresión de moléculas de superficie, la síntesis de citocinas y receptores para citocinas, la proliferación celular y la diferenciación en células efectoras y de memoria [3].

Las respuestas del linfocito T disminuyen y muchas células efectoras mueren por apoptosis después de la eliminación del antígeno, con lo que devuelven al sistema a homeostasis. Así mismo, durante su activación los linfocitos T CD4⁺ perciben señales del medio, como las citocinas que son secretadas por otras células y que regulan la diferenciación celular. La figura 2 ejemplifica la activación de un linfocito T CD4⁺ por una célula dendrítica [3,4] (*ver figura 2*).

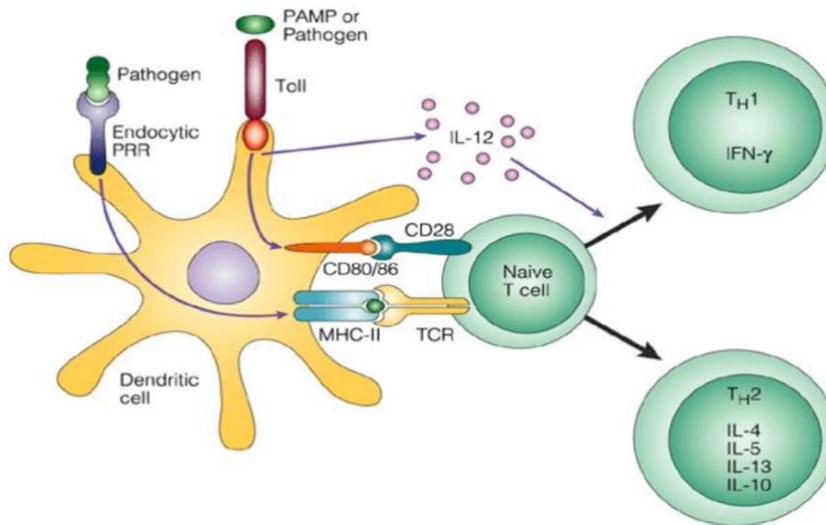


Figura 2. Activación y diferenciación de linfocitos T CD4+. Se muestran señales requeridas para la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4+, y dos posibles vías de diferenciación. Figura tomada de [7].

2.3 Diferenciación de los linfocitos T CD4+

Las citocinas que los linfocitos perciben del microambiente durante su activación juegan un papel clave en la determinación del destino celular. Los linfocitos T CD4⁺ cooperadores pueden diferenciarse en linfocitos Th1, que secretan interferón gamma (IFN- γ) y que median la defensa contra microbios intracelulares; en linfocitos Th2, que secretan IL-4, IL-5 e IL-13, y favorecen las reacciones inmunitarias mediadas por la IgE y los eosinófilos/mastocitos contra los helmintos; o en linfocitos Th17, que promueven la inflamación y median la defensa contra los hongos y las bacterias extracelulares. También pueden diferenciarse en células reguladoras (Treg), que controlan la respuesta inmune por la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 [4].

2.4 Características metabólicas de los estados de activación

Actualmente se sabe que el metabolismo es fundamental para la regulación de todo el sistema inmune. La función efectora de las células T se ha relacionado estrechamente con el metabolismo en varios estudios y puede tener un papel que desempeñar en las respuestas sesgadas de las células T de los recién nacidos.

La glucosa es fundamental para el metabolismo de las células de los mamíferos. Su paso a través de las membranas celulares está mediado por una familia de transportadores de glucosa (GLUT). GLUT1 está codificado por el gen SLC2A1, la proteína está conformada por 492 aminoácidos y se localiza principalmente en eritrocitos, barrera hematoencefálica, cerebro, placenta y riñón. La principal función de GLUT1 es mantener la respiración celular mediante el consumo basal de glucosa y el aporte de ésta al cerebro. GLUT1 también transporta otras moléculas como galactosa, manosa y glucosamina. Durante el desarrollo fetal hay una mayor expresión de GLUT 1 y disminuye luego del nacimiento.

Los cambios en la captación de glucosa pueden reflejar los cambios en el metabolismo celular. Por ejemplo, las células tumorales generalmente usan glucosa para la glucólisis aeróbica para apoyar su rápida proliferación. Normalmente, las células tumorales tienen mayores tasas de captación de glucosa en comparación con las células normales [10].

El gen INSR codifica la proteína llamada Receptor de Insulina, que se encuentra en muchos tipos de células. Los receptores de insulina están incorporados en la membrana externa que rodea la célula, donde se unen a la hormona insulina, que circula en el torrente sanguíneo. La insulina desempeña muchas funciones en el cuerpo, incluida la regulación de los niveles de azúcar en la sangre al controlar la cantidad de glucosa que pasa del torrente sanguíneo a las células para ser utilizada como energía.

La insulina regula el metabolismo en general, así como el crecimiento y desarrollo celular y también promueve la translocación del transportador GLUT1 a la membrana plasmática.

La glucólisis convierte la glucosa en piruvato a través de reacciones enzimáticas secuenciales, que conducen a la generación de metabolitos intermedios que pueden ingresar a otras vías. Estos procesos metabólicos coordinados son fundamentales para el éxito de la biosíntesis y el crecimiento celular. El piruvato generado a partir de la glucólisis puede ingresar a las mitocondrias y convertirse en acetil-CoA ingresando al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para generar energía, o puede convertirse en lactato en el citoplasma y excretarse de la célula (*ver figura 3*) [14,22].

El ácido láctico o lactato se produce en grandes cantidades como resultado de la glucólisis aerobia. Sin embargo, la acumulación de ácido láctico conduce a una disminución del pH intracelular y a la interrupción de la glucólisis. Para que la glucólisis continúe a un ritmo elevado, el ácido láctico debe ser transportado fuera de la célula. Este proceso de transporte lo lleva a cabo una familia de transportadores de monocarboxilato (MCT), que funcionan como simportadores de protones para el L-lactato. La familia MCT consta de al menos 8 miembros. MCT4 es codificado por el gen SLC16A3 que se expresa predominantemente en el músculo esquelético [33].

Otros nutrientes críticos para los linfocitos T son los lípidos, que pueden metabolizarse a través de la oxidación de ácidos grasos (FAO) o usarse para reacciones biosintéticas en lugar de producir energía. Los intermediarios producidos por reacciones catabólicas de los lípidos también entran en el ciclo de TCA, además de producir intermediarios que alimentan múltiples vías biosintéticas. Las reacciones oxidativas del ciclo del TCA generan NADH y dinucleótido de flavina adenina, que son necesarios para la donación de electrones a la cadena de transporte de electrones para la fosforilación oxidativa (OXPHOS) [21,22].

La fosforilación oxidativa, también conocida como OXPHOS, es el poder energético de la célula debido a la abundante producción de ATP, ya que puede generar 10 veces más moléculas de ATP por molécula de glucosa en comparación con la glucólisis. El citrato es un producto clave del ciclo de TCA, que forma la base para la síntesis de ácidos grasos (FAS) después de su exportación al citosol. Para mantener la integridad funcional y la capacidad de dividirse, una célula sana debe equilibrar el consumo de nutrientes y el metabolismo para mantener con éxito la energía, la biosíntesis y el estado redox [19,20].

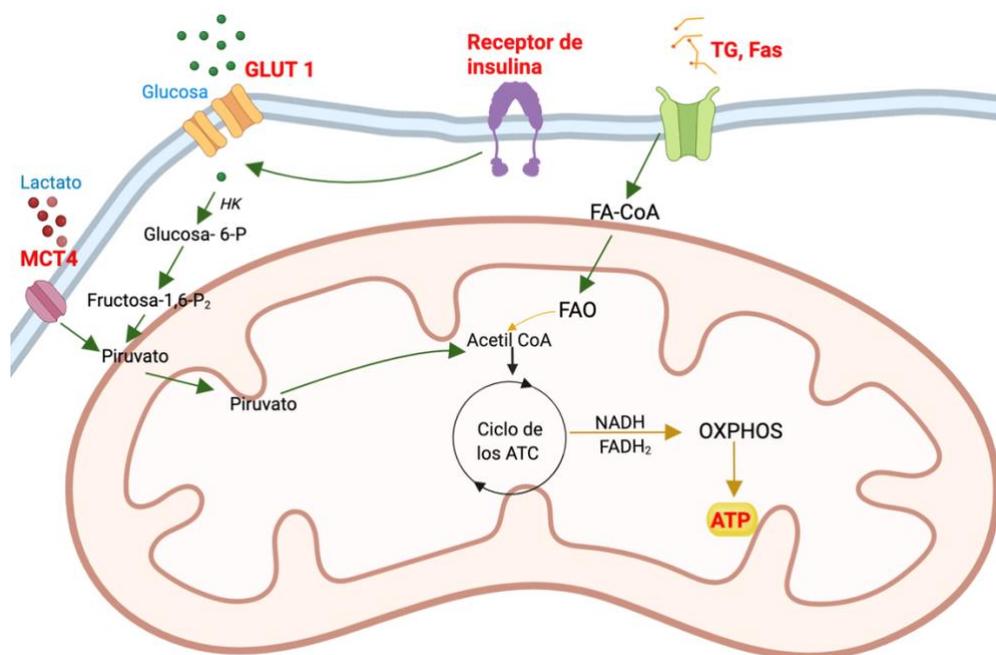


Figura 3. Representación general del metabolismo celular. La glucosa y los ácidos grasos son los principales metabolitos utilizados por las células del sistema inmunológico. Estos metabolitos se incorporan al ciclo del TCA a través de la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos u otras vías metabólicas. La oxidación de estos metabolitos, a través de estas vías metabólicas, genera ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato. Creado usando biorender.com

2.5 Inmunidad neonatal

Pese a los avances en medicina y tecnología, aproximadamente 2.4 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 [5,9]. Durante mucho tiempo este suceso se atribuyó a la inmadurez del sistema inmune de los neonatos y se pensó que estos eran inmunodeficientes. Sin embargo, actualmente se sabe que, aunque en la sangre neonatal circula una mayor proporción de células inmaduras en comparación con la sangre de adulto, los neonatos sí son capaces de llevar a cabo respuestas inmunes eficientes bajo condiciones fuertes de estimulación [12].

El neonato debe evitar las respuestas exacerbadas porque éstas lo pueden llevar a un choque séptico, al entrar en contacto con el inmenso número de antígenos extraños del medio ambiente. Además, el recién nacido debe permitir nuevas asociaciones microbianas en sus mucosas, que son benéficas para su salud [27].

El sistema inmune adaptativo del neonato es básicamente virgen (no hay células de memoria), debido a que el recién nacido no ha tenido contacto con la mayoría de los antígenos del ambiente, puesto que hay una limitada exposición de antígenos dentro del útero. El sistema inmune neonatal carece de memoria inmunológica y presenta un alto umbral de activación para generar células efectoras y de memoria [6].

Se puede decir, de manera general, que los neonatos tienden a favorecer ciertos tipos de respuesta. Particularmente, se favorece la respuesta Th2, que es la respuesta especializada para combatir parásitos helmintos y si se encuentra exacerbada, participa en las alergias. También se favorece la respuesta de tolerancia que se encarga de terminar o impedir a otros tipos de respuesta inmune. La respuesta de tolerancia aumenta el umbral de la respuesta antigénica [21]. Por otra parte, se ha visto que la respuesta Th17, encargada de combatir a las bacterias extracelulares y los hongos, presenta niveles comparables con la de los adultos,

aunque viene acompañada de una secreción aumentada de IL-10 que le confiere tolerancia. Sin embargo, la respuesta Th1, que es la respuesta especializada en combatir patógenos intracelulares, es frecuentemente deficiente. También se ha observado que en el plasma de neonato hay una alta producción de citocinas inmunosupresoras comparado con el plasma de los adultos [6,27].

Estudios previos observados en nuestro laboratorio han sugerido que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos tienen un metabolismo alterado y que esta alteración pudiera asociarse con la baja respuesta de los mismos como se mencionará más adelante [13].

3. Antecedentes

En estudios previos de nuestro laboratorio, se examinó la expresión diferencial de los genes relacionados con la citotoxicidad inducida en las células T CD8⁺ neonatales y adultas, se observó que las células T CD8⁺ neonatales proliferan de forma constitutiva, con características inmaduras y sesgadas hacia la inmunidad innata [13]. Está demostrado que una de las principales respuestas de las células T neonatales humanas es la producción de IL-8, una molécula proinflamatoria asociada con la inmunidad innata, esto apoyando la idea de que las células neonatales están sesgadas hacia la inmunidad innata [39].

Así mismo, dentro de nuestro laboratorio, con el objetivo de evaluar las células T CD8⁺ neonatales en condiciones normales y de alta estimulación, se determinó el RNA seq de los linfocitos T CD8⁺ neonatales tras la estimulación [12]. Se obtuvieron resultados que muestran que en condiciones de alta estimulación (TCR/CD28/IL-12) los linfocitos T CD8⁺ neonatales son capaces de reprogramar su transcriptoma a un transcriptoma similar al de los adultos. En ese artículo se mostró que en condiciones normales de estimulación (TCR/CD28) se inducen las moléculas de ciclo celular, pero las células sólo proliferan en presencia de IL-12 y esto se debió a la activación metabólica de las células. Entre estos cambios metabólicos, están

representados algunos genes del metabolismo, entre ellos la vía de la glicólisis, con la sobreexpresión de genes como lactato deshidrogenasa A (LDHA), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) la sobreexpresión de genes de la vía de la cadena transportadora de electrones y la vía de los ácidos grasos [12].

En nuestro laboratorio se realizó un proyecto donde se analizó el RNA seq de linfocitos T CD4⁺ a nivel basal y después de la activación (Tesis de Doctorado inédita UAEM. Linda Kempis 2022) [16]. En este estudio, se evaluó el transcriptoma de células T CD4⁺ humanas. Los resultados han mostrado diferencias entre las células T CD4⁺ neonatales en comparación con células de adultos, que sobreexpresan genes que se agrupan en vías relacionadas con el metabolismo de la glucosa, la proliferación, péptidos antimicrobianos y el reordenamiento del citoesqueleto. En este análisis, a nivel transcriptómico, se encontró un aumento de genes característicos de la glucólisis aeróbica a nivel basal en los linfocitos T CD4⁺ neonatales (*ver figura 4, panel A*). Las células T CD4⁺ neonatales sobreexpresan el gen del transportador de glucosa tipo 1 (SLC2A1) y genes implicados en la glucólisis (HK1, HK2, LDHA), así como la sobreexpresión del gen transportador de monocarboxilato (SLC16A3), que funciona en la exportación de L-lactato, el cual está altamente expresado en tejidos glicolíticos y anaeróbicos. Al igual, se observó que la sobreexpresión del gen del receptor de insulina (INSR), que codifica para un miembro de la familia de proteínas del receptor tirosina quinasa. Esta preproteína codificada se procesa proteolíticamente para generar subunidades alfa y beta que forman un receptor heterotetramérico. La unión de insulina a este receptor activa la vía de señalización de la insulina, que regula la captación y liberación de glucosa, así como la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas [22].

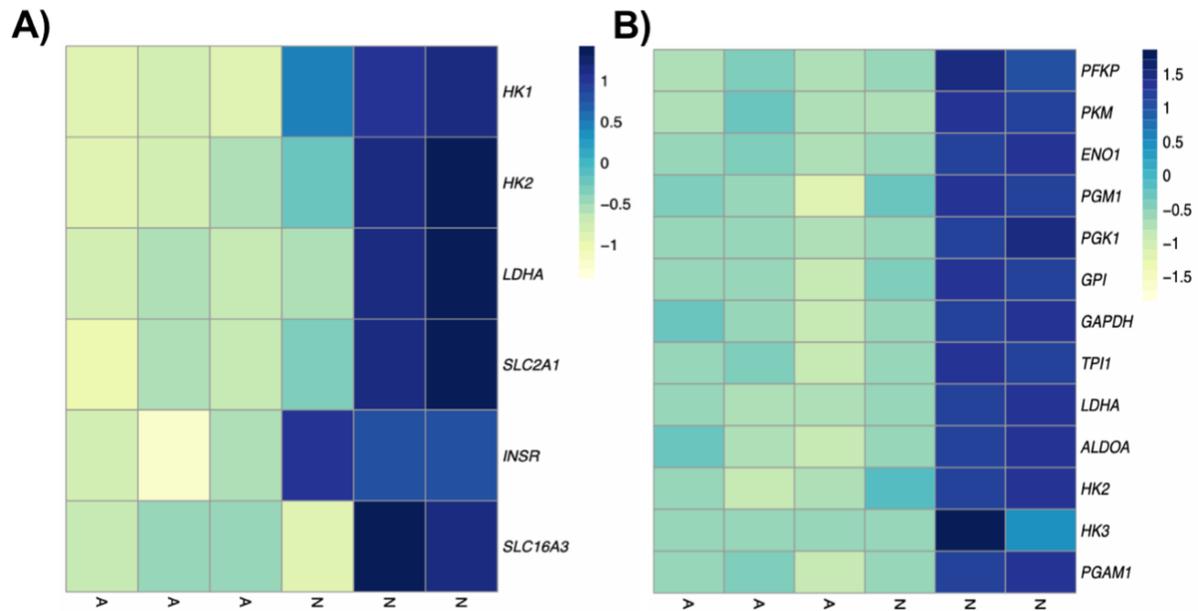


Figura 4. Heatmap de genes expresados. A) Heatmap de genes expresados diferencialmente de cada vía enriquecida en células T CD4 + de adultos y neonatos humanos a nivel basal. B) Heatmap de genes expresados en la comparación de genes activados en neonatos con CD3/CD28 contra genes de adultos activados con CD3/CD28. Figuras tomadas de [16].

En el análisis transcriptómico de linfocitos T CD4⁺, al comparar las células de los neonatos estimulados (CD3/CD28) contra las de los adultos estimulados (CD3/CD28), se pudo observar que en los neonatos hubo aumento en los genes sobreexpresados en la vía de la glucólisis entre ellos el gen GAPDH (*ver figura 4, panel B*). Estos hallazgos podrían indicar un nuevo mecanismo regulador que está involucrado en la glucólisis y que promueve la función de las células T neonatales. En general, el metaboloma de las células T vírgenes está dictado por la regulación postranscripcional de las enzimas metabólicas, lo que resalta la importancia de evaluar la función metabólica y la expresión de receptores importantes de vías metabólicas [23,28].

Estudios recientes han demostrado que la función de la glucólisis aeróbica incluye la diferenciación de células T mediante el aumento en la producción de citocinas a través del control postranscripcional. La expresión de citocinas está regulada a múltiples niveles, incluidos los niveles transcripcional y postranscripcional, durante

la activación de las células T. La formación de un complejo mediante la unión de una enzima metabólica (GAPDH) y el ARN mensajero de citocinas (ARNm) es un mecanismo regulador postranscripcional clave para la producción de citocinas (ver figura 5) [18,28].

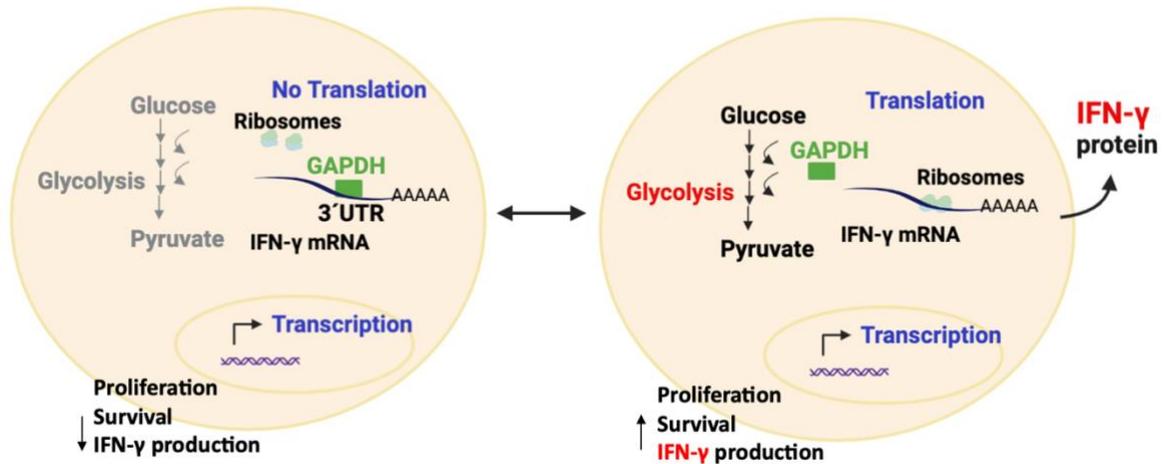


Figura 5. La glucólisis aeróbica es necesaria para la producción óptima de citocinas IFN-γ en las células T. Creado usando biorender.com

Por ejemplo, la enzima glucolítica GAPDH puede unirse a la región no traducida 3'-UTR del ARNm del IFN γ e interleucina 2 (IL-2) en células T CD4⁺ y reducen la producción de citocinas. La activación de las células T incrementa la glucólisis aeróbica, reduce la unión de ARNm de GAPDH y citocinas, para aumentar la producción de citocinas, lo que indica que las enzimas metabólicas tienen el potencial de moldear los fenotipos y las funciones efectoras de las células T.

4. Justificación

Los linfocitos T CD4⁺ son sumamente importantes en la respuesta inmunológica, ya que coordinan la activación de otras células para llevar a cabo la eliminación de los antígenos.

Sabemos por la literatura que existe un cambio metabólico en las células T CD4⁺ de adultos a nivel basal y cuando ya se han activado, estos cambios ocurren de la fosforilación oxidativa a la glicolisis aerobia. Las células neonatales tienen cambios

en la expresión de genes que participan en el metabolismo a nivel basal, pero no sabemos si este cambio llega a nivel de la proteína y cómo cambia el metabolismo después de la activación. La justificación de esta tesis es evaluar a nivel de las proteínas los cambios que se encontraron en el transcriptoma [16] y ver si se traducen en una diferencia en la expresión de receptores, como el receptor de insulina (INSR), el transportador de lactato (MTC4) y el transportador de glucosa (GLUT1) y el consumo de glucosa,

Hasta la fecha se cree que las células neonatales podrían tener un metabolismo glucolítico energético aumentado en los linfocitos T CD4⁺. La caracterización de los procesos bioquímicos intracelulares que regulan la generación y el mantenimiento de células T CD4⁺ vírgenes en neonatos es esencial para comprender sus respuestas inmunitarias. Esto permitirá conocer mejor su activación temprana y contribuir a un mejor manejo de las infecciones en los neonatos y mejores formulaciones de vacunas.

5. Hipótesis

Encontraremos una sobreexpresión de receptores metabólicos, los cuales se encontraron sobreexpresados a nivel de transcriptoma en las células T CD4⁺ neonatales a nivel basal y observaremos cambios en la expresión de estos receptores después de la activación.

6. Objetivos

Objetivo General:

- Evaluar los cambios en la actividad de la vía de la glicolisis durante la activación celular en células T CD4⁺ de neonatos y adultos.

Objetivos particulares:

- Evaluar la expresión de los transportadores de glucosa Glut1, insulina (INSR) y lactato (MCT4) en células T CD4+ de neonatos y adultos humanos a nivel basal y después de la activación.
- Evaluar el consumo de glucosa en células T CD4+ de neonatos y adultos humanos a nivel basal y después de la activación.

7. Metodología

7.1 Purificación de linfocitos, cultivo celular y adherencia de linfocitos T CD4+

Los concentrados de leucocitos se obtuvieron de donantes adultos sanos del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea en Cuernavaca, México, bajo el convenio con la Secretaría de Salud Morelos (CONBIOÉTICA-17-CEI-001-20160329) México. Para la sangre de adulto, se tomaron paquetes leucocitarios de adultos jóvenes de 18 a 25 años, bajo el mismo convenio. Los paquetes leucocitarios se procesaron el día de la colecta en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Las muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por parto natural fueron donados por las madres del hospital General de Temixco, Mor. A las madres donantes se les proporcionó toda la información referente a esta investigación y se les pidió firmar el debido consentimiento informado (*Anexo 1*). La sangre del cordón umbilical se recogió y procesó inmediatamente después del nacimiento y antes de la expulsión de la placenta. Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron consideradas en edades gestacionales de 37 a 41 semanas. La sangre se colectó en tubos estériles con EDTA para evitar la coagulación. El mismo día de la colecta de la sangre, se procedió a hacer la purificación de las Células Mononucleares de Sangre de Cordón Umbilical (CBMC).

La purificación se realizó en varios pasos secuenciales. El primer paso se hizo mediante la separación de las células, con el uso de Lymphoprep™ (STEMCELL), (Anexo 2) el cual 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 un tubo falcon estéril de 50 mL y cuidadosamente se mezcló por inversión. Mientras que en un segundo tubo estéril se tenían 10 mL de Lymphoprep™. Posteriormente se procedió a pasar la muestra de sangre del primer tubo al segundo que contiene Lymphoprep™, sin romper el gradiente. Se centrifugó durante 30 min a 1500 rpm para muestras de adulto y 1400 rpm para muestras neonatales a 20 °C seleccionando tasas de aceleración y desaceleración de 9/0. De dicha separación, se procedió a aislar la interfase que correspondía a las células mononucleares.

Los eritrocitos fueron incubados en medio RPMI⁺ (Gibco) suplementado con L-glutamina, suero fetal bovino y estreptomina de penicilina. Posteriormente se utilizaron 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 1400 rpm para muestras de adulto y 1300 rpm para muestras neonatales por 10 minutos a 20 °C seleccionando tasas de aceleración y desaceleración de 9/9, y se decantó el sobrenadante.

Un procedimiento de adherencia a plástico nos permitió eliminar las células adherentes y los monocitos. Las células mononucleares fueron puestas en medio RPMI suplementado al 5% en cajas de cultivo celular durante toda la noche a 37 °C, 5% de CO₂.

7.2 Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes

Los linfocitos T CD4⁺ se separaron de todas las demás células mononucleadas mediante el uso del RosetteSep™(STEMCELL) por selección negativa.

RosetteSep™ es un coctel de complejos de anticuerpos que reconocen a CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, TCRγ/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 Lymphoprep™ se eliminaron a las células que afuera fueron reconocidas por estos complejos y así se obtuvieron poblaciones de células T CD4⁺ arriba del 95 % de pureza.

Para la eliminación de células de memoria se utilizó la depleción de CD45RO y CD44 (marcadores de células de memoria y efectoras en la sangre de adultos). Esto se realiza mediante el uso de los mAb con anti-CD45RO (TONBO) humano y anti-CD44 (TONBO) humano, que se acoplaron durante toda la noche a perlas magnéticas (20 µl de Protein A/G Magnetic Pierce para adultos) a razón de 3 µg/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. En este paso, las células que estaban unidas a las nanopartículas permanecieron pegadas, mientras que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes pudieron ser recolectados (*Anexo 3*). Las células purificadas se cultivaron en medio RPMI con 5% de suero fetal bovino.

7.3 Estimulación de las células

Las células fueron recuperadas y se realizaron estímulos para el TCR con anticuerpos monoclonales a una concentración de 1 µg/mL. Se utilizaron anticuerpos anti-CD3 (Clon: OKT3 (TONBO)) y anti-CD28 (Clon: CD28.2 (TONBO)) humanos, entrecruzados con un segundo anticuerpo anti-mouse IgG (goat antimouse IgG) (Bioss). El estímulo fue puesto a las células en cultivo, en cajas de cultivo celular de 24 pozos durante 6 horas a 37 °C, 5% de CO₂ (*Anexo 4*).

7.4 Tinción de marcadores en membrana plasmática

Para cada tinción se usaron 2X10⁶ células. Se lavaron las células con 1 mL e PBS y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos. Se tiró el sobrenadante y se

resuspendió en seco. Se agregó el anticuerpo fluorescente de viabilidad (Fixable Violet Dead Cell Stain Kit N. Cat. L34963). Se dejó 30 minutos en frío y en la oscuridad. Después se lavó con 1 mL de PBS y se fijaron las células con 50 µl de paraformaldehído al 1.5% en solución de FACS Juice el cual es PBS con 2% de suero bovino fetal (*Anexo 5*).

7.5 Tinción de kits metabólicos

El kit 2-NBDG es un análogo de la desoxiglucosa con fluorescencia para la detección de glucosa absorbida por células cultivadas. Para determinar la absorción de glucosa, primero se incubaron células con 50 µM de 2-NBDG (2'-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-desoxiglucosa) disuelto. La lectura en el citómetro se realizó minutos después de haber culminado el procedimiento, porque las células no fueron fijadas (*Anexo 7*).

Tabla 1. Tabla de anticuerpos y Kits a utilizar.

Anticuerpos	Marca	#Catálogo
Anti-Glucose Transporter Glut1 Antibody (A-4)	Santacruz	sc-377228
Anti-MCT4 Antibody (D-1)	Santacruz	sc-376140AF488
Anti-INSR/Insulin Receptor β Antibody (CT-3)	Santacruz	sc-57342AF680
Kit experimental	Marca	#Catálogo
2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose)	Invitrogen	N13195

El reactivo 2-NBDG tiene un peso molecular de 342.264 g/mol y contiene 5 µg. La concentración recomendada de este reactivo para trabajar con la línea de células T es de 50 µM con base en lo reportado en diversas investigaciones [30] y lo indicado por el fabricante. El reactivo se disolvió con 292 µL de PBS 1X.

$$M = \frac{g}{PM \times V}$$

$$1 \text{ M} \underline{\hspace{1cm}} 1,000,000 \text{ uM} \quad X = 5 \times 10^{-5} \text{ uM}$$

$$X \underline{\hspace{1cm}} 50 \text{ uM}$$

$$1 \text{ g} \underline{\hspace{1cm}} 1,000,000 \text{ ug} \quad X = 5 \times 10^{-6} \text{ g}$$

$$X \underline{\hspace{1cm}} 5 \text{ ug}$$

$$V = \frac{g}{PM \times M}$$

$$V = \frac{(5 \times 10^{-6} \text{ g})}{(5 \times 10^{-5} \text{ uM}) (342.264 \text{ g/mol})} \longrightarrow V = 2.921 \times 10^{-4} \text{ L}$$

$$1 \text{ L} \underline{\hspace{1cm}} 1,000,000 \text{ uL} \quad X = 292 \text{ uL}$$

$$2.92 \times 10^{-4} \text{ L} \underline{\hspace{1cm}} X$$

7.6 Tinción de proteínas metabólicas intracelulares

Se fijaron las células directamente en medio con Paraformaldehído 1.5.% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en seco. Se agregó 1 mL de Metanol 100% a 4 °C. Se centrifugaron las células a 4500 rpm por 5 min y se retiró el sobrenadante para realizar un lavado con PBS. Se agregó el 1er anticuerpo (se utilizó para la tinción del transportador de lactato el anticuerpo MCT4 (D-1), para la tinción del transportador de glucosa el anticuerpo Glut1(A-4), y para el receptor de insulina el anticuerpo insulín Rβ (CT-3) (*ver tabla 1*) y se incubó durante 30 minutos en frío a 4°C y en oscuridad. Después se lavó con 1 mL de PBS. Finalmente terminamos realizando un último lavado con PBS y se fijaron las células con 50 µL de paraformaldehído al 1.5% en solución de FACS juice (Anexo 6).

7.7 Citometría de flujo

Se analizaron células fijadas y no fijadas en un citómetro de flujo Attune[®] NxT de Invitrogen[™] (Part no. 100024236). Las muestras fueron adquiridas con 5,000 eventos sobre las células de interés, se utilizó compensación de los fluoróforos para restar el solapamiento de los espectros de emisión. La citometría de flujo es una técnica que mide las características físicas (tamaño y granularidad) y químicas (fluoróforos unidos a anticuerpos para detectar proteínas) de una célula en una corriente de flujo conforme un haz de láser incide sobre cada célula.

7.8 Análisis de datos

El programa para adquirir los datos fue Attune[™] NxT Software. El análisis de los datos se llevó a cabo con la ayuda del programa FlowJo v10.0.7. Los valores de fluorescencia obtenidos se analizaron con Microsoft Excel.

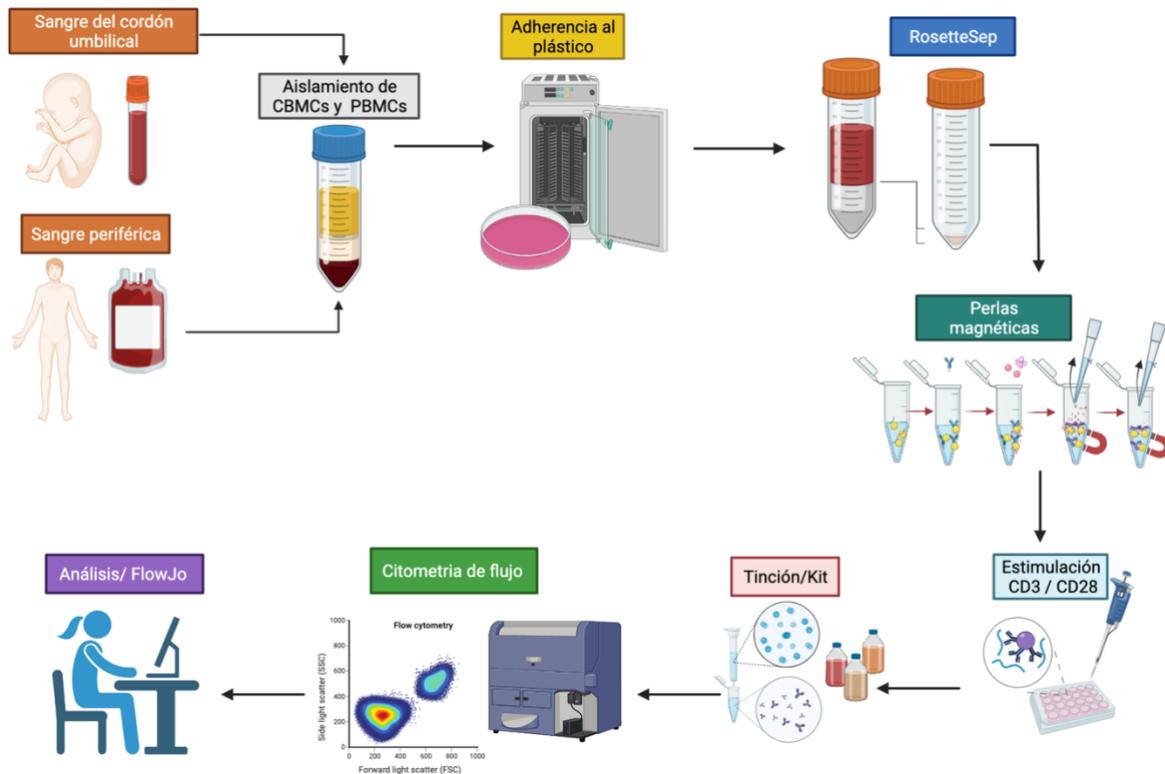


Figura 6. Diagrama experimental general. Creado usando biorender.com

8. Resultados

8.1 Estandarización del kit de ensayo de absorción de glucosa 2-NBDG en PBMC totales de adulto

Para la medición de la absorción de glucosa, se estandarizó un marcador celular llamado 2-NBDG (Invitrogen No cat. N13195), que es un análogo de glucosa fluorescente. Para llevar a cabo la estandarización de este método, fue necesario fijar el tiempo de incubación, la concentración ideal para optimizar la viabilidad celular, así como la concentración del producto.

El reactivo 2-NBDG tiene un peso molecular de 342.264 g/mol y contiene 5 µg. La concentración recomendada de este reactivo para trabajar con la línea de células T es de 50 µM con base en lo reportado en diversas investigaciones [30] y lo indicado por el fabricante. El reactivo se disolvió con 292 µL de PBS 1X. Posteriormente realizamos diluciones de 25, 50 y 100 µM para establecer cual concentración sería la adecuada para trabajar.

$$M = \frac{g}{PM \times V}$$

$$M = \frac{(5 \times 10^{-3} \text{g})}{(342.264 \text{g/mol})(2.92 \times 10^{-5} \text{L})}$$

$$M = 0.05 \text{M}$$

Una vez que se obtuvo la concentración final del reactivo, las PBMC fueron cultivadas en placas petri en medio RPMI⁺ (Gibco). Posteriormente en una placa de 96 pozos con 1x10⁶ células/pozo en 100 µl de medio de cultivo se realizó un estímulo de 24 horas, utilizando los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, entrecruzado con un segundo anticuerpo anti-mouse. Al día siguiente, se realizó una tinción extracelular. Se tiñeron las células con un anticuerpo anti-CD4 APC (APC). Posteriormente, realizamos una tinción intracelular con el compuesto experimental 2-NBDG (FITC) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se utilizaron las concentraciones de 25, 50 y 100 µM (véase figura 7). Se analizó la absorción de glucosa mediante citometría de flujo y los datos se analizaron con el programa FlowJo v10.0.7.

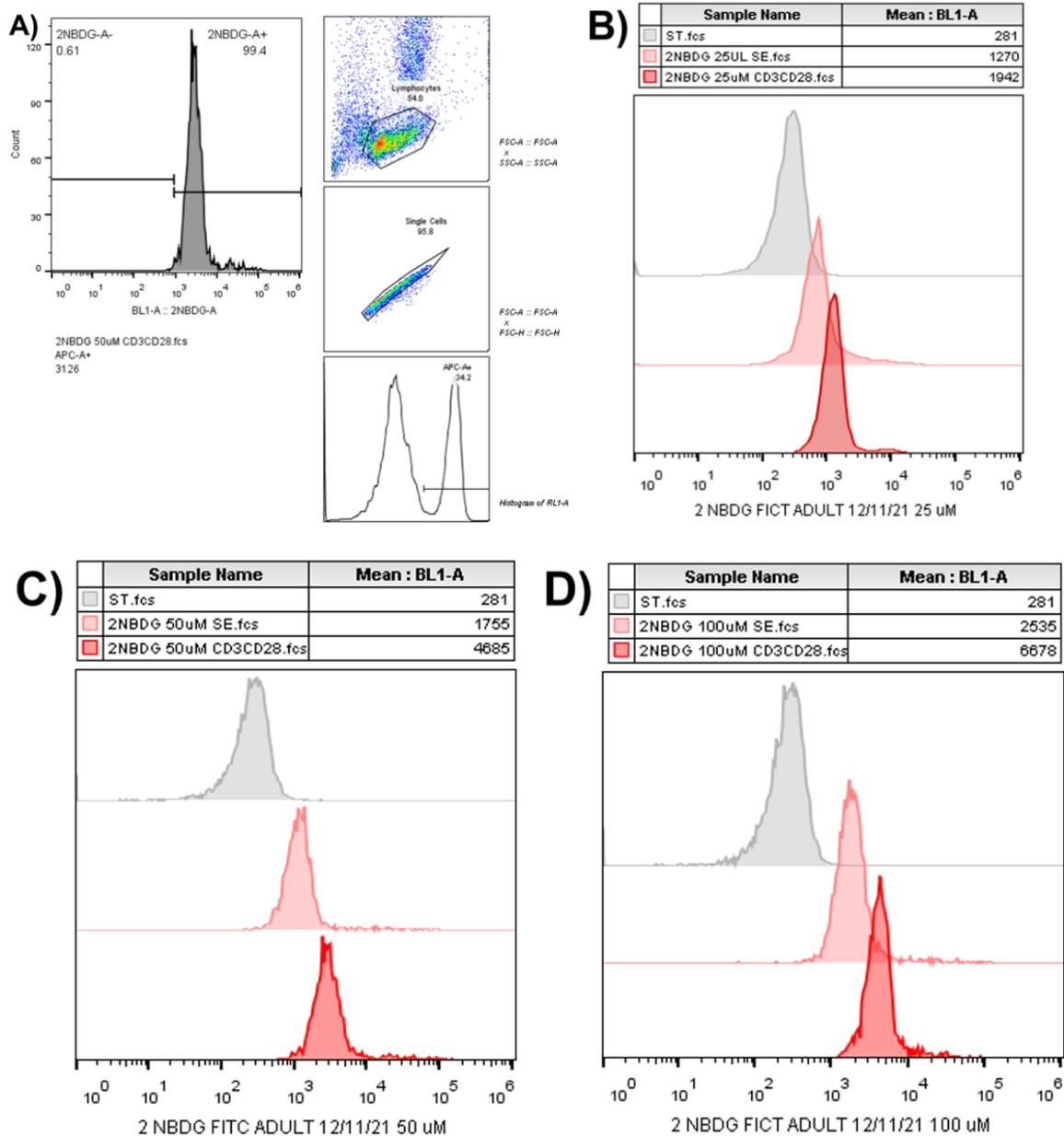


Figura 7. Histogramas a diferentes concentraciones tras la estandarización del kit de consumo de glucosa 2-NBDG. En los 3 histogramas, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

A) Para el análisis tomamos los eventos y se seleccionaron en dispersión frontal y lateral para identificar la población de PBMC y seleccionamos los singletes para identificar células individuales. Después seleccionamos a la población que se tiñó con el anticuerpo CD4 APC+ y sobre esta población volvimos a seleccionar las células positivas que se tiñeron con el compuesto experimental 2-NBDG (2NBDG-A+).

B) Se muestra en color gris la muestra sin teñir (ST), en color rojo bajo la muestra sin estímulo y en color rojo fuerte la muestra estimulada (CD3 CD28) a una concentración de 25 μ M.

C) Se muestra en color gris la muestra sin teñir (ST), en color rojo bajo la muestra sin estímulo y en color rojo fuerte la muestra estimulada (CD3 CD28) a una concentración de 50 μ M.

D) Se muestra en color gris la muestra sin teñir (ST), en color rojo bajo la muestra sin estímulo y en color rojo fuerte la muestra estimulada (CD3 CD28) a una concentración de 100 μ M.

$$SI = \frac{(\text{Med población}+) - (\text{Med población}-)}{2 (\text{desviación estándar de población -})}$$

El índice de tinción nos habla que tanto se dispersa la población negativa. El índice de tinción es igual al cociente entre la mediana (intensidad media de fluorescencia de la población positiva) menos la mediana (intensidad media la población negativa) sobre dos veces la desviación estandar de la población negativa (intensidad media la población negativa).

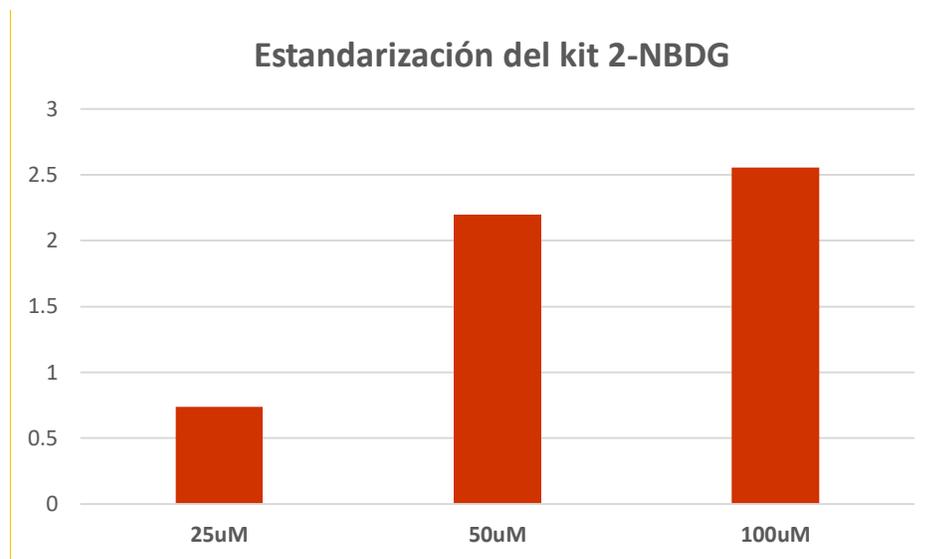


Figura 8. Índice de tinción del kit de estandarización 2NBDG. Se muestra la representación gráfica de los diferentes niveles de concentración del kit 2-NBDG en tres experimentos dependientes de células PBMC totales tras un estímulo de 24 horas.

Se determinó que 50 μ M de 2-NBDG era la concentración óptima media ideal (índice de tinción) para trabajar, ya que una concentración baja nos daría poca señal y una alta señal causaría sesgo (véase la figura 7 C y figura 8).

8.2 Purificación de linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ se separaron de todas las demás células mononucleadas mediante el uso de RosetteSep por selección negativa. Se purificaron linfocitos T

CD4⁺ a partir de sangre periférica de donadores sanos. Se lograron obtener linfocitos T CD4⁺ con una pureza superior al 95%. La pureza de la población obtenida se verificó mediante las tinciones de membrana para CD3 y CD4, usando anticuerpos monoclonales anti-CD3-PE y anti-CD4-APC. En la figura 7 se muestra un ejemplo representativo de purificación de este tipo celular.

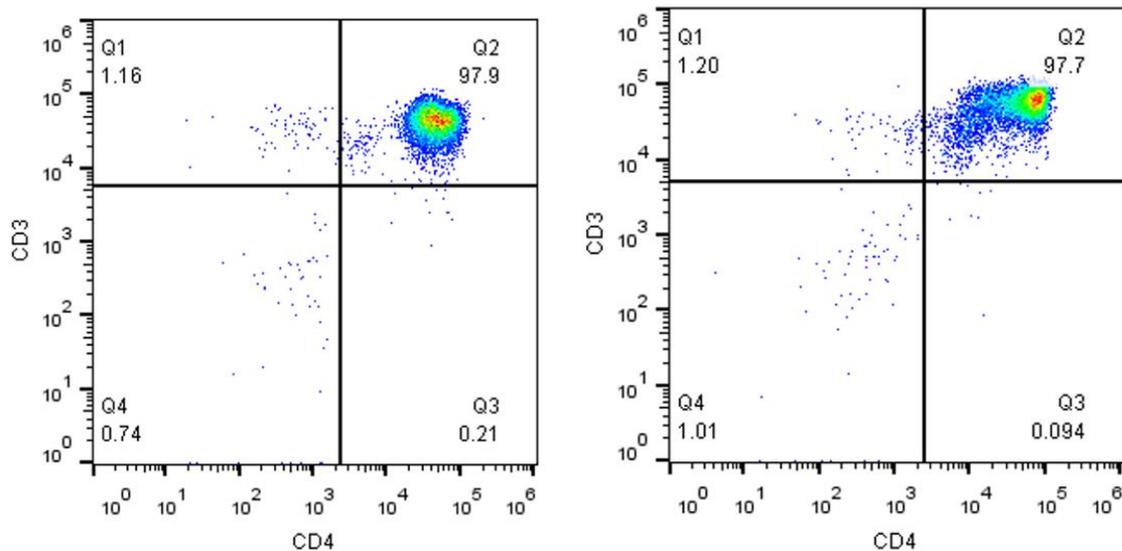


Figura 9. Purificación de linfocitos T CD4 en adultos humanos. Se muestran dos experimentos independientes en linfocitos T CD4 ambos en adultos.

Para verificar la pureza de cada muestra obtenida, se utilizó la técnica de citometría de flujo, logrando tener purezas de arriba del 95% realizándose tinciones para CD3 y CD4 usando anticuerpos monoclonales anti-CD3-PE y anti-CD4 APC. En el eje X se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula CD4, y el eje Y se muestra el porcentaje de las células que se expresa en la molécula CD3. El porcentaje de pureza se obtiene de las células que expresan ambas moléculas en el cuadrante Q2 (dobles positivas).

8.3 Obtención de células T CD4⁺ vírgenes

Una vez obtenida la población de linfocitos T CD4⁺ totales se eliminaron los linfocitos de memoria mediante el uso de perlas magnéticas acopladas a CD45RO y a CD44.

Para medir la eficiencia con la que se eliminaron los linfocitos de memoria fueron marcados con anticuerpo anti-CD45RO (FITC). En la figura 9 se muestra la expresión de CD45RO en células de memoria (CD45ROm) en comparación con las células naïve ó vírgenes (CD45ROv).

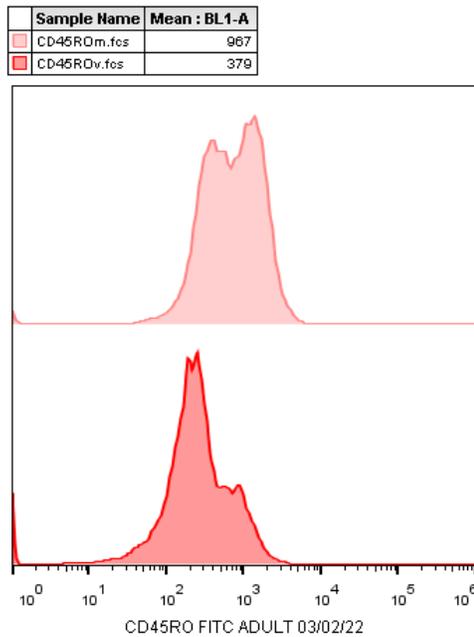


Figura 9. Expresión de CD45RO. En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad. La molécula CD45 es un antígeno de diferenciación, del que se conocen diferentes isoformas que permiten caracterizar subtipos de linfocitos T funcionalmente diferentes. La isoforma CD45RO la expresan las células T denominadas células de memoria que han sido previamente activadas. En el histograma se muestra en color rojo claro la población CD45RO de linfocitos CD4 de memoria y la población CD45RO positiva en linfocitos CD4 vírgenes se muestra en el histograma rojo intenso.

8.4 Marcador de activación de células T CD4⁺ vírgenes

Se verificó que las células T no estuvieran activadas antes del procedimiento experimental. Los linfocitos T CD4⁺ se tiñeron con el marcador de activación CD69.

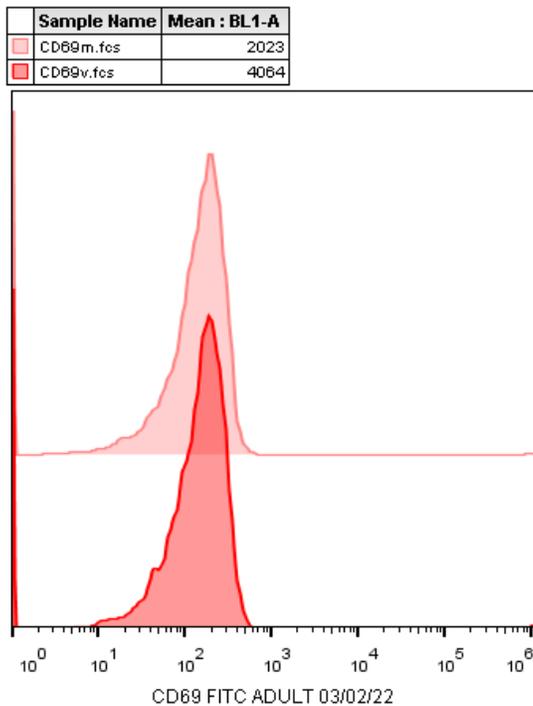


Figura 10. Expresión de CD69 en membrana como marcador de activación en linfocitos T CD4 de adultos. En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

CD69 es un receptor de membrana expresado en leucocitos, considerado en general como marcador de activación. En linfocitos se induce su expresión en pocas horas, como en linfocitos T tras estimulación.

En el histograma se muestra en color rojo claro la población CD69 de linfocitos CD4⁺ totales y la población CD69 de linfocitos CD4⁺ naïve se muestra en el histograma rojo intenso. Se muestra que ambas poblaciones marcadas con CD69 en el lado izquierdo (negativo), corroborando que las células T de memoria y naïve no se activaron antes de realizar el experimento.

Seguido de esto procedimos a realizar un estímulo para el TCR con un tiempo de incubación 6 horas basándonos en el *transcriptoma a nivel basal y estimulado en neonatos y adultos humanos* que es el antecedente directo de esta tesis [16].

8.5 Expresión de marcadores metabólicos en células PBMC de adultos

Se intentó medir a los marcadores metabólicos en las células T CD4⁺ purificadas, pero no lo logramos (resultados no mostrados), por lo que decidimos trabajar con PBMC vírgenes, para medir la expresión de los marcadores metabólicos.

Determinamos la expresión de los marcadores de genes que ya se había visto que estaban sobreexpresados a nivel basal y se mantenía una mayor expresión que en las células de adulto ambas activadas por 6 horas, a nivel transcripcional. Se determino la expresión del transportador de glucosa (Glut1, Santacruz No cta. sc-377228), el receptor de insulina (INSR, Santacruz No cta. sc-57342) y el transportador de lactato (MCT4, Santacruz No cat. sc-376140) en células PBMC de adultos y células CBMC de neonatos.

Para determinar la expresión de estos marcadores metabólicos se diluyeron los reactivos con el fin de optimizar el consumo del producto, aumentar la sensibilidad del ensayo y disminuir el sesgo generado por uniones no específicas. La concentración inicial de estos anticuerpos es de 200 µg/mL.

Los marcadores GLUT1 y INSR (AlexaFluor 790) se midieron con anticuerpos a una concentración final de 4 µg/ml y de 20 µg/ml.

La metodología que se realizó para la expresión de los marcadores se esquema en la figura 11.



Figura 11. Diagrama experimental en células PBMC para la expresión de los marcadores metabólicos. Creado usando biorender.com

En las figuras 12 y 13 se muestran los resultados de la expresión de estos tres marcadores metabólicos tras el estímulo de 6 horas en las células PMBC. Se muestra la representación gráfica de los diferentes niveles de expresión de los transportadores de glucosa (GLUT1), lactato (MCT4) y el receptor de insulina (INSR) en dos experimentos de células PBMC. El cambio o la normalización con su basal es la división de la muestra estimulada sobre la muestra sin teñir "ES/SE", nos indica cuantas veces aumento la muestra de interés, la muestra que tenía el estímulo en

comparación con valores de intensidad media de fluorescencia que se tenía a nivel basal tras el estímulo (véase la figura 13). Sólo en una muestra de células de adultos se vió un aumento en la expresión del receptor de insulina (véase la figura 13). Es posible que este tiempo de estimulación fue corto para poder medir la expresión de estas moléculas.

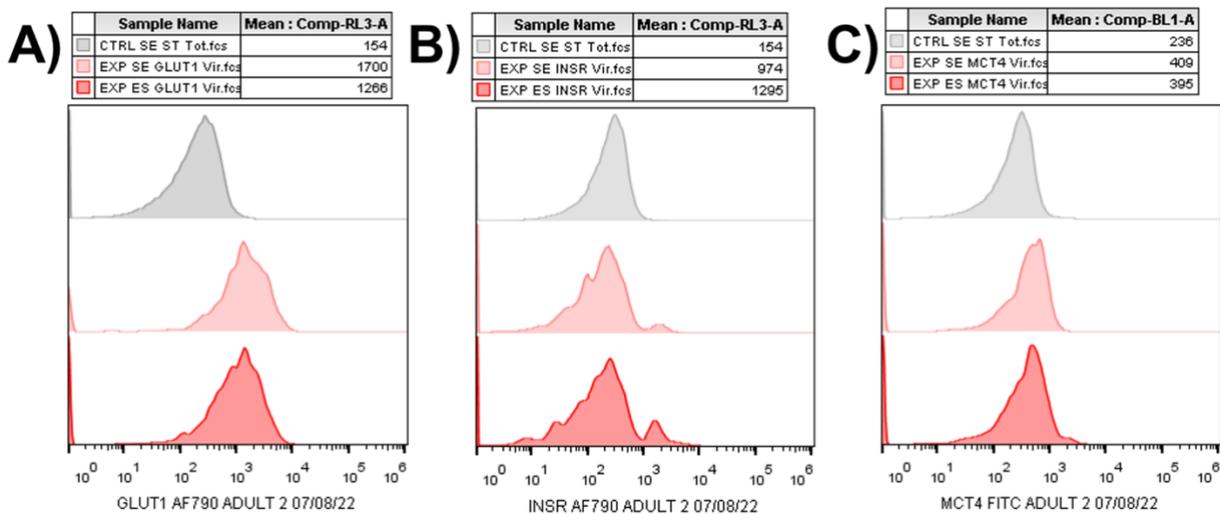


Figura 12. Histogramas de los marcadores metabólicos en células PBMC de adultos.

En los 3 histogramas, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

A) Expresión del transportador de glucosa (GLUT1) en células PBMC a 6 horas de estimulación. Se muestra en color gris la muestra sin teñir, en color rojo claro la muestra sin estimular y la muestra estimulada se muestra en color rojo intenso.

B) Expresión del receptor de insulina (INSR) en células PBMC a 6 horas de estimulación. Se muestra en color gris la muestra sin teñir, en color rojo claro la muestra sin estimular y la muestra estimulada se muestra en color rojo intenso.

C) Expresión del transportador de lactato (MCT4) en células PBMC a 6 horas de estimulación. Se muestra en color gris la muestra sin teñir, en color rojo claro la muestra sin estimular y la muestra estimulada se muestra en color rojo intenso.

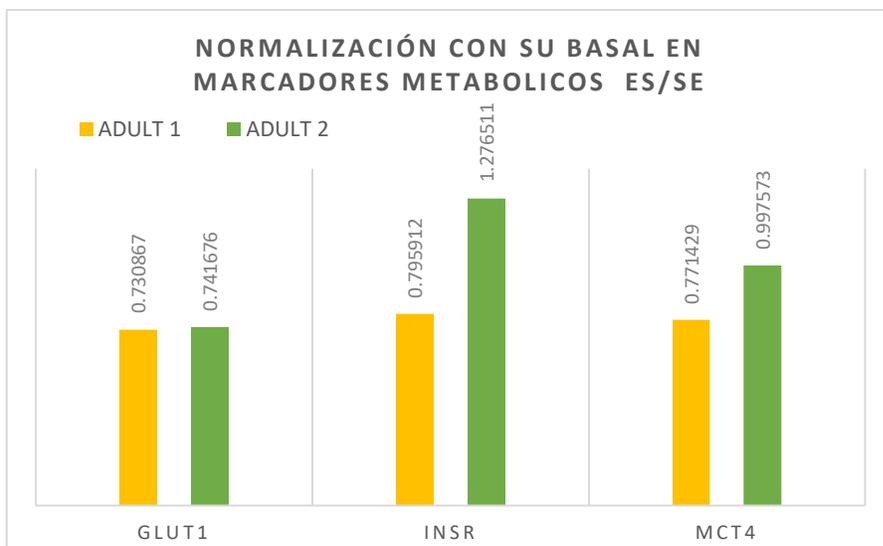


Figura 13. Analisis de expresión del cambio en la normalización con su basal de los distintos marcadores metabolicos en dos experimentos independientes en células PBMC tras el estímulo de 6 h.

Se muestra la representación gráfica de los diferentes niveles de expresión de los trasportadores de glucosa (GLUT1), lactato (MCT4) y el receptor de insulina (INSR) en dos experimentos de células PBMC.

Los números representan el nivel de fluorescencia de las células estimuladas con respecto al control.

8.6 Expresión de marcadores metabolicos en CBMC de neonatos

Los siguientes experimentos fueron realizados en células CBMC. La metodologia que se realizó para la expresión de los marcadores se muestra en la figura 14.

Inicialmente se midió la expresión de los tres marcadores metabólicos a 6 horas de estimulación (*véase la figura 15*). Se muestra la representación gráfica de los diferentes niveles de expresión de los trasportadores de glucosa (GLUT1), lactato (MCT4) y el receptor de insulina (INSR) en tres experimentos de células CBMC tras un estímulo de 6 h. Se puede observar un ligero incremento en el receptor de insulina y el transportador de lactato (*véase la figura 16*).

En vista del resultado anterior, repetimos la medición de la expresión de estas tres moléculas a las 48 h de estimulación. Las muestras fueron normalizadas con su muestra correspondiente pero a nivel basal.

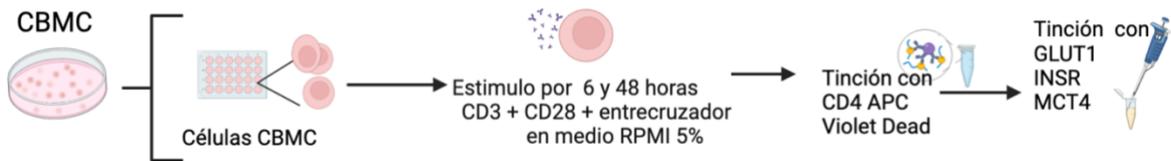


Figura 14. Diagrama experimental en células CBMC para la expresión de los marcadores metabólicos. Creado usando biorender.com

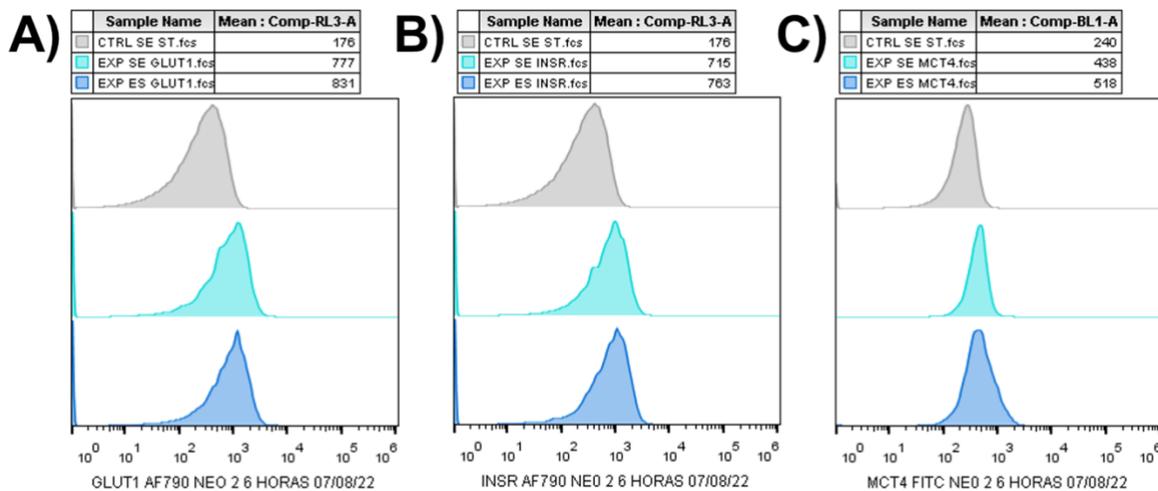


Figura 15. Histogramas de los marcadores metabólicos enCBMC de neonatos.

En los 3 histogramas, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

A) Expresión del transportador de glucosa (GLUT1) en células CBMC a 6 horas de estimulación. Se muestra en color gris la muestra sin teñir, en color azul claro la muestra sin estimular y la muestra estimulada se muestra en color azul intenso.

B) Expresión del receptor de insulina (INSR) en células CBMC a 6 horas de estimulación. Se muestra en color gris la muestra sin teñir, en color azul claro la muestra sin estimular y la muestra estimulada se muestra en color azul intenso.

C) Expresión del transportador de lactato (MCT4) en CBMC a 6 horas de estimulación. Se muestra en color gris la muestra sin teñir, en color azul claro la muestra sin estimular y la muestra estimulada se muestra en color azul intenso.

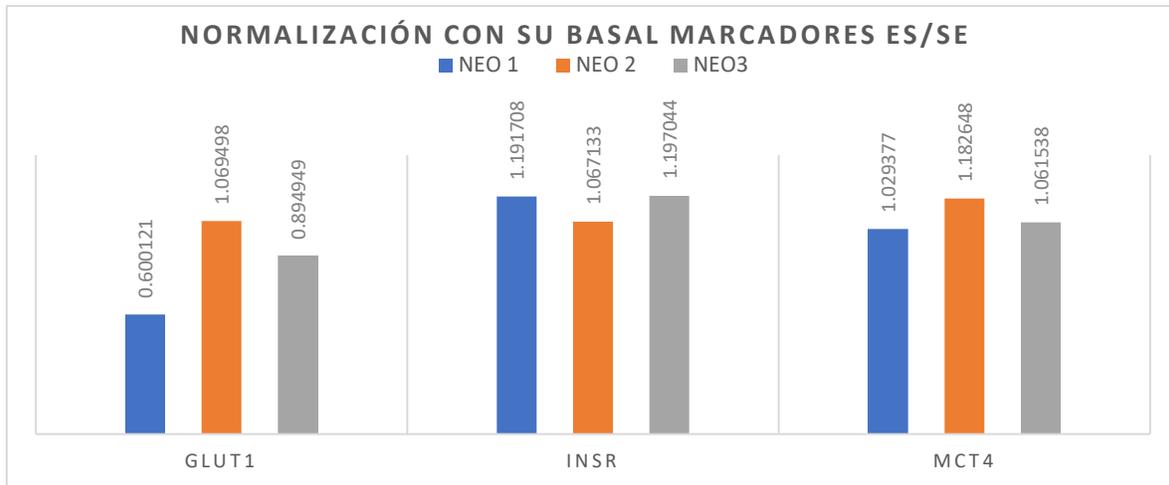


Figura 16. Analisis de expresión del cambio en la normalización con su basal de los distintos marcadores metabolicos en tres experimentos independientes en células CBMC tras el estímulo de 6 horas.

Se muestra la representación gráfica de los diferentes niveles de expresión de los transportadores de glucosa (GLUT1), lactato (MCT4) y el receptor de insulina (INSR) en tres experimentos de células CBMC. Los números representan el nivel de fluorescencia de las células estimuladas con respecto al control.

Tras el estímulo, la expresión de las muestras estimuladas se ven ligeramente desplazadas a la derecha (véase la figura 17). En los valores de normalización con su basal se ve reflejado un cambio en los tres marcadores, el cambio mas notable se observo en la muestra del neonato 2 en el transportador de lactato (véase la figura 18), pero en todos los marcadores hubo un incremento en su expresión.

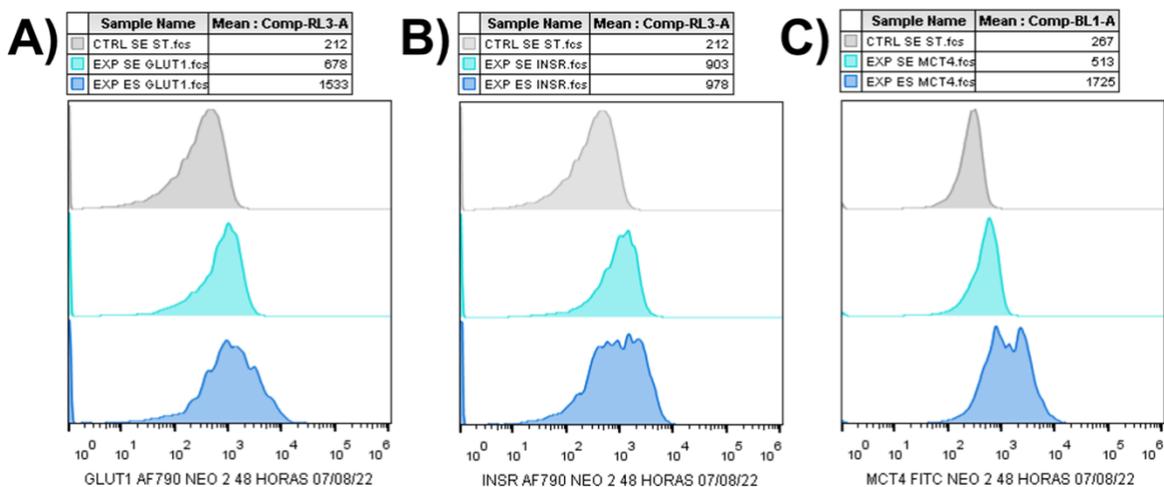


Figura 17. Histogramas de los marcadores metabolicos en células CBMC de neonatos.

En los 3 histogramas, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

- A) Expresión del transportador de glucosa (GLUT1) en células CBMC a 48 h de estimulación.
- B) Expresión del receptor de insulina (INSR) en CBMC a 48 h de estimulación.
- C) Expresión del transportador de lactato (MCT4) en CBMC a 48 h de estimulación.

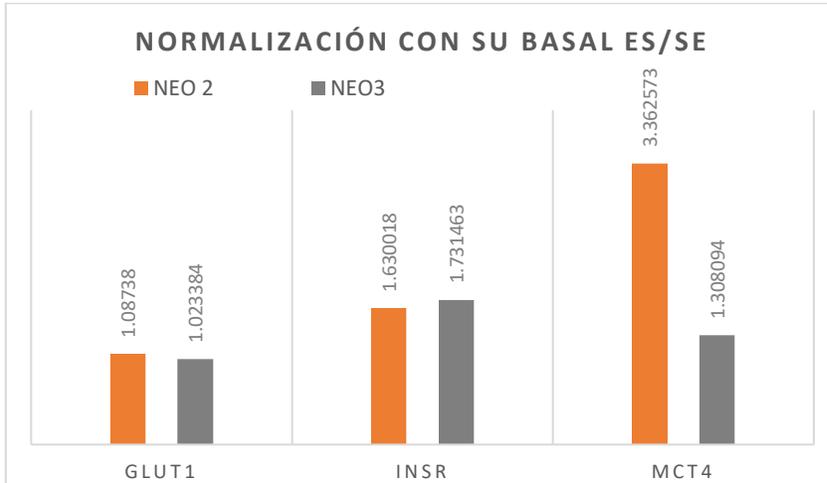


Figura 18. Analisis de expresión del cambio en la normalización con su basal en distintos marcadores metabolicos en dos experimentos independientes en CBMC tras el estímulo de 48 h. Se muestra la representación gráfica de los diferentes niveles de expresión de los trasportadores de glucosa (GLUT1), lactato (MCT4) y el receptor de insulina (INSR) en dos experimentos de CBMC.

8.6.1 Comparación de expresión de los marcadores metabolicos en células PBMC vs CBMC

En la figura 19 observamos la comparación de las muestras a nivel basal o estimuladas a 6 h en comparación con las muestras sin estimular. Se observó una enorme dispersión de los datos en el nivel medio de fluorescencia, tanto en células de adulto como de neonato. Esto posiblemente fue un error técnico, ya que se hicieron las determinaciones de cada muestra en distintos días y posiblemente hubo errores de pipeteo o en los parámetros del citómetro. Se tendrán que repetir estos experimentos, tomando para cada medición del citómetro una muestra de adulto y de neonato y cuidando tanto el pipeteo y la dilución de los anticuerpos como los ajustes del citómetro.

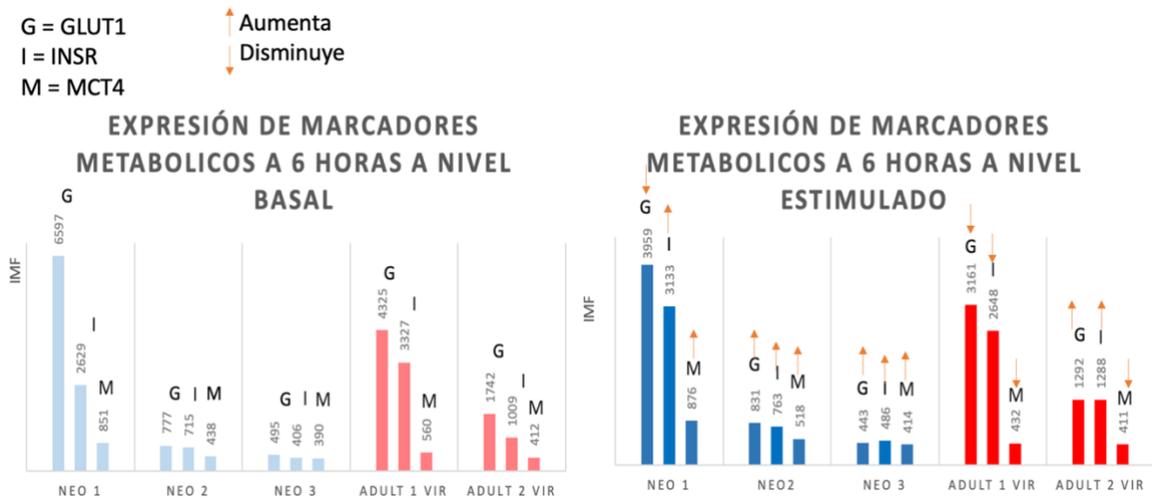


Figura 19. Analisis de expresión de los distintos marcadores metabolicos en células PBMC y CBMC a nivel basal y después del estímulo de 6 h.

En la figura 20 se muestran los distintos marcadores metabolicos, en células estimuladas en comparación con las muestras sin estimular o a nivel basal, vemos que tras el estímulo de 48 h en las células CBMC (*NEO 2* y *NEO 3*) la expresión de los marcadores se ve aumentada en ambas muestras, pero la mayor expresión se ve reflejada en en neonato 2.

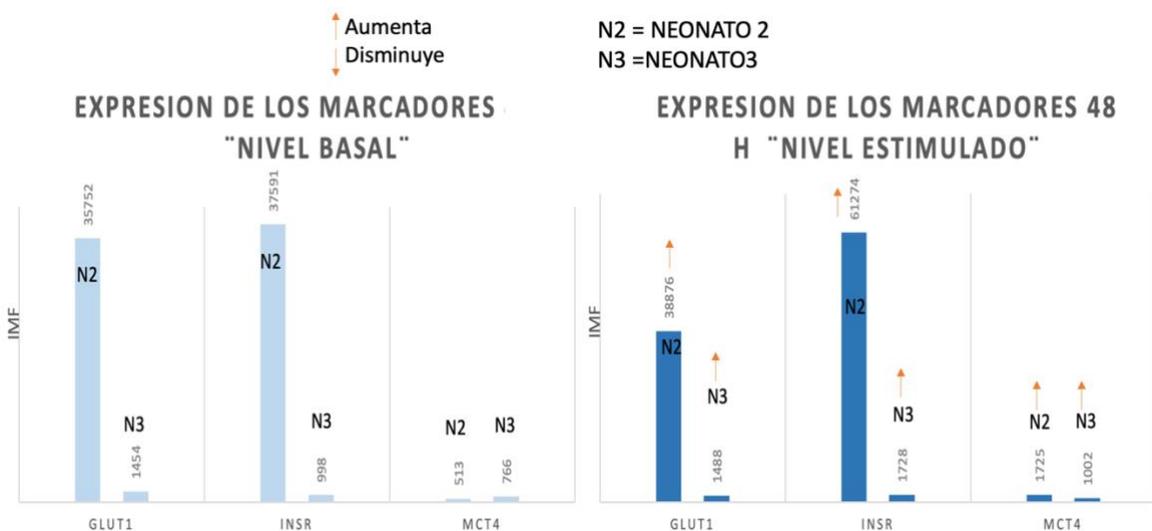


Figura 20. Analisis de expresión de los distintos marcadores metabolicos en células CBMC en dos experimentos independientes a nivel basal y después del estímulo de 48 h.

8.7 Puesta a punto de la técnica para medir absorción de glucosa en células T CD4⁺ y PBMCs vírgenes en adultos

Después de la obtención de los linfocitos T CD4⁺ procedimos a realizar un estímulo para el TCR.

La estimulación se realizó utilizando anticuerpos monoclonales a una concentración de 1 µg/mL. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 humanos, que fueron entrecruzados con un segundo anticuerpo anti-mouse IgG. El estímulo fue puesto en medio RPMI⁺ 5% suplementado en cajas de celular de 24 pozos durante 6 horas a 37 °C, 5% de CO₂.

Una vez que el estímulo cumplió el tiempo de incubación se realizó la tinción con el reactivo experimental 2-NBDG para medir el consumo de glucosa en células T CD4⁺ de adultos (véase figura 21 A)).

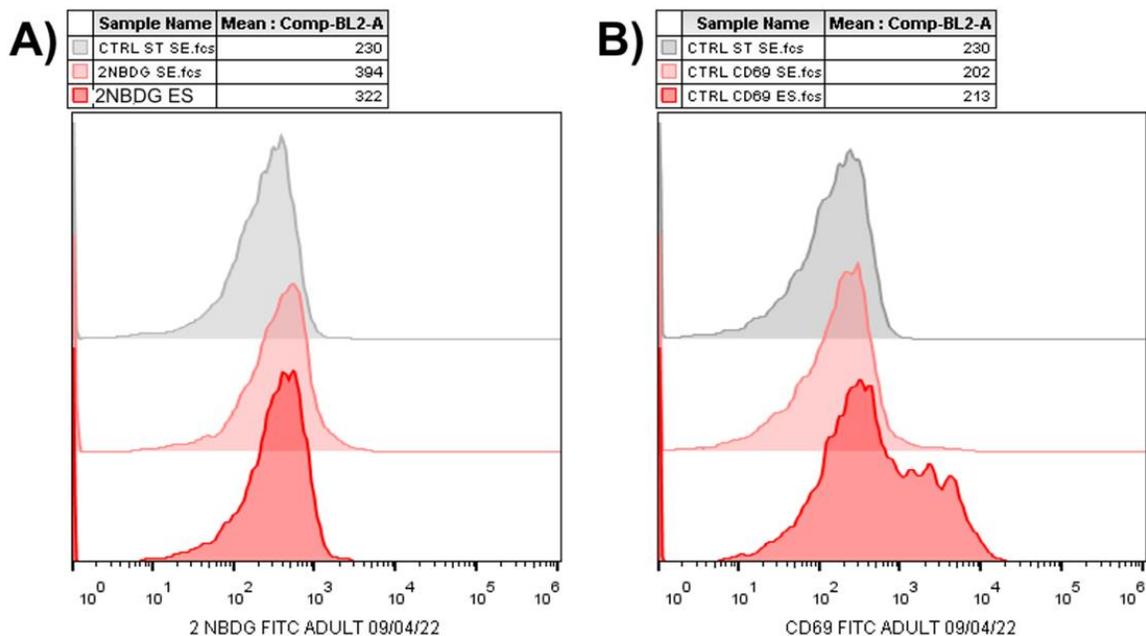


Figura 21. Consumo de glucosa a 6 horas de estimulación y expresión de CD69 en linfocitos T CD4 en adultos.

En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

A) Se muestra en color gris la muestra sin teñir (ST), en color rojo bajo la muestra sin estimular y en color rojo fuerte se muestra la muestra estimulada. Tras el estímulo de 6 horas, la expresión de 2NBDG no muestra una mayor la absorción de glucosa en linfocitos T CD4 a comparación de la muestra sin estimular (en color rojo bajo).

B) Se muestra en color gris el control sin teñir (ST), en color rojo claro el control sin estimular y en color rojo fuerte se muestra el control estimulado. La expresión del marcador de activación CD69 del

lado derecho del eje X (marcado en color rojo intenso) nos asegura que tras el estímulo las células si fueron activadas exitosamente.

En la figura 21 A, podemos observar que tras el estímulo de 6 horas, la expresión de 2NBDG no mostró una mayor la absorción de glucosa en linfocitos T CD4⁺ en comparación de la muestra sin estimular (en color rojo bajo). Por otro lado, la expresión del marcador de activación CD69 del lado derecho del eje X (marcado en color rojo fuerte) nos asegura que tras el estímulo las células si fueron activadas exitosamente.

Como no se observó ningún cambio en la absorción de glucosa tras el estímulo de 6 horas, cambiamos el tiempo de estimulación a 24 horas.

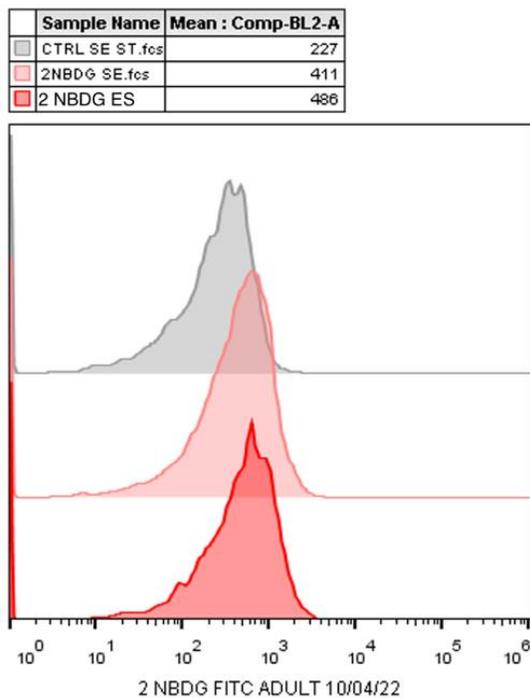


Figura 22. Consumo de glucosa a 24 horas de estimulación en linfocitos T CD4⁺ en adultos. En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

La expresión del reactivo experimental 2NBDG en linfocitos T CD4⁺ en adultos a 24 h de estimulación

Se observa en la figura 22 que nuevamente no ocurrió ningún cambio entre la muestra a nivel basal (2NBDG SE en color rojo claro) en comparación con la muestra activada (2NBDG ES en color rojo intenso).

Sabemos que las células T tras el estímulo requieren una mayor demanda de glucosa durante la proliferación. Según la literatura, la captación de glucosa aumenta de 16 a 72 horas después de la estimulación en las células T [31]. Debido a que se presentaron problemas técnicos como la manipulación en la obtención de las células T CD4⁺ de adultos, decidimos trabajar solo con PBMC totales que aún conservaron memoria y PBMC naïve las cuales ya no poseían memoria, de igual forma cambiamos la metodología y experimentamos diferentes tiempos para encontrar un tiempo óptimo o final con el cual pudiéramos establecer nuestro modelo.

Para el medio RPMI, se decidió llevarlo a una concentración mas alta con SFB al 10%, porque por medio de la literatura donde utilizaron este reactivo experimental utilizaron un medio “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) (+) con la adición de 10% de glucosa” [32] entonces al no contar con ese tipo de medio se decidió por sustituir ese medio con la adición del 10% de SFB al medio RPMI y sobre éste fue puesto el estímulo de 48 y 72 h en incubación. Tras finalizar el estímulo el medio fue removido y la muestra de interés fue lavada con PBS 1X para asegurar la eliminación del medio de glucosa.

Los tiempos utilizados fueron de 48 y 72 h de estimulación, y con el fin de absorber efectivamente 2-NBDG, las células deben tener una restricción o ayuno (el tiempo de ayuno se puede definir como la cantidad de tiempo que las células se incuban sin nutrientes, por ejemplo: glucosa) en medios que no contienen glucosa, ya que por medio de la literatura entendimos que la adición de suero a los medios libres de glucosa aumentan la absorción del reactivo 2-NBDG [32]. Investigaciones sobre el reactivo 2-NBDG han demostrado que la adición de 5% de SBF aumenta la viabilidad celular mientras se ayunan las células en medios libres de glucosa [30].

Las células se colocaron en la incubadora durante diferentes tiempos de ayuno entre 30 y 120 minutos, el medio o la solución de ayuno fue FACS Juice, el cual es PBS con suero bovino fetal pero llevándolo ahora a una concentración del 5% y no del 2%.

Seguido de esto se marcó con el 1er anticuerpo fluorescente que es CD4 APC (Clone: OKT4 (TONBO)) junto con un anticuerpo de viabilidad (Fixable Violet Dead Cell Stain Kit). Se dejó 30 minutos en frío y en la oscuridad. Después se lavó con 1 mL de PBS, para finalmente realizar una tinción intracelular con el reactivo experimental 2-NBDG.

El cambio de metodología se realizó como se esquema en la figura 23.

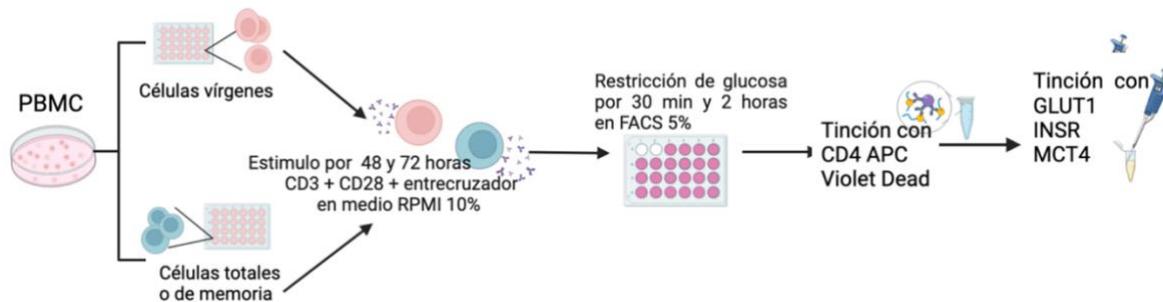


Figura 23. Diagrama experimental de restricción de glucosa y cambio de medio con mayor concentración de suero bovino fetal. Creado usando biorender.com

Antes de realizar el experimento de consumo de glucosa en células PBMC naïve, dispusimos de un control CD45RO para medir que a las células si se les elimino la memoria (véase la figura 24).

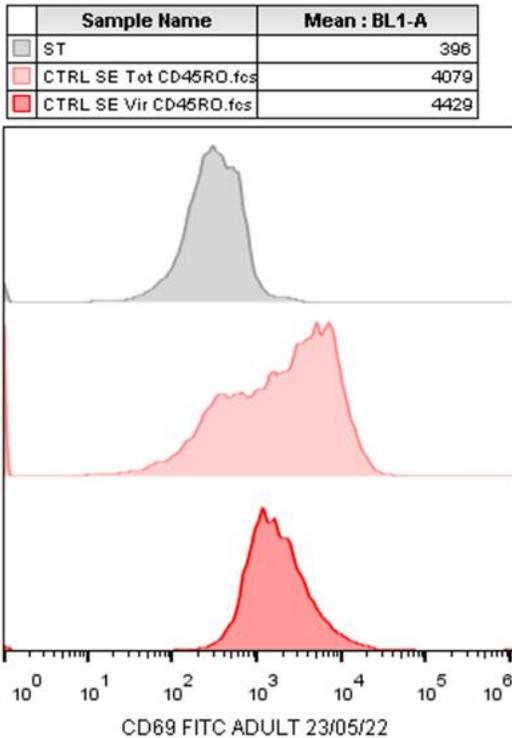


Figura 24. Expresión de CD45RO en células PBMC de adultos. En el histograma se muestra en color rojo claro la población CD45RO de PBMC de memoria y la población CD45RO positiva en PBMC naïve se muestra en el histograma rojo intenso.

Seguido de esto, nuevamente realizamos estímulos para el TCR pero ahora en PBMC con memoria y sin memoria y los tiempos de incubación fueron de 72 h. En este punto determinamos un tiempo de ayuno o restricción de glucosa de 30 minutos y 2 horas para observar un cambio en la captación de glucosa. Seguido de esto procedimos a realizar la tinción con el reactivo experimental 2-NBDG para medir el consumo de glucosa (*véase figura 25 y figura 26*).

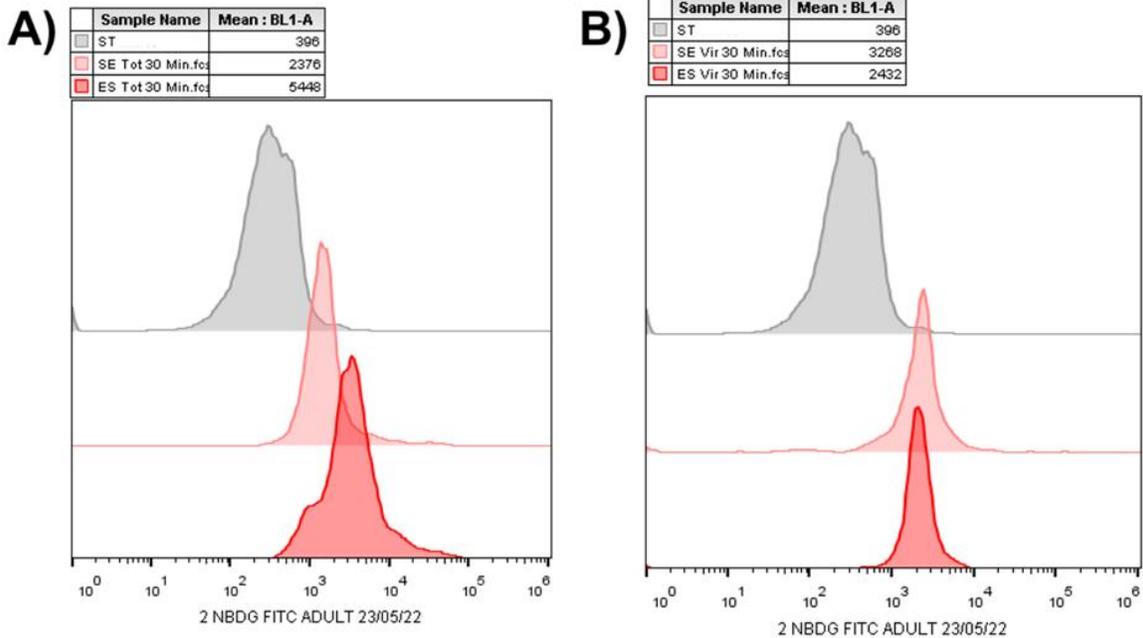


Figura 25. Consumo de glucosa a 72 horas de estimulación en células PBMC totales y vírgenes tras un ayuno de glucosa de 30 minutos en medio FACS 5%.

En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

A) Absorción de 2NBDG en células PBMC totales o con memoria de adultos a 72 horas de estimulación con restricción de glucosa por 30 minutos.

B) Absorción de 2NBDG en células PBMC naïve o sin memoria de adultos a 72 horas de estimulación con restricción de glucosa por 30 minutos.

La captación de glucosa en PBMC totales estimuladas durante 72 h con una restricción de glucosa por 30 minutos mostraron una captación más alta que las células naïve (véase figura 25 A y figura 26 A).

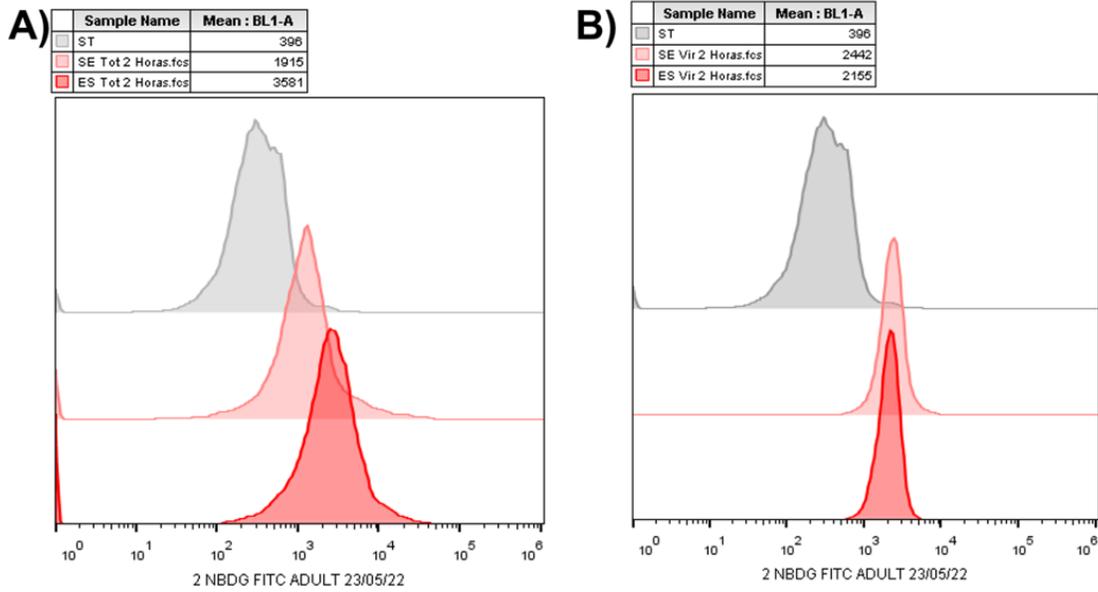


Figura 26. Consumo de glucosa a 72 horas de estimulación en células totales y células vírgenes tras un ayuno de 2 horas en medio FACS 5%. En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad. A) Absorción de 2NBDG en células PBMC totales o con memoria de adultos a 72 horas de estimulación con restricción de glucosa por 120 minutos. B) Absorción de 2NBDG en células PBMC vírgenes o sin memoria de adultos a 72 horas de estimulación con restricción de glucosa por 120 minutos.

No se observó un cambio significativo en la captación de glucosa en PBMC naïve con ayuno de 30 minutos y 2 h, el cambio fue más notable en PBMC totales en ambos tiempos de ayuno.

Por los valores de intensidad media de fluorescencia de la figura 25 de los paneles A y B, en comparación de los valores de intensidad media de fluorescencia de la figura 26 de los paneles A y B son más bajos en esta última figura, las células no estaban expresando una mayor captación de glucosa a las 2 h de restricción, así que decidimos avanzar tomando en cuenta un tiempo de 30 minutos de ayuno como un control positivo en PBMC en células naïve y células totales, a partir de este punto empezariamos a realizar el experimento con 30 minutos de restricción de glucosa.

Observamos que a 72 horas existía un aumento en el consumo de glucosa pero aún así decidimos que sería favorable realizar el estímulo a 48 h para tener un tiempo determinado para los próximos experimentos, así que decidimos realizar un

experimento a 48 h bajo la misma condición de 30 minutos de restricción de glucosa en PBMC naïve y totales (véase figura 27 A y B).

Vemos en la Figura 27 que tras el estímulo de 48 h en PBMC totales y naïve la absorción de glucosa se ve aumentada y los valores de intensidad media de fluorescencia son mayores en las muestras estimuladas, a partir de este punto se decidió para los siguientes experimentos utilizar 48 h para el estímulo y 30 minutos de ayuno. Una vez que determinamos los tiempos de estimulación y ayuno nos dispusimos a replicar estos resultados en CBMC.

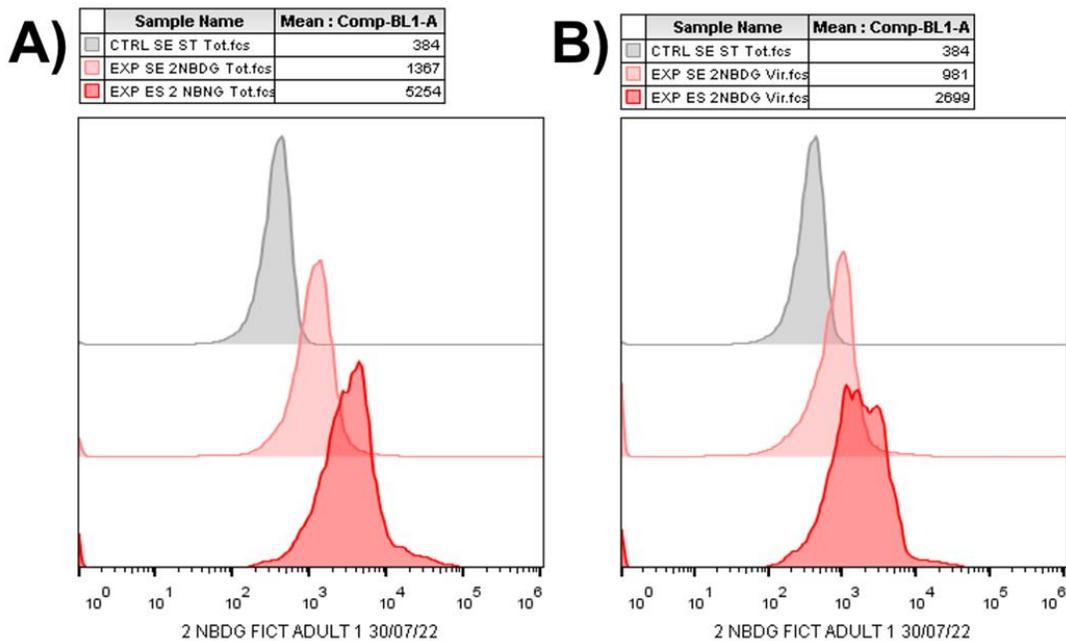


Figura 27. Consumo de glucosa a 48 horas de estimulación en células totales y células vírgenes tras un ayuno de 30 minutos en medio FACS 5%.

En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

A) Absorción de 2NBDG en células PBMC vírgenes o sin memoria tras 48 horas de estimulación.

B) Absorción de 2NBDG en células PBMC totales o con memoria de tras 48 horas de estimulación.

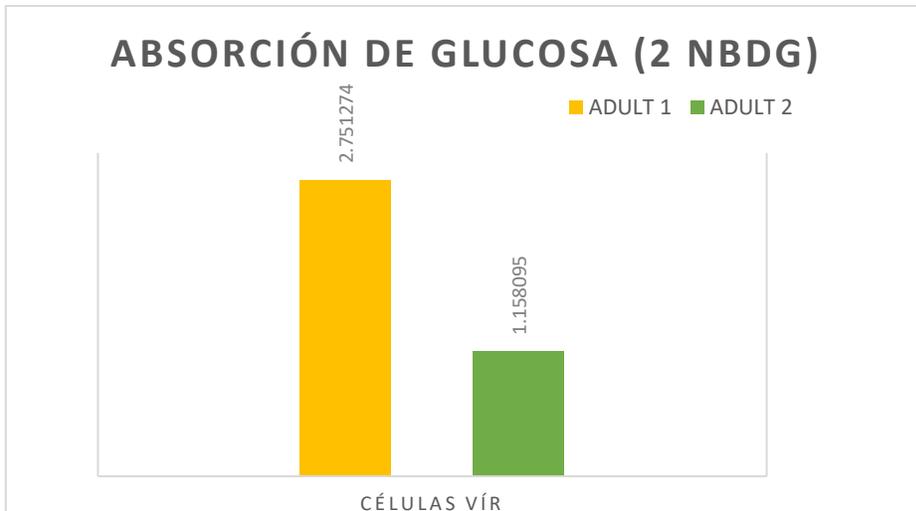


Figura 28. Analisis de expresión del cambio en la normalización con su basal en la absorción de glucosa por el reactivo 2-NBDG en dos experimentos independientes en células PBMC tras el estímulo de 48 h.

Se muestra la representación gráfica de los niveles de 2-NBDG en dos experimentos en células PBMC vírgenes (VÍR).

8.8 Absorción de 2-NBDG en células CBMC de neonatos

Los siguientes experimentos fueron realizados en CBMC bajo las mismas condiciones usadas en los experimentos con células PBMC. 48 h de estimulación y 30 minutos de restrcción de glucosa.

En la figura 29 se observa que tras el estímulo la muestra de interes (color azul intenso) se ve desplazada a la derecha (a partir de 10^3). La intensidad de fluorescencia media en la muestra sin estimular es de 414 mientras que en la muestra estimulada es de 3777. El cambio o la normalización con su basal fue de $ES/SE=9.12$ (véase la figura 32-Neo 2). Lo que nos indica que las células CBMC tienen un mayor aumento en el consumo de glucosa tras su estimulación.

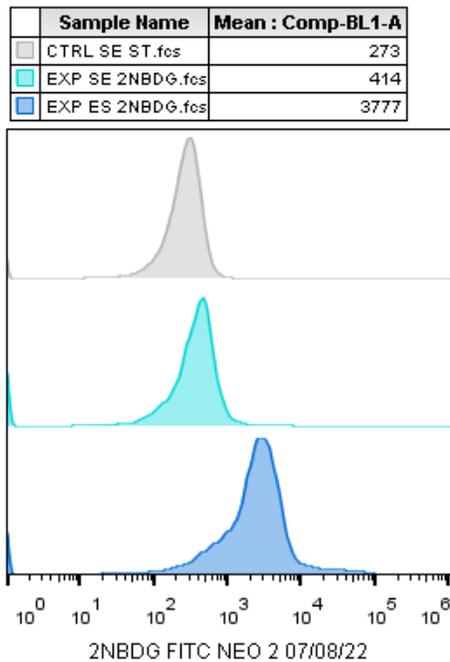


Figura 29. Absorción de 2NBDG en células CBMC a 48 horas de estimulación con restricción de glucosa por 30 minutos en medio FACS 5%. En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad. Se muestra la absorción de 2NBDG en CBMC tras 48 h de estimulación con restricción de glucosa por 30 minutos.

En este experimento también nos dispusimos a poner un control CD45RO (véase la figura 30). Este marcador se utilizó para saber si la muestra utilizada para este experimento no estaba contaminada con muestra de la madre al momento de la colecta, si el histograma nos hubiera dado un valor positivo en CD45RO (desplazado a la derecha a partir de 10^3) diríamos que la muestra estaba contaminada. Por lo tanto, descartamos que la muestra estuviera contaminada con sangre de la madre. Este marcador se utilizó en todos los experimentos posteriores.

	Sample Name	Mean : Comp-BL1-A
■	CTRL SE ST.fes	273
■	CTRL SE CD45RO.fes	450

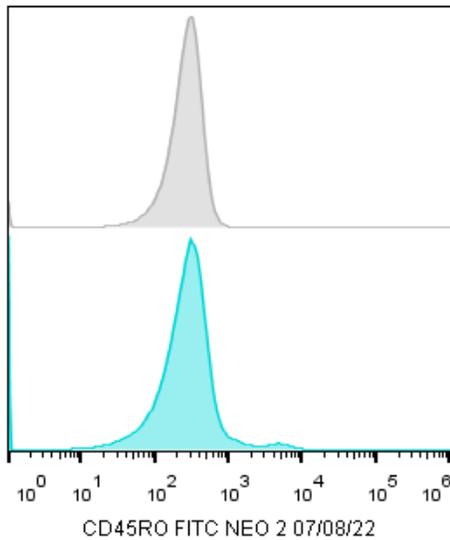


Figura 30. Expresión de CD45RO en células CBMC.

En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad. En el histograma se muestra en color gris la muestra sin teñir y en color azul claro la muestra teñida con CD45RO.

También se puso un control CD69, vemos que la muestra estimulada dio un valor positivo (desplazado a la derecha a partir de 10^3) lo cual nos indica que las células fueron activadas tras el estímulo exitosamente. Este marcador se utilizó en todos los experimentos posteriores. (véase la figura 31).

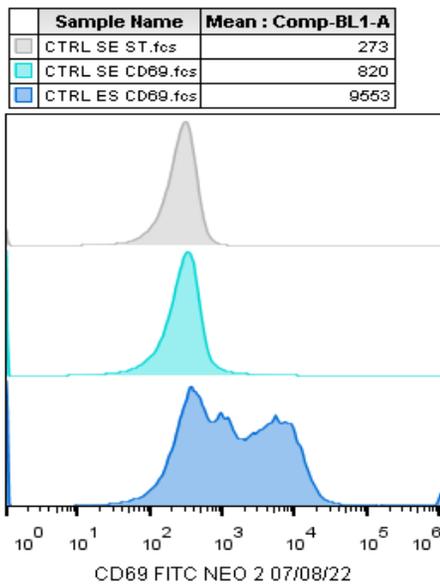


Figura 31. Expresión de CD69 en células CBMC tras 48 horas de estimulación.

En el histograma, X representa el valor de intensidad media de fluorescencia y Y representa el número de células (eventos) que emiten esa intensidad.

En el histograma se muestra en color gris la muestra sin teñir, en color azul claro la población de CBMC marcada con CD69 sin estimular y en color azul intenso la población de CBMC marcada con CD69 estimulada.

A continuación, evaluamos el incremento en el consumo de glucosa en nas CBMCs (figura 32). Se puede observar que en cada muestra hubo un incremento substancial en en consumo de glucosa.

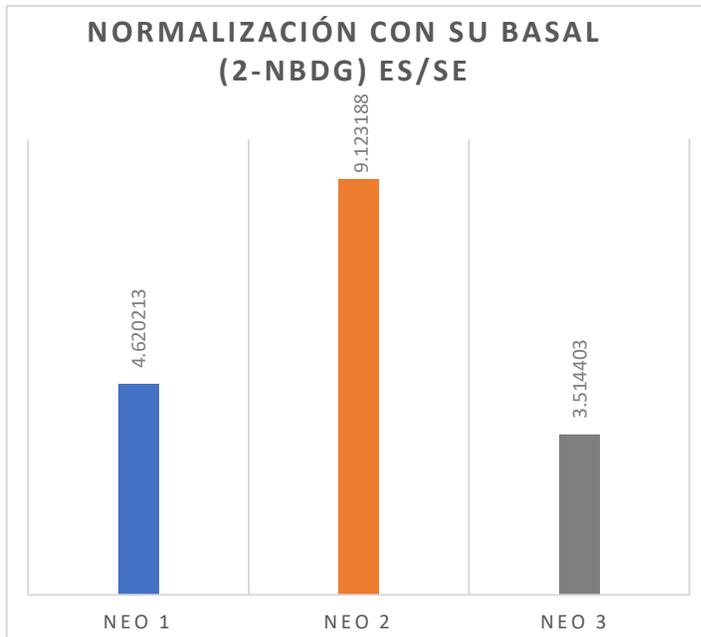


Figura 32. Analisis de expresión del cambio en la normalización con su basal en la absorción de glucosa por el reactivo 2-NBDG en tres experimentos independientes en células CBMC tras el estímulo de 48 h.

8.8.1 Comparación del consumo de glucosa en células PBMC vs CBMC

En la figura 33 observamos la comparación de las muestras estimuladas a 48 h en comparación con las muestras sin estimular o a nivel basal, vemos que tras el estímulo en las células PMBC vírgenes (*ADULT 1* y *ADULT 2*) y en las células CBMC (*NEO 1*, *NEO 2* y *NEO 3*) la absorción de glucosa se ve aumentada tras la estimulación en todas las muestras, pero no se encontraron diferencias significativas entre neonatos y adultos.

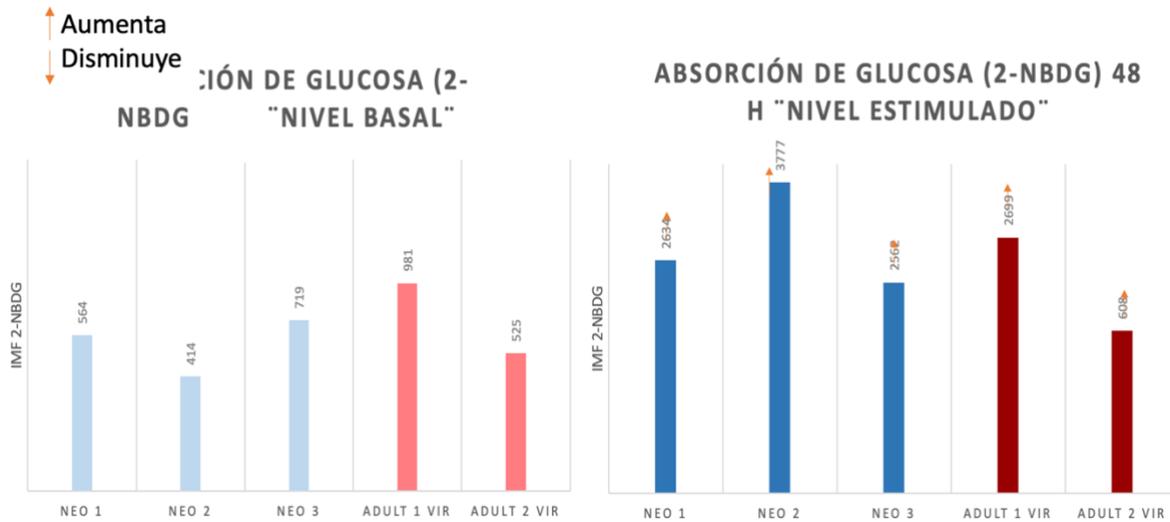


Figura 33. Comparación de la absorción de glucosa en células PBMC y CBMC a nivel basal y después del estímulo de 48 h.

9. Discusión

Este trabajo tuvo varios retos técnicos que se lograron cubrir, algunos totalmente y otros parcialmente. Podemos decir que resolvimos adecuadamente la purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes y totales de donadores adultos, logramos establecer condiciones óptimas para la purificación de linfocitos T CD4⁺ en adultos humanos. Aunque la purificación de las células fue exitoso, regresamos a realizar las mediciones metabólicas en células mononucleares, ya que no logramos medir ninguno de los parámetros en las células purificadas.

Al evaluar la expresión del transportador de glucosa y el receptor de insulina en células neonatales a 48 horas de estimulación se ve un ligero aumento en la expresión de ambos. Una de las funciones del receptor de insulina es su participación en el desarrollo y crecimiento y el transporte de glucosa. Cuando la insulina se une a las subunidades alfa de su receptor, lo activa y esto conlleva a cambios conformacionales en las subunidades beta estas subunidades tienen actividad de tirosina quinasa por lo que llevan a cabo una autofosforilación, esto conduce a la fosforilación de otras proteínas como la IRS (que es el sustrato del receptor de insulina), cuando esta activo atrae a la proteína PI3K esta proteína a su vez puede atraer a otras proteínas como PDK1 y PK2 puede fosforilar a la proteína AKT y se activa, AKT a su vez fosforila a AS160 pero no lo activa sino que lo inactiva, este estado inactivo va a permitir la activación o tráfico dependiente de Rab-GTP de GLUT hacia la membrana plasmática para que se de la exocitosis. Así el transportador GLUT se pueda translocar hacia la membrana y fusionarse con ella para dejar a los transportadores de GLUT en la membrana.

La importancia de esto radica en que la membrana va a ser permeable a la glucosa y va a permitir su entrada hacia la célula. Entonces, es lógico que ambos marcadores se estén expresando, solo que esto no lo logramos ver en células mononucleares de adulto en las condiciones en las que lo intentamos. Es posible que a tiempos más largos se pudieran observar cambios más notorios, y se tendrían

que repetir estos experimentos para poder asegurar estos cambios, en las condiciones en las que medimos el consumo de glucosa [35].

El lactato es transportado a través de la membrana plasmática por varios transportadores de monocarboxilato (MCT), principalmente MCT1 y MCT4 [38]. La función fisiológica principal de MCT1 es la importación de lactato, mientras que la de MCT4 es la exportación de lactato. Además, la dirección de la transferencia de lactato in vivo por los MCT depende de los gradientes de concentración de lactato. Por lo tanto, la importación de lactato en la célula se estimula al reducir tanto la concentración de lactato intracelular como los gradientes de pH.

Se ha demostrado que la expresión de MCT1 y MCT4 depende de la expresión de la glicoproteína transmembrana CD147, esta proteína promueve la expresión y localización de MCT4 en la superficie celular [36].

Recientemente se ha demostrado que el lactato actúa como una molécula de señalización para estimular la transcripción de genes a través de la lactilación de la histona lisina en los macrófagos M1. La lactilación de histonas es una nueva forma de modificaciones postraduccionales (PTM), fue descubierto por primera vez por Zhang et al como una molécula de señalización que estimula la transcripción de genes a través de la lactilación de histona en macrófagos M1 [37]. Aunque no se ha confirmado si la maquinaria enzimática que podría convertir el lactato en lactil-CoA con la ayuda de la lactil-CoA sintetasa actúa en linfocitos T neonatales. Se sabe que la lactil-CoA estimula la histona K1a en la secuencia promotora, regulada por enzimas. La histona K1a está presente en un elevado número de regiones promotoras de genes para regular al alza la transcripción de genes, y promueve la polarización similar a M2 en los macrófagos M1. Por lo tanto, la lactilación de histonas es un producto de la glucólisis y está regulada por el lactato.

Pudiera ser que en las células mononucleares sucedan estas modificaciones postraduccionales, tal vez por eso no se expresó en gran medida el transportador de lactato al ser evaluado a 48 horas de estimulación, porque el lactato está siendo

ingresado al núcleo y actúa como una molécula de señalización para estimular la transcripción de genes a través de la lactilación de la histona y es por eso que no se exporta el lactato por el transportador MCT4 hacia el espacio extracelular. Otra posibilidad es que la baja expresión del transportador de lactato MCT4 podría ser suficiente para exportar el lactato al medio extracelular. Además de que también podría ocurrir que no se exporte el lactato por su transportador y pueda ser utilizado por la célula como fuente de carbono, como se ha visto en otros tipos de células.

En este trabajo uno de los retos técnicos fue estandarizar el reactivo 2-NBDG que se utilizó para supervisar el consumo de glucosa en células vivas. El reactivo 2-NBDG entra en las células a través de los transportadores de glucosa (GLUT). Una vez que las células absorben el 2-NBDG, este se fosforila en la posición C-6 para generar 2-NBDG-6-fosfato en su metabolismo, el cual es bien retenido dentro de la célula. En este trabajo se presentó un error desde un inicio, el error está en las conversiones para la estandarización de este reactivo 2-NBDG. Los cálculos correctos se encuentran en la página 28 y los cálculos incorrectos se encuentran en la página 30 (*véase las páginas 28 y 30*). El error fue que utilizamos 5×10^{-3} g y no 5×10^{-6} g del reactivo 2-NBDG, lo cual nos da una concentración de 0.05M y no de 50 μ M, la cual es la concentración recomendada para trabajar con este tipo de cultivo celular. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la actividad celular de captación de glucosa, y una de las ventajas que posee el reactivo 2-NBDG sobre otros análogos radica en que gracias a ser una molécula de mayor tamaño que la glucosa, el transporte de NBDG es más lento, puede que por ello al tener en el medio una concentración mayor, los tiempos cortos de incubación para la detección de glucosa no se vieron reflejados, y solo se logró observar a tiempos más largos. Puede ser que por ello es que no logramos tener mejores resultados [40].

Otro reto fue que logramos poner a punto la técnica a medición del consumo de glucosa, la cual nos planteó un reto importante, en el que tuvimos que establecer las condiciones experimentales para evaluar el consumo de glucosa, que no se logró medir en los linfocitos T CD4+ vírgenes purificados ni con las 6 horas de estimulación. Buscando en la literatura, tuvimos que incluir un periodo de ayuno y

una estimulación más larga para poder medir la captación de la glucosa, para que las células puedan absorber efectivamente 2-NBDG [30]. Se recomienda añadir suero a los medios de ayuno para aumentar la viabilidad celular y la absorción de 2-NBDG.

Este trabajo proporcionó un avance técnico que permitirá la evaluación más eficiente del consumo de glucosa en células T CD4+ purificadas. Ya que por el tiempo no pudimos repetir la evaluación de los marcadores metabólicos en las condiciones en las que vimos consumo de glucosa. Incluso es posible que en estas condiciones se puedan evaluar los parámetros metabólicos en células purificadas, lo que dará mediciones más limpias del estado metabólico en linfocitos T.

10. Conclusión

- 1) Logramos obtener poblaciones puras de células T CD4⁺ en adultos humanos
- 2) En la expresión de los marcadores metabólicos en células mononucleares de adulto es posible que a tiempos más largos se pudieran observar cambios más notorios, y se tendrían que repetir estos experimentos para poder asegurar estos cambios.
- 3) Logramos establecer las condiciones experimentales para evaluar el consumo de glucosa.
- 4) Las células mononucleares vírgenes de adulto respondieron menos a la absorción de glucosa a comparación con las células de adultos totales.
- 5) Es necesario seguir trabajando para establecer un protocolo uniforme para el reactivo 2-NBDG. Los experimentos realizados aquí proporcionan datos preliminares para el protocolo.

11. Bibliografía

- [1] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman & Shiv Pillai (2018). *Propiedades y generalidades de las respuestas inmunitarias*. Inmunología celular y molecular (2). ELSEVIER.
- [2] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman & Shiv Pillai (2018). *Receptores inmunitarios y transducción de señales* (7). ELSEVIER.
- [3] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman & Shiv Pillai (2018). *Activación de los linfocitos T* (9). ELSEVIER.
- [4] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman & Shiv Pillai (2018). *Diferenciación y funciones de los linfocitos T* (10). ELSEVIER.
- [5] A. Hernández Hdez, C. Coronel Rodríguez, M. Monge Zamorano, C. Quintana Herrera (2015). Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *Pediatría Integral* 2015; XIX (5): 337-3541.
- [6] A. Iwasaki, R. Medzhitov (2010). *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. *Science*. 327, 291–5.
- [7] Berrueta Lisbeth, Salmen Siham & Montes Henry. (2007). *Respuesta inmunitaria frente a virus*.
- [8] Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). *Adaptive immunity*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40.
- [9] Brooks, George A. (2020). *Lactate as a fulcrum of metabolism*. *Redox Biology*, 35(), 101454–. doi: 10.1016/j.redox.2020.101454.

[10] Chisolm, D. A., & Weinmann, A. S. (2015). *TCR-Signaling Events in Cellular Metabolism and Specialization*. *Frontiers in Immunology*, 6. doi:10.3389/fimmu.2015.00292.

[11] Developed, E., Group, IN., Mortality, C. & Estimation, M. Child Mortality 2019. (2019).

[12] Gutiérrez-Reyna, Cedillo-Baños, Kempis-Calanis, Ramirez-Pliego, Santana, Maria A. (2020). *IL-12 Signaling Contributes to the Reprogramming of Neonatal CD8+ T Cells*. *Frontiers in Immunology*, 11().

[13] Galindo-Albarrán, López-Portales, Gutiérrez-Reyna, Rodríguez-Jorge, Sánchez-Villanueva, M. Angélica (2016). *CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response*. *Cell Reports*, 17(8), 2151–2160.

[14] Jorge Luis Roig (2017). Mitocondrias en la degradación y formación de ácidos grasos.

[15] Le Bourgeois T, Strauss L, Aksoylar HI, Daneshmandi S, Seth P, Patsoukis N y Boussiotis VA (2018). *Targeting T Cell Metabolism for Improvement of Cancer Immunotherapy*. *Oncol*. 8: 237. doi: 10.3389 / fonc.2018.00237.

[16] Linda A. Kempis Calanis (2021). *Análisis transcriptómico de los linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos humanos a nivel basal y activados en presencia o ausencia de flagelina*. [Tesis de Doctorado inédita]. UAEM.

[17] Nicoli, Francesco; Papagno, Laura; Frere, Justin J.; Cabral-Piccin, Mariela Pires; Clave, Emmanuel; Appay, Victor (2018). *Naïve CD8+ T-Cells Engage a Versatile Metabolic Program Upon Activation in Humans and Differ Energetically From Memory CD8+ T-Cells*. *Frontiers in Immunology*, 9(), 2736.

- [18] Nicole M. Chapman, Mark R. Boothby and Hongbo Chi. (2019). *Metabolic coordination of T cell quiescence and activation*. Nature reviews | Immunology.
- [19] O'Neill, Luke A. J.; Kishton, Rigel J.; Rathmell, Jeff (2016). *A guide to immunometabolism for immunologists*. Nature Reviews Immunology, (), – . doi:10.1038/nri.2016.70.
- [20] O'Sullivan, David (2019). *The metabolic spectrum of memory T cells*. Immunology & Cell Biology, (), imcb.12274–. doi:10.1111/imcb.12274.
- [21] Palin, A. C., Ramachandran, V., Acharya, S., & Lewis, D. B. (2013). *Human neonatal naive CD4+ T cells have enhanced activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a*. The Journal of Immunology, 190(6), 2682-2691.
- [22] Palmer, Clovis S (2015). *Glucose Metabolism Regulates T Cell Activation, Differentiation, and Functions*. Frontiers in Immunology.
- [23] Sara Ricciard ; Manfrini, Pagani, Massimiliano; Abrignani, Sergio; Biffo, Stefano (2018). *The Translational Machinery of Human CD4+ T Cells Is Poised for Activation and Controls the Switch from Quiescence to Metabolic Remodeling*. Cell Metabolism, (), S1550413118305102–. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.009.
- [24] Sean R. Holm., Ben J. Jenkins., James G. Cronin., Nicholas Jones & Catherine A. Thornton. (2021). *A role for metabolism in determining neonatal immune function*.
- [25] Shyer, J.A., Flavell, R.A. & Bailis, W. *Metabolic signaling in T cells*. Cell Res 30, 649–659 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0379-5>.
- [26] Sureshchandra S, Mendoza N, Jankeel A, Wilson RM, Marshall NE and Messaoudi I (2021). *Phenotypic and Epigenetic Adaptations of Cord Blood CD4+ T*

Cells to Maternal Obesity. *Front. Immunol.* 12:617592. doi: 10.3389/fimmu.2021.617592.

[27] Tsafaras, George P.; Ntontsi, Polyxeni; Xanthou, Georgina (2020). *Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System*. *Frontiers in Pediatrics*, 8(), 5 . doi:10.3389/fped.2020.00005.

[28] Wen, J., Cheng, S., Zhang, Y. *et al.* Lactate anions participate in T cell cytokine production and function. *Sci. China Life Sci.* 64, 1895–1905 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1887-7>.

[29] CONVENIO DE BIOETICA EN EL ESTADO DE MORELOS
http://www.ssm.gob.mx/portal/descargables/SEIC/CEI_Hospitales.pdf

[30] Folgmann Drew (2016). *Protocolo optimizado para medir la absorción de 2-NBDG como marcador celular de la demanda glucolítica*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Arkansas, Fayetteville.

[31] Lisa Holthaus, Sharma, Daniel Brandt, Anette-Gabriele Ziegler, Martin Jastroch, Bonifacio (2021). *Functional and metabolic fitness of human CD4+ T lymphocytes during metabolic stress*. Life Science Alliance.

[32] Briley, A. C. (2017). *Optimizing a Standard Fasting Time for 2-NBDG Uptake Studies in Murine Breast Cancers*. Biomedical Engineering Undergraduate Honors Theses Retrieved from <https://scholarworks.uark.edu/bmeguht/41>.

[33] Yoshioka K, Takahashi H, Homma T, et al. (1995). A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Eserichia coli*. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1289, 5-9. 7.

[34] O'Neil R.G., Wu L, Mullani N. (2005). Uptake of a fluorescent deoxy-glucose analog in tumor cells. *Molecular Imaging and Biology*. 7, 388-392.

[35] Yuchang Fu; Lidia Maianu; Barry R Melbert; W.Timothy Garvey (2004). *Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation.* , 32(1), 0–190. doi:10.1016/j.bcmd.2003.09.002.

[36] Chen AN, Luo Y, Yang YH, Fu JT, Geng XM, Shi JP y Yang J (2021) Lactilación, un nuevo código de reprogramación metabólica: estado actual y perspectivas. *Frente. inmunol.* 12:688910. doi: 10.3389/fimmu.2021.688910

[37] Xin, Q., Wang, H., Li, Q. et al. La lactilación: una moda pasajera o el futuro de la modificación postraduccional. *Inflamación* 45 , 1419–1429 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01637-w>.

[38] Walters, Denise K; Arendt, Bonnie K; Jelinek, Diane F (2013). *CD147 regulates the expression of MCT1 and lactate export in multiple myeloma cells.* *Cell Cycle*, 12(19), 3364–3372. doi:10.4161/cc.26193.

[39] Gibbons, Deena; Fleming, Paul; Virasami, Alex; Michel, Marie-Laure; Sebire, Neil J; Costeloe, Kate; Carr, Robert; Klein, Nigel; Hayday, Adrian (2014). *Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants.* *Nature Medicine*, 20(10), 1206–1210. doi:10.1038/nm.3670.

[40] Yamada, K., Nakata, M., Horimoto, N., Saito, M., Matsuoka, H., and Inagaki, N. (2000). Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 275(29):22278-83

12. Anexos

Anexo 1. Consentimiento informado

 <p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS</p> <p>Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas</p> <p>Centro de Investigación en Dinámica Celular</p>	<p>INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR Dirección</p>
<p>Cuernavaca, Morelos a ____ de _____ del 2022</p>	
<p>Carta de consentimiento informado</p>	
<p>Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación denominado: <i>Identificación y caracterización de poblaciones precursoras e inmaduras de linfocitos T en sangre de cordón umbilical</i>. Registrado ante el comité local de investigación de este hospital.</p>	
<p>Se me ha explicado ampliamente acerca del estudio de investigación y que para participar se deberá recolectar sangre de mi placenta después del parto y de cortar el cordón umbilical y estoy enterada de que la colecta de esta sangre no requerirá de ninguna punción o procedimiento especial, ya que dicha sangre es un producto normal que se desecha después del nacimiento y que no perjudica en sentido alguno a mi salud ni a la de mi bebé. Se me informó que esta investigación se lleva a cabo en el IMSS, en el Hospital General José G. Parres y en Facultad de Ciencias de la Universidad del Estado de Morelos. También se me informó que <i>la sangre no será criopreservada</i> (congelada) <i>para obtener células madre</i> y que no existe ninguna clase de fines lucrativos. Con la donación de la sangre de mi placenta estoy colaborando con una mayor comprensión de los mecanismos que regulan la respuesta inmune en los neonatos. La mayor comprensión de estos mecanismos puede resultar en conocimientos que ayuden a mejorar el diagnóstico y terapia en recién nacidos.</p>	
<p>Los investigadores principales, L. C. Ariel Oswaldo Galindo Albarrán, Biol. Oscar Ramírez Pliego, y L. C. Otoniel Rodríguez Jorge, se han comprometido a responder las preguntas o cualquier duda que yo le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo. Entiendo que conservo el derecho de no participar en el estudio sin que esto influya sobre la atención que recibo por esta institución, así como que dicha participación no tendrá ningún costo (no pagaré por la participación en el estudio).</p>	
<p>_____ Nombre y firma del participante</p>	<p>_____ Nombre y firma del investigador</p>
<p>Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 33 Tel. (777) 329 70 20, Ext. 3385 Correo: admon.cidc@uaem.mx</p>	
	
<p>Una universidad de excelencia</p>	
<p>RECTORÍA 2017-2023</p>	

Anexo 2. Purificación de PBMC y CBMC

- En un tubo falcón tomar 20 mL de sangre y agregar 15 mL de PBS. Mezclar por inversión.
- En otro tubo Falcón, agregar 10 mL de Ficoll. Pasar la sangre + PBS al tubo del ficoll sin romper el gradiente. (Hago 2 gradientes).
- Centrifugar a 1500 rpm x 30 minutos con aceleración=9 y desaceleración=0.
- Recolectar toda la fase blanca en un tubo falcón (que son las células PBMC).
- Aforar a 40 ó 50 mL con PBS.
- Centrifugar a 1400 rpm x 10 minutos con aceleración=9 y desaceleración=9.
- Decantar o quitar el sobrenadante, después re suspender.
- Agregar medio suplementado al 5% a las células PBMC (Usualmente yo agrego 10 mL de medio).
- Guardar en cajas Petri (cada una con 8 mL de medio 5% + 2 mL de medio+células).
- NOTA: Guardar 2 ml de eritrocitos (tomar los eritros de la fase roja, la ultima capa que se formo en el Ficoll) y adicionar 8 ml de RPMI suplementado 5% con SFB, colocarlo en una caja petri e incubar toda la noche a 37°C, 5% de CO₂.

Anexo 3. Purificación de linfocitos T CD4⁺

- Recolectar las células en un tubo falcón, dando lavados a la caja petri con el mismo medio que contienen, para traernos las células que no se adhirieron.
- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1400 rpm.
- Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en seco.
- Adicionar 5 ml de RPMI 5%
- Realizar el conteo de células.
- Una vez realizado el conteo, guardar 2x10⁶ de PBMCs para controles de tinción.
- Sacar la caja petri con los eritros que se guardaron la noche anterior, dar lavados a la caja petri con el mismo medio que contiene, antes de adicionarlos al tubo de PBMCs.
- Adicionar los 5 ml de Eritros al tubo falcón con PBMCs. NOTA: EL volumen final de la mezcla de eritros-PBMCs-RPMI es de 10 ml.
- Adicionar el RossetSep para CD8/CD4, adicionando la siguiente cantidad:
- Cuando **no esta precipitado**: menos de 300x10⁶ células adicionar 110 ul y mayor de 300x10⁶ adicionar 220ul de RossetSep de CD4 (en el caso de adultos) ó 120 ul de RossetSep de CD4 (en el caso de neonato). Nota: Consultar con los expertos en CD4 si esta precipitado.
- Dejar incubando a T.A. durante 42-45 minutos en agitación leve (Poner el agitador a una velocidad de rotación de ROTATE/ROCK =7:14).
- En un tubo falcón estéril poner 10 ml de Ficoll, verter lentamente las células con RossetSep, sin romper el gradiente formado.
- Centrifugar a 20 °C por 30 min a 1500 revoluciones por minuto (rpm) sin desaceleración, desac=0,acel=9.
- Extraer toda la interfase blanca con ayuda de una pipeta (En esta interfase se encuentran los linfocitos T CD8/CD4).
- Realizar un lavado con 40 ml de PBS 1x.
- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1400 rpm.

- Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en seco.
- Adicionar 1 ml de medio RPMI 5%

Anexo 4. Estimulación

- Recolectar las células en tubos eppendorf 1.5, centrifugar a 3500 rpm x 5 min.
- Quitar el sobrenadante y re suspender.
- Agregar 1 mL medio RPMI Suplementado al 10% en cada tubo eppendorf.
- Dividir el volumen para poner 2 millones de células por cada pozo.
- Estimular con 2 uL de CD3, 2 uL de CD28, 1 uL de Goat anti-Mouse.
- Esperar 6 horas para el experimento de los transportadores
- Esperar 48 horas para el experimento de 2NBDG

Anexo 5. Tinción extracelular

1. Recolectar las células en tubos eppendorf 1.5 mL.
2. Centrifugar a 3500 rpm x 5 min.
3. Quitar el sobrenadante y re suspender el pellet.
4. Agregar 1 mL de PBS 1X. Centrifugar a 3500 rpm x 5min. Decantar y re suspender (dejarlo en un volumen pequeño de 10-20uL).
5. Agregar el anticuerpo e incubar en frio por 25-30 minutos.
 - a) Teñir con 2 uL de CD4 APC.
 - b) Teñir con 50 uL de Violet.
6. Agregar 1 mL de PBS 1X. Centrifugar a 3500 rpm x 5 min.
7. Quitar el sobrenadante y re suspender el pellet.

Anexo 6. Tinción intracelular

8. Agregar 50 uL de paraformaldehido 1.5 y 500 uL de FACS 2% por 20 minutos, incubar a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 3500 rpm x 5 min. Quitar el sobrenadante y re suspender el pellet.
10. Agregar 1 mL de PBS 1X. Centrifugar a 3500 rpm x 5 min. Quitar el sobrenadante y re suspender el pellet.
11. Agregar 1 mL de MeOH frio e incubar 10 minutos en frio (en nevera del refrigerador blanco).
12. Centrifugar a 4500 rpm x 5 min. Quitar el sobrenadante y re suspender el pellet.
13. Agregar 1 mL de FACS 2%. Centrifugar a 4500 rpm x 5 min. Quitar el sobrenadante y re suspender el pellet.
14. Agregar el anticuerpo e incubar en frio por 25-30 minutos.
 - a) Teñir con 10 uL INSR y GLUT1 Diluido 1/50.
 - b) Teñir con 10 uL MCT4 Diluido 1/10
15. Agregar 1 mL de FACS 2%. Centrifugar a 4500 rpm x 5 min.
16. Quitar el sobrenadante y re suspender el pellet.
17. Agregar 500 uL de FACS 2% y 50 uL de paraformaldehido.

Anexo 7. Experimento 2-NBDG

Restricción de glucosa por 30 Min en FACS 5%

1. Recolectar las células en tubos de 1.5 mL.
2. Centrifugar a 3500 rpm x 5 min
3. Decantar o quitar el SN y re suspender el pellet
4. Agregar 1 mL de FACS 5%.
5. Guardar en la incubadora y esperar 30 minutos.

Experimento

1. Recolectar las células en tubos de 1.5 mL.
2. Centrifugar a 3500 rpm x 5 min
3. Decantar o quitar el SN y re suspender el pellet
4. Agregar 1 mL de PBS, centrifugar a 3500 rpm x 5 min. Decantar y re suspender el pellet
5. Agregar el anticuerpo e incubar en frio por 25-30 min.
 - a) Agregar 2 uL de CD4 APC y 50 uL de violet.
6. Agregar 1 mL de PBS, centrifugar a 3500 rpm x 5 min.
7. Decantar y re suspender el pellet.
8. Teñir con 2NBDG

En un tubo epp aparte, preparar el 2-NBDG. Se prepara:

- a. Tenemos alícuotas de 2NBDG de 10 uL. A esa alícuota le agregamos 90 uL de PBS. Volumen total de 100 uL.
- b. En un tubo de 1.5 mL agregar 1 mL de PBS y 10 uL de 2NBDG (ya preparado) volumen total 1010 uL.
9. Agregar los 1010 uL de PBS + 2NBDG al punto 8, e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 3500 rpm x 5 min.
11. Quitar el SN y re suspender.
12. Agregar 1 mL de PBS, centrifugar a 3500 rpm x 5 min.
13. Decantar y re suspender el pellet.
14. Agregar 500 uL de PBS.
15. Pasar al citometro ese día.

Anexo 8. Lista de reactivos

- Lymphoprep (STEMCELL)
- Medio RPMI (Gibco)
- Suero fetal bovino (Gibco)
- RosetteSep (STEMCELL)
- Pierce Protein A/G Magnetic Beads (Invitro)
- PBS: NaCl 13.7M, KCl 2.7M, Na₂HPO₄ 10M, KH₂PO₄ 1.8M
- FacsJuce: PBS, 2% SFB, NaN₃ 0.01M
- FacsFlow: NaCl 0.7M, KH₂PO₄ 0.009M, Na₂HPO₄ 0.8M, KCl 0.2M, EDTA 0.06M, LiCl 0.05M
- Attune 1x Focusing Fluid (Invitrogen Lot. 3169963)
- Attune 1x Shutdown Solution (Invitrogen Lot. 3289068)

- Attune Wash solution (Invitrogen Lot. 2413474)
- Anti-Human/Mouse CD44 Purified Clone:IM7 (TONBO)
- Anti-Human/Mouse CD45RO Purified Clone: UCHL1 (TONBO)
- Anti-Human/Mouse CD3 Purified Clone: OKT3 (TONBO)
- Anti-Human/Mouse CD28 Purified Clone: CD28.2 (TONBO)
- Goat Anti-Mouse Lot A111044338 (Bioss)
- Anti-Human CD4 APC Clone: OKT4 (TONBO)
- Anti-Human CD45RO Clone: UCHL1 (TONBO)
- Anti-Human CD3 Clone: OKT3 (TONBO)
- Insulin RB (CT-3) (Santa Cruz Biotechnology Lot. K0619)
- Glut1 (A-4) (Santa Cruz Biotechnology Lot. E2518)
- MCT4 (D-1) (Santa Cruz Biotechnology Lot. H2021)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS BASICAS Y APLICADAS

CONTROL ESCOLAR DE LICENCIATURA



VOTOS APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. Mayra Joselin Gutiérrez Marín** con número de matrícula **20164007719** cuyo título es:

"Evaluación de cambios en el metabolismo en función de la activación celular en células T CD4+ de neonatos y adultos humanos"

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

Cuernavaca, Mor a 20 de febrero del 2024

Atentamente
Por una humanidad culta

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

**DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA
DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO
DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA
DR. OTONIEL RODRÍGUEZ JORGE**

**(Presidente).
(Secretario).
(Vocal).
(Suplente).
(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

OTONIEL RODRIGUEZ JORGE | Fecha:2024-02-21 13:48:19 | Firmante

PxpsX81jk/ZzpZH8YhI4/vQu2/cQI97Fk8FWqt5sNMa6xOhKpoJbrWiWwQklQoMMWgEvaCcxh90gVdO7jJQrKna1+NLAX+ypcunkGDISrFuWalDUuygwDwk5Bk+3+A+FOGp4uh18K
ERVY7mo1BG07IHtAw6rWuS1sTO0WYyNmF/Z3dlGkjqhMjEITUICglMXX/OG3j1N4kamT4pdwDy0VS6bnokxJoRVVdt5zex3Umr1epWqY2jWFXxJyfpze3iv+q6/DWJ7r5ilw3ym
+ynHqbDglJUfciFsG6GLERTIf4kBm9aWnls+dtlz7gjGmxKKNR24YQDefUIV4Wj7dffjw==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2024-02-21 13:48:55 | Firmante

Yv9UjrqjrdVbXu5n/m1uKNCX9D13JkZ77UaRNOe0tHLGGbZax/mQ/FbV1tWLdZrghhHwHj5u1J3D1UKqE8bZ/hRlvPt6gep4sUfcA3XYOrZPDydw14fw3JWkl5yOIDtSzijeNVkdait
H0DMj+ZYSZ8+qhdFuawVxL52eL3bJxy/04tO9ffXtLWZ4TrVUCalue+51YmaG2xGuwVqI8cyZC1VOgUPUFE72/cfktuF53MHPWrUl1sAUsmN70h9PU0mcdvEhJxN3rpXrhuaXTffk
//sB/IPQjNj8s9x9ci/p1hQRO3yFlgSsFQxjTQAKyCL/AaxDAEUUfLYa0B0UZAIVA==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2024-02-21 15:42:59 | Firmante

dx+vfnoC6QIFA71bTI6BhncAH3XVgxr0Ax09z9mrMFyWGJQvXO/kEqyPPoOkobBdP9YtNdHFEpHL/+sYAwMRtmm7UAqCa6IK3pubT98KI+YIP/EkTTIZkGniewTgqRgGEPqYpUf
0FbAcEmZpXfh9EQQu1VwjdTFHXEDitvgYnv/7OdpVnA1/90CTraOkrG+uG4V3ivCBh/nieJP4p4dcjGYVFMeltWqcltMcGGqzL+DvDkb+uUosj5Gjqe6dkaT7sRPD2gKfyuWDOMD
nW9O2UPb56mcJgaryBe5/WQZza52QjctObnBwk42CJbLsD+jC48IBUvDCH+DnLgJKUS2g==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2024-02-22 09:03:47 | Firmante

km1B+/841uZPumIPR2WftPzXukt72FE5vTrtrpzPTELL5i1DY+0Zv3k5Ycaj1AE7vDXcERZn5S/CbyoFSJesYfgUk1oYsGjjW7ZFJ5WEr3KYAtc+Dd33G9J6/6HSjvuaHCGzLVsVB
dTswxJjhH1VXB72j0P6+jv8fbYRcQE6ZmOjCQEY3wJ7PflBUdBAL0g0rZFQYnQAc8sGw68wYHA23Gu8eriT21xVlIxBnMQcZZJE4jy8pe/UtS+NNq6d/979NZ2jtouWtO/GFS/2U
94ESijLnpFb4/AES2BOySQkcKNZQoSjqjWicxqDDEo5+bYriHjAZtrpw0pUmmtdDA==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2024-02-22 11:31:30 | Firmante

ywlZVQtP2Iz/xch9oqv+7Pg8pJFD7V4qCFAaqsZA9PYIgxZs6j/nq7jTwrUmO+mV0W8OvcJhHjGhMhJF9yT8D5wgvNnguWR6Oo4mEhewbpPxrqq6UAMhm6RNikeHySHe01pvV8l
LohsCuoQLw7RTRxvWyyVcBhqjEN2sHWA/pmwrYM0NeNf/e0YMm1QhFUza28Gu6OrVChCqDVD/0dvAhGvVcxrS1pZhPPO8BGGuH6BIRC2iRpb6bn0Bbel/tqQEDQjCzC6NUk0
0cJ28DJ56A2vqVA7mYmUkQkq4rNYpj1rCZSxhRzRoLRZ8ka/B5ELNetZzPvN/Q2cF7gJQ1nbRcA==

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



wUQ5DkfMg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PPwR9B4z9pg4VcmPLWx8FBnPLX3fnJZL>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029