

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“EFECTO DE LA L-ARGININA Y LA L-SERINA EN
LA RESPUESTA INMUNE DE LOS LINFOCITOS T
CD4⁺ NEONATALES: UN ENFOQUE
EXPERIMENTAL Y COMPUTACIONAL”**

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

L. EN C. JONATHAN RICARDO ROBLES REYES

DIRECTOR: **DR. OTONIEL RODRÍGUEZ JORGE**

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2026

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Otoniel Rodríguez Jorge

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

COMITÉ TUTORAL

Dr. Armando Hernández Mendoza

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Facultad de Medicina, UAEM

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Instituto de Biotecnología, UNAM

JURADO REVISOR DE TESIS

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Facultad de Medicina, UAEM.

PRESIDENTE

Dra. Delia Vanessa López Guerrero

Facultad de Nutrición, UAEM.

SECRETARIO

Dr. José Luis Maravillas Montero

Instituto de Biotecnología, UNAM.

VOCAL

Dra. Linda Aimara Kempis Calanis

Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

SUPLENTE

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Facultad de Medicina, UAEM.

SUPLENTE

RESUMEN

El periodo neonatal es una de las etapas más vulnerables de la vida humana. Lo cual se refleja en la alta tasa de mortalidad neonatal. Entre las principales causas de muertes neonatales, las relacionadas con infecciones o con el sistema inmune, como las infecciones respiratorias y la sepsis, representan la tercera casusa de muertes, siendo solo superado por el nacimiento prematuro y las complicaciones durante el parto, lo que evidencia la necesidad de estudiar el sistema inmune neonatal para abordar esta problemática. En este trabajo se estudia a los linfocitos T CD4⁺, los cuales son componentes de la respuesta inmune adaptativa, que participan en la inmunidad celular y humoral, y son capaces de modular la intensidad y el fenotipo de la respuesta inmune. En la bibliografía y en trabajos previos del laboratorio se ha reportado que los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen una respuesta atenuada ante el estímulo anti-CD3/anti-CD28, con un fenotipo sesgado hacia la respuesta tolerogénica, una reducida producción de citocinas y una mayor proliferación en comparación con los linfocitos T CD4⁺ de adultos.

En la etapa adulta, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes presentan poca demanda transcripcional y traduccional, por lo que tienen poca demanda biosintética, lo que les permite mantener un metabolismo catabólico en el que se oxidan los nutrientes para impulsar la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP. Los linfocitos T CD4⁺ se activan cuando reconocen un antígeno a través del receptor de células T y reciben señales coestimuladoras como la señal del correceptor CD28, las cuales desencadenan vías de señalización que culminan en la activación de factores transcripcionales que cambian el panorama transcripcional de los linfocitos T CD4⁺. Como consecuencia del cambio transcripcional, aumenta la síntesis de proteínas de vías metabólicas, lo que ocasiona un incremento de la tasa metabólica, permitiendo el uso de metabolitos en vías anabólicas y una reprogramación metabólica necesaria para la síntesis de metabolitos con actividad inmunorreguladora que afectan la activación a diferentes niveles y biomoléculas indispensables para que el linfocito T CD4⁺ cumpla con sus funciones efectoras. En el caso de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, estos presentan un metabolismo altamente glucolítico y una mayor tasa metabólica tanto en condiciones basales como en respuesta a la activación, en comparación con los linfocitos T CD4⁺ de adultos. El programa metabólico característico de los linfocitos T CD4⁺ neonatales promueve la síntesis de metabolitos con actividad inmunoreguladora, como el lactato y las especies reactivas de oxígeno, la cuales contribuyen a que la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ neonatales este sesgada a un fenotipo tolerogénico, que, aunque adecuada para esa etapa de vida, deja vulnerable al neonato a infecciones.

En este proyecto empleamos un modelo lógico para describir la influencia del metabolismo en la activación de las células T CD4⁺ y exploramos la influencia del estado metabólico de dichas células sobre su activación. Mediante simulaciones computacionales y experimentos in vitro, exploramos la suplementación con L-arginina o L-serina como posible estrategia para potenciar las respuestas inmunitarias de las células T CD4⁺ de neonatos y adultos. Nuestros resultados indican un papel inhibidor de la L-arginina y la L-serina en la activación de las células T CD4⁺ de adultos y neonatos, ya que el programa metabólico causado por la suplementación con la L-arginina y la L-serina reprimen la producción de la marca de activación CD69 y reduce la producción de la mayoría de las citocinas Th, sin afectar la viabilidad celular.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Otoniel Rodríguez Jorge, por su apoyo y consejos a lo largo de la elaboración del proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial y jurado revisor de tesis, por sus observaciones y consejos para el desarrollo del trabajo.

Al equipo de trabajo del laboratorio de inmunología celular y de sistemas, Linda, Carlos, Ale, Yari, Francisco, Pau, Ángel, Sebas, Gia, Steven y Oscar, por todo su apoyo y por siempre hacerme sentir bienvenido en el laboratorio.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), al Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA) y al Centro de investigación en dinámica Celular (CIDC), por brindarme el espacio y las facilidades para la elaboración del proyecto y mi formación.

Al Hospital General de Temixco, el Hospital General de Cuernavaca “Dr. José G. Parres” y al Centro Estatal de Transfusión Sanguínea (CETS), al igual que a las personas gestantes y donadores, por aportar las muestras biológicas indispensables para el desarrollo de este proyecto y los demás trabajos del laboratorio citados en esta tesis.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el financiamiento otorgado a través del proyecto CF 2019 1727995 y por brindarme el apoyo económico de la beca nacional para estudios de posgrado, apoyo que me permitió desarrollar y concluir el proyecto de maestría.

A mi familia y en particular a mi madre y mi abuela, por brindarme un hogar y por su apoyo sin el cual no hubiera podido continuar y concluir el posgrado.

Por último, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, aunque no son mencionadas, de una u otra forma han contribuido a mi formación personal y profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Sistema inmune	1
<i>Respuesta inmune innata</i>	1
<i>Respuesta inmune adaptativa</i>	1
Linfocitos T	3
Activación de linfocitos T	4
<i>Señales coestimuladoras</i>	4
Metabolismo de linfocito T	5
<i>Metabolismo de linfocitos T vírgenes</i>	7
<i>Metabolismo de linfocitos T activos</i>	8
Inmunidad neonatal	12
<i>Mortalidad y causas de muerte de los neonatos</i>	13
<i>Linfocitos T CD4⁺ neonatales</i>	14
Modelado lógico	15
ANTECEDENTES	18
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
HIPÓTESIS	27
METODOLOGÍA	27
Purificación de células mononucleares de sangre	27
Purificación de linfocitos T CD4 ⁺	28
Purificación de linfocitos T CD4 ⁺ vírgenes	29
Estimulación de los linfocitos T CD4 ⁺	29
Tinción de marcadores de membrana y de viabilidad	29
Cuantificación de citocinas	30
Citometría de flujo	30
Modelado computacional	31
RESULTADOS	31
Modelo computacional de la influencia del metabolismo sobre la activación de los linfocitos T CD4 ⁺ de adultos y neonatos	31

<i>Datos experimentales del metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos</i>	<i>32</i>
<i>Integración de datos bibliográficos y datos experimentales en el modelo computacional</i>	<i>35</i>
<i>Validación del modelo computacional.....</i>	<i>37</i>
Efecto de la reprogramación metabólica y funcional de la suplementación con L-arginina y L-serina en la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos.....	41
<i>Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos</i>	<i>41</i>
<i>Efecto de la suplementación con aminoácidos en la expresión de la marca de activación CD69 en los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos</i>	<i>43</i>
<i>Efecto de la suplementación con aminoácidos en la viabilidad de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos</i>	<i>44</i>
<i>Efecto de la suplementación con aminoácidos en la producción de citocinas de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos.....</i>	<i>45</i>
Simulación computacional del efecto de la reprogramación metabólica inducida por el aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos	49
<i>Simulación del efecto del aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos</i>	<i>49</i>
<i>Simulación del efecto del aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos</i>	<i>51</i>
DISCUSIÓN	54
BIBLIOGRAFÍA	57

SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

NK: linfocitos citolíticos naturales o natural killer.

ILC: célula linfocítica innata.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

APC: célula presentadora de antígeno.

MHC: complejo principal de histocompatibilidad.

TCR: receptor de célula T.

CTL: linfocito T citotóxico.

Th: linfocitos T auxiliares o cooperadores.

Treg: linfocitos T regulador.

G0: etapa del ciclo celular donde la célula no se divide.

FAO: oxidación de ácidos grasos.

TCA: ácido tricarboxílico.

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH: nicotiamida adenina dinucleótido fosfato.

ATP: adenosín trifosfato.

GTP: guanosina Trifosfato.

OXPHOS: fosforilación oxidativa.

ETC: cadena de transferencia de electrones.

IL-7: interleucina 7.

IL-4: interleucina 4.

IL-6: interleucina 6.

IL-5: interleucina 5.

IL-13: interleucina 13.

IL-17A: interleucina 17A.

IL-17F: interleucina 17F.

IL-9: interleucina 9.

IL-22: interleucina 22.

IL-10: interleucina 10.

IL-2: interleucina 2.

IFN- γ : Interferón gamma.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

PI3K: fosfoinositol 3-cinasa.

Akt: proteína quinasa B.

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero.

PI3P: fosfatidilinositol 3-fosfato.

PDK1: Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1.

BAZ1B: bromodominio adyacente al dominio de dedo de zinc 1B.

PSIP1: proteína 1 Interactiva de PC4 y SRSF1.

TSN: proteína translin.

CASTOR1: sensor citoplasmático de arginina para mTORC1 - subunidad 1.

GATOR1: GAP Activity Towards Rags 1.

GATOR2: GAP Activity Towards Rags 2.

mTORC1: blanco de mamíferos del complejo de rapamicina 1.

mTORC2: diana de mamíferos del complejo de rapamicina 2.

c-Myc: factor de transcripción mielocitomatosis celular.

HIF-1 α : subunidad alfa del factor de transcripción 1 inducible por hipoxia.

GLUT: transportador de glucosa.

LAT1: Transportador de Aminoácidos tipo L 1.

ASCT2: Transportador de Alanina, Serina y Cisteína 2.

PPP: vía de las pentosas fosfato.

Acetil-CoA: acetil coenzima A.

Palmitoil-CoA: palmitoil coenzima A.

LDH: lactato deshidrogenasa.

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

NF- κ B: factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas.

Foxp3: forkhead box protein P3 (Proteína P3 de la caja cabeza de tenedor).

AP-1: activador proteico-1.

NFAT: factor nuclear de células T activadas.

α -KG: alfa cetoglutarato.

GLS: glutaminasa.

GDH1: glutamato deshidrogenasa 1.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

BPTES: Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide.

TLR: receptores tipo toll.

η = número de componentes o nodos que tiene un modelo.

χ = variable asociada a los nodos.

$x^{\rightarrow}$ = vector que representa el estado del modelo.

f = función lógica.

t = tiempo inicial.

$t + 1$ = tiempo inicial más una unidad de tiempo.

ECAR: tasa de acidificación extracelular.

OCR: tasa de consumo de oxígeno.

ADP-ribosa: adenosina difosfato ribosa.

NO: óxido nítrico.

ARG1/2: arginasa 1 o 2.

eIF5A: factor de iniciación de la traducción eucariota 5A.

Hyp: hipusina.

RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute.

SGOC: red metabólica de la serina, glicina y el metabolismo de un carbono.

THF: tetrahidrofolato.

SHMT1/2: serina hidroximetiltransferasa 1 o 2.

MTHFD1/2: metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1 o 2.

SAM: S-adenosil-L-metionina.

IMP: inosina monofosfato.

GSH: glutatión.

GCL: γ -glutamato-cisteína ligasa.

GS: glutatión sintasa.

SPTLC: serina palmitoiltransferasa.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

PBS: solución salina tamponada con fosfato.

PBMC's: células mononucleares de sangre periférica.

CBMC's: células mononucleares de sangre de cordón.

IgG: Inmunoglobulina G.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

APC: Alofococianina.

IR: infrarrojo.

SA-PE: estreptavidina-ficoeritrina.

2NBDG: 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa.

BODIPY: boron-dipyrromethene.

TMRM: tetrametilrodamina.

IMF: índice medio de fluorescencia.

E#: estado estable #.

WT: wild type o tipo silvestre.

KI: knock-in.

ES: condición control (Experimental Standard)

R5X: concentración L-arginina x5.

R10X: concentración L-arginina x10.

S5X: concentración L-serina x5.

S10X: concentración L-serina x10.

PI Cytokines: citocinas
proinflamatorias.

AI Cytokines: citocinas
antiinflamatorias.

FASynthesis: síntesis de ácidos
grasos.

NASynthesis: síntesis de ácidos
nucleicos.

AAO: oxidación de aminoácidos.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla del porcentaje de células que expresan los marcadores CD3, CD4, CD45RO y CD69.....	43
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema inmune innato y adaptativo	2
Figura 2. Activación de linfocitos T CD8+ y T CD4+	4
Figura 3. Señales para la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+	5
Figura 4. Cambios entre un estado metabólico glucolítico y oxidativo a lo largo de la respuesta inmune	7
Figura 5. Metabolismo de linfocito T inactivo	8
Figura 6. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR	9
Figura 7. Metabolismo de los linfocitos T CD4+ activos	12
Figura 8. Número de muertes de jóvenes menores de 25 años y causas de muertes neonatales en el año 2023	14
Figura 9. Modelado lógico	17
Figura 10. Comparación estadística de la proliferación de linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos en estado basal y en respuesta a la activación con anti-CD3 y anti-CD28	18
Figura 11. Producción de citocinas por linfocitos T CD4+ de neonatos y adultos en estado basal y en respuesta a la activación con anti-CD3 y anti-CD28	19
Figura 12. Heatmap del RNA-seq de linfocitos T CD4+ de adultos (A) y neonatos (N)	20
Figura 13. Red de las vías sobrerrepresentadas	21
Figura 14. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4+	23
Figura 15. Estados estables de la influencia del estado metabólico neonatal en la activación de los linfocitos T CD4+	24
Figura 16. Expresión del transportador GLUT1 y consumo de 2NBDG en linfocitos T CD4+ vírgenes y activados de adultos y neonatos	33
Figura 17. Consumo de ácidos grasos (BODIPY-C16) en linfocitos T CD4+ vírgenes y activados de adultos y neonatos	34

Figura 18. Potencial de membrana (TMRM) de los linfocitos T CD4+ vírgenes y activados de adultos y neonatos	34
Figura 19. Especies reactivas de oxígeno (MitoSOX-IMF) en linfocitos T CD4+ vírgenes y activados de adultos y neonatos.....	35
Figura 20. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4+	36
Figura 21. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4+ de adultos WT	38
Figura 22. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4+ de neonatos WT	40
Figura 23. Expresión de los marcadores CD3, CD4, CD45RO y CD69 en linfocitos T CD4+ vírgenes de adultos.....	42
Figura 24. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la expresión de CD69 en linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos a las 72 horas de estimulación	44
Figura 25. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la viabilidad de los linfocitos T CD4+ de adultos y neonatos a las 72 horas de estimulación	45
Figura 26. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la respuesta inmune de linfocitos T CD4+ de adulto a las 72 horas de estimulación	46
Figura 27. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la respuesta inmune de linfocitos T CD4+ de neonatos a las 72 horas de estimulación	48
Figura 28. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo de la activación de los linfocitos T CD4+ de adultos KI de L-serina y L-arginina	51
Figura 29. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo de la activación de los linfocitos T CD4+ de neonatos KI de L-serina y L-arginina	54

INTRODUCCIÓN

Sistema inmune

El sistema inmune es el encargado de generar la respuesta de defensa de un organismo frente a agentes externos potencialmente patógenos, como microorganismos y sus componentes (proteínas, polisacáridos, ADN, etc.). El sistema inmune puede responder rápidamente de forma general (respuesta inmune innata), usando componentes preexistentes en el organismo, o de forma más específica (respuesta inmune adaptativa), al modular diferentes tipos de respuestas inmunes y sus componentes.

Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra agentes externos; sus componentes siempre están presentes y activos en el organismo, incluso en ausencia de un patógeno o agente externo, lo que le permite generar una respuesta rápida. La respuesta inmune innata se promueve al reconocer estructuras comunes de los patógenos y productos de células dañadas. Los mecanismos de la inmunidad innata no distinguen diferencias específicas entre los patógenos (Abbas et al., 2023). Esta respuesta es general y se mantiene en caso de reinfección. Los principales componentes de la inmunidad innata son barreras físicas y químicas (tejido epitelial y sustancias antimicrobianas secretadas por el epitelio), componentes celulares, como las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales (natural killer o NK) y otras células linfocíticas innatas (ILC) y, por último, proteínas sanguíneas, como las proteínas del sistema del complemento [Figura 1] (Abbas et al., 2023).

Respuesta inmune adaptativa

La inmunidad adaptativa, a diferencia de la innata, puede reconocer características específicas de las estructuras de los patógenos y distinguir entre ellos. Los componentes de la inmunidad adaptativa distinguen entre antígenos de agentes extraños, los cuales en su mayoría son fragmentos de proteínas de entre 7 y 15 aminoácidos. La respuesta de la inmunidad adaptativa es específica para cada patógeno, además, en el caso de una reinfección, la magnitud, intensidad y eficiencia de la respuesta aumenta. A esta característica de la inmunidad se le llama memoria inmunológica (Owen et al., 2014).

Identificar al patógeno y generar una respuesta le toma entre 5 y 7 días al sistema inmune adaptativo, así que a diferencia de la del innato, la respuesta del sistema

adaptativo es más lenta. Los componentes del sistema inmune adaptativo son los linfocitos y sus productos, como anticuerpos y citocinas [Figura 1] (Abbas et al., 2023).

La inmunidad adaptativa puede dividirse en dos tipos: la humoral y celular. La inmunidad humoral se encarga principalmente de la defensa frente a patógenos extracelulares. Este tipo de inmunidad está conformada por los linfocitos B y los anticuerpos que estos secretan. Los anticuerpos reconocen y se unen a los antígenos del patógeno, impidiendo su capacidad de infección y marcándolo para su eliminación mediante diferentes mecanismos efectores. Por otro lado, la inmunidad celular depende de los linfocitos T. Este tipo de inmunidad se encarga de combatir a los patógenos intracelulares, como virus y algunas bacterias. Estos últimos pueden sobrevivir en el interior de las células del organismo infectado, por lo que la inmunidad celular favorece la eliminación de las células que actúan como reservorio del patógeno. Cabe mencionar que los linfocitos T también participan en la eliminación de patógenos extracelulares, reclutando leucocitos y ayudando a los linfocitos B a producir anticuerpos con mayor afinidad por los antígenos, aumentando su eficiencia (Abbas et al., 2023).

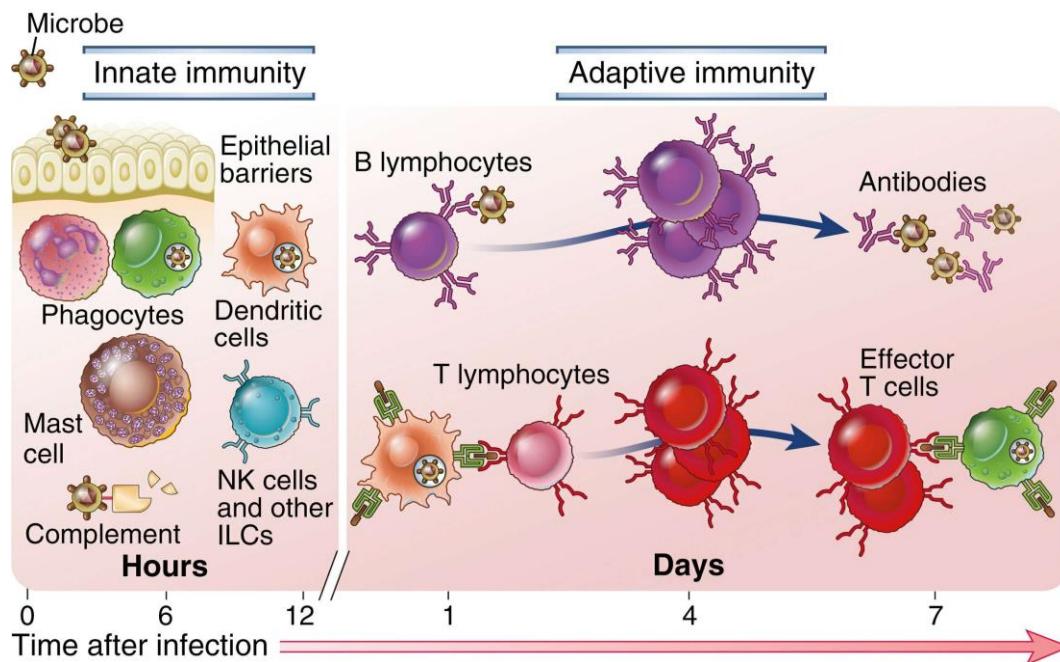


Figura 1. Sistema inmune innato y adaptativo: En esta imagen se muestran los componentes y mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa, la inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos, la respuesta adaptativa se activa por la interacción entre componentes de la respuesta inmune innata con los linfocitos T y B (Abbas et al., 2023).

Linfocitos T

Durante una infección, los componentes de la inmunidad innata se activan al reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Posteriormente, una célula presentadora de antígeno (APC), normalmente una célula dendrítica, procesa el patógeno y presenta antígenos del mismo en su superficie por medio del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I o II. Las células dendríticas activadas viajan a los órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos, donde los linfocitos T reconocen el antígeno mediante su receptor de célula T (TCR), lo que provoca su activación y diferenciación en linfocitos T con funciones efectoras, iniciando la respuesta inmune adaptativa (Owen et al., 2014).

Los linfocitos T pueden dividirse en dos tipos de células, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Los linfocitos T CD8⁺ pueden responder a la presentación de antígeno por el complejo MHC clase I y diferenciarse en linfocitos efectores citotóxicos. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) tienen su actividad en el sitio de la infección, donde identifican e interactúan con las células infectadas y las eliminan induciéndolas a la muerte celular programada (apoptosis). Por su parte, los linfocitos T CD4⁺ responden a los antígenos presentados por el MHC de clase II y pueden diferenciarse en uno de varios subgrupos de linfocitos T CD4⁺ activos (linfocitos T auxiliares o Th), por ejemplo, Th1, Th2, Th17 y Treg (Abbas et al., 2023; Luckheeram et al., 2012; Zhu et al., 2012). Estas poblaciones tienen diferentes funciones efectoras y su diferenciación depende de las señales que el linfocito recibe de la APC, del ambiente químico donde se diferencia y de otros linfocitos [Figura 2]. Cada subgrupo de linfocitos T CD4⁺ cumple con funciones específicas para eliminar al patógeno y evitar una inmunopatología que dañe al organismo durante la respuesta inmune; al diferenciarse adquieren la capacidad de producir y secretar varios factores de crecimiento y citocinas. Estos productos desencadenan y dirigen varios eventos importantes para la inmunidad, como la promoción de la activación y proliferación de otras células linfoides y macrófagos.

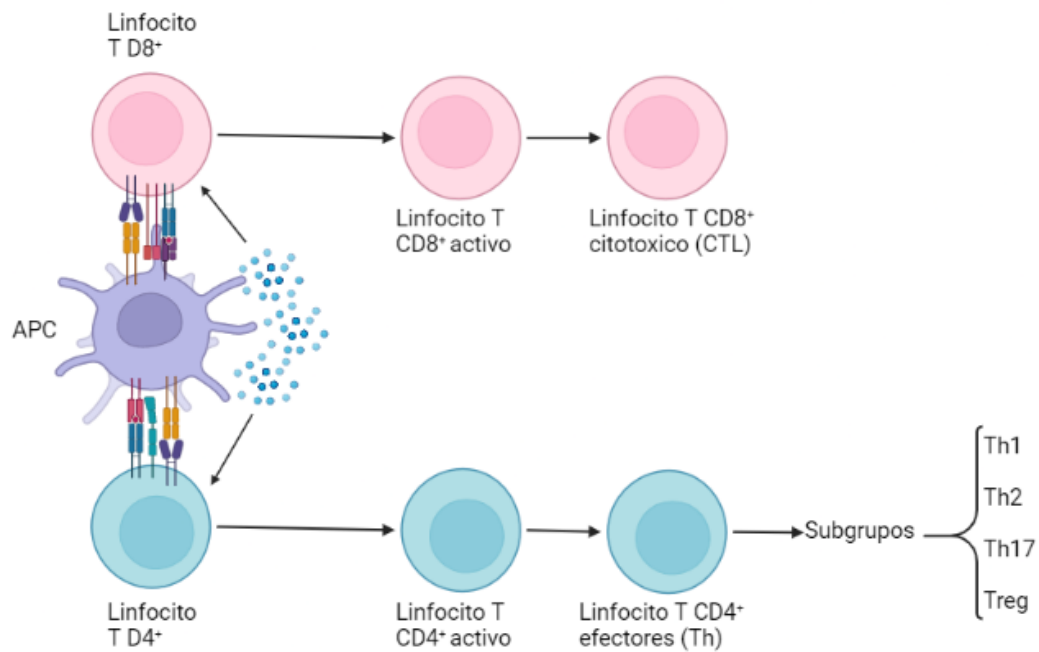


Figura 2. Activación de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺: En esta imagen se muestra la interacción entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T CD8⁺/CD4⁺ y la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos T efectores citotóxicos y auxiliares, respectivamente.

Activación de linfocitos T

Una vez que los linfocitos T maduran, salen del timo como células T vírgenes en la etapa G0 del ciclo celular. Al salir del timo, los linfocitos T maduros vírgenes entran en circulación, pasando por la sangre, la linfa y los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, placas de Peyer).

Si durante su recorrido por los órganos linfoides secundarios el linfocito T virgen encuentra una APC profesional que expresa un complejo MHC-antígeno en su superficie, el linfocito T interactuará con el complejo MHC-antígeno por medio del receptor de células T (TCR), formando un complejo TCR/MHC-antígeno. Esta interacción, junto con señales coestimuladoras proporcionadas por las APC y por el microambiente, desencadena la activación y la proliferación del linfocito, lo que permite que el linfocito T CD4⁺ se diferencie en un linfocito Th productor de citocinas, mientras que el linfocito T CD8⁺ se diferencia principalmente en un linfocito T citotóxico (CTL) (Abbas et al., 2023).

Señales coestimuladoras

La afinidad entre el TCR y el complejo MHC-antígeno es relativamente baja, lo que hace que esta interacción sea inestable y requiera ayuda para activar correctamente al linfocito T. El complejo TCR-antígeno-MHC es estabilizado por los correceptores CD4 en el caso de los linfocitos T CD4⁺ y CD8 en el caso de los linfocitos T CD8⁺; estos aumentan la avidez de la interacción, uniéndose al MHC clase I o II [Figura 3] (Owen et al., 2014).

Otra señal coestimuladora necesaria para la activación de las células T es la del receptor CD28, este receptor se puede unir a dos ligandos que se expresan en la superficie de las APC profesionales, CD80 y CD86. La unión de CD28 con CD80/86 desencadena una serie de señales e interacciones que desempeñan un papel importante en la activación y la respuesta de las células T [Figura 3] (Abbas et al., 2023).

Además de las señales proporcionadas por el complejo TCR/antígeno-MHC, estabilizado por el correceptor CD4/8 y la interacción del CD28 con CD80/86, la magnitud y las consecuencias de la activación de las células T están influenciadas por señales provenientes de citocinas, que pueden encontrarse en el ambiente, ser secretadas por la APC o por las células T. Estas citocinas se unen a sus receptores en la superficie de las células T y activan vías de señalización intracelulares que promueven diferentes procesos y eventos de la respuesta de los linfocitos T, como la proliferación, la supervivencia y la diferenciación [Figura 3] (Owen et al., 2014).

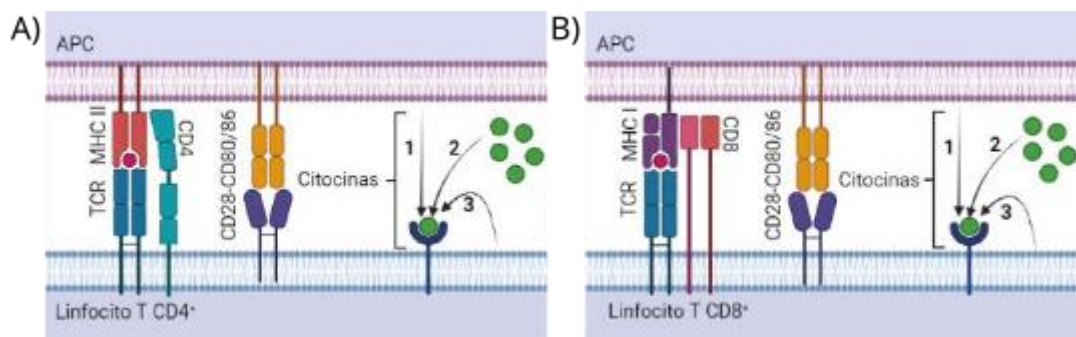


Figura 3. Señales para la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺: En esta imagen se muestra el complejo TCR/antígeno-MHC estabilizado por el correceptor CD4 en el caso de los linfocitos CD4⁺ (A) y CD8 para linfocitos CD8⁺ (B), la interacción entre CD28 y CD80/86 y la señal proporcionada por citocinas provenientes de 1) la APC, 2) el microambiente y 3) el linfocito T.

Metabolismo de linfocito T

Es bien sabido que el metabolismo de los linfocitos T está vinculado a los distintos estados y funciones que estos adquieren a lo largo de su vida. Entre los factores metabólicos que afectan la función de los linfocitos T están, el tipo de metabolismo (anabólico o catabólico), la disponibilidad de nutrientes, el nivel de expresión de proteínas metabólicas, la abundancia de intermediarios de las vías metabólicas y la producción o presencia de metabolitos con actividad inmunorreguladora (Chapman & Chi, 2022).

Los linfocitos T vírgenes se encuentran en un estado metabólico que depende de la oxidación de los nutrientes para obtener energía [Figura 4], pero durante una infección, la activación de los linfocitos T provoca una reprogramación metabólica hacia un programa altamente glucolítico [Figura 4]. Este estado promueve la síntesis de metabolitos necesarios para la síntesis de polímeros indispensables para el linfocito T activo y promueve la síntesis de biomoléculas que causan modificaciones postraduccionales que impulsan la activación y diferenciación de los linfocitos T, como los cambios epigenéticos necesarios para la activación (Lopez Krol et al., 2022). Una vez que la respuesta inmune termina y el patógeno es eliminado, la mayoría de los linfocitos T activos mueren por apoptosis, quedando solo los linfocitos T de memoria. Durante la diferenciación en células de memoria inmunológica, los linfocitos pasan nuevamente por una reprogramación metabólica en la que la glucólisis se reduce y se regresa a un programa metabólico oxidativo [Figura 4] (Michalek & Rathmell, 2010).

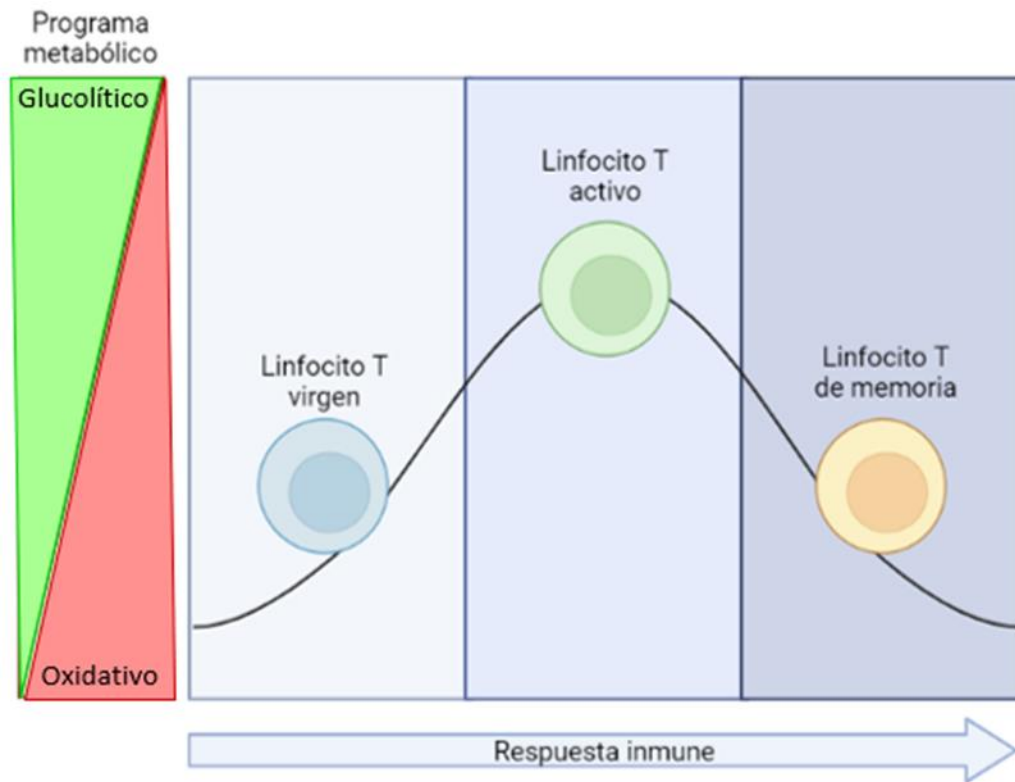


Figura 4. Cambios entre un estado metabólico glucolítico y oxidativo a lo largo de la respuesta inmune: En esta imagen se muestran los cambios que hay entre el programa metabólico oxidativo y glucolítico en las diferentes etapas de la vida de un linfocito T durante la respuesta inmune.

Metabolismo de linfocitos T vírgenes

Las células T vírgenes se encuentran en un estado basal con bajos niveles de actividad transcripcional y traduccional (Chapman et al., 2020). Estas células no realizan la división clonal ni secretan cantidades significativas de citocinas, por lo que su necesidad energética y de precursores biosintéticos es limitada (Almeida et al., 2016). Sin la necesidad de producir biomoléculas, los nutrientes disponibles pueden usarse para generar energía, a través de la β -oxidación de ácidos grasos (FAO), la oxidación del piruvato proveniente la oxidación de la glucosa a través de la glucólisis y la oxidación de aminoácidos como la glutamina, la cual es oxidada por la vía de la glutaminólisis. Los productos de la FAO, la glucólisis y la glutaminólisis se conectan con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para la producción de NADH y FADH₂. Este programa metabólico permite alcanzar un rendimiento óptimo en la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS) [Figura 5]. El ATP es necesario para el reordenamiento del citoesqueleto que ocurre

constantemente mientras el linfocito T virgen inactivo se encuentra en circulación (Maciver et al., 2013).

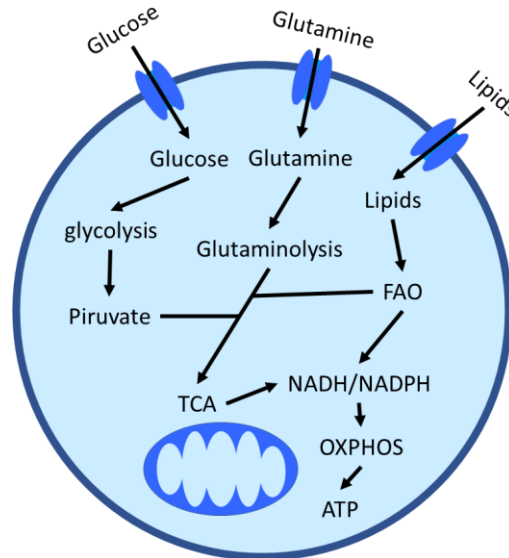


Figura 5. Metabolismo de linfocito T inactivo: En esta imagen se muestra cómo en los linfocitos T vírgenes los nutrientes disponibles son usados para la producción de poder reductor que es aprovechado por la OXPHOS para la síntesis de ATP.

El programa metabólico de los linfocitos T vírgenes es regulado por señales que el linfocito recibe durante su circulación. En ausencia de infección o patógeno, los linfocitos T en circulación reconocen, en menor cantidad e intensidad, señales que normalmente promueven su activación, como las inducidas por la IL-7 y el TCR. Estas señales mantienen la homeostasis del linfocito evitando la anergia o muerte de la célula (Chapman et al., 2020).

Metabolismo de linfocitos T activos

Cuando el linfocito T interactúa con una APC y recibe todas las señales necesarias para su activación, la célula experimenta cambios transcripcionales y una reprogramación metabólica. Los linfocitos T activos son altamente proliferativos y biosintéticos, por lo que aumenta la tasa metabólica y se pasa de un metabolismo catabólico a uno anabólico. El aumento en la tasa metabólica aumenta la producción de metabolitos con actividad inmunorreguladora y permite que intermediarios de las vías metabólicas sean usados para sintetizar todas las biomoléculas e intermediarios que la célula necesita para cumplir con sus funciones de linfocito T activo (Pearce & Pearce, 2013).

La activación de las células T requiere de la estimulación del TCR y la señal coestimuladora del CD28, las señales del TCR y el CD28 inducen la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR. La unión de CD28 con CD80/86 y de TCR con el MHCII-antígeno conduce a la fosforilación de PI3K, activándola y formando el fosfatidilinositol 3- fosfato (PIP3) [Figura 6] (Maciver et al., 2013). PIP3 permite el reclutamiento de diferentes isoformas de Akt y PDK1. PDK1 fosforila a Akt en sitios específicos, lo que activa a Akt. En su forma activa Akt fosforila a mTOR promoviendo su activación, mTOR activado puede formar 2 complejos, mTORC1 y mTORC2. Tanto mTORC1 como mTORC2 pueden activar de forma directa o indirecta los factores transcripcionales c-Myc y HIF1- α , los cuales promueven la transcripción de genes relacionados con el transporte de nutrientes y las vías que los metabolizan, como la glucosa y la glucólisis o la glutamina y la glutaminólisis, adicionalmente, el aumento en el transporte de nutrientes promueve la actividad de los complejos de mTOR, formando un ciclo de retroalimentación positivo que promueve la reprogramación metabólica [Figura 6] (Szwed et al., 2021).

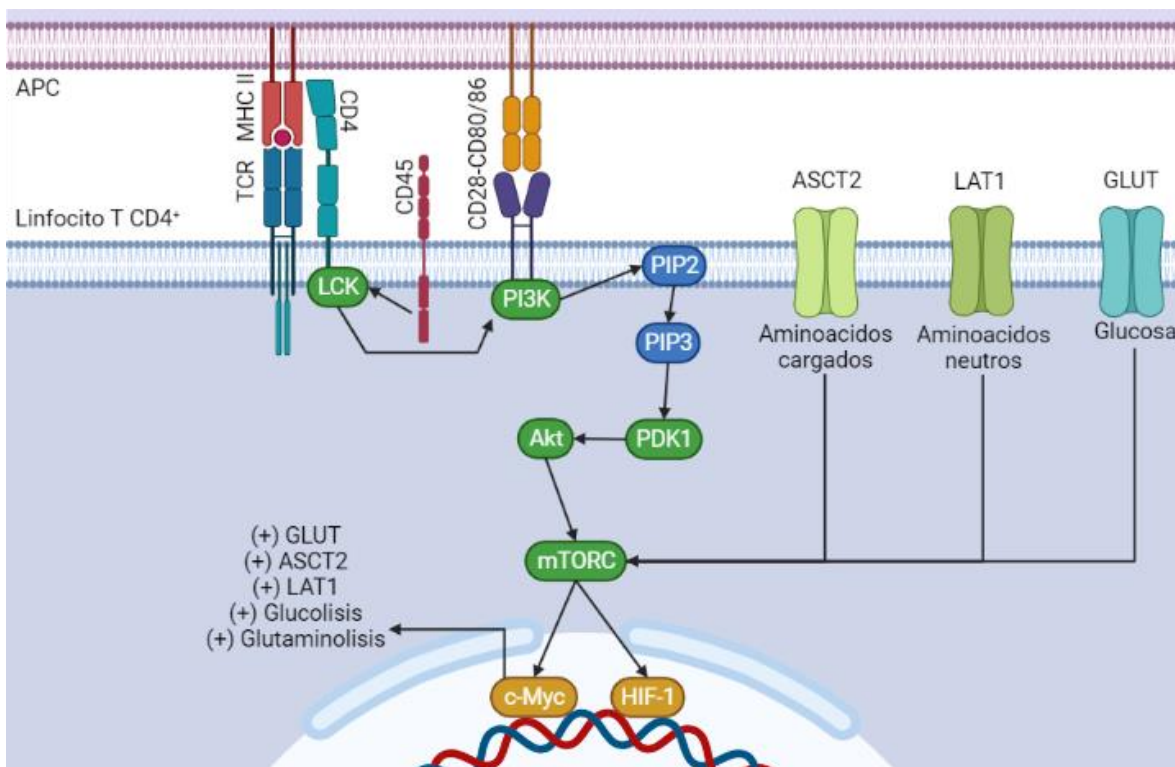


Figura 6. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR: En esta imagen se muestra como las señales del TCR y CD28 activan la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, causando un aumento en la expresión de transportadores de nutrientes como GLUT, LAT1 y ASCT2, y en los genes de vías metabólicas como la glucólisis y

glutaminólisis, también se muestra como el aumento en el transporte de los nutrientes promueve la señalización de mTOR.

Durante la activación y la reprogramación metabólica, la glucólisis aumenta. En el programa metabólico de los linfocitos T activados, el piruvato producido por la glucólisis se convierte principalmente en lactato en vez de Acetil-CoA para entrar en el ciclo del TCA, la síntesis de lactato es catalizada por el lactato deshidrogenasa (LDH), la reacción de síntesis de 2 moléculas lactato regenera 2 moléculas de NAD⁺ consumidas durante la glucólisis en la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), por lo que la síntesis de lactato es una parte importante de la reprogramación metabólica que impulsa el aumento en la tasa metabólica y la velocidad de la glucólisis. El rendimiento neto de ATP de la glucólisis es de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Este rendimiento de ATP es mucho menor que el que se obtiene por la fosforilación oxidativa, por lo que los linfocitos T activos necesitan consumir glucosa a un ritmo muy alto para poder producir toda la energía necesaria para satisfacer sus necesidades (Maciolek et al., 2014). Este fenómeno se conoce como el efecto Warbug, el cual es una característica de células con alta actividad proliferativa. El aumento en la glucólisis permite que los intermediarios de la vía se utilicen para la síntesis de biomoléculas, como la glucosa-6-fosfato, que puede convertirse en ribosa-5-fosfato por la vía de las pentosas fosfato (PPP), un metabolito necesario para la síntesis *de novo* de nucleótidos [Figura 7], un paso importante para la correcta activación y proliferación de los linfocitos T. El rápido aumento de la glucólisis y la síntesis de lactato, un metabolito con actividad inmunorreguladora, contribuye a la activación de los linfocitos T a través de la modificación postraducciona conocida como la lactilación; un ejemplo claro es el cambio epigenético inducido por la lactilación de los residuos de histonas en genes de factores transcripcionales clave para la activación y respuesta de los linfocitos T, como NF- κ B y Foxp3. En linfocitos T CD4⁺ de ratones, se ha demostrado que los niveles extracelulares de lactato pueden influir en la lactilación de los residuos de histonas (Lopez Krol et al., 2022), lo que podría afectar la activación y respuesta de los linfocitos T.

Además del aumento del metabolismo de la glucosa, la reprogramación metabólica aumenta el metabolismo de los aminoácidos. Una de las vías metabólicas de aminoácidos más estudiada en los linfocitos T es la glutaminólisis, la cual convierte la glutamina en glutamato, que es usado para la síntesis de alfa cetoglutarato (α -KG), un intermediario del TCA, el metabolismo de la glutamina también participa en la biosíntesis de nucleótidos, glutatión y otros aminoácidos (Yoo et al., 2020). Durante la activación de los linfocitos T, se promueve la glutaminólisis, que contribuye a la síntesis de intermediarios necesarios para la fabricación de

macromoléculas implicadas en la activación, diferenciación y proliferación (Yoo et al., 2020). La señalización de TCR y CD28 aumenta la expresión del transportador de glutamina ASCT2 y de enzimas del metabolismo de la glutamina, lo que incrementa su internacionalización y la tasa metabólica de sus vías (Nakaya et al., 2014; Wang et al., 2011). Cuando la glutamina extracelular entra al citoplasma, puede utilizarse para la biosíntesis de nucleótidos, hexosamina y asparagina. La glutamina citosólica puede entrar a la mitocondria, donde ocurre la glutaminólisis mitocondrial, que convierte la glutamina en glutamato mediante una reacción catalizada por la glutaminasa (GLS). En la mitocondria, el glutamato se convierte en α -KG mediante la enzima glutamato deshidrogenasa 1 (GDH1). El α -KG puede exportarse al citosol, donde participa en la biosíntesis de ácidos grasos. En la mitocondria, el α -KG puede entrar al ciclo TCA (Nelson & Cox, 2020; Yoo et al., 2020). Durante la activación de los linfocitos T, donde el piruvato contribuye más a la síntesis de lactato que a la síntesis de Acetil-CoA, la glutamina contribuye a soportar el metabolismo oxidativo mitocondrial. Adicional al papel de la glutamina en las vías que la metabolizan, esta participa en la señalización durante la activación de los linfocitos T, promoviendo indirectamente la captación de leucina, a través del transportador LAT1-CD98. La leucina y la glutamina promueven la activación de mTORC1, manteniendo el flujo metabólico e impulsando la reprogramación metabólica, y el glutamato producido por la glutaminólisis puede ser exportado al citosol y ser usado para generar glutatión, un antioxidante que neutraliza especies reactivas de oxígeno (ROS), ayudando a mantener el estrés oxidativo y las ROS en niveles apropiados para la activación (Chapman et al., 2020). Se ha demostrado que el uso de fármacos dirigidos a la glutaminólisis sirve como tratamiento contra enfermedades autoinmunes, como en el caso del síndrome de Sjögren, en el que el tratamiento de las células T CD4⁺ con el inhibidor de la Glutaminasa 1 BPTES normaliza su respuesta (Kronquist et al., 2022).

Durante la reprogramación metabólica, para compensar el desvío del piruvato hacia la síntesis de lactato, la glutaminólisis junto con la oxidación de otros aminoácidos (como el triptófano o la serina) y otras fuentes fisiológicas de carbono (como el acetato), impulsan el ciclo del TCA para aumentar y mantener los niveles de intermediarios necesarios para que estos contribuyan al anabolismo y a la generación del poder reductor que será aprovechado por la OXPHOS para la generación de ATP y aceptores de electrones como el NAD⁺, ambos necesarios para satisfacer las necesidades energéticas y biosintéticas del linfocito T CD4⁺ activo (Feng et al., 2022; Kaymak et al., 2022). Entre los intermediarios que salen del ciclo del TCA para contribuir al anabolismo, gracias al aumento en la tasa metabólica, se

encuentre el citrato, el cual es usado para la síntesis de novo de lípidos [figura 7] (Yoo et al., 2020).

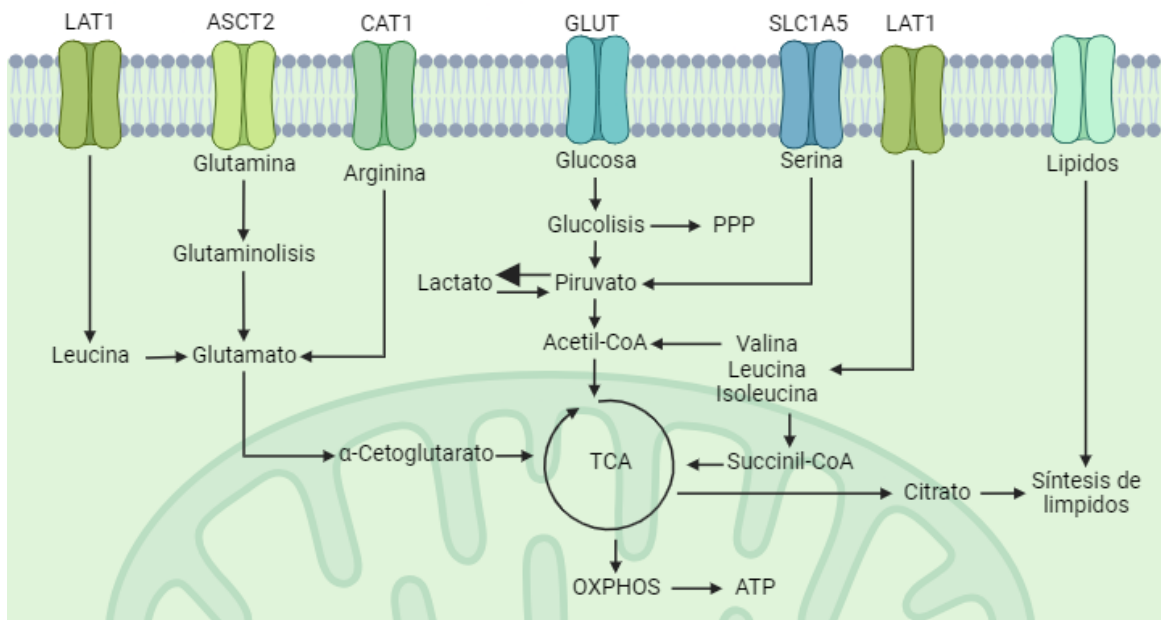


Figura 7. Metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ activos: En esta imagen se muestra cómo la glucosa y algunos aminoácidos son metabolizados durante la activación, además se muestra como el aumento en la tasa metabólica permite que algunos intermediarios de las vías salgan hacia la síntesis de biomoléculas, como lípidos y nucleótidos, los cuales son importantes para la proliferación.

Inmunidad neonatal

El nacimiento es una transición dramática del vientre materno, prácticamente estéril, a un ambiente rico en microorganismos, causando una exposición rápida a antígenos, por lo que para el sistema inmune neonatal es difícil reconocer entre microorganismos comensales y patógenos. Lo que genera la necesidad de una respuesta inmune menor a la de los adultos, que permita el establecimiento de la microbiota y reduzca el riesgo de sufrir daño causado por una respuesta inmune intensa y el costo energético que esta representa (Harbeson, Francis, et al., 2018; Pieren, 2022).

Aunque hoy en día está claro que el sistema inmune neonatal no está subdesarrollado o es inmaduro, y que en realidad la respuesta del sistema inmune durante el periodo neonatal está adaptada para las necesidades de esta etapa de la vida, también es claro que al priorizar la prevención de inmunopatologías sobre la eliminación de los patógenos, esto deja al neonato susceptible a infecciones,

siendo una etapa con una alta tasa de morbilidad (Harbeson, Ben-othman, et al., 2018).

Mortalidad y causas de muerte de los neonatos

Pese a los avances en la medicina, el periodo neonatal, que abarca los primeros 28 días de vida después del nacimiento, es una de las etapas más vulnerables del ciclo de vida de los humanos. Esta vulnerabilidad se refleja en la alta tasa de mortalidad neonatal y en el número de muertes que ocurren durante el periodo neonatal, en comparación con otros grupos de edad en etapas tempranas de la vida humana.

Entre los años 2000 y 2023 la tasa de mortalidad neonatal se redujo en un 44%, pasando de 31 muertes por cada 1000 nacidos vivos a 17 muertes por cada 1000 nacidos vivos, esta reducción en la mortalidad neonatal es menor que la que se obtuvo en niños menores de 5 años en el mismo periodo de tiempo, en el caso de los niños menores de 5 años su tasa de mortalidad se redujo en un 58%, paso de 47 muertes por cada 1000 nacidos vivos a 20 muertes por cada 1000 nacidos vivos (UNICEF & World Health Organization, 2024). A pesar de la disminución en la mortalidad neonatal entre los años 2000 y 2023, el porcentaje de muertes de niños menores de 5 años que ocurrieron durante el periodo neonatal va en aumento, en el año 2000 se reportaron 4.2 millones de muertes durante el periodo neonatal, que representaron el 39% de las muertes de niños menores de 5 años durante ese año, en el 2019 ocurrieron 2.4 millones de muertes neonatales que fueron el 48% de muertes de niños menores de 5 años (Paulson et al., 2021). Por último, en el año 2023 se reportaron 2.3 millones de muertes neonatales, que representan aproximadamente el 48% de las muertes de niños menores de 5 años [figura 8] (UNICEF & World Health Organization, 2024). Entre las 3 principales causas que contribuyen a las muertes durante el periodo neonatal se encuentran el nacimiento prematuro, eventos intraparto como la asfixia y/o traumas y causas relacionadas con el sistema inmune o infecciones, en el año 2019 la suma de las muertes neonatales que ocurrieron por causas relacionadas al sistema inmune como la sepsis o infecciones como la diarrea o infecciones respiratorias representaron aproximadamente el 17.8% de las muertes, en el año 2023 estas mismas causas de muerte representaron el 16.3% de las muertes neonatales [figura 8] (Perin et al., 2022; United Nations Children's Fund (UNICEF), 2024).

En conjunto, estas estadísticas revelan un estancamiento en los esfuerzos por reducir la mortalidad durante el periodo neonatal y evidencian la necesidad de estudiar el sistema inmune neonatal para abordar esta problemática.

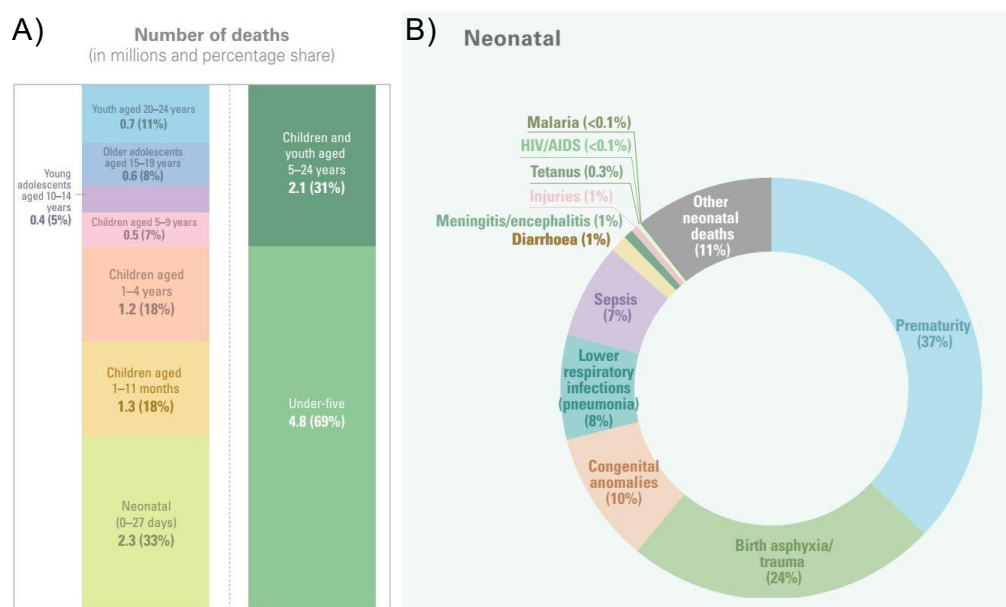


Figura 8. Número de muertes de jóvenes menores de 25 años y causas de muertes neonatales en el año 2023: En esta imagen se muestran las estadísticas de las muertes de jóvenes menores de 25 años (A) y las causas de muertes neonatales (B) durante el año 2023 (UNICEF & World Health Organization, 2024).

Linfocitos T CD4⁺ neonatales

En neonatos, los linfocitos T CD4⁺ desempeñan un papel importante en mantener la respuesta inmune atenuada durante el periodo neonatal. Los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen un paisaje epigenético característico que genera un transcriptoma y proteoma exclusivos de esta etapa de la vida, que les otorga su respuesta inmune tan característica a los neonatos (Bermick et al., 2022; Holm et al., 2021; Kempis-Calanis et al., 2024).

Los genes sobreexpresados en los linfocitos T CD4⁺ neonatales, en comparación con los de adultos, favorecen vías relacionadas con la proliferación y la glucólisis aeróbica, mientras que en los linfocitos T CD4⁺ de adultos los genes sobreexpresados en comparación con los de neonatos se relacionan con funciones de las células T, como la diferenciación. Los linfocitos T CD4⁺ de neonatos son menos responsivos que los linfocitos T CD4⁺ de adultos al estímulo del TCR; su respuesta a este estímulo se caracteriza por una menor producción de citocinas y marcadores de activación, como CD69, junto con una mayor proliferación en comparación con los linfocitos T CD4⁺ de adultos (Bermick et al., 2022; Kempis-Calanis et al., 2024). Esta mayor proliferación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales se puede apreciar incluso previa a la activación (Kempis-Calanis et al., 2024). Sin embargo, se ha reportado que los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen

características típicas de componentes del sistema inmune innato, como la expresión de receptores tipo Toll (TLR's), y se ha reportado que el estímulo de los linfocitos T CD4⁺ neonatales con ligandos de los TLR's puede promover una respuesta más parecida a la de los adultos (Pieren, 2022; Rudd, 2020).

Estos datos indican que los linfocitos T CD4⁺ neonatales tiene una red regulatoria diferente a los de adultos, la cual actúa a diferentes niveles (epigenómico, transcriptómico, metabólico, etc.) para equilibra la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ dependiendo del estímulo antigénico y otros factores como el microambiente, revelando la necesidad de estudiar esta red regulatoria a sus diferentes niveles, para desarrollar posibles estrategias para modular la respuesta inmune neonatal dependiendo de las necesidades que tenga el neonato.

Modelado lógico

El modelado computacional es una técnica que nos permite estudiar el complejo comportamiento dinámico de los sistemas biológicos, como redes regulatorias y de señalización. Mediante la abstracción del sistema, el modelado se centra en describir los componentes del mismo, sus interacciones y la influencia (positiva o negativa) que ejercen entre ellos (Naldi et al., 2018). Mediante su análisis, los modelos nos permiten identificar mecanismos de regulación y distintos blancos de interés en el sistema modelado. Los modelos computacionales pueden ser cuantitativos o cualitativos. En el caso de los modelos cuantitativos, estos requieren información cinética del sistema, la cual solo está disponible para sistemas bien definidos y ampliamente investigados, lo que limita su aplicación. Por otro lado, los modelos cualitativos se basan en una red de interacciones que representa la influencia que los componentes ejercen sobre el sistema modelado (Samaga & Klamt, 2013) y no requieren parámetros cinéticos ni otro tipo de conocimientos precisos sobre los mecanismos moleculares (Schwab et al., 2020).

En el modelo lógico, un número de n elementos llamados nodos [Figura 9-A)], representan los componentes del sistema biológico, por ejemplo, proteínas, genes o biomoléculas (Schwab et al., 2020). Los nodos también pueden simbolizar procesos completos, como las vías metabólicas, o fenómenos abstractos de los sistemas biológicos, como la diferenciación celular (Niarakis & Helikar, 2021). Las interacciones entre los componentes del sistema biológico, en el modelo, se representan mediante vectores que van del nodo/componente que induce la interacción hasta el nodo/componente al que afecta [Figuras 9-A, B) y C)]. El conjunto de nodos y vectores forma una red o gráfico regulatorio, que es una forma gráfica de describir el sistema [Figura 9-B) y C)] (Naldi et al., 2018).

Los nodos están asociados a una variable discreta entera ($x=\{x_1, \dots, x_n\}$), la cual es una abstracción lógica que nos permite conocer el estado del componente al que está asociado (Saadatpour & Albert, 2013). En el caso de los modelos booleanos, la variable x asociada a los nodos pueden tener un valor de 0 (ausencia/inactivado/apagado) o 1 (presencia/activado/encendido) (Niarakis & Helikar, 2021). Sin embargo, en los sistemas biológicos, un solo componente puede tener diferentes efectos en el sistema y en los demás componentes, dependiendo de su concentración o de su activación. En estos casos es necesario el uso de variables multivaluadas con un valor máximo mayor que 1 (Fauré & Kaji, 2018).

Las consecuencias de las interacciones sobre el modelo y sobre el valor de la variable a la que los nodos están asociados, están codificadas en las funciones booleanas o reglas lógicas ($f=\{f_1, \dots, f_n\}$). Las funciones booleanas se escriben con los operadores **AND**, **OR** y **NOT**, que describen todos los cambios que pueden ocurrir en la variable x asociada a los nodos y las condiciones necesarias para que estos cambios ocurran [Figura 9-B) y C)] (Niarakis & Helikar, 2021).

En el modelo, los nodos de entrada representan señales externas, como nutrientes (por ejemplo, la glucosa) o señales ambientales. Estos no están regulados por otros nodos, pero sí ejercen regulación sobre otros nodos; los nodos de entrada no tienen funciones booleanas asociadas y su variable tiene un valor basal. Los nodos internos del modelo están regulados por otros nodos y ejercen regulación sobre otros nodos, estos nodos representan componentes como proteínas. Los nodos de salida son regulados por otros nodos, pero no regulan a otros, y representan componentes como fenotipos o la diferenciación celular (Schwab et al., 2020).

Las funciones booleanas pueden usarse para trazar el progreso del modelo al tiempo $t+1$ partiendo de un estado inicial al tiempo t . El cambio del valor de la variable de un componente al tiempo $t+1$ depende de los niveles de los reguladores asociados a ese componente en el tiempo t . El estado del modelo al tiempo t puede definirse con el vector $\vec{x}(t)=\{x_1(t), \dots, x_n(t)\}$, y el cambio en el valor de la variable x del tiempo t al $t+1$ ($x_i(t) \rightarrow x_i(t+1)$), está definida por las funciones f asociada al respectivo nodo $x_i(t+1)=f_i(\vec{x}(t))$ (Schwab et al., 2020).

El comportamiento a largo plazo del modelo puede describirse mediante un gráfico de transición de estados, donde se representan las transiciones entre todos los estados posibles del modelo a lo largo del tiempo [Figura 9-D) y E)]. Si en el gráfico de transición de estados se llega a una secuencia periódica de estados, significa que se ha llegado a un atractor, en el cual los valores asociados a los componentes del sistema no cambian a menos que ocurra una perturbación (Schwab et al., 2020). Los estados estables pueden dividirse en dos tipos: 1) El primero se denomina atractores de estado estacionario [Figura 9-D)], los cuales son un solo estado donde

los valores de cada componente del modelo se mantienen constantes (punto fijo). Estos atractores estables se relacionan con el fenotipo y la diferenciación celular. 2) El segundo tipo de atractores son los cíclicos [Figura 9-E)], estos atractores están formados por una secuencia de estados que se repiten periódicamente; este tipo de atractores se asocia con el ciclo celular o ciclos circadianos (Schwab et al., 2020). En los modelos booleanos, los atractores cíclicos no suelen ser de gran interés y, de serlo, se tratan con cautela, ya que pueden surgir como consecuencia de cualquier asa de retroalimentación negativa presente en el modelo, sin que necesariamente representen lo que ocurre en el sistema biológico real.

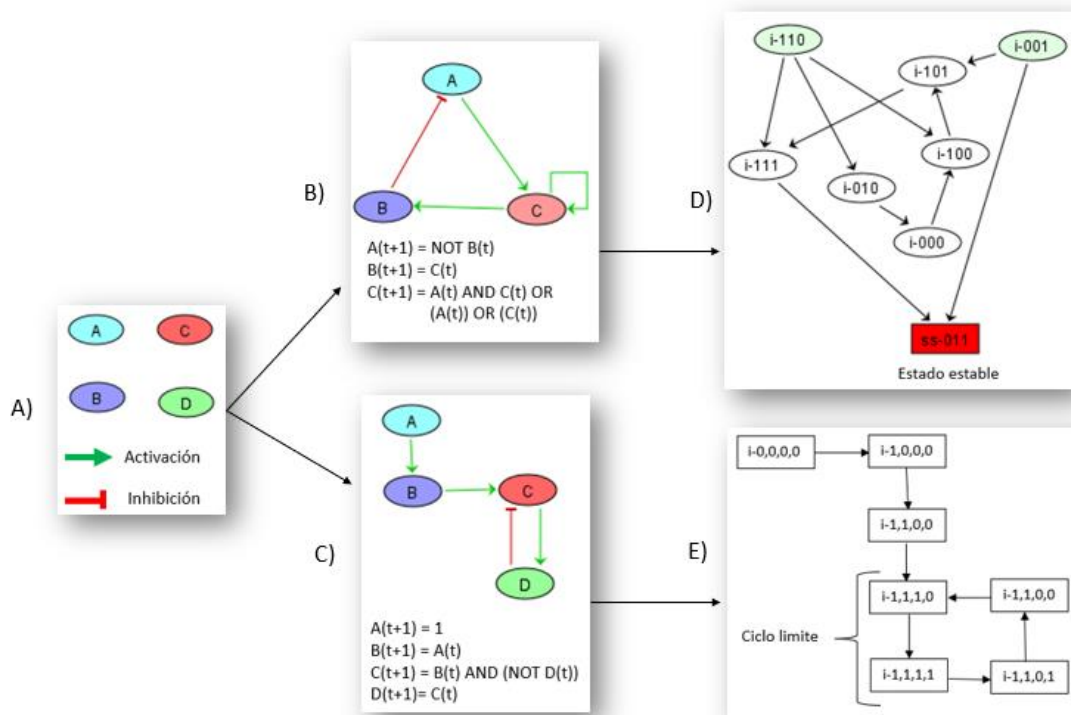


Figura 9. Modelado lógico: En el inciso A) se muestran nodos que representan los componentes de un sistema y los vectores que indican la interacción entre los componentes, los vectores tienen características que indican si la interacción es positiva o negativa. En los incisos B) y C), se muestran dos gráficos regulatorios formados por estos nodos y vectores, junto con sus funciones lógicas que describen las consecuencias de las interacciones sobre las variables asociadas a los nodos a lo largo del tiempo. En los incisos D) y E), se muestran dos gráficos de transición de estados que representan el cambio en los valores de las variables asociadas a los nodos a lo largo del tiempo. En el gráfico de transición de estados D) se llega a un estado estable; en el gráfico de transición de estados E) se llega a un ciclo estable compuesto por 4 estados que se repiten conforme pasa el tiempo.

ANTECEDENTES

En trabajos previos del laboratorio y de otros grupos, se han realizado esfuerzos para caracterizar la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, definir los mecanismos inmunoreguladores que causan la respuesta particular de los linfocitos T CD4⁺ durante el periodo neonatal y buscar posibles estrategias para modular esta respuesta inmune de acuerdo con las necesidades del neonato.

En publicaciones previas del laboratorio, se reportó una mayor proliferación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales en comparación con los de adultos, tanto en el estado basal como en respuesta a la activación [Figura 10] (Kempis-calanis et al., 2024).

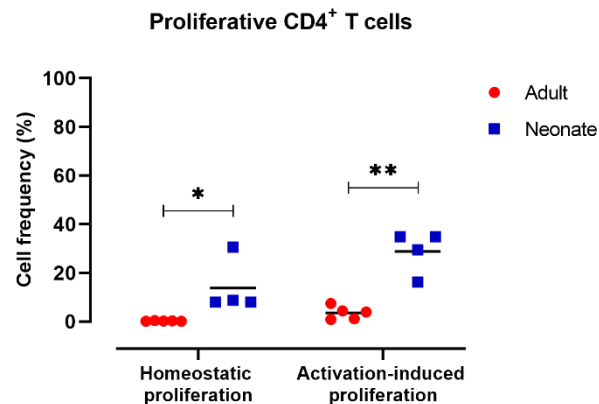


Figura 10. Comparación estadística de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos en estado basal y en respuesta a la activación con anti-CD3 y anti-CD28: En esta imagen se muestra una mayor proliferación de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos en comparación con los de adultos, antes y después de la activación (Kempis-Calanis et al., 2024).

Además, se reportó una menor producción de citocinas en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos en comparación con los de adultos en estado basal y en respuesta a la activación [Figura 11] (Kempis-calanis et al., 2024).

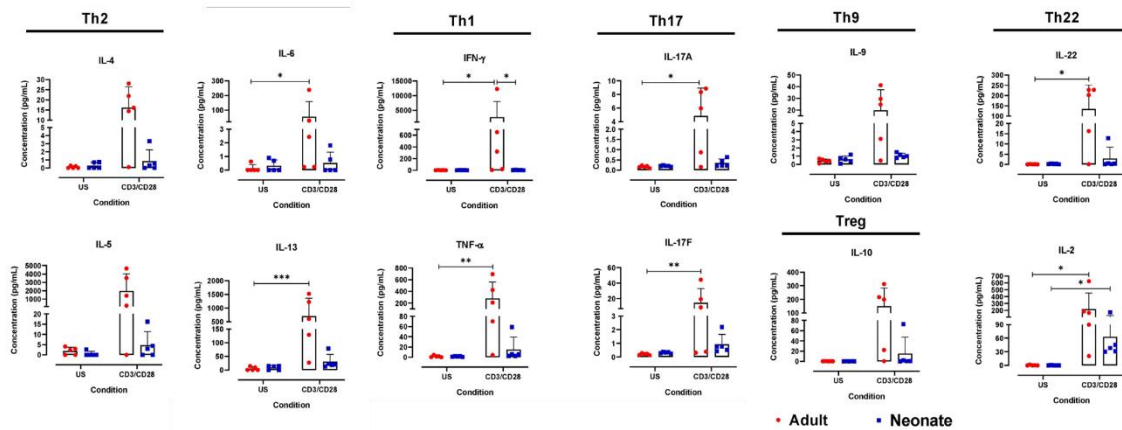


Figura 11. Producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos en estado basal y en respuesta a la activación con anti-CD3 y anti-CD28: En esta imagen se observa una menor producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ de neonatos en comparación con los de adultos, tanto en estado basal y después de la activación (Kempis-calanis et al., 2024).

También, al analizar el transcriptoma de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y de neonatos. Se reportó que entre los genes diferencialmente expresados, se encontró una sobreexpresión de genes de la glucólisis en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de neonatos en comparación con los de adultos [Figura 12] (KEMPIS, 2021).

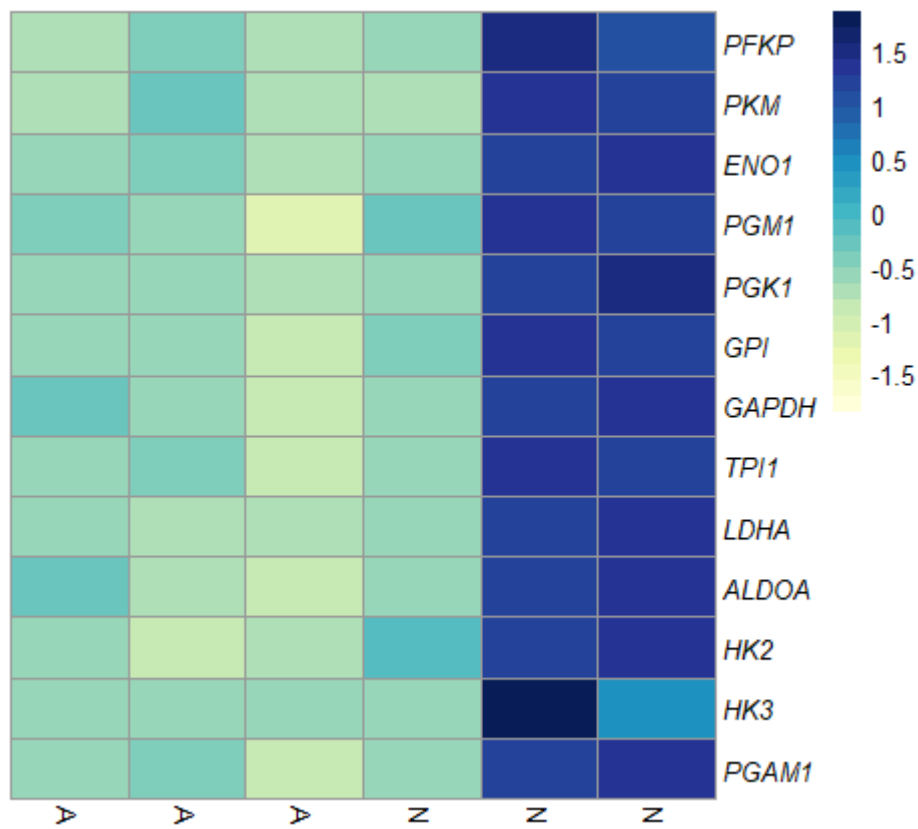


Figura 12. Heatmap del RNA-seq de linfocitos T CD4⁺ de adultos (A) y neonatos (N): En esta imagen se muestra un heatmap en el que se observa la diferencia en la expresión de RNA de enzimas relacionadas con la glucólisis entre linfocitos T CD4⁺ neonatales (N) y adultos (A) (KEMPIS, 2021).

En ese mismo estudio del transcriptoma, al analizar las funciones asociadas a los genes diferencialmente sobreexpresados entre los linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos, se identificaron vías relacionadas con el metabolismo, como la vía de señalización de HIF y el metabolismo central del carbono en el cáncer [Figura 13] (Kempis-calanis et al., 2024).

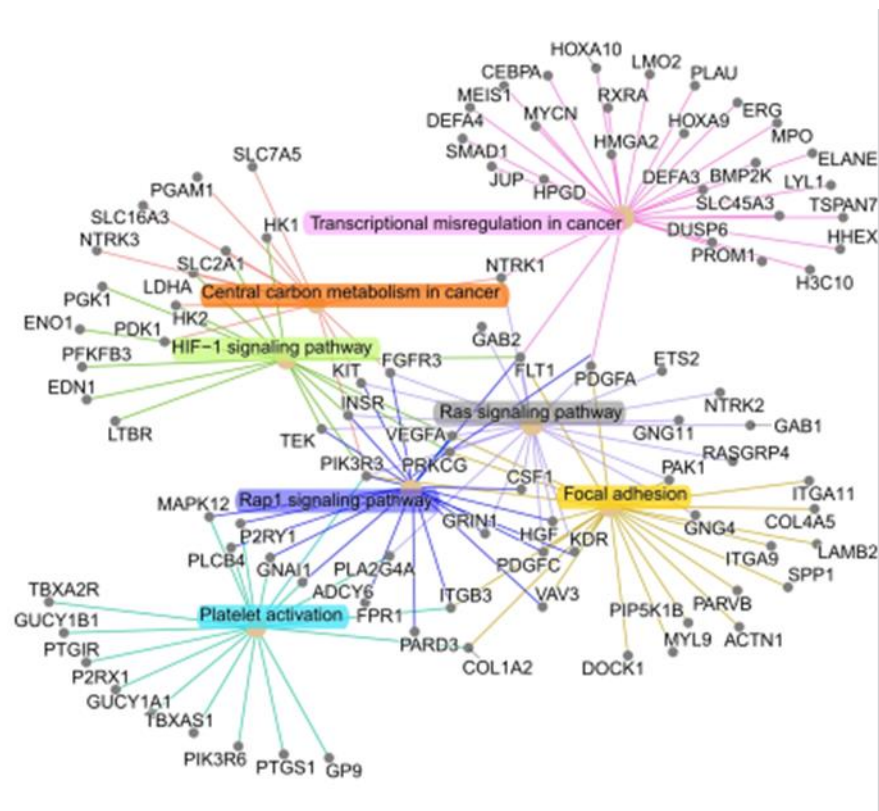


Figura 13. Red de las vías sobrerrepresentadas: En esta imagen se muestran las vías a las que están asociados los genes diferencialmente expresados entre linfocitos T CD4⁺ neonatales y adultos (Kempis-calanis et al., 2024).

Recientemente, se reportó que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de neonatos presentan una mayor expresión de genes relacionados con la glucólisis y una disminución en la expresión de genes relacionados con la cadena de transferencia de electrones, en comparación con los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos (Dwyer et al., 2025).

El programa transcripcional de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes se ve reflejado en su panorama metabólico. Recientemente, se reportó que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de neonatos tienen una mayor tasa de acidificación extracelular (ECAR) en comparación de los de adultos, lo que significa una mayor producción de lactato, uno de los productos de la glucólisis, sin embargo, no hay diferencias significativas entre la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos, lo que se puede interpretar como una actividad similar de la cadena de transferencia de electrones entre los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos (Dwyer et al., 2025). Durante el estímulo con los anticuerpos anti-CD3+anti-CD28, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de neonatos tienen un mayor

aumento en la tasa de acidificación extracelular y de consumo de oxígeno en comparación con los de los adultos, lo que significa que los linfocitos T CD4⁺ activados de neonatos tienen un mayor aumento en la glucólisis, ETC y la fosforilación oxidativa a comparación del aumento en los linfocitos T CD4⁺ activados de neonatos (Dwyer et al., 2025). Adicionalmente, se demostró que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos tienen una mayor expresión a nivel RNA y proteína de CD38 que cataliza la síntesis de ADP-ribosa, reacción que consume NAD⁺, esto causa una desregulación del poder reductor, con una mayor cantidad de NAD⁺ en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de neonatos en comparación de los de los adultos (Dwyer et al., 2025).

Para poder apreciar el efecto del estado metabólico neonatal sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, en el laboratorio se realizó un modelo computacional de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺, el modelo está compuesto por 212 nodos [Figura 14], de los cuales 156 nodos son booleanos, osea que estos nodos pueden tener solo 1 de 2 valores (0 y 1), y 56 nodos son nodos multivalor de los cuales la mayoría puede tener 1 de 3 valores (0, 1 y 2), pero algunos pueden tener 1 de hasta 4 valores (0, 1, 2 y 3). Las interacciones entre los nodos del modelo están representadas por 394 vectores, los cuales representan interacciones positivas y/o negativas [Figura 14]. Los componentes del sistema están asociados a 239 reglas lógicas que describen cómo se comportan los componentes en una transición de eventos a partir de un estado inicial. El modelo cuenta con nodos de entrada de color verde, que representan componentes que inician las vías de señalización y metabólicas, como la señalización del TCR y del CD28 o nutrientes como la glucosa y los ácidos grasos [Figura 14]. También contiene vías de activación de factores transcripcionales resaltados en amarillo, que son importantes para la activación de los linfocitos T CD4⁺, como NF-κB, AP-1 y NFAT [Figura 14]. Además, contiene vías de señalización que conectan la activación de los linfocitos T con su metabolismo, como la vía PI3K/Akt/mTOR que induce la reprogramación metabólica y es activada por la señalización del TCR y el CD28 [Figura 14]. El modelo contiene vías metabólicas completas como la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo de Krebs) [Figura 14], junto con nodos que representan procesos metabólicos del catabolismo (como la oxidación de ácidos grasos y la glutaminólisis) resaltados de color rosa [Figura 14]. El anabolismo (como la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos) está resaltado en azul y el anfibolismo (como la vía de las pentosas fosfato) en color morado [Figura 14]. Además, los nodos de fenotipo están mostrados de color gris, que representan conceptos más abstractos, como la secreción de citocinas, el nivel de activación de la glucólisis aerobia, o el ciclo celular [Figura 14] (Robles, 2023).

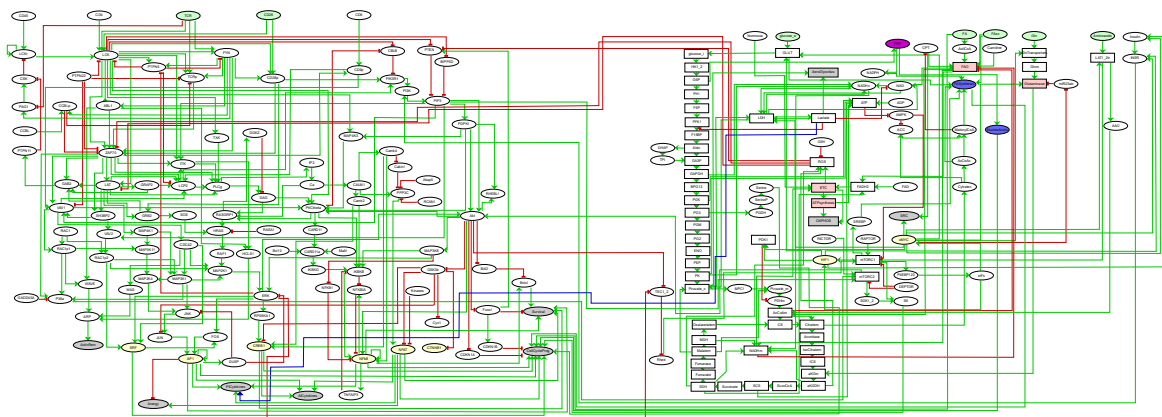


Figura 14. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺: En esta imagen se muestra el modelo computacional de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺, este modelo está formado por 212 nodos (156 nodos booleanos y 56 nodos multivalor) que están unidos entre sí por 394 vectores que representan interacciones positivas y/o negativas entre estos. El modelo tiene 7 nodos de entrada de color verde, 5 nodos que representan componentes del catabolismo de color rosa, 2 nodos que representan componentes del anabolismo de color azul, 1 nodo que representa componentes del anfibolismo de color morado, 8 nodos que representan factores de transcripción de color amarillo, 9 nodos de salida o de fenotipo de color gris y 180 nodos intermedios de color blanco que representan vías de señalización, vías metabólicas, proteínas, intermediarios, etc (Robles, 2023).

Usando el modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ se realizaron predicciones computacionales para poder observar la influencia de un estado metabólico neonatal rico en lactato y especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺, ambas características del estado metabólico de los linfocitos T CD4⁺ neonatales si se les compara con el estado metabólico de los linfocitos T CD4⁺ de adultos, en los estados estables del modelo bajo estas condiciones, las ROS y el lactato impide la producción de citocinas aun en presencia de las señales del TCR y el CD28 y el estado metabólico favorece la proliferación [Figura 15 - A)]. Adicionalmente, se realizaron predicciones mediante perturbaciones knock-in para reducir los niveles de ROS y de lactato. En los estados estables del modelo con estas perturbaciones se recupera la capacidad de secretar citocinas con los estímulos del TCR y CD28 [Figura 15 – B)] (Robles, 2023).

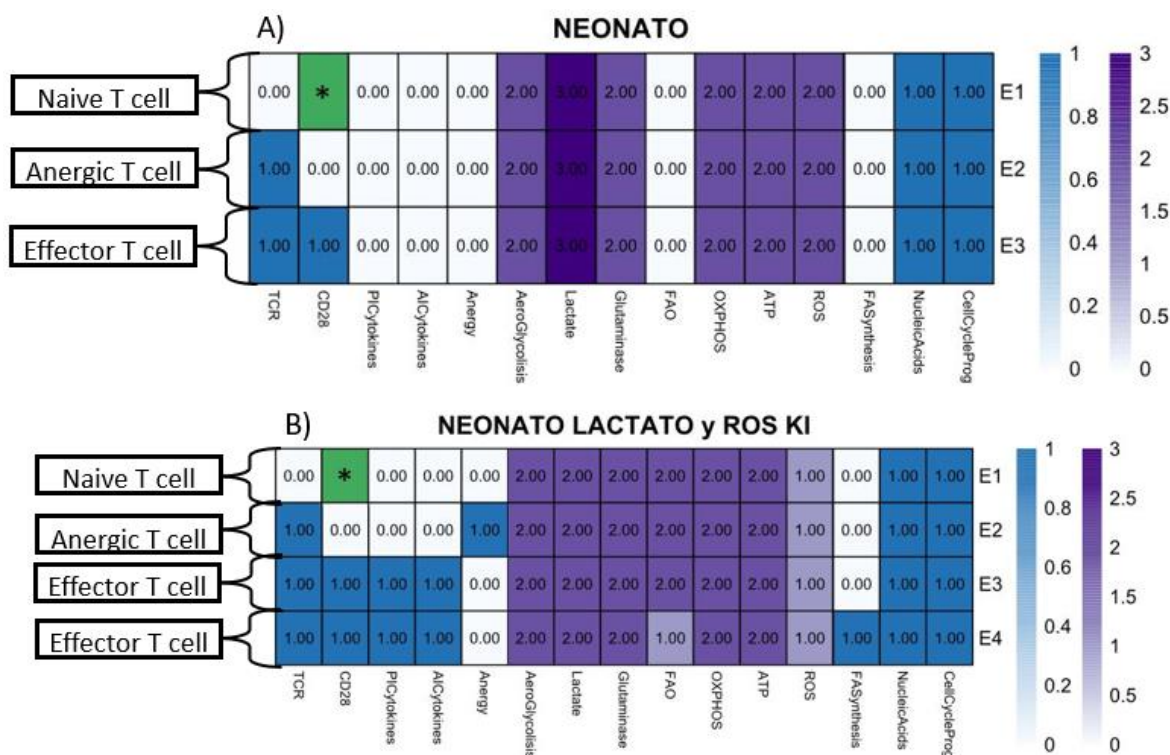


Figura 15. Estados estables de la influencia del estado metabólico neonatal en la activación de los linfocitos T CD4⁺: En esta imagen se muestran los estados estable de la influencia del estado metabólico neonatal en la activación de los linfocitos T CD4⁺, en el inciso A) se muestran los estados estables que el modelo produce bajo un estado metabólico neonatal con altas concentraciones de lactato y especies reactivas de oxígeno (ROS), en el inciso B) se muestran los estados estables que el modelo produce al reducir las ROS y el lactato en el estado metabólico neonatal (Robles, 2023).

La L-serina y la L-arginina son aminoácidos semiesenciales, esto significa que son aminoácidos que pueden ser sintetizados por las células del cuerpo humano bajo ciertas circunstancias. Sin embargo, la síntesis *de novo* de estos aminoácidos no es suficiente para compensar una deficiencia en la concentración de esto aminoácidos. Además de su papel en la síntesis de proteínas, aminoácidos como la L-serina y la L-arginina también son sustratos que impulsan vías metabólicas que afectan a diferentes niveles a las células del sistema inmune. En el caso de los linfocitos T CD4⁺, la L-arginina y la L-serina son rápidamente internalizadas durante la activación; su consumo del medio extracelular aumenta a niveles superiores a los necesarios para satisfacer las necesidades de síntesis de proteínas, lo que indica que estos aminoácidos son necesarios para alimentar vías metabólicas durante la activación (Geiger, Rieckmann, Wolf, Basso, et al., 2016).

La disponibilidad de la L-arginina y su metabolismo están estrechamente ligados a la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺; alteraciones en estos aspectos pueden producir resultados variados en estas células y en su biología (Martí i Líndez & Reith, 2021). Durante la activación y a lo largo de la respuesta inmune, la L-arginina desempeña un papel como mensajero molecular al interactuar con sensores moleculares a los que se une y promueve vías de señalización que modulan aspectos fundamentales para el correcto funcionamiento de los linfocitos T CD4⁺. La L-arginina promueve la supervivencia de los linfocitos T CD4⁺ de humanos al unirse a los reguladores transcripcionales BAZ1B, PSIP1 y TSN, los cuales promueven la supervivencia (Geiger, Rieckmann, Wolf, Basso, et al., 2016), la L-arginina también contribuye a la reprogramación metabólica de los linfocitos T CD4⁺ al promover la activación de mTORC1, la L-arginina puede unirse y activar a CASTOR1, CASTOR1 en su forma activa se disocia de GATOR2 y este se activa, GATOR2 activado puede inhibir a GATOR1, el cual es un inhibidor de la activación de mTORC1 (Szwed et al., 2021). El metabolismo puede usar la L-arginina como sustrato para la síntesis de diferentes compuestos que contienen nitrógeno, como las poliaminas, y de compuestos con actividad biológica como el óxido nítrico (NO) (Martí i Líndez & Reith, 2021). En condiciones normales de L-arginina, cuando esta es internalizada por los linfocitos T CD4⁺ humanos la L-arginina es rápidamente metabolizada por las enzimas arginasa 2 (ARG2) que convierten la arginina en ornitina, la ornitina puede mantenerse en el ciclo de la urea o ser usada por el metabolismo para la síntesis de poliaminas y L-prolina (Geiger, Rieckmann, Wolf, Basso, et al., 2016). La L-prolina puede usarse para la síntesis de proteínas o el metabolismo puede degradarla hasta formar α -KG, el cual puede entrar al TCA para producir poder reductor (Patriarca et al., 2021). El metabolismo de las poliaminas tiene un papel importante para la correcta activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺, en las células de mamíferos las poliaminas son la putrescina, la espermidina y la espermina. La espermidina es un sustrato necesario para la síntesis de la hipusina (Hyp), un aminoácido modificado que solo está presente en el factor de elongación de la traducción eIF5A (Puleston et al., 2021). eIF5A-Hyp facilita la elongación durante la traducción al mejorar la formación de enlaces peptídicos en secuencias específicas de aminoácidos, como las secuencias de poliprolina, eIF5A-Hyp también regula la traducción y traslado de proteínas mitocondriales que contienen secuencias de poliprolina, promoviendo el metabolismo mitocondrial (Chen et al., 2025). Se ha demostrado que el cultivo de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica de adultos y sangre de cordón umbilical en medio RPMI sin L-arginina provoca un programa epigenético que impide la correcta activación de los linfocitos T CD4⁺, aumentar la concentración de la L-arginina desde

cero hasta la concentración del medio RPMI, restaura el epigenoma y la respuesta inmune de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica de adultos y de sangre de cordón umbilical (Crump et al., 2021; Yu et al., 2021).

El metabolismo de la L-serina, así como otras vías metabólicas relacionadas, son necesarias para la correcta activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺, como para el cumplimiento de sus funciones efectoras. En linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de ratones y linfocitos T CD8⁺ de humanos, la activación aumenta la transcripción de genes de la red metabólica de la serina, glicina y del metabolismo de un carbono (SGOC) (E. H. Ma et al., 2017). Dentro del metabolismo SGOC, la L-serina puede ser procesada en el ciclo del tetrahydrofolato (THF) por la enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT 1/2), la reacción de la SHMT consume L-serina y tetrahydrofolato (THF) para producir L-glicina y 5,10-metilenTHF, en el ciclo del THF la enzima metilentetrahydrofolato deshidrogenasa (MTHFD 1/2) puede consumir el 5,10-metilenTHF y reducir a NAD(P)⁺ para formar 10-FormilTHF y NAD(P)H (E. H. Ma et al., 2017; Nelson & Cox, 2020; Sugiura et al., 2022). En linfocitos Th17 y Treg humanos, inhibir la enzima MTHFD2 disminuye la proliferación, incrementa la expresión de FOXP3 y reduce la actividad de mTORC1 (Sugiura et al., 2022). La L-glicina y el 10-FormilTHF son metabolitos necesarios para la síntesis de inosina monofosfato (IMP) el precursor de los nucleótidos de purina (ATP y GTP) (Nelson & Cox, 2020). Durante la activación de los linfocitos T CD4⁺ los nucleótidos de guanina como el GTP son clave para el correcto funcionamiento y activación de varias proteínas de la vía de activación de mTORC1 (Szwed et al., 2021). Además de usarse para la síntesis de L-glicina, la L-serina puede metabolizarse junto con la homocisteína para producir L-cisteína y α -cetobutirato (Nelson & Cox, 2020). La L-glicina y la L-cisteína pueden usarse para síntesis de glutatión (GSH), el L-glutamato y la L-cisteína reaccionen con la enzima γ -glutamato-cisteína ligasa (GCL) para formar γ -glutamil-cisteína que reacciona con la L-glicina para sintetizar GSH por medio de la enzima glutatión sintasa (GS) (Kurniawan et al., 2020; Nelson & Cox, 2020). En linfocitos Treg humanos, inhibir la enzima GCL disminuye la producción de GSH, aumenta la actividad de mTORC1 y causa una pérdida de la actividad supresora, privar a estos linfocitos Treg de L-serina o inhibir la síntesis de novo de L-serina restaura la expresión de FOXP3 (Kurniawan et al., 2020). Además de su papel en el metabolismo SGOC a través del ciclo del THF y en la síntesis de L-glicina y L-cisteína, la L-serina puede ser usada para la síntesis de novo de esfingolípidos, en el primer paso de la vía metabólica, la L-serina se condensa con palmitoil-CoA por la enzima serina palmitoiltransferasa (complejo SPTLC) (S. Ma et al., 2024). En los linfocitos T CD4⁺ humanos, la adición de esfingarina, un

metabolito de la vía de síntesis *de novo* de los esfingolípidos, promueve la diferenciación hacia el fenotipo Treg de forma dependiente de la dosis (S. Ma et al., 2024).

OBJETIVOS

Objetivo general

Modelar el efecto de la L-serina y L-arginina en la respuesta de activación de linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos humanos.

Objetivos específicos

1. Integrar los datos experimentales del metabolismo en un modelo computacional del efecto del metabolismo sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺.
2. Evaluar el efecto de los aminoácidos L-arginina y L-serina en la activación y la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos humanos.
3. Mediante el modelo computacional, proponer posibles mecanismos mediante los cuales los aminoácidos L-arginina y L-serina afectan la activación y la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ en neonatos y adultos.

HIPÓTESIS

Se ha reportado que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de neonatos presentan una respuesta atenuada al estímulo anti-CD3+anti-CD28 en comparación con los de adultos. Esta respuesta, en parte, se debe al programa metabólico de los linfocitos neonatales, caracterizado por un mayor consumo de nutrientes y un aumento en los productos metabólicos inmunomoduladores. **La L-arginina y la L-serina promoverán una activación más robusta de los linfocitos T CD4⁺ neonatales.**

METODOLOGÍA

Purificación de células mononucleares de sangre

Las muestras de sangre de adultos se obtuvieron de paquetes de Buffy Coats donados por el centro estatal de transfusión sanguínea (CETS). Las muestras de sangre neonatal se recolectaron del cordón umbilical después del parto, pero antes de la expulsión de la placenta, para evitar la contaminación de la muestra neonatal por la sangre materna. La sangre se recolecta en un tubo Falcón de 50 mL estéril

con EDTA (anticoagulante). Tanto las muestras de sangre de adultos como neonatales fueron tratadas para la purificación de linfocitos el mismo día de su recolección.

Para separar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) y las células mononucleares de sangre de cordón (CBMC's) de los eritrocitos, se realizó un gradiente de ficoll. El ficoll es un polisacárido hidrofílico altamente ramificado que genera un gradiente de densidad que separa las células mononucleadas de los eritrocitos, el suero, las plaquetas y los granulocitos. Para generar el gradiente, en un tubo Falcón se diluyeron 20 mL de sangre con 15 mL de PBS 1X (total = 35 mL), después, la sangre diluida se vació cuidadosa y lentamente en otro tubo Falcón con 10 mL de ficoll, sin romper el gradiente entre el ficoll y la sangre. El tubo Falcón con las fases de sangre y ficoll se centrifugaron a 1500 rpm por 30 min a 20 °C con desaceleración = 0 y aceleración = 9. Después de la centrifugación, se recolectó la fase blanca entre el suero y el ficoll, adicionalmente, se recolectaron 2 mL de la fase de eritrocitos para purificación de linfocitos T CD4⁺. Los eritrocitos recolectados se almacenaron en incubación con 8 mL de medio RPMI suplementado al 10%. A la fase blanca recolectada se le realizó un lavado con PBS 1X; se centrifugó a 1400 rpm durante 10 min a 20 °C, con desaceleración = 9 y aceleración = 9. Después del lavado se decantó el sobrenadante y las células mononucleares se incuban durante una noche en una caja Petri con medio RPMI 10% a 37°C y 5% de CO₂ para eliminar monocitos mediante la adherencia a plástico.

Purificación de linfocitos T CD4⁺

Después de la adherencia a plástico las células se recolectaron en un tubo Falcón y se les realizó un lavado con PBS 1X, se centrifugaron a 1400 rpm por 10 min a 20 °C con desaceleración = 9 y aceleración = 9. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de medio RPMI 10% y se les adicionaron 5 mL de los eritrocitos recolectados. A la mezcla de 10 mL de células mononucleares y eritrocitos se les adicionó el RossetSep para CD4. El RossetSep contiene tetrámeros de anticuerpos que reconocen a componentes de las células mononucleares no CD4⁺ (CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b y TCRγ/δ) que están unidos por su región Fc a anticuerpos que reconocen componentes de los eritrocitos (glicoforina A), esta combinación de anticuerpos permite que las células mononucleares que no son CD4⁺ se unan a los eritrocitos. Después la mezcla de eritrocitos y células mononucleares + RossetSep para CD4 se vació en otro tubo Falcón con 10 mL de ficoll de forma cuidadosa y sin romper el gradiente, después el tubo Falcón se centrifugan a 1500 rpm por 30 min a 20 °C con desaceleración = 0 y aceleración = 9. Al terminar la centrifugación, se recolectó la fase blanca que

está por encima del ficoll, la cual contiene los linfocitos T CD4⁺ totales (vírgenes y de memoria). Después de su recolección se les realizó un lavado a las células con PBS 1X.

Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes

A los linfocitos T CD4⁺ totales de adultos se les eliminaron las células de memoria mediante un tratamiento con perlas magnéticas unidas a un anticuerpo anti CD45RO, un marcador de linfocitos T de memoria, los anticuerpos se unen a las perlas magnéticas mediante las proteínas A y G de unión a IgG, que recubren la superficie de las perlas magnéticas, los linfocitos T CD4⁺ de memoria unidas a las perlas magnéticas después se separaron de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes al someter las células a un campo magnético, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes se recolectaron al ser centrifugadas a 3500 rpm durante 5 min, las células se recolectaron y se dejaron restablecerse en medio RPMI 10% a 37°C y 5% de CO₂ antes de utilizarlas.

Estimulación de los linfocitos T CD4⁺

Para apreciar el efecto de la L-serina y la L-arginina en la activación de los linfocitos T CD4⁺, las células se sometieron a 4 tratamientos de estimulación. Adicionalmente un grupo de células no fue estimulado para usarse como control. Para cada estimulación se necesitan alrededor de 1×10^6 células. El primer estímulo al que se sometió el primer grupo de células fue el de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. El segundo estímulo fue con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y suplementado con arginina. El tercer estímulo fue con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y suplementado con L-serina. El cuarto estímulo fue con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y suplementado con L-arginina y L-serina. Cabe mencionar que, en todos los casos en que se usaron anticuerpos estimuladores, también se usó un anticuerpo entrecruzador: goat anti-mouse IgG.

Tinción de marcadores de membrana y de viabilidad

Para realizar los controles de pureza, viabilidad y medir la activación de los linfocitos T CD4⁺ usados en los experimentos, se realizó la tinción de marcadores de membrana y de viabilidad. Para la tinción de los marcadores de membrana se necesitaron alrededor de 1×10^6 células que previamente fueron lavadas con PBS. Después del lavado, el sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en seco y se dejaron suspendidas en un volumen de 50 µL y se agregaron los anticuerpos o reactivos para la tinción deseada. Para medir la depleción de linfocitos T CD8⁺, se usaron los anticuerpos CD3 - FITC y CD4 - APC. Para medir la depleción

de los linfocitos T de memoria se usó el anticuerpo CD45RO - FITC. Para medir la activación de los linfocitos T CD4⁺ se usó el anticuerpo CD69 - FITC. Para la viabilidad se usó el Kit de tinción de células muertas cercano a IR de fijación LIVE/DEAD. Después de añadir los reactivos de tinción, las células se incubaron durante 20 min a 4 °C en oscuridad. Después de la incubación, a las células se les realizó un lavado con FACS; después del lavado el sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en seco y se fijaron con 300 µL de FACS y 30 µL de paraformaldehído al 15%.

Cuantificación de citocinas

Para la cuantificación de las citocinas, las células estimuladas bajo las diferentes condiciones se recolectaron al finalizar el estímulo, las células recolectadas se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, después de la centrifugación el sobrenadante se recolectó con una pipeta y se almacenó en 80 °C, las células se recolectaron y se tiñen con marcadores de membrana y de viabilidad. El día en que se cuantificaron las citocinas, el sobrenadante se descongeló en hielo. La cuantificación de citocinas se realizó mediante el kit LEGENDplex. Los ensayos LEGENDplex son inmunoensayos que utilizan el principio básico de los inmunoensayos de tipo sándwich. El ensayo LEGENDplex utiliza perlas de diferentes tamaños e intensidades de fluorescencia interna. Cada conjunto de perlas está conjugado a un anticuerpo específico que reconoce una citosina en particular (anticuerpo de captura). Cuando las perlas con el anticuerpo de captura se mezclan e incuban con una muestra que contiene las citocinas objetivo, cada citosina se unirá a su perla de captura específica. Después de un lavado, a la mezcla se agregan anticuerpos biotinilados (anticuerpo de detección) que reconocen las citocinas unidas a los anticuerpos de captura, formando así sándwiches de perlas de captura, analito y anticuerpos de detección. Posteriormente a la mezcla se añade estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), que se unirá a los anticuerpos de detección, produciendo una señal fluorescente proporcional a la cantidad de citocinas unidas a las perlas. Dado que las perlas se diferencian por tamaño e intensidad de la fluorescencia interna, en un citómetro de flujo se pueden separar poblaciones específicas de analitos y cuantificar la señal fluorescente de PE. La concentración de las citocinas se determinó mediante una curva estándar generada con concentraciones conocidas de las citocinas a cuantificadas.

Citometría de flujo

Para el análisis de las muestras por citometría, se utilizó un citómetro de flujo Attune NxT de la marca Thermo Fisher. Al pasar las células se obtuvieron al menos 10,000

eventos y se utilizó la compensación de los fluoróforos para restar el solapamiento de los espectros de emisión. Los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo v10.0.7 y el análisis estadístico se realizó con la paquetería de R ggpubr.

Modelado computacional

Para realizar las predicciones computacionales de la influencia de la L-arginina y la L-serina, se partió de un modelo computacional de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺, el cual fue elaborado a partir de dos modelos: un modelo del metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ y otro de las vías de activación de los linfocitos T CD4⁺ publicado en el año 2019 [(Rodríguez-Jorge et al., 2019) (<http://ginsim.org/node/225>)]. El modelo fue modificado con base en una investigación en la bibliografía y en bases de datos, para la obtención de información sobre el efecto de la L-arginina y la L-serina en la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺, así como sobre temas relacionados, como el inmunometabolismo y el metabolismo de la L-serina y la L-arginina. Conforme la información era recopilada, se fue integrando al modelo en forma de nodos y vectores. Las consecuencias de las interacciones de los nuevos componentes adicionados se redactaron en forma de reglas lógicas con los símbolos {&, |, !}, para representar los operadores {AND, OR, NOT}. Una vez que el modelo integraba satisfactoriamente la información recopilada. Se realizaron análisis de estados estables junto con las perturbaciones knock-out y knock-in necesarias para apreciar teóricamente la posible influencia de la L-arginina y la L-serina sobre los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos. Este procedimiento se realizó con ayuda del software GINsim [(v3.0), (Naldi et al., 2018) (<http://ginsim.org/>)].

RESULTADOS

Modelo computacional de la influencia del metabolismo sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos

Para poder comprender el efecto del programa metabólico de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos sobre su activación y respuesta así como el posible efecto de la reprogramación metabólica inducida por el aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos, se empleó un modelo computacional lógico multinivel que nos permite entender a diferentes niveles el sistema biológico modelado, en este caso, los linfocitos T CD4⁺ y su metabolismo. Para asegurar que nuestro modelo refleje de forma genuina la activación y la reprogramación metabólica de los linfocitos T

CD4⁺ de adultos y neonatos, así como la influencia del estado metabólico sobre la activación y el efecto del estado metabólico inducido por la suplementación con L-serina y L-arginina, se realizó una investigación de temas de interés relacionados al proyecto en la bibliografía y bases de datos, por ejemplo, temas como el metabolismo de linfocitos T neonatales, el metabolismo de los aminoácidos L-arginina y L-serina, el efecto del metabolismo sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺, etc. Para complementar la información disponible en la bibliografía sobre el metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, se realizó un análisis estadístico de datos experimentales del metabolismo de linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos antes y después de la activación. Previamente, los experimentos del metabolismo de los linfocitos TCD4⁺ de adultos y neonatos fueron realizados por el Mtro. Francisco Castañeda Gómez (Castañeda, 2025). La información obtenida de los datos experimentales y de la investigación en la bibliografía y en bases de datos se integró en nuestro modelo lógico computacional sobre la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺.

Datos experimentales del metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos

Para poder valorar las diferencias en el consumo de glucosa entre los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos antes y después de la activación, el Mtro. Castañeda utilizó un anticuerpo dirigido al transportador de glucosa GLUT1 el cual está unido a un fluoróforo y también utilizó 2NBDG, un análogo de la glucosa fluorescente, el cual puede ser internalizado por el transportador de glucosa GLUT. En los resultados no se observa una diferencia significativa en la expresión de GLUT1 en linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos [Figura 16 – A)], pero los linfocitos T CD4⁺ activados de neonatos tienen una mayor expresión de GLUT1 en comparación con los linfocitos T CD4⁺ activados de adultos [Figura 16 – B)], además, antes y después de la activación los linfocitos T CD4⁺ de los neonatos tienen una mayor internalización de 2NBDG [Figura 16 – C) y D)].

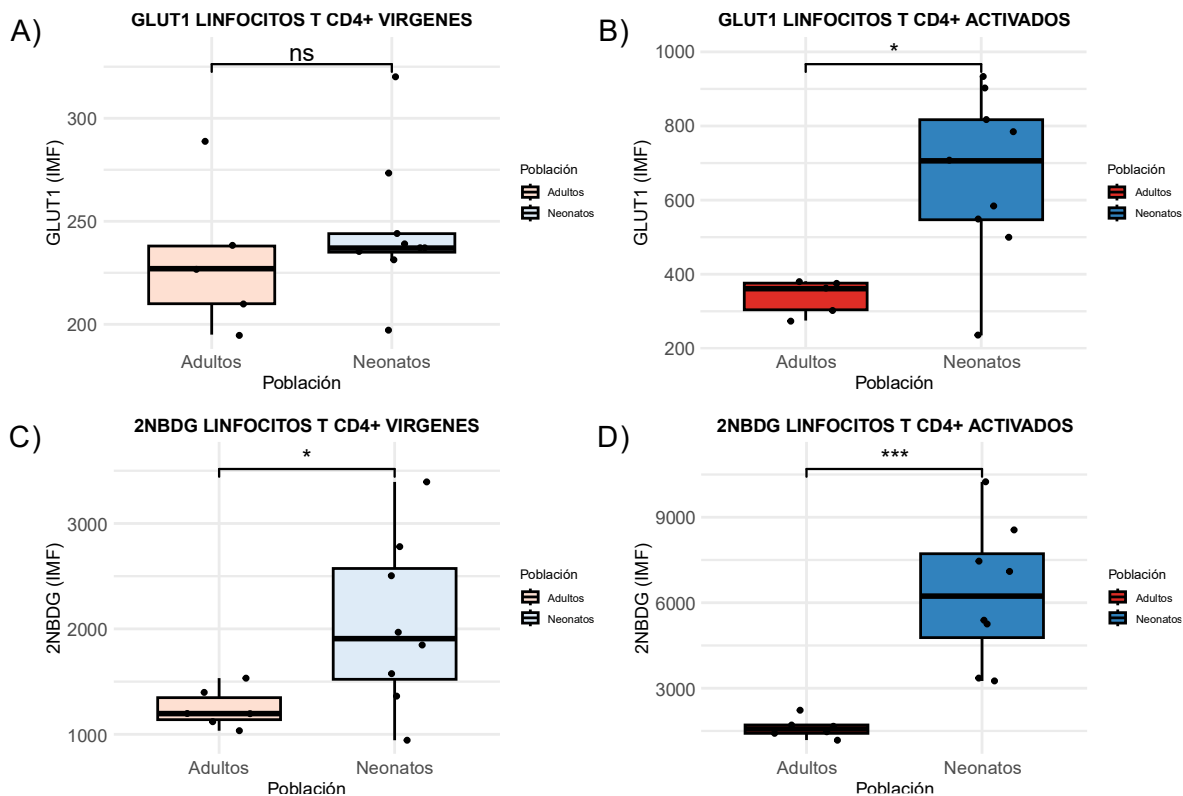


Figura 16. Expresión del transportador GLUT1 y consumo de 2NBDG en linfocitos T CD4⁺ vírgenes y activados de adultos y neonatos: En esta imagen en el inciso A) se muestra la expresión del transportador de glucosa GLUT1 en linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos, en el inciso B) se muestra la expresión del transportador de glucosa GLUT1 en linfocitos T CD4⁺ activados de adultos y neonatos, en el inciso C) se muestra el consumo de 2NBDG de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos, en el inciso D) se muestra el consumo de 2NBDG de los linfocitos T CD4⁺ activados de adultos y neonatos. Los datos originales fueron obtenidos por el Mtro. Castañeda (Castañeda, 2025).

Para valorar las diferencias en el consumo de ácidos grasos entre los linfocitos T CD4⁺ de adultos y de neonatos, el Mtro. Castañeda utilizó el fluoróforo BODIPY-C¹⁶, que se emplea para cuantificar la captación y el almacenamiento de ácidos grasos de cadena larga en las células. En los resultados, se puede apreciar que, antes y después de la activación, los linfocitos T CD4⁺ de neonatos presentan un mayor consumo de BODIPY-C¹⁶ que los de adultos [Figura 17 – A) y B)].

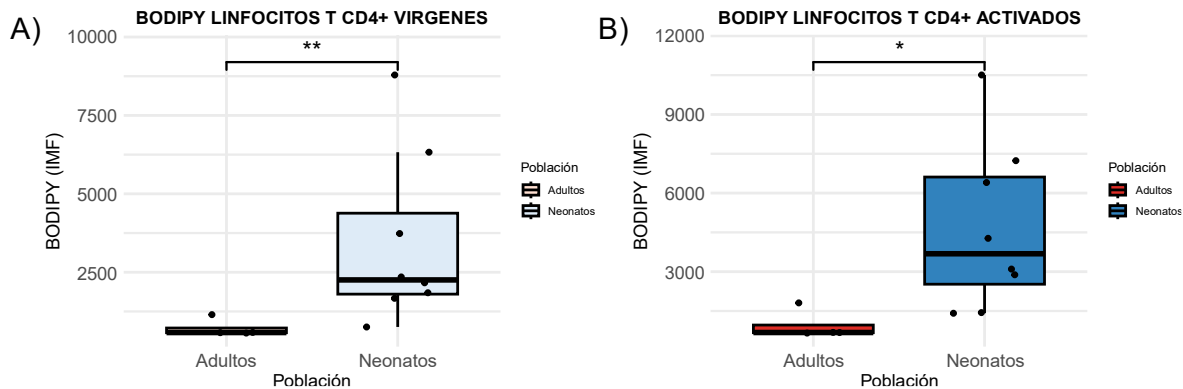


Figura 17. Consumo de ácidos grasos (BODIPY-C16) en linfocitos T CD4⁺ vírgenes y activados de adultos y neonatos: En esta imagen en el inciso A) se muestra el consumo de BODIPY en linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos, en el inciso B) se muestra el consumo de BODIPY C16 en linfocitos T CD4⁺ activados de adultos y neonatos. Los datos originales fueron obtenidos por el Mtro. Castañeda (Castañeda, 2025).

Para valorar las diferencias en el funcionamiento de las mitocondrias de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos, el Mtro. Castañeda evaluó el potencial de membrana mediante el tetrametilrodamina (TMRM), el cual es una molécula fluorescente, lipofílica y catiónica, gracias a estas características el TMRM puede difundir por las membranas celulares y es atraído por la carga negativa en el interior de la mitocondria. En el análisis de los datos experimentales con TMRM, no se obtuvieron diferencias significativas en el potencial de membrana de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos antes y después de la activación [Figura 18 – A) y B)].

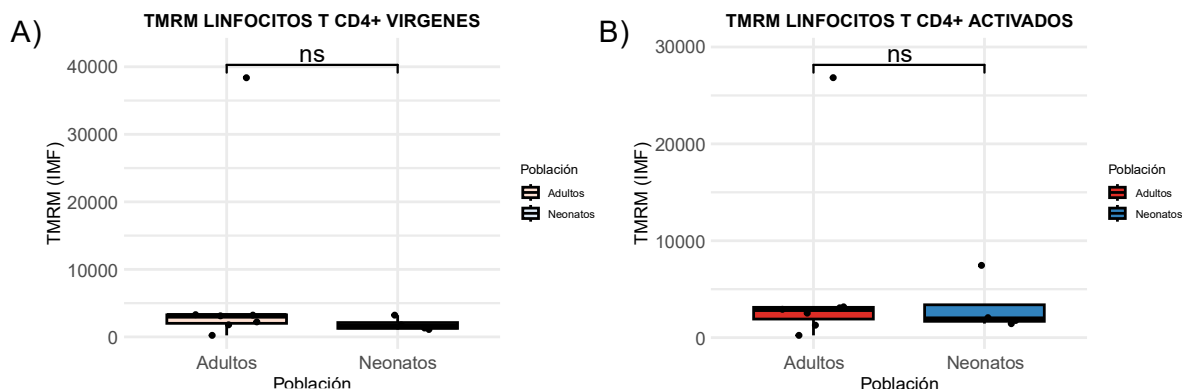


Figura 18. Potencial de membrana (TMRM) de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes y activados de adultos y neonatos

Figura 18. Potencial de membrana (TMRM) de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes y activados de adultos y neonatos: En esta imagen en el inciso A) se muestra el potencial de membrana (TMRM-IMF) de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos, en el inciso B) se muestra el potencial de membrana (TMRM-IMF) de los

linfocitos T CD4⁺ activados de adultos y neonatos. Los datos originales fueron obtenidos por el Mtro. Castañeda (Castañeda, 2025).

Para valorar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) el Mtro. Castañeda usó MitoSOX, el cual es oxidado por las especies reactivas de oxígeno y produce fluorescencia. En los resultados obtenidos parece haber una tendencia que indica que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos tienen una mayor producción de ROS que los adultos antes y después de la activación [Figura 19 – A) y B)], aunque faltan repeticiones con muestras de neonatos para poder afirmar que la tendencia es cierta y que es estadísticamente significativa.

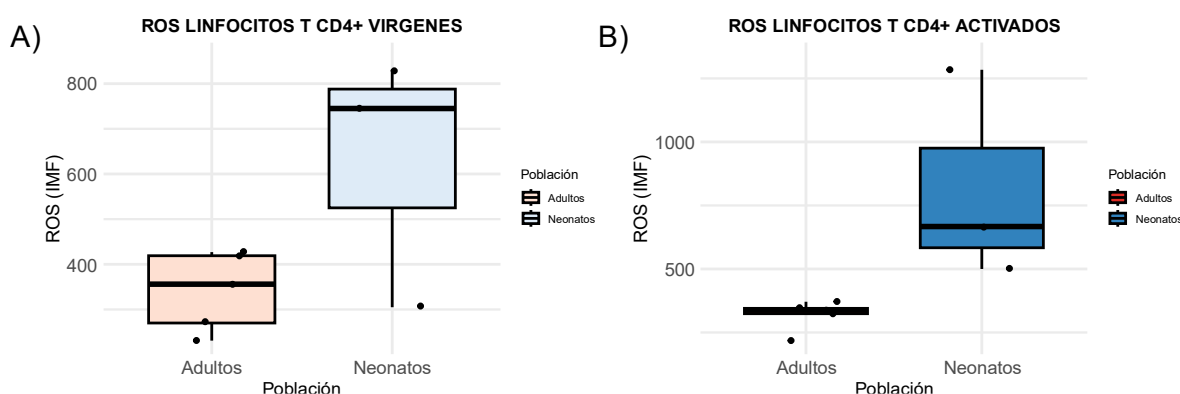


Figura 19. Especies reactivas de oxígeno (MitoSOX-IMF) en linfocitos T CD4⁺ vírgenes y activados de adultos y neonatos: En esta imagen en el inciso A) se muestra la producción de ROS (MitoSOX-IMF) en linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos, en el inciso B) se muestra la producción de ROS (MitoSOX-IMF) en linfocitos T CD4⁺ activados de adultos y neonatos. Los datos originales fueron obtenidos por el Mtro. Castañeda (Castañeda, 2025).

Integración de datos bibliográficos y datos experimentales en el modelo computacional

Para asegurar que nuestro modelo represente correctamente los sistemas modelados y recree de forma fidedigna los eventos ocurridos en nuestros experimentos en las diferentes condiciones de cultivo, los resultados obtenidos del análisis estadístico de los datos experimentales y la información recolectada de la bibliografía se integraron al modelo computacional.

Para poder apreciar el efecto de la suplementación con L-arginina y L-serina sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺, al modelo se agregaron nodos que representan metabolitos y proteínas de vías metabólicas relacionadas con estos aminoácidos. En los linfocitos T CD4⁺ activados, la L-arginina es rápidamente metabolizada por la enzima ARG-1/2 para la síntesis de la ornitina que

posteriormente puede usarse para la síntesis de poliaminas como la espermidina, la ornitina también puede usarse para la síntesis de prolina (Geiger, Rieckmann, Wolf, Basso, et al., 2016). Por su parte, la L-serina puede entrar al ciclo del THF por la enzima SHMT-1/2, la cual produce glicina y 5,10-metilenTHF partiendo de L-serina y THF, la L-glicina y otros intermediarios del ciclo del THF participan en la síntesis de nucleótidos (H. Ma et al., 2017), la L-serina también puede ser usada para la síntesis de la L-cisteína, la L-glicina y la L-cisteína pueden ser usadas para la síntesis de GSH (Kurniawan et al., 2020). Adicional a reacciones que interactúan directamente con la L-arginina o la L-serina, al modelo se agregó el ciclo de la L-metionina, el cual se conecta con el ciclo del THF, y es el encargado de la síntesis del S-adenosil-L-metionina (SAM) (H. Ma et al., 2017), SAM es un donador de grupo metilo para la metilación. SAM puede ser ocupado para la síntesis de poliaminas (H. Ma et al., 2017; Kurniawan et al., 2020), el ciclo de la metionina conecta el metabolismo de la arginina y la serina [Figura 20].

La nueva versión del modelo cuenta con 238 nodos, de los cuales 162 nodos son booleanos, osea que estos nodos pueden tener solo 1 de 2 valores (0 y 1), y 76 nodos son nodos multivalor, la mayoría puede tener 1 de 3 valores (0, 1 y 2), pero algunos pueden tener 1 de hasta 4 valores (0, 1, 2 y 3). Las interacciones entre los componentes se incorporan al modelo con 443 vectores, los cuales representan interacciones positivas y/o negativas [Figura 20].

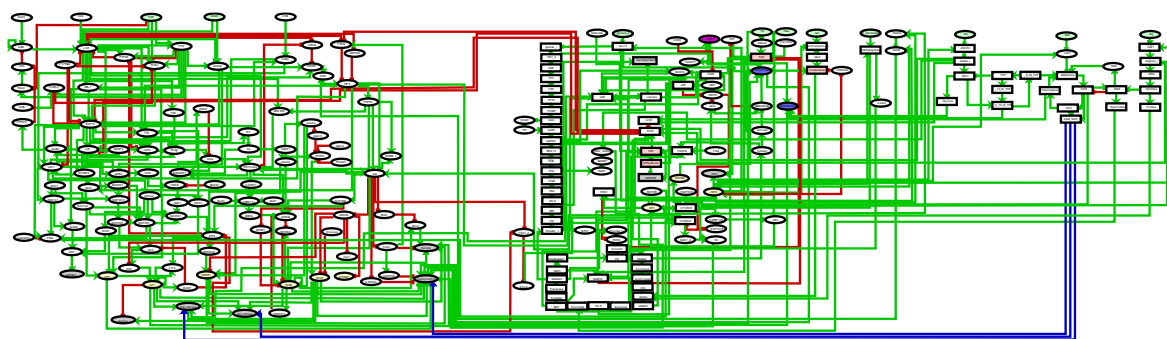


Figura 20. Modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺: En esta imagen se muestra la versión actualizada del modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ que está formado por 238 nodos (162 nodos booleanos y 76 nodos multivalor), que están unidos entre sí por 443 vectores que representan interacciones positivas y/o negativas. El modelo tiene 7 nodos de entrada de color verde, 10 nodos que representan componentes del catabolismo de color rosa, 2 nodos que representan componentes del anabolismo de color azul, 1 nodo que representa componentes del anfibolismo de color morado, 8 nodos que representan factores de transcripción de color amarillo, 9 nodos de salida o de fenotipo de color gris y 201 nodos

intermedios de color blanco que representan vías de señalización, vías metabólicas, proteínas, intermediarios, etc.

Validación del modelo computacional

Para verificar que nuestro modelo puede producir estados estables de interés para el estudio, se calcularon los estados estables que el modelo puede predecir para los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos sin ninguna perturbación. Para producir los estados estables de adultos y neonatos, las reglas lógicas se ajustaron para reproducir el estado metabólico de los linfocitos de cada grupo (adultos y neonatos) [Figura 21 y 22].

Cuando calculamos los estados estables sin ninguna perturbación (WT) para la versión del modelo en adultos, se producen 5 estados estables, E1, E2, E3, E4 y E5 [Figura 21]. Los estados estables E1 y E2 representa dos estados estables en los que la única diferencia es la ausencia o presencia de la señal coestimuladora del CD28, en estos estados la ausencia de la señal del TCR no desencadena las vías de señalización necesarias para activar las funciones efectoras ni la reprogramación metabólica, por lo tanto no hay producción de citocinas y se mantiene un metabolismo basal con una baja tasa metabólica en la que la síntesis de ATP depende en gran medida de la oxidación de ácidos grasos, estos estados se relacionan con células T CD4⁺ vírgenes [Figura 21]. En el estado E3 se recibe la señal del TCR, pero no la del correceptor CD28, esto causa que la célula entre a un estado de anergia, no se activan las funciones efectoras ni se promueve la reprogramación metabólica, permaneciendo como en el estado basal, este estado se relaciona con las células T CD4⁺ anérgicas [Figura 21]. En los estados E4 y E5 se activa la señal del TCR y el CD28, lo que desencadena vías de señalización que promueven las funciones efectoras como la producción de citocinas, en el estado E4 no ocurre la reprogramación del metabolismo, hay una baja tasa metabólica y el metabolismo depende mayormente de la oxidación de ácidos grasos para la síntesis de ATP, por la adquisición de funciones efectoras sin un aumento en la tasa metabólica que cause un cambio a un metabolismo anabólico, este estado estable se relaciona con células T CD4⁺ de memoria [Figura 21], por otro lado, en el estado E5 la adquisición de funciones efectoras es acompañada por una reprogramación metabólica, se aprecia un aumento en la glucólisis, lo que causa un aumento en la producción de lactato, permitiendo regenerar el NAD⁺ necesario para la glucólisis, la oxidación de los ácidos grasos disminuye pero aumenta la actividad de las vías de oxidación de aminoácidos como la glutaminólisis, esto permite un aumento en la fosforilación oxidativa, que junto a la glucólisis mantienen los niveles de ATP, el aumento en la fosforilación oxidativa causa un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), además, el aumento en la tasa metabólica

permite la salida de intermediarios a vías anabólicas, promoviendo la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos, permitiendo la expansión clonal, por contar con funciones efectoras y aumentar su tasa metabólica adquiriendo un metabolismo anabólico con la síntesis de metabolitos con actividad inmunoreguladora como el lactato y las ROS, este estado se relaciona con las células T CD4⁺ efectoras [Figura 21].

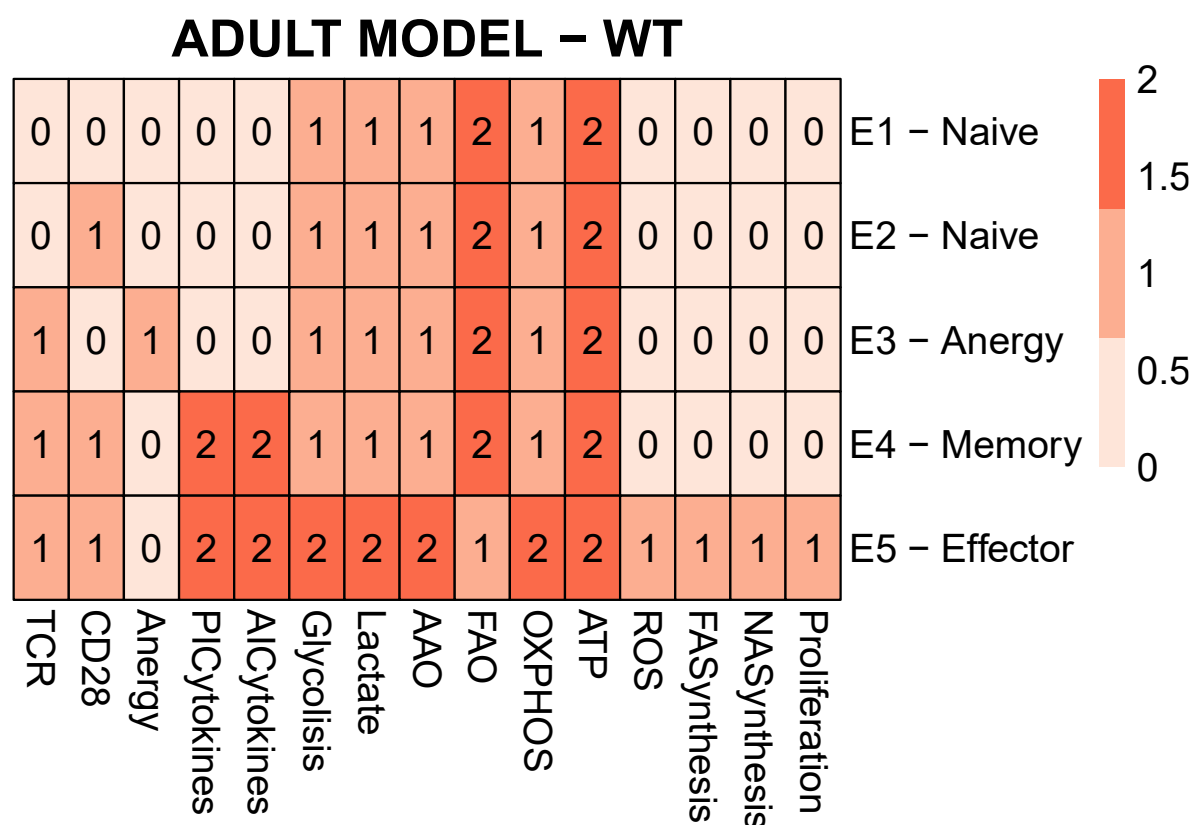


Figura 21. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos WT: En esta imagen se muestran los estados estables que se obtienen con el modelo adaptado para adultos sin ninguna perturbación (knock-out o knock-in).

Cuando calculamos los estados estables sin ninguna perturbación (WT) para la versión del modelo en neonatos al igual que con los adultos obtenemos 5 estados estables, en los estados estables E1 y E2 se representan dos estados estables en los que la única diferencia es la ausencia o presencia de la señal coestimuladora del CD28, en estos estados la ausencia de la señal del TCR no activa las vías de señalización necesarias para activar las funciones, sin embargo los linfocitos T CD4⁺ de los neonatos tienen una mayor actividad de la vía de la glucólisis en estado basal a comparación de los adultos, lo que se refleja en una mayor producción de lactato,

al igual que con la glucólisis, los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen una actividad de las vías oxidativas de los aminoácidos en estado basal en comparación de los adultos, lo neonatos cuentan con una mayor consumo de ácidos que alimentan la oxidación y la síntesis de ácidos grasos, en conjunto, la oxidación de ácidos grasos y de aminoácidos alimentan la fosforilación oxidativa para la producción altos niveles de ATP, al tener una mayor tasa metabólica que los adultos en su estado basal los linfocitos T CD4⁺ neonatales en su estado basal se producen más especies reactivas de oxígeno (ROS) y se promueven la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos, permiten la proliferación, los estados E1 y E2 se relacionan con células T CD4⁺ neonatales vírgenes [Figura 22]. En el estado E3 se recibe la señal del TCR, pero no la del correceptor CD28, esto causa que la célula entre a un estado de anergia, no se promueve la síntesis de citocinas ni se promueve la reprogramación metabólica, permaneciendo como en el estado basal, pero con una tasa metabólica mayor que la de los linfocitos T CD4⁺ de adultos, este estado se relaciona con las células T CD4⁺ neonatales anérgicas [Figura 22]. En los estados E4 y E5 se activa la señal del TCR y el CD28, lo que desencadena vías de señalización que promueven las funciones efectoras como la producción de citocinas, en el estado E4 no ocurre la reprogramación del metabolismo, se mantiene como en el estado basal, por la adquisición de funciones efectoras sin pasar por una reprogramación metabólica, este estado estable se relaciona con células T CD4⁺ neonatales de memoria [Figura 22], en el estado E5 además de la síntesis de citocinas ocurre una reprogramación metabólica, se aprecia un aumento en la glucólisis, lo que causa un aumento en la producción de lactato, permitiendo regenerar el NAD⁺ necesario para la glucólisis, la oxidación de los ácidos grasos se mantiene como en el estado basal y las vías de oxidación de aminoácidos como la glutaminólisis aumenta, esto permite un aumento en la fosforilación oxidativa, que junto a la glucólisis mantienen los niveles de ATP, el aumento en la tasa metabólica causa un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), el aumento en la tasa metabólica mantiene el metabolismo anabólico que se observa desde el estado basal, promoviendo la síntesis de nucleótidos y ácidos grasos, permitiendo la expansión clonal, al tener funciones efectoras y aumentar su tasa metabólica, este estado se relaciona con las células T CD4⁺ efectoras [Figura 22].

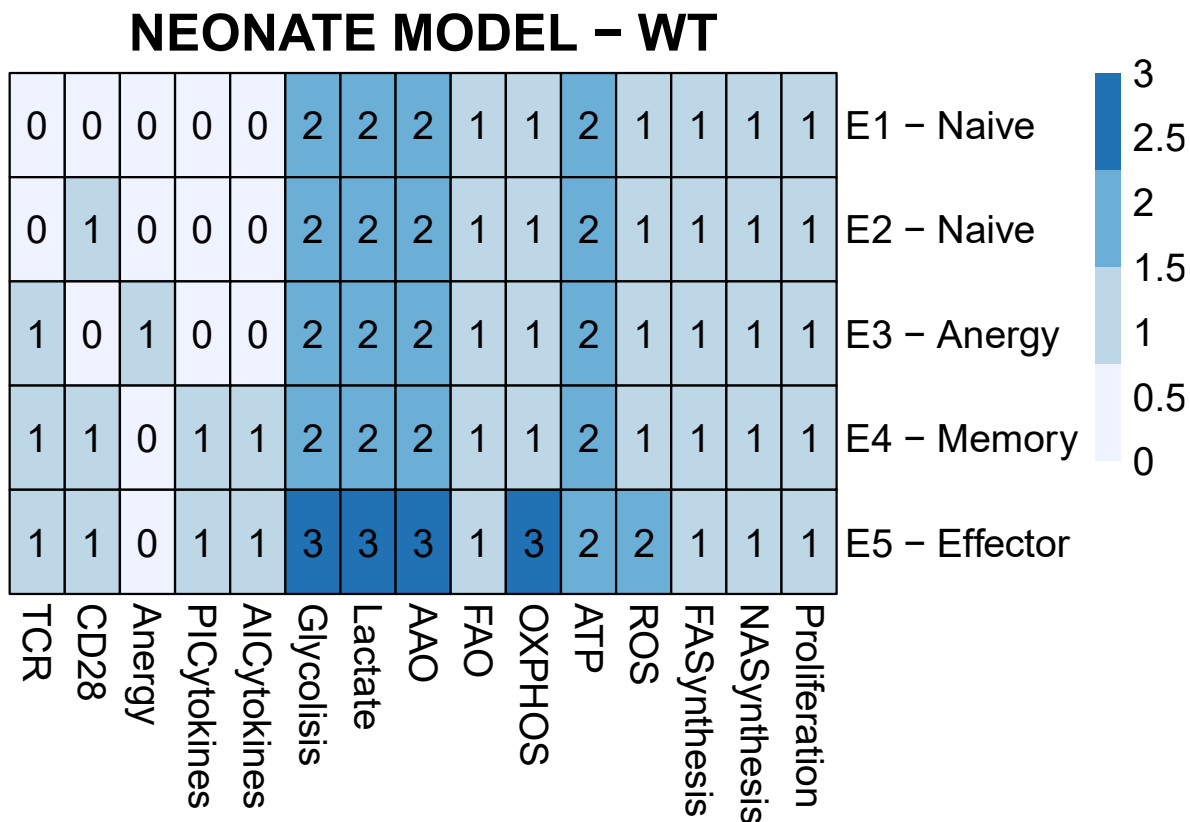


Figura 22. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos WT: En esta imagen se muestran los estados estables que se obtienen con el modelo adaptado para neonatos sin ninguna perturbación (knock-out o knock-in).

Nuestro modelo lógico de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4⁺, fue capaz de producir estados estables que reproducen las características reportadas en la bibliografía y lo observado en los datos experimentales obtenidos en el laboratorio, los estados estables producidos por el modelo pueden asociarse con linfocitos T CD4⁺ vírgenes sin funciones efectoras y poca actividad metabólica, linfocitos T CD4⁺ anérgicos sin funciones efectoras y poca actividad metabólica, linfocitos T CD4⁺ de memoria con funciones efectoras pero poca actividad metabólica y linfocitos T CD4⁺ efectores con una alta actividad metabólica. Además, el modelo logra representar la mayor tasa metabólica de los linfocitos T CD4⁺ neonatales en comparación con la de los adultos, antes y después de la activación. En los estados estables que produce el modelo de linfocitos T CD4⁺ neonatales se observa una mayor presencia de productos metabólicos con actividad inmunoreguladora, como ROS y lactato, a lo largo de todos los estados estables obtenidos [Figura 22]. El programa metabólico de los linfocitos T CD4⁺ de los neonatos, caracterizado por una mayor tasa metabólica y mayor producción de

metabolitos con actividad inmunoreguladora a comparación de los linfocitos T CD4⁺ de los de los adultos, esta relacionados con la respuesta atenuada que es característica de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes neonatales ante el estímulo CD3+CD28, en busca de estrategias para mejorar la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ neonatales decidimos aumentar la concentración de los aminoácidos L-arginina o L-serina en el medio de cultivo de nuestras células y apreciar su efecto en la activación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos.

Efecto de la reprogramación metabólica y funcional de la suplementación con L-arginina y L-serina en la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos.

Para poder apreciar el efecto del aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos, se suplementó el medio de cultivo de las células para aumentar la concentración de estos aminoácidos 5 y 10 veces más de la que hay en el medio RPMI-1640. La concentración final de L-arginina en las condiciones 5 y 10 veces más fue de 5.7471265 mM (x5) y 11.494253 mM (x10), respectivamente. La concentración final de L-serina en las condiciones 5 y 10 veces más fue de 1.4285715 mM (x5) y 2.857143 mM (x10), respectivamente. Para valorar el efecto de la suplementación con los aminoácidos en la respuesta de los linfocitos T CD4⁺, se activaron linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos y neonatos durante 72 horas de estímulo con anti-CD3 y anti-CD28 en las diferentes condiciones de cultivo, medio RPMI sin suplementación extra de aminoácidos o medio RPMI suplementado con las concentraciones x5 o x10 de los aminoácidos L-serina o L-arginina, para posteriormente medir la viabilidad de las células, la presencia del marcador de activación CD69 y la secreción de citocinas de los fenotipos efectores Th2 (IL-4, IL-6, IL-5, IL-13 y IL-2), Th1 (IFN- γ , TNF- α y IL-2), Th17(IL-17A, IL-17F y IL-2), Th9 (IL-9 y IL-2), Th22 (IL-22 y IL-2) y Treg (IL-10 y IL-2)- Los experimentos de la influencia del metabolismo de la L-arginina y la L-serina en células T CD4⁺ de neonatos fueron realizados por la L. en C. Ingrid Yaritzit Carreon Cortes (Carreon, 2025).

Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos

Para los experimentos sobre el efecto de la suplementación con los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos se utilizaron linfocitos T CD4⁺ vírgenes purificadas de sangre periférica. Para comprobar que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes se purificaron correctamente y que las otras poblaciones celulares se depletaron de la muestra, antes de realizar los experimentos, las células T CD4⁺ vírgenes se tiñeron con anticuerpos dirigidos a

marcadores de membrana que nos permiten verificar la pureza de las muestras mediante citometría de flujo.

Para confirmar que el gradiente con ficoll y el tratamiento con el RossetSep para CD4 eliminaron las demás poblaciones celulares de nuestras muestras se usaron los anticuerpos anti-CD3 APC y anti-CD4 FITC para poder observar la proporción de células doble positivas que representan a los linfocitos T CD4⁺ [Figura 23 – A)], en las muestras que se usaron para los experimentos se obtuvieron porcentajes de células CD3⁺/CD4⁺ mayores o iguales al 95% [Tabla 1]. Para comprobar que el tratamiento con perlas magnéticas unidas al anticuerpo anti-CD45RO depletó los linfocitos T CD4⁺ de memoria, se tiñó una pequeña cantidad de nuestras células, antes y después del tratamiento, con el anticuerpo anti-CD45RO FITC, lo que nos permitió apreciar como disminuye la población de células CD45RO después del tratamiento [Figura 23 – B)], en las muestras que se usaron para los experimentos se obtuvieron porcentajes de células CD45RO⁺ menores o iguales al 5% [Tabla 1]. Para verificar que antes de realizar los experimentos los linfocitos T CD4⁺ vírgenes no estuvieran activados, se usó el anticuerpo anti-CD69 FITC para apreciar la proporción de células que expresan este marcador de activación [Figura 23 – C)], en las muestras que se usaron para los experimentos se estuvo una proporción de células CD69⁺ menores al 0.9% [Tabla 1].

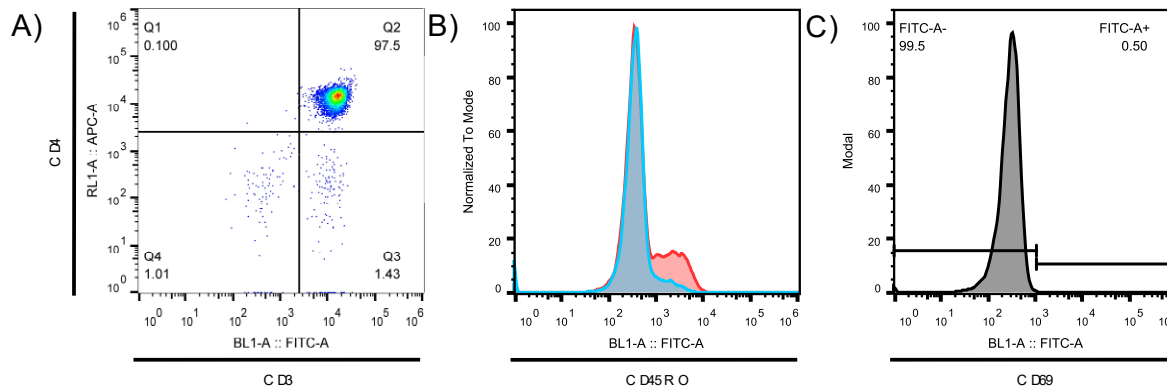


Figura 23. Expresión de los marcadores CD3, CD4, CD45RO y CD69 en linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos: En esta imagen en el inciso A) se muestra el Dot Plot de la población de células doble positivas para CD3 (eje x) y CD4 (eje y). En el inciso B) se muestra el histograma de la población de células CD45RO⁺ en los linfocitos T CD4⁺ totales y vírgenes. En el inciso C) se muestra el histograma de la población de células CD69⁺ en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes.

ADULTO	CÉLULAS CD3+/CD4+ (%)	CÉLULAS CD45RO+ (%)	CÉLULAS CD69+ (%)
A1	95.6	4.32	0.59
A2	95.6	3.96	0.76
A3	97	3.48	0.41
A4	95	2.2	0.9
A5	97.5	4.61	0.5
A6	95.7	5	0.32
A7	97.1	2.93	0.48
A8	95.2	2.54	0.8
PROMEDIO	96.0875	3.63	0.595

Tabla 1. Tabla del porcentaje de células que expresan los marcadores CD3, CD4, CD45RO y CD69: En esta tabla se muestra la proporción de células doble positivas para CD3 y CD4, positivas para CD45RO y positivas para CD69, en nuestras muestras de linfocitos T CD4⁺ vírgenes.

Efecto de la suplementación con aminoácidos en la expresión de la marca de activación CD69 en los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos

A las 72 horas después de iniciar el estímulo con anti-CD3 y anti-CD28 bajo las diferentes condiciones de cultivo, control sin suplementar (ES), suplementado con L-arginina x5 (R5X), L-arginina x10 (R10X), L-serina x5 (S5X) o L-serina x10 (S10X), se puede apreciar una disminución en el porcentaje de células que expresan el marcador de activación CD69 en los linfocitos T CD4⁺ de adultos, aunque esta diferencia en la proporción de células CD69⁺ solo fue significativa en las comparaciones ES vs R5X y ES vs S5X, se puede apreciar una clara tendencia hacia la disminución de la expresión del marcador CD69 [Figura 24 – A)]. En el caso de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos que fueron estimulados bajo las diferentes condiciones no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células CD69⁺, a excepción de la comparación ES vs S5X, donde se pudo apreciar un ligero aumento en la media del porcentaje de células CD69⁺ que dio significativo, en la condición S10X también se puede apreciar un aumento en la expresión de CD69 en las células, pero no se obtuvo una significancia estadística, esto podría ser causado por la dispersión de los datos, se necesitan más replicas para poder comprobar estas tendencias [Figura 24 – B)].

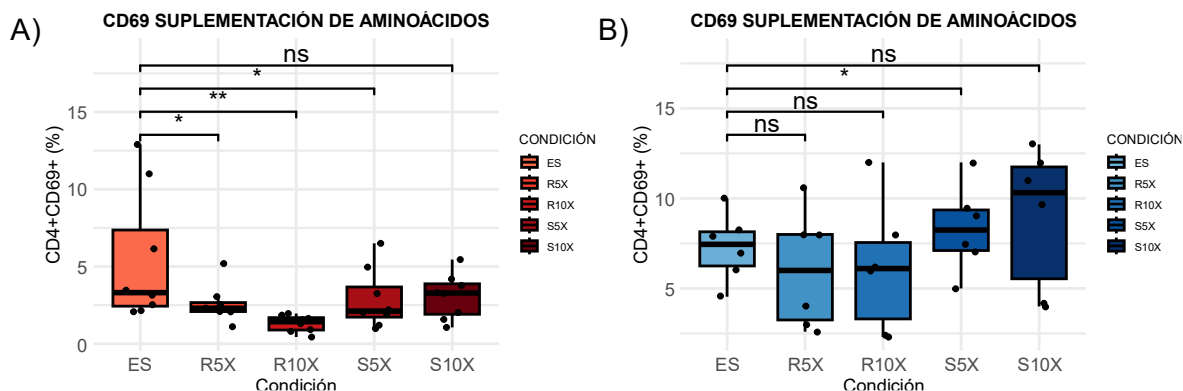


Figura 24. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la expresión de CD69 en linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos a las 72 horas de estimulación: En esta imagen se muestra el efecto de la L-arginina y la L-serina en la expresión de CD69 en linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos, en el inciso A) se muestra la presencia del marcador CD69 en los linfocitos T CD4⁺ de adultos activados en el medio suplementado con L-serina y/o L-arginina a las concentraciones x5 y x10 (respectivamente). En el inciso B) se muestra la presencia del marcador CD69 en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos activados en el medio suplementado con L-serina y/o L-arginina a las concentraciones x5 y x10 (respectivamente). Los datos originales de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos fueron obtenidos por la Mtra. Carreon (Carreon, 2025).

Efecto de la suplementación con aminoácidos en la viabilidad de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos

A las 72 horas después de iniciar el estímulo con anti-CD3 y anti-CD28 bajo las diferentes condiciones de cultivo no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células vivas en los linfocitos T CD4⁺ de adultos o de neonatos, ni tampoco es visible una tendencia que indique lo contrario, esto parece significar que la suplementación del medio con los aminoácidos L-arginina o L-serina a las concentraciones x10 y x5, no tiene ningún efecto en la viabilidad de los linfocitos T CD4⁺ de adultos o de neonatos [Figura 25].

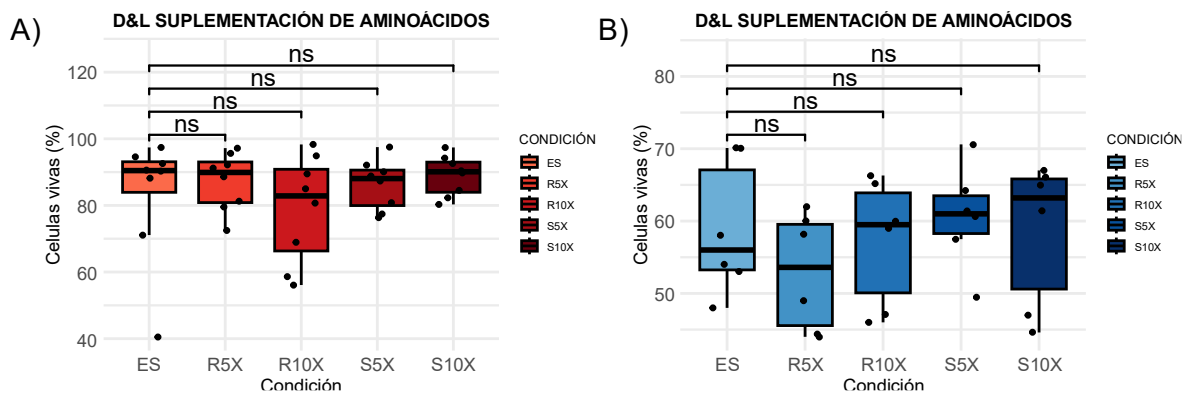


Figura 25. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la viabilidad de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos a las 72 horas de estimulación: En esta imagen se muestra el efecto de la arginina y la serina en el porcentaje de células vivas en linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos, en el inciso A) se muestra el porcentaje de células vivas en los linfocitos T CD4⁺ de adultos activados en el medio suplementado con L-Serina y/o L-Arginina a las concentraciones x5 y x10 (respectivamente). En el inciso B) se muestra el porcentaje de células vivas en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos activados en el medio suplementado con L-serina y/o L-arginina a las concentraciones x5 y x10 (respectivamente). Los datos originales de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos fueron obtenidos por la Mtra. Carreon (Carreon, 2025).

Efecto de la suplementación con aminoácidos en la producción de citocinas de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos

Al igual que con la expresión del marcador CD69, en los linfocitos T CD4⁺ de adultos, a las 72 h tras la activación bajo las diferentes condiciones de cultivo se aprecia una clara tendencia a la disminución en la producción de todas las citocinas, aunque la disminución parece ser menor en la condición de L-serina x5 (S5X) [Figura 26]. Aunque la disminución en las citocinas es clara y la mayoría de las comparaciones dieron significancia estadística, en algunas citocinas no se obtuvieron significancias estadísticas en algunas de las comparaciones, en el caso de IL-9 y IL-17A no se obtuvo ninguna significancia, se necesitan más replicas para poder obtener una las significancias faltantes [Figura 26]. Entre las diferentes condiciones de suplementación con aminoácidos al ser comparadas con el control se obtuvieron más significancias estadísticas al comprar el control con las condiciones en las que el medio se suplemento con L-serina (x5 y x10) y se encontraron menos significancias al comparar el control con las condiciones en las que el medio se suplemento con L-Arginina (x5 y x10), por lo que parece ser que en los linfocitos T CD4⁺ de adultos hay una mayor supresión de la respuesta por parte de la L-serina. Basado en la significancia estadística, en los linfocitos T CD4⁺ de

adultos la L-arginina (x5 y x10) pudo reducir la expresión de IL-4, IL-17F, IL-22 y IL-2, en el caso de la L-serina (x5 y x10) se redujo la expresión de IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ , IL-22, IL-10 y IL-2 [Figura 26].

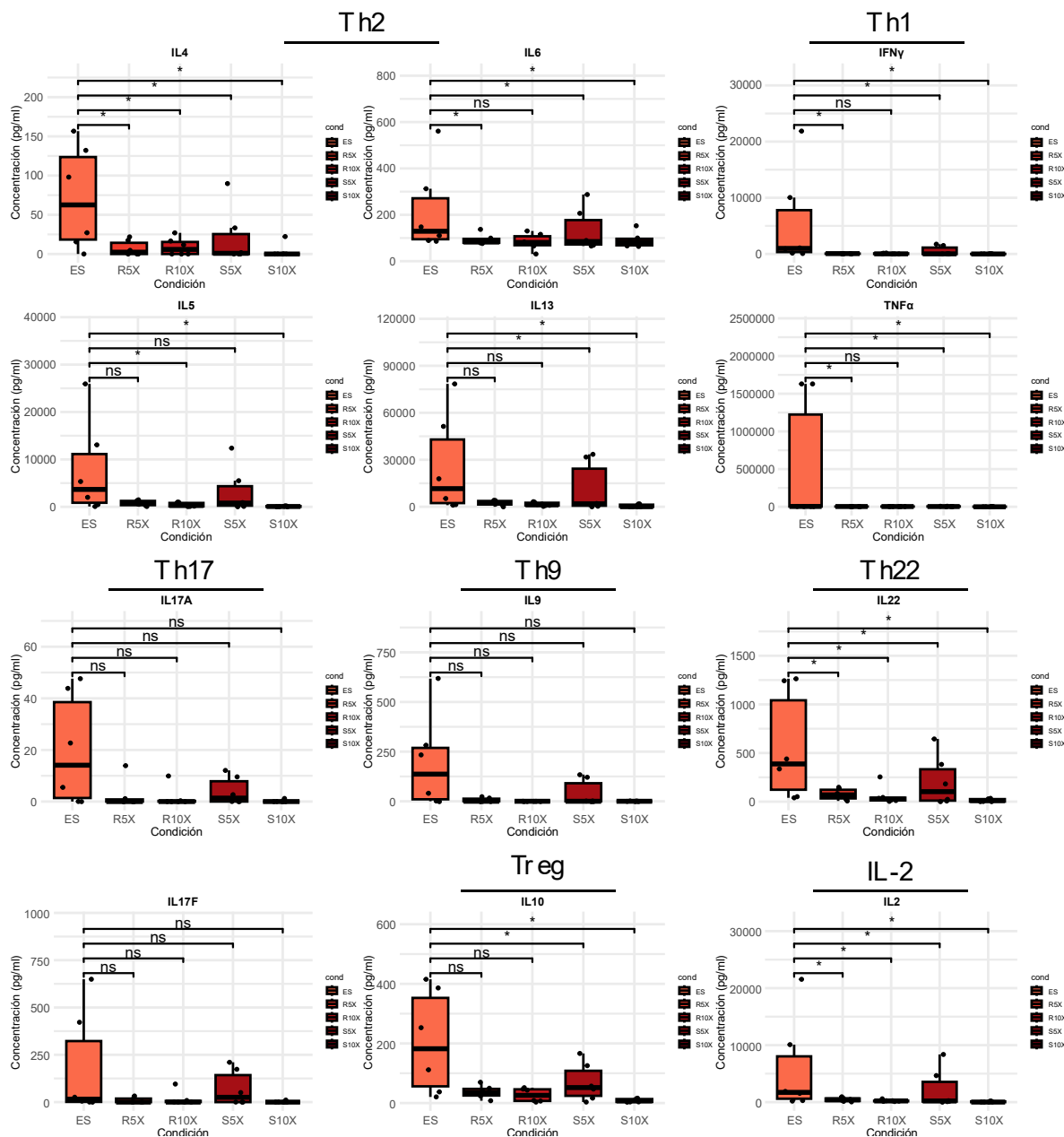


Figura 26. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la respuesta inmune de linfocitos T CD4⁺ de adulto a las 72 horas de estimulación: En esta imagen se puede apreciar la reprogramación funcional inducida por la arginina y la serina en la linfocitos T CD4⁺ de adultos, esto mediante la medición de la concentración de

las citocinas IL-4, IL-6, IL-5, IL-13, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-9, IL-22, IL-10 y IL-2, en los diferentes medios de cultivo.

En los linfocitos T CD4⁺ neonatales, a las 72 h después de iniciar la activación con anti-CD3 y anti-CD28 bajo las diferentes condiciones de cultivo, se puede apreciar una tendencia poco marcada hacia la disminución en la producción de las citocinas, sin embargo, se obtuvieron muy pocas significancias estadísticas [Figura 27]. En el análisis estadístico no se obtuvieron significancias estadísticas en las concentraciones x5 ni de L-Serina ni de L-Arginina (R5X y S5X), en el caso de las condiciones x10 se obtuvieron muy pocas significancias estadísticas, en la comparación ES vs R10X se obtuvo significancia estadística en la reducción de las citocinas IL-5 y IL-10, en la comparación ES vs S10X se obtuvo significancia estadística en la reducción de las citocinas IL-13, IL-10 y IL-2 [Figura 27].

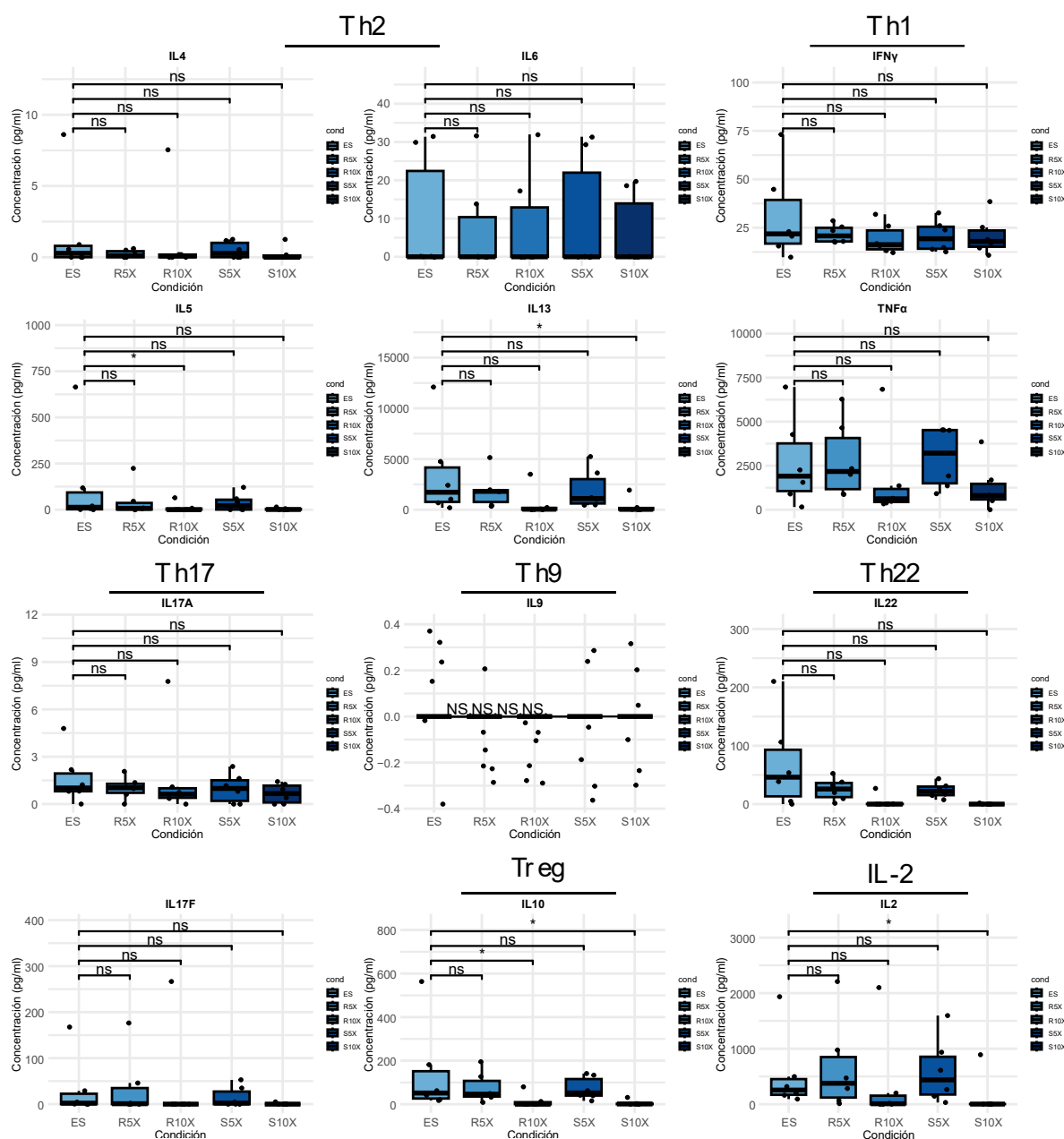


Figura 27. Efecto de la L-arginina y la L-serina sobre la respuesta inmune de linfocitos T CD4⁺ de neonatos a las 72 horas de estimulación: En esta imagen se puede apreciar la reprogramación funcional inducida por la L-arginina y la L-serina en la en linfocitos T CD4⁺ de neonatos, esto mediante la medición de la concentración de las citocinas IL-4, IL-6, IL-5, IL-13, IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-17F, IL-9, IL-22, IL-10 y IL-2, en los diferentes medios de cultivo. Los datos originales fueron obtenidos por la Mtra. Carreon (Carreon, 2025).

En los resultados obtenidos por el equipo del laboratorio sobre el efecto del aumento de la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos, de forma general se puede apreciar un efecto inhibitorio de la respuesta efectora causado por el aumento en la concentración de los aminoácidos, sin embargo, este efecto inhibitorio es más evidente en los linfocitos T CD4⁺ de adultos en comparación con los de neonatos, por lo que los aminoácidos no tienen un efecto muy significativo sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos.

Simulación computacional del efecto de la reprogramación metabólica inducida por el aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos

Para poder proponer una explicación del efecto que tiene la reprogramación metabólica inducida por la suplementación con los aminoácidos L-arginina o L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos se realizó el cálculo de los estados estables del modelo computacional bajo una perturbación knock-in (KI) que eleva los niveles de L-arginina o L-serina.

Simulación del efecto del aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos

Al realizar las perturbaciones KI para aumentar los niveles de L-arginina [Figura 28 - A)] o L-serina [Figura 28 – B)] en la versión del modelo para los linfocitos T CD4⁺ de adultos, en ambos escenarios se obtienen 4 estados estables (E1, E2, E3 y E4), los cuales se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de la señal del TCR y el CD28, los estados E1 y E2 se puede asociar con linfocitos T CD4⁺ vírgenes, el estado E3 se puede asociar a linfocitos T CD4⁺ anérgicos y el estado E4 con linfocitos T CD4⁺ activados o efectores [Figura 28].

En el caso de la perturbación KI para aumentar los niveles de L-arginina, se observa un aumento de los metabolitos por debajo de la L-arginina en el metabolismo, como la L-prolina y las poliaminas, en todos los estados estables. El aumento en la L-arginina y la L-prolina sintetizada a partir de la L-arginina promueve un aumento en las vías de oxidación de estos aminoácidos, lo cual se ve reflejado en el modelo por el valor elevado (3) del nodo que representa la oxidación de los aminoácidos (AAO) en todos los estados estables [Figura 28 – A)], el cual es mayor que el valor (2) de este nodo en el estado asociado a los linfocitos T CD4⁺ activados (E5) en la versión del modelo para adulto en condiciones WT [Figura 21], la oxidación de la L-arginina y la L-prolina aumenta los niveles de α -cetoglutarato, el cual es un intermediario del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), el aumento la síntesis de poliaminas aumenta la

síntesis de la Hyp, promoviendo la forma activa de eIF5A (eIF5A-Hyp), en su forma activa eIF5A-Hyp promueve la traducción de proteínas de la mitocondria que promueven el funcionamiento de la cadena de transferencia de electrones, en conjunto, los altos niveles de los intermediarios del ciclo del TCA y el aumento en el funcionamiento de la ETC provoca un incremento en la OXPHOS, esto se puede apreciar en el modelo por el valor elevado (3) del nodo que representa a la OXPHOS en todos los estados estables que se producen [Figura 28 – A)], el cual es mayor que el valor (2) de este nodo en el estado asociado a los linfocitos T CD4⁺ activados (E5) en la versión del modelo para adulto en condiciones WT [Figura 21], en nuestro modelo, este aumento en la ETC y la OXPHOS induce un incremento en la producción de ROS en todos los estados estables, por lo que el nodo que las representa adquiere un valor elevado (2) por encima del valor (1) que tienen en el estado estable asociado a los linfocitos T CD4⁺ activados (E5) en la versión del modelo para adulto en condiciones WT [Figura 21], en el modelo, los altos niveles de ROS pueden afectar negativamente las vías de señalización del TCR y el CD28, impidiendo que en el estado E3 el linfocito entre a anergia por la presencia de la señal del TCR en ausencia de la del CD28 [Figura 28 – A)], también se impide la adquisición de funciones efectoras, como la producción de citocinas proinflamatorias (PICytokines = 0) y antiinflamatorias (AICytokines = 0), en el estado E4 aunque la señal del TCR y el CD28 estén activas, la inhibición de la señal del TCR y el CD28 impide la reprogramación metabólica en el estado E4, la glucólisis mantiene un nivel basal (Glycolysis = 1 ; Lactate = 1) y se mantiene un estado metabólico altamente oxidativo sin la síntesis de biomoléculas como ácidos grasos (FASynthesis = 0) o nucleótidos (NASynthesis = 0), impidiendo la proliferación (Proliferation = 0) de los linfocitos T CD4⁺ de adultos [Figura 28 – A)].

En el caso de la perturbación KI para aumentar los niveles de L-serina, esta causa un aumento de los metabolitos por debajo de la L-serina en el metabolismo, en todos los estados estables. El aumento en la L-serina promueve la síntesis de los aminoácidos L-glicina y L-cisteína, el aumento en la concentración de estos aminoácidos, incluyendo la L-serina, promueve su oxidación y esto se aprecia en el valor elevado (3) del nodo que representa la oxidación de aminoácidos (AAO) en el modelo, el cual es mayor que el valor (2) de este nodo en el estado asociado a los linfocitos T CD4⁺ activados (E5) en la versión del modelo para adulto en condiciones WT [Figura 21], la oxidación de la L-serina, L-glicina y L-cisteína, produce piruvato que puede convertirse en acetil-CoA y entrar al TCA promoviendo y aumentando la síntesis de sus intermediarios, el aumento en el TCA por la oxidación de los aminoácidos promueve la ETC y la OXPHOS, esto se ve reflejado en el modelo por el alto valor (3) del nodo que representa la OXPHOS, el cual es mayor que el valor (2) de este nodo en el estado asociado a los linfocitos T CD4⁺ activados (E5) en la

versión del modelo para adulto en condiciones WT [Figura 21], sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el escenario anterior donde aumentar la L-arginina aumentan los niveles de ROS, el aumento en la concentración de L-serina promueve la síntesis del antioxidante glutatión (GSH), lo que impide que la producción de ROS aumenten a niveles (2) que interfieran con la señalización del TCR, manteniendo el valor (1) que el nodo que representa las ROS tiene en el estado asociado a los linfocitos T CD4⁺ activados (E5) en la versión del modelo para adulto en condiciones WT [Figura 21];[Figura 28 – B)]. El metabolismo de la L-serina por medio del ciclo del THF se conecta con el ciclo de la metionina, por lo que en el modelo el aumento en la concentración de la L-serina provoca un aumento en la síntesis de los intermediarios del ciclo de la L-metionina, incluyendo la S-adenosil metionina (SAM), el cual sirve como donador de grupos metilo para las reacciones de metilación, el aumento en los niveles de SAM cambia el panorama de metilación en la célula, en el modelo esto impide la correcta activación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos, por lo que aún bajo el estímulo del TCR y el CD28 en el modelo no ocurre la reprogramación metabólica, la glucólisis mantiene un nivel basal (Glycolisis = 1 ; Lactate = 1), y no hay síntesis de ácidos grasos (FASynthesis = 0) o nucleótidos (NASynthesis = 0), lo que impide la proliferación (Proliferación = 0) y no se promueven funciones efectoras como la producción de citocinas proinflamatorias (PICytokines = 0) y antiinflamatorias (AICytokines = 0), todo esto sin importar aunque la señal del TCR y el CD28 estén activas o no [Figura 28 – B)].

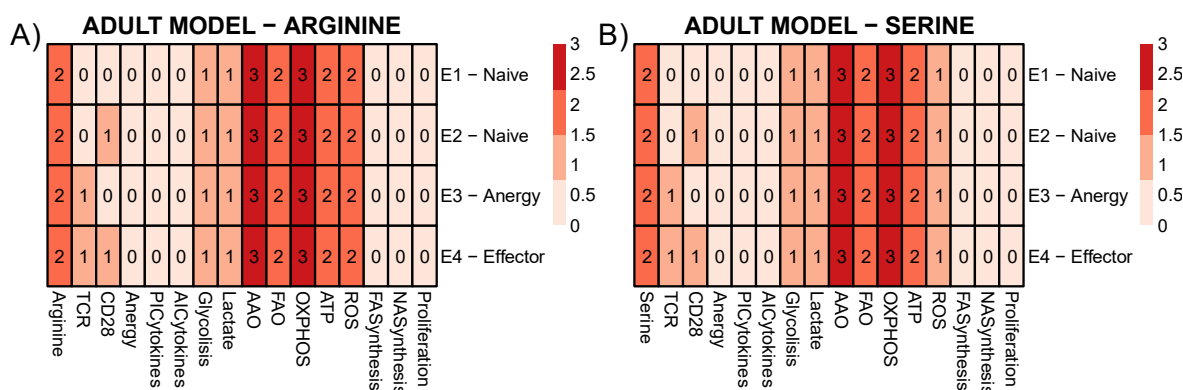


Figura 28. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo de la activación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos KI de L-serina y L-arginina: En esta imagen se muestran los estados estables que se obtienen con el modelo adaptado para adultos con la perturbación knock-in que aumenta los niveles de L-arginina (A) o L-serina (B).

Simulación del efecto del aumento en la concentración de los aminoácidos L-arginina y L-serina sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos

Al igual que con los adultos, al realizar las perturbaciones KI en el modelo de linfocitos T CD4⁺ adaptado al escenario de los neonatos para aumentar los niveles de L-arginina [Figura 29 - A)] o L-serina [Figura 29 - B)], se obtienen 4 estados estables (E1, E2, E3 y E4), que se diferencian por la presencia o ausencia de la señal del TCR y el CD28, los estados E1 y E2 se asocian con linfocitos T CD4⁺ vírgenes, el estado E3 se puede asociar a linfocitos T CD4⁺ anérgicos y el estado E4 con linfocitos T CD4⁺ activados o efectores [Figura 29].

En el modelo adaptado para los neonatos, al igual que ocurrió en el de los adultos, la perturbación KI para aumentar los niveles de L-arginina incrementa la producción de los metabolitos por debajo de esta en todos los estados estables. En el modelo, el aumento en la L-arginina promueve la síntesis de L-prolina, y el aumento de ambos aminoácidos promueve un aumento en la tasa metabólica de sus vías de oxidación en todos los estados estables, esto provoca que, en todos los estados estables, independientemente de la presencia de la señal del TCR y el CD28, se puede apreciar un valor alto (3) asociado al nodo que representa la oxidación de aminoácidos (AAO) [Figura 29 – A)]. La oxidación de la L-arginina y L-prolina produce glutamato, que puede entrar al ciclo del TCA al producir α -cetoglutarato, esto provoca un aumento en los intermediarios del ciclo del TCA, el aumento en el metabolismo de la L-arginina también aumenta la síntesis de poliaminas, lo que promueve la síntesis de Hyp lo que activa a eIF5A (eIF5A-Hyp), en su forma activa eIF5A-Hyp promueve la síntesis de proteínas de la mitocondria, incluyendo proteínas de la ETC lo cual promueve su actividad y la OXPHOS, esto se ve reflejado en el modelo por el alto valor (3) del nodo que representa la OXPHOS en todos los estados estables, en conjunto, el aumento en el ciclo del TCA y en la ETC causa una mayor producción de ROS, esto se ve reflejado en el modelo por el valor elevado (2) del nodo que representa la ROS en todos los estados estables, sin embargo, en los datos experimentales ya hay indicios de que los linfocitos T CD4⁺ neonatales activados tiene niveles muy altos de ROS, si se les compara con los linfocitos T CD4⁺ de adultos [Figura 19 - B)], esta alta producción de ROS en los linfocitos T CD4⁺ neonatales en estado basal y durante la activación, en comparación con los linfocitos T CD4⁺ de adultos, se puede apreciar en nuestro modelo desde los estados estables que se producen en el modelo para neonatos bajo condiciones WT [Figura 22], por lo tanto, al tener niveles altos de ROS normalmente, en nuestro modelo adaptado para los linfocitos T CD4⁺ neonatales las ROS no impiden la adquisición de funciones efectoras como la producción de citocinas proinflamatorias (PICytokines = 0) y antiinflamatorias (AICytokines = 0) en presencia de la señal del TCR y el CD28 (estado E4) [Figura 29 – A)]. Aunque los niveles de los nodos que representan la oxidación de los aminoácidos (AAO), la OXPHOS y las ROS tienen niveles elevados, estos son los mismos que el modelo

adaptado para los linfocitos T CD4⁺ neonatales produce en el estado (E5) que puede asociarse con linfocitos T CD4⁺ activos [Figura 22];[Figura 29 – A)], pero el programa metabólico inducido por el aumento en la concentración de L-arginina no evita la programación metabólica en presencia de la señal del TCR y el CD28, por lo que en presencia de estas señales la tasa metabólica de la glucólisis aumenta (Glycolysis = 3 ; Lactate = 3), además, en todos los estados estables se mantiene un estado metabólico caracterizado por una alta tasa metabólica a comparación de la de los linfocitos T CD4⁺ de adultos [Figura 21], lo que les permite la síntesis de biomoléculas, como nucleótidos (NASynthesis = 1) y ácidos grasos (FASynthesis = 1), lo que promueve la proliferación (Proliferation = 1) independientemente de la señal del TCR y el CD28 [Figura 29 – A)].

La perturbación KI para aumentar los niveles de L-serina en el modelo adaptado para los linfocitos T CD4⁺ de neonatos aumenta la síntesis de los metabolitos de las vías que metabolizan la L-serine en los estados estables. El metabolismo de la L-serina produce L-glicina y L-cisteína, el aumento en estos aminoácidos promueve sus vías de oxidación, lo cual produce piruvato que puede entrar al ciclo del TCA por medio de la síntesis de acetil-CoA que se usa para sintetizar citrato, en el modelo, el aumento en la oxidación de estos aminoácidos aumenta el ciclo del TCA, lo que a su vez promueve la actividad de la ETC y la OXPHOS, este aumento en la oxidación de aminoácidos (AAO) y la OXPHOS se ve reflejado en el modelo por el alto valor (3) de los nodos que los representan en todos los estados estables [Figura 29 – B)] , sin embargo, a diferencia de lo que sucede con las ROS cuando la concentración de L-arginina aumenta, la L-serina contribuye a la síntesis del antioxidante GSH, por lo que el aumento en la OXPHOS no causa un aumento en las ROS y el nodo que las representa mantiene un valor basal (1) en todos los estables, igual que en el estado estable que se puede asociar a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes en la versión del modelo para neonatos en condiciones WT [Figura 22];[Figura 29 – B)]. En el modelo el metabolismo de la L-serina se conecta a través del ciclo del THF con el ciclo de la L-metionina, esto causa que en nuestro modelo el aumento en la L-serina aumenta los intermediarios del ciclo de la metonimia, incluyendo el donador de grupos metilo SAM, el aumento en SAM puede causar una reprogramación del panorama de metilación en los linfocitos T CD4⁺, no obstante, los linfocitos T CD4⁺ neonatales en condiciones normales tienen un panorama de metilación diferente al de los linfocitos T CD4⁺ de adultos, como en el caso de su epigenoma, el cual tiene una distribución diferente de las marcas de metilación y se caracteriza por una mayor cantidad de marcas de cromatina cerrada, estas características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales hace que el aumento en los niveles de SAM a causa del aumento en la L-serina tenga un efecto mínimo sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, permitiéndoles adquirir

funciones efectoras como la producción de citocinas proinflamatorias (PICytokines = 0) y antiinflamatorias (AICytokines = 0) en presencia de la señal del TCR y el CD28 [Figura 28 – B)]. A causa del panorama de metilación particular de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, el programa metabólico inducido por el aumento en la concentración de L-serina no evita la programación metabólica en presencia de la señal del TCR y el CD28, por lo que en presencia de estas señales en el estado E4 la tasa metabólica de la glucólisis aumenta (Glycolysis = 3 ; Lactate = 3) [Figura 29 – B)], además, en todos los estados estables se mantiene un estado metabólico caracterizado por una alta tasa metabólica a comparación de la de los linfocitos T CD4⁺ de adultos [Figura 21], lo que les permite la síntesis de biomoléculas, como nucleótidos (NASynthesis = 1) y ácidos grasos (FASynthesis = 1), lo que promueve la proliferación (Proliferation = 1) independientemente de la señal del TCR y el CD28 [Figura 29 – B)].

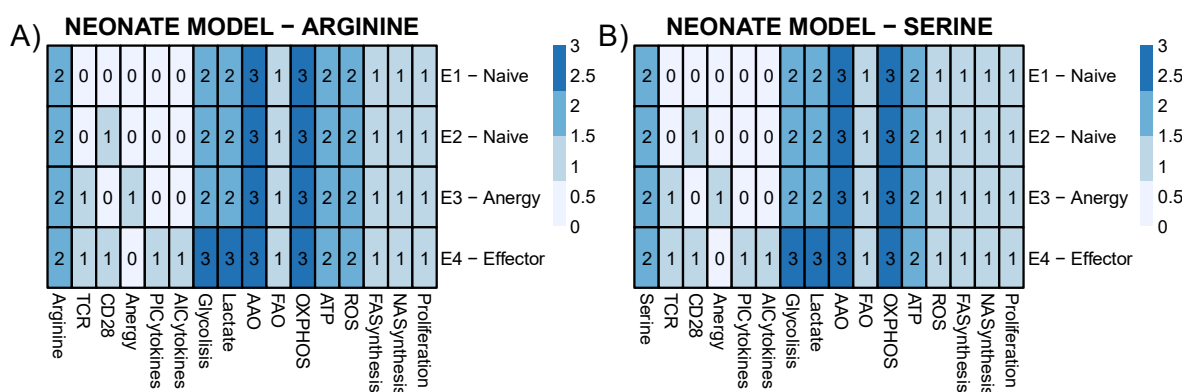


Figura 29. Estados estables del modelo de la influencia del metabolismo de la activación de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos KI de L-serina y L-arginina: En esta imagen se muestran los estados estables que se obtienen con el modelo adaptado para neonatos con la perturbación knock-in que aumenta los niveles de L-arginina (A) o L-serina (B).

DISCUSIÓN

En este proyecto, en congruencia con resultados previos del laboratorio y los datos de la bibliografía (Dwyer et al., 2025; Kempis-calanis et al., 2024), el análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos por el equipo de trabajo del laboratorio (Castañeda, 2025) revela que los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen un mayor consumo de nutrientes antes y después de la activación en comparación con los de adultos, lo cual respalda que los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen una mayor tasa metabólica en estado basal y en respuesta a la activación. La integración

de los datos experimentales obtenidos en el laboratorio y la información de la bibliografía nos permitió usar el modelo computacional para reproducir estados estables biológicamente relevantes, que reflejan la diferencia entre la actividad metabólica de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos.

Contrario a lo esperado, el aumento en la concentración de L-serina y L-arginina tuvo un efecto inhibitor en la producción de la marca de activación CD69 y la producción de citocinas de los diferentes fenotipos de Th, sin afectar la viabilidad de los linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, en el caso de los neonatos, el efecto inhibitorio sobre la activación y la producción de moléculas efectoras es menos eficaz que en los adultos.

Mediante el cómputo de perturbaciones knock-in (KI) que representan un aumento en la concentración de L-serina o L-arginina, nuestro modelo nos permitió proponer posibles mecanismos en los que la reprogramación metabólica inducida por el aumento en la concentración de estos aminoácidos afecta la activación de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos.

En el caso de la perturbación KI para aumentar la concentración de L-arginina, en el modelo se promueve un aumento en la vía de oxidación de la L-arginina y en la síntesis de poliaminas, en conjunto la oxidación de la L-arginina y la síntesis de poliaminas promueven un aumento en la OXPHOS, a través de un aumento en el ciclo del TCA impulsado por la oxidación de la L-arginina y un aumento en la actividad de la ETC impulsado por la actividad del factor de elongación eIF5A-Hyp, el cual es activado por la síntesis de Hyp a partir de la poliamina espermidina, en el modelo, este incremento en la actividad mitocondrial causa un aumento en la producción de ROS. Aunque la producción de ROS es un evento normal de la programación metabólica que contribuye a la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺, el estrés oxidativo causado por un aumento en la concentración de las ROS puede afectar negativamente la activación de los linfocitos T CD4⁺ al interferir con la señalización del TCR y la activación de factores transcripcionales (Cemerski et al., 2002; Klemke & Samstag, 2009), provocando una hiporreactividad al estímulo antigénico (Cemerski et al., 2003). En nuestro modelo adaptado para linfocitos T CD4⁺ de adultos, estos efectos de las ROS sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ se ven reflejados en los estados estables que se producen bajo la perturbación KI que aumenta la concentración de L-arginina, en los cuales, en presencia de la señal del TCR y el CD28, no se activan las funciones efectoras, no hay producción de citocinas, ni ocurre la programación metabólica, permaneciendo en un estado basal altamente oxidativo y poco glucolítico, estas características efectoras y metabólicas de los linfocitos T CD4⁺ que se producen por el aumento en la L-arginina en el modelo coinciden con los resultados experimentales obtenidos y los datos en la bibliografía (Geiger, Rieckmann, Wolf, Zamboni, et al., 2016). En el

caso del modelo adaptado para linfocitos T CD4⁺ de neonatos, en los estados estables producidos bajo condiciones WT ya se puede apreciar un metabolismo altamente oxidativo y una alta producción de ROS en presencia de la señal del TCR y el CD28, por lo que en caso contrario a lo que ocurre en el modelo de los linfocitos T CD4⁺ de adultos, en el modelo adaptado para los linfocitos T CD4⁺ neonatales la reprogramación metabólica inducida por el aumento en la concentración de L-arginina no tiene efecto sobre la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, en los estados estables la presencia de la señal del TCR y CD28 estos adquieren funciones efectoras como la producción de citocinas, esto coincide con los datos experimentales obtenidos por el equipo del laboratorio (Carreon, 2025), en los que el efecto inhibitor del aumento en la concentración de L-arginina sobre la producción de citocinas es menos eficiente en los linfocitos T CD4⁺ neonatales a comparación del efecto sobre los de los adultos.

En el caso de la perturbación KI para aumentar la concentración de la L-serina, en el modelo se promueven las diferentes vías que metabolizan la L-serina y se promueve la síntesis de los productos de estas vías, igual que en el caso de la L-arginina, el aumento en la L-serina promueve su oxidación, lo que impulsa el TCA y aumenta la OXPHOS, sin embargo, la L-serina puede entrar al ciclo de THF produciendo L-glicina o puede metabolizarse para producir L-cisteína. La L-glicina y la L-cisteína son intermediarios en la síntesis de GSH, en el modelo el aumento en síntesis de L-glicina y L-cisteína causado por el aumento en la L-serina promueven la síntesis de GSH, lo que mantiene bajo control las ROS. El ciclo del THF se conecta con el ciclo de la L-metionina; en el modelo, esto causa que el incremento en el ciclo del THF, causado por el aumento en la concentración de la L-serina, también provoque un incremento en el ciclo de la L-metionina, lo que aumenta sus intermediarios, incluyendo al donador de grupos metilo SAM. En la bibliografía se ha reportado que el aumento de la concentración de SAM en linfocitos T CD8⁺ puede causar un cambio en el epigenoma reduciendo la accesibilidad de la cromatina, lo que impide la correcta activación y diferenciación de los linfocitos T (Hung et al., 2021). En nuestro modelo de los linfocitos T CD4⁺ de adultos este efecto del aumento en la concentración de SAM impulsado por un aumento en el ciclo de la L-metionina y el ciclo del THF se aprecia en los estados estables que se producen con la perturbación KI que aumenta la concentración de L-serina, en los cuales, en presencia de la señal del TCR y el CD28, no se activan las funciones efectoras, no hay producción de citocinas, ni ocurre la programación metabólica, permaneciendo en un estado basal altamente oxidativo y poco glucolítico, estas características efectoras de los linfocitos T CD4⁺ que se producen por el aumento en la L-serina en el modelo coinciden con los resultados experimentales obtenidos. En la bibliografía se ha reportado que los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen un

epigenoma diferente al de los linfocitos T CD4⁺ de adultos, el cual se caracteriza por una mayor cantidad de marcas de cromatina cerrada (Bermick et al., 2022; Kempis-Calanis et al., 2024), en el modelo adaptado para linfocitos T CD4⁺ de neonatos, estas características de los linfocitos T CD4⁺ neonatales hace que el aumento en los niveles de SAM a causa del aumento en la L-serina no tenga ningún efecto sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ neonatales, esto se ve reflejado en los estados estables producidos bajo la perturbación KI que aumenta la concentración de la L-serina, en los que en presencia de la señal del TCR y CD28 se promueve la adquisición de funciones efectoras, como la producción de citocinas, esto coincide con los datos experimentales obtenidos por el equipo del laboratorio (Carreon, 2025) en los que el efecto inhibitor del aumento en la concentración de L-serina sobre la producción de citocinas es menos eficiente en los linfocitos T CD4⁺ neonatales a comparación del efecto sobre los de adultos.

En conjunto, nuestros resultados experimentales revelan que los linfocitos T CD4⁺ neonatales tienen una mayor tasa metabólica en comparación con los de adultos y que el aumento en la concentración de la L-serina y la L-arginina tiene un efecto inhibitor sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺, el cual es menos efectivo en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos en comparación con los de adultos. Nuestros resultados computacionales indican que el aumento en la concentración de la L-arginina y la L-serina producen un programa metabólico altamente oxidativo que promueve la producción de metabolitos con actividad inmunoreguladora, como las ROS y SAM respectivamente, sin embargo, el metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ neonatales disminuye el efecto inhibitor de la programación metabólica causada por los aminoácidos. Por último, nuestro trabajo sienta un precedente que remarca la necesidad de estudiar el metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ y su respuesta a diferentes concentraciones de metabolitos y nutrientes con actividad inmunoreguladora, si se desea desarrollar estrategias metabólicas para modular la red regulatoria que rige la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ de adultos y neonatos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2023). *Cellular and molecular IMMUNOLOGY*.
- Almeida, L., Lochner, M., Berod, L., & Sparwasser, T. (2016). Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Seminars in Immunology*, 28(5), 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009>
- Bermick, J. R., Issuree, P., denDekker, A., Gallagher, K. A., Santillan, D., Kunkel, S., Lukacs, N., & Schaller, M. (2022). Differences in H3K4me3 and chromatin

accessibility contribute to altered T-cell receptor signaling in neonatal naïve CD4 T cells. *Immunology and Cell Biology*, 100(7), 562–579. <https://doi.org/10.1111/imcb.12561>

Carreon, I. (2025). *Efecto de la suplementación con L-arginina y L-serina sobre el perfil de citocinas de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea*. 2025.

Castañeda, F. (2025). *ASOCIACIÓN DEL ESTADO METABÓLICO CON LA RESPUESTA DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ Y CD8+ DE ADULTOS Y NEONATOS HUMANOS*.

Cemerski, S., Cantagrel, A., Meerwijk, J. P. M. Van, & Romagnoli, P. (2002). Reactive Oxygen Species Differentially Affect T Cell Receptor-signaling Pathways *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19585–19593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111451200>

Cemerski, S., Meerwijk, J. P. M. Van, & Romagnoli, P. (2003). *Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules*. 2178–2185. <https://doi.org/10.1002/eji.200323898>

Chapman, N. M., Boothby, M. R., & Chi, H. (2020). Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 55–70. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y>

Chapman, N. M., & Chi, H. (2022). Metabolic adaptation of lymphocytes in immunity and disease. *Immunity*, 55(1), 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.012>

Chen, J., Liu, Q., Zhou, J., Chen, J., Zhu, L., Cui, Z., Zhang, Y., Jia, R., Zhou, D., Hu, B., Zhong, W., Xu, J., & Zhang, L. (2025). *Spermidine restricts neonatal inflammation via metabolic shaping of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells Spermidine restricts neonatal inflammation via metabolic shaping of polymorphonuclear myeloid- derived suppressor cells*. 135(7).

Crump, N. T., Hadjinicolaou, A. V., Xia, M., Walsby-Tickle, J., Gileadi, U., Chen, J. L., Setshedi, M., Olsen, L. R., Lau, I. J., Godfrey, L., Quek, L., Yu, Z., Ballabio, E., Barnkob, M. B., Napolitani, G., Salio, M., Koohy, H., Kessler, B. M., Taylor, S., ... Cerundolo, V. (2021). Chromatin accessibility governs the differential response of cancer and T cells to arginine starvation. *Cell Reports*, 35(6), 109101. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109101>

Dwyer, L., Clancy, S., Gouirand, V., Chien, C., Rogers, E., Oltman, S., Pawlowski, L., Lynch, S., Wagner, A., Combes, A., & Scharschmidt, T. (2025). *CD38 expression by neonatal human naïve CD4+ T cells shapes their distinct metabolic state and high regulatory T cell potential*.

- Fauré, A., & Kaji, S. (2018). A circuit-preserving mapping from multilevel to Boolean dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, 440, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.12.013>
- Feng, Q., Liu, Z., Yu, X., Huang, T., Chen, J., Wang, J., Wilhelm, J., Li, S., Song, J., Li, W., Sun, Z., Sumer, B. D., Li, B., Fu, Y. X., & Gao, J. (2022). Lactate increases stemness of CD8 + T cells to augment anti-tumor immunity. *Nature Communications*, 13(1), 4981. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32521-8>
- Geiger, R., Rieckmann, J. C., Wolf, T., Zamboni, N., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Geiger, R., Rieckmann, J. C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., Zamboni, N., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell*, 167(3), 829–836.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>
- H. Ma, E., Bantug, G., Griss, T., Condotta, S., Johnson, R. M., Samborska, B., Mainolfi, N., Suri, V., Guak, H., Balmer, M. L., Verway, M. J., Raissi, T. C., Tsui, H., Boukhaled, G., Henriques da Costa, S., Frezza, C., Krawczyk, C. M., Friedman, A., Manfredi, M., ... Jones, R. G. (2017). Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metabolism*, 25(2), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.011>
- Harbeson, D., Ben-othman, R., Amenyogbe, N., Kollmann, T. R., Clarke, E., John, A., Luty, F., & Harbeson, D. (2018). *Outgrowing the Immaturity Myth: The Cost of Defending From Neonatal Infectious Disease*. 9(May), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01077>
- Harbeson, D., Francis, F., Bao, W., Amenyogbe, N. A., & Kollmann, T. R. (2018). *Energy Demands of Early Life Drive a Disease Tolerant Phenotype and Dictate Outcome in Neonatal Bacterial Sepsis*. 9(August). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01918>
- Holm, S. R., Jenkins, B. J., Cronin, J. G., Jones, N., & Thornton, C. A. (2021). A role for metabolism in determining neonatal immune function. *Pediatric Allergy and Immunology*, 32(8), 1616–1628. <https://doi.org/10.1111/pai.13583>
- Hung, M. H., Lee, J. S., Ma, C., Diggs, L. P., Heinrich, S., Chang, C. W., Ma, L., Forgues, M., Budhu, A., Chaisaingmongkol, J., Ruchirawat, M., Ruppin, E., Greten, T. F., & Wang, X. W. (2021). Tumor methionine metabolism drives T-cell exhaustion in hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21804-1>
- Kaymak, I., Luda, K. M., Duimstra, L. R., Ma, E. H., Longo, J., Dahabieh, M. S., Faubert, B., Oswald, B. M., Watson, M. J., Kitchen-Goosen, S. M., DeCamp, L. M., Compton, S. E., Fu, Z., DeBerardinis, R. J., Williams, K. S., Sheldon, R. D.,

- & Jones, R. G. (2022). Carbon source availability drives nutrient utilization in CD8⁺ T cells. *Cell Metabolism*, 34(9), 1298-1311.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.07.012>
- Kempis-Calanis, L. A., Rodríguez-Jorge, O., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Ventura-Martínez, C. J., Spicuglia, S., Medina-Rivera, A., Thieffry, D., González, A., & Santana, M. A. (2024). Neonatal CD4⁺ T cells have a characteristic transcriptome and epigenome and respond to TCR stimulation with proliferation and yet a limited immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, 116(1), 64–76. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad162>
- KEMPIS, L. (2021). *Análisis transcriptómico de los linfocitos T CD4 + de adultos y neonatos humanos a nivel basal y activados en presencia o ausencia de flagelina*.
- Klemke, M., & Samstag, Y. (2009). *Advances in Enzyme Regulation Molecular mechanisms mediating oxidative stress-induced T-cell suppression in cancer*. 49, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2008.12.006>
- Kronquist, E. K., Kaur, M., Gober, L. M., Knutsen, R. H., Fu, Y. P., Yu, Z. X., Donahue, D. R., Chen, M. Y., Osgood, S., Raja, N., Levin, M. D., Barochia, A., & Kozel, B. A. (2022). Airflow Obstruction in Adults with Williams Syndrome and Mice with Elastin Insufficiency. *Diagnostics*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061438>
- Kurniawan, H., Franchina, D. G., Guerra, L., Bonetti, L., Baguet, L. S., Grusdat, M., Schlicker, L., Hunewald, O., Dostert, C., Merz, M. P., Binsfeld, C., Duncan, G. S., Farinelle, S., Nonnenmacher, Y., Haight, J., Das Gupta, D., Ewen, A., Taskesen, R., Halder, R., ... Brenner, D. (2020). Glutathione Restricts Serine Metabolism to Preserve Regulatory T Cell Function. *Cell Metabolism*, 31(5), 920-936.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.03.004>
- Lopez Krol, A., Nehring, H. P., Krause, F. F., Wempe, A., Raifer, H., Nist, A., Stiewe, T., Bertrams, W., Schmeck, B., Luu, M., Leister, H., Chung, H., Bauer, U., Adhikary, T., & Visekruna, A. (2022). Lactate induces metabolic and epigenetic reprogramming of pro-inflammatory Th17 cells. *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.15252/embr.202254685>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). *CD4 + T Cells : Differentiation and Functions*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Ma, E. H., Bantug, G., Griss, T., Condotta, S., Johnson, R. M., Samborska, B., Mainolfi, N., Suri, V., Guak, H., Balmer, M. L., Verway, M. J., Raissi, T. C., Tsui, H., Boukhaled, G., Henriques da Costa, S., Frezza, C., Krawczyk, C. M., Friedman, A., Manfredi, M., ... Jones, R. G. (2017). Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metabolism*, 25(2), 345–357.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.011>

- Ma, S., Sandhoff, R., Luo, X., Shang, F., Shi, Q., Li, Z., Wu, J., Ming, Y., Schwarz, F., Madi, A., Weisshaar, N., Mieg, A., Hering, M., Zettl, F., Yan, X., Mohr, K., Bosch, N. ten, Li, Z., Poschet, G., ... Cui, G. (2024). Serine enrichment in tumors promotes regulatory T cell accumulation through sphinganine-mediated regulation of c-Fos. *Science Immunology*, 9(94), 1–18. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.adg8817>
- Maciolek, J. A., Alex Pasternak, J., & Wilson, H. L. (2014). Metabolism of activated T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 27(1), 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.006>
- Maciver, N. J., Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 31). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>
- Martí i Líndez, A. A., & Reith, W. (2021). Arginine-dependent immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(13), 5303–5324. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>
- Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunological Reviews*, 236(1), 190–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x>
- Nakaya, M., Xiao, Y., Zhou, X., Chang, J., Chang, M., Cheng, X., Blonska, M., Lin, X., & Sun, S. (2014). Inflammatory T Cell Responses Rely on Amino Acid Transporter ASCT2 Facilitation of Glutamine Uptake and mTORC1 Kinase Activation. *Immunity*, 40(5), 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.007>
- Naldi, A., Hernandez, C., Abou-Jaoudé, W., Monteiro, P. T., Chaouiya, C., & Thieffry, D. (2018). Logical modeling and analysis of cellular regulatory networks with GINsim 3.0. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00646>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2020). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed.).
- Niarakis, A., & Helikar, T. (2021). A practical guide to mechanistic systems modeling in biology using a logic-based approach. *Briefings in Bioinformatics*, 22(4), 1–19. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa236>
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. (2014). *KUBY Inmunología*.
- Patriarca, E. J., Cermola, F., Aniello, C. D., Fico, A., Guardiola, O., Cesare, D. De, & Minchiotti, G. (2021). *The Multifaceted Roles of Proline in Cell Behavior*.

9(August), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.728576>

- Paulson, K. R., Kamath, A. M., Alam, T., Bienhoff, K., Abady, G. G., Abbas, J., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abd-Elsalam, S. M., Abdoli, A., Abedi, A., Abolhassani, H., Abreu, L. G., Abu-Gharbieh, E., Abu-Rmeileh, N. M. E., Abushouk, A. I., Adamu, A. L., Adebayo, O. M., ... Kassebaum, N. J. (2021). Global, regional, and national progress towards Sustainable Development Goal 3.2 for neonatal and child health: all-cause and cause-specific mortality findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 398(10303), 870–905. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01207-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01207-1)
- Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38(4), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
- Perin, J., Mulick, A., Yeung, D., Villavicencio, F., Lopez, G., Strong, K. L., Prieto-Merino, D., Cousens, S., Black, R. E., & Liu, L. (2022). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet Child and Adolescent Health*, 6(2), 106–115. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(21\)00311-4](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(21)00311-4)
- Pieren, D. K. J. (2022). The adaptive immune system in early life: The shift makes it count. *Frontiers in Immunology*, 13(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031924>
- Puleston, D. J., Baixauli, F., Sanin, D. E., Edwards-Hicks, J., Villa, M., Kabat, A. M., Kamiński, M. M., Stanckzak, M., Weiss, H. J., Grzes, K. M., Piletic, K., Field, C. S., Corrado, M., Haessler, F., Wang, C., Musa, Y., Schimmelpfennig, L., Flachsmann, L., Mittler, G., ... Pearce, E. L. (2021). Polyamine metabolism is a central determinant of helper T cell lineage fidelity. *Cell*, 184(16), 4186–4202.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.007>
- Robles, J. (2023). *Modelado computacional de la influencia del metabolismo en la activación de los linfocitos T CD4 neonatales*.
- Rudd, B. D. (2020). *Neonatal T Cells : A Reinterpretation*. 229–247.
- Saadatpour, A., & Albert, R. (2013). Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. *Methods*, 62(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.10.012>
- Samaga, R., & Klamt, S. (2013). Modeling approaches for qualitative and semi-quantitative analysis of cellular signaling networks. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-43>

- Schwab, J. D., Kühlwein, S. D., Ikonomi, N., Köhl, M., & Kestler, H. A. (2020). Concepts in Boolean network modeling: What do they all mean? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.001>
- Sugiura, A., Andrejeva, G., Voss, K., Heintzman, D. R., Xu, X., Madden, M. Z., Ye, X., Beier, K. L., Chowdhury, N. U., Wolf, M. M., Young, A. C., Greenwood, D. L., Sewell, A. E., Shahi, S. K., Freedman, S. N., Cameron, A. M., Foerch, P., Bourne, T., Garcia-Canaveras, J. C., ... Rathmell, J. C. (2022). MTHFD2 is a metabolic checkpoint controlling effector and regulatory T cell fate and function. *Immunity*, 55(1), 65–81.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.011>
- Szwed, A., Kim, E., & Jacinto, E. (2021). REGULATION AND METABOLIC FUNCTIONS OF mTORC1 AND mTORC2. *Physiological Reviews*, 101(3), 1371–1426. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2020>
- UNICEF, & World Health Organization. (2024). *Levels and Trends Child Mortality-Report 2023: Estimates Developed by the United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation*.
- United Nations Children's Fund (UNICEF). (2024). *Levels & Trends in Child Mortality*. <https://data.unicef.org/resources/levels-and-trends-in-child-mortality-2024/>
- Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., & Green, D. R. (2011). The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity*, 35(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.021>
- Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(9), 1496–1516. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>
- Yu, H. R., Hsu, T. Y., Tsai, C. C., Huang, H. C., Cheng, H. H., Lai, Y. J., Lin, Y. J., Chen, C. C., Li, S. C., & Yang, K. D. (2021). The functional dna methylation signatures relevant to altered immune response of neonatal t cells with l-arginine supplementation. *Nutrients*, 13(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu13082780>
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2012). *Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations*. 1, 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212.Differentiation>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 18 de mayo de 2026

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: "EFECTO DE LA L-ARGININA Y LA L-SERINA EN LA RESPUESTA INMUNE DE LOS LINFOCITOS T CD4⁺ NEONATALES: UN ENFOQUE EXPERIMENTAL Y COMPUTACIONAL" que presenta el L. en C. Jonathan Ricardo Robles Reyes (10018682), para obtener el título de Maestro en Ciencias.

Dirección de tesis: Dr. Otoniel Rodríguez Jorge

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM - UAEM	APROBADO
Dra. Delia Vanessa López Guerrero FN - UAEM	APROBADO
Dr. José Luis Maravillas Montero IBT - UNAM	APROBADO
Dra. Linda Aimara Kempis Calanis CIDC - UAEM_Posdoc	APROBADO
Dra. Gabriela Rosas Salgado Fac. Medicina - UAEM	APROBADO





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2026-05-21 07:38:59 | FIRMANTE

HZLwxEE1OjTWiciZ3ofTiDhKLu5HIGx5GCa3fVRKHwYwLDbYjpnz69RlkZES//FX6S1Dnz5+TuPVVthpmcxXBPAKFr5udcYA+A1LHDM1LcTrMs6UHz4LJir03+uHAWRAJEZYIRpXaG7vOry4xUSc3k2h/M3xzN92jiE1ZvRspZZZPAznkOF93yrlPtqcrZcmbpwjWB1NECFGc6tM9maRi8Dkr+qh7PssYQW2tsji/BUJcrIMTAIYW3FkodQwyc8+T88Oc8P66PJWCgarN7xEvmwjzRcQqG5m/aaV8yDw4t/bTwV43Dj1ZYapEiyl2izR2mgGOD0Jpr6jIbJWCDBUg==

JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO | Fecha:2026-05-21 23:32:57 | FIRMANTE

Un2eL+qqYdRKUQxoCFmApAD55lgyqqs/A9rGqhP0zivghjGtpY6R0m17j7ltW2shO9tj54ReFx/iCv2r8lprbwObvwieUklIRkhl0+LIMDi/glys+9EvY0tubENJLCys40NrF5JNEBSfAPHfA9+K27P+f1w+07jhQG3vq+zfCpw17mf1RT3YRX0o6V89JYvhElyfJJODIE77gX2B8f0j7CMnAFIVN7gXwaez4gqQ50+Vk3bwHrkKi5DwKO6lDryQuVVqk2iOhhBmH675py+tdEG/Man84rvlFcBsGYSnEckACVAdQRbsloDKBswWf6+kal+Yk3nHbIYqqUnA==

LINDA AIMARA KEMPIS CALANIS | Fecha:2026-05-22 13:54:08 | FIRMANTE

hJSdenlvIn5ZXuv0NuvaUvbW/AhpUaoctHH14cJaoeWPTkqzOqlzb+aBaR7cnv5INvFDZx6bXToaduPCPQLWayg7z3PUjJ2SmrRsYPQYQqobleE21zYXkgm5L+GJT8MbPnN/nb4uZ43cjDdpCrYyVidEayAE7f6pp8tDx4FcxrjgeMgdZMY2/EjRt9ZhOpENi4CEWjam/yND6NI1sVekb5ZVudOuEEkZcSWFhQnNq3tnRMqj8UnmN6a0eRCGWW1JXpsZ/P/DEznJzZ98fErnvUdvvF34ZP2Qd2X/Z6jZesZBq/aVJYW0hOsMyR42D0ztwdal3wbGlaXENyfiqBrQ7g==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2026-05-22 15:27:22 | FIRMANTE

O3ZDg9tXBzISvKX/euEFXjLqYicJTRLQm2eCc/40KjJu1MMU1c5ec3Eyo0uSOMQnL7xE6CsYh2MkPQ74VFr8cj5fZoyNBrtPiOLjOWgVsOmuf997+xc3JsohLb5nCaumr/l9QVWYG2EkSq1CjYyV70fU3XEYbwC0u3zD/GI+ioOJKSw1LJ/UwHluOGuUy4HqWBu1q72T8Yf/potiVSWsvhTKmUxkJR9prSkw7cpqpercTyhc+aZaqPfPkt3WDce/Bsq+eqWy2V4y6CrbU83kX1eRSeeo/as7c0+1P4odc3dobeS4Xi4hQy9k2jJSYDb99q30Qt85R5WwloAMN74rg==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2026-05-27 19:25:50 | FIRMANTE

Ct/Ritl4qwUN7SrDfpu5LAX8uFe04N32L4Y91VL91FKc+giHUy5q474NdMcSqnSoOTg4HEwVq1ByvRPcx9CSFu1HxjkTnSrLgq2efHhBJGnjN2N78fohjcQYTesXPL2Nsw/9Z+BrznR66BXZBldx3S4nBw2nbkxC8RRtk9Nz58qDqn5XDGFjns0U6wDH3Zwxn2qQ+vtRj+KYx3geSIAE4B5r6cOkPrvE8pGWc4lp5oBjIBkVQd7ukhgYngzJ2mKLGg+6WzUD8dWj4R6IV6i1ukiM4c6Rulpa7A5o1sBVZY1Hrh2Jvxu0vbQF3n3Kc/hS2x5r9WoSAuFeIORSi9uA==

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



sm1L3b7X9

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Opo1TJwsFX06bXR4h0xXdga5jUEb5IK2>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029