

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Biomedicina y Bionanotecnología**

***Efecto in vitro de la proteína núcleo del virus de la hepatitis C
en las funciones efectoras de linfocitos T colaboradores***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Karla Daniela Carballo Zamora

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Karla Daniela Carballo Zamora

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Marco Antonio De León Nava
Director de tesis

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dra. Ivett Zavala Guillén

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Dra. Laura Angélica Álvarez Lee



Dra. Ana Denise Re Araujo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Karla Daniela Carballo Zamora** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Efecto *in vitro* de la proteína núcleo del virus de la hepatitis C en las funciones efectoras de linfocitos T colaboradores

Resumen aprobado por:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Director de tesis

Algunos virus son patógenos que, para establecerse y reproducirse en sus hospederos humanos, han desarrollado estrategias para evadir, mediante proteínas estructurales y no estructurales, la respuesta inmunológica. El virus de la hepatitis C (HCV) perteneciente a la familia *Flaviridae* y al género *Hepacivirus*, codifica en su genoma una poliproteína que genera diez proteínas virales: núcleo, estructural (E) 1, E2, proteína (p) 7, no estructural (NS) 2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Algunas evidencias indican que la proteína núcleo (PN) participa en la evasión de la respuesta inmunitaria, modificando vías de señalización y alterando las poblaciones de linfocitos T, células importantes en coordinar y establecer una respuesta antiviral efectiva, pero no está claro si esta proteína actúa directamente en los linfocitos T colaboradores (Th) y reguladores (Treg). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto *in vitro* de la PN sobre la activación y función efectora de distintas poblaciones de linfocitos T: Th1, Th2, Th17 y Treg. Para cumplir con este objetivo se estableció una estrategia experimental, que consistió en obtener muestras de sangre periférica de sujetos sanos, separar las células mononucleares por medio de centrifugación en gradiente de densidad, aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y, tras un conteo, cultivarlas y tratarlas con la PN. Después se evaluaron las subpoblaciones de linfocitos Th, identificadas por la expresión de biomarcadores membranales y producción de citocinas. Los resultados indican que la PN tiene un efecto modulador de la activación y producción de citocinas, como el IFN- γ y la IL-10 por parte de los linfocitos T, además hipotetizamos que esta proteína puede estar involucrada en el agotamiento celular de los linfocitos T como lo indica la expresión de los marcadores inhibidores, PD-1 y CTLA-4. La aportación de este trabajo fue caracterizar el efecto inmunomodulador de la proteína núcleo, contribuyendo a la comprensión de la interacción virus-inmunidad y los mecanismos moduladores del HCV sobre los linfocitos T.

Palabras clave: Inmunomodulación, PN, linfocitos T colaboradores.

Abstract of the thesis presented by **Karla Daniela Carballo Zamora** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

In vitro effect of the core protein of the hepatitis C virus on the effector functions of T helper lymphocytes

Abstract approved by:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Thesis Director

Some viruses are pathogens that, in order to establish and reproduce in their human hosts, have developed strategies to evade, through structural and non-structural proteins, the immune response. The Hepatitis C virus (HCV), belonging to the *Flaviridae* family and the *Hepacivirus* genus, encodes a polyprotein that in turn generates ten viral proteins: core, structural (E) 1, E2, protein (p) 7, non-structural (NS) 2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B. Some evidence indicates that the core protein (PN) participates in the evasion of the immune response, modifying signaling pathways and altering the populations of T lymphocytes, important cells in coordinating and establishing an effective antiviral response, but it is not clear if this protein acts directly on helper (Th) and regulatory T (Treg) lymphocytes. The objective of this work is to evaluate the *in vitro* effect of PN on the activation and effector function of different populations of Th lymphocytes: Th1, Th2, Th17 and Treg. To accomplish this objective, an experimental strategy was established, which consisted in obtaining peripheral blood samples from healthy subjects, separating the mononuclear by means of density gradient centrifugation, isolating the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and after a count, cultivate them and treat them with PN. Th cell subpopulations, identified by the expression of membrane biomarkers and cytokine production, were then assessed. The results indicated that the PN has a modulatory effect on the activation and production of cytokines, such as IFN- γ and IL-19 by T cells, we also hypothesize that this protein may be involved in the cellular exhaustion of T cells as indicated by the expression of inhibitory markers, PD-1 and CTLA-4. The contribution of this work is to characterize the immunomodulatory effect of the core protein, helping us to understand the virus-host interaction and the modulating mechanisms of the HCV protein on T lymphocytes.

Keywords: Immunomodulation, PN, T helper lymphocytes.

Dedicatoria

Dedico de manera especial esta tesis a mi abuelo, Miguel Zamora López, por siempre creer en mí. Te extraño.

A mi mamá Leticia, mi papá Alfredo, mi abuela Nelly y a mi hermanita Valeria por ofrecerme el amor y la calidez de la familia a la cual amo.

A mi papá Carlos, por mostrarme desde muy pequeña las instalaciones de CICESE y la curiosidad por la ciencia.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por el apoyo, instalaciones y facilidades otorgadas durante la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Al Dr. Villalta de la Universidad de California por proporcionar reactivos para mi proyecto.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social y la Secretaría de Salud por proporcionarme las muestras biológicas necesario para todos mis experimentos.

A mi director de tesis, Dr. Marco Antonio De León Nava, por permitirme trabajar bajo su dirección y guiarme durante mi estancia en CICESE.

A la Dra. Laura Angélica Álvarez Lee, por siempre estar al pendiente de mí y de mi trabajo, y por ser un gran apoyo y muy buena amiga.

A mi comité de tesis, el Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno, la Dra. Ivett Zavala Guillén y la Dra. Laura Angélica Álvarez Lee, por su disposición al aceptar este proyecto y por todas sus aportaciones.

Al Dr. Ismael Mancilla del Instituto Nacional de Perinatología (INPER) en CDMX, por su apoyo en la obtención de datos de citocinas solubles y todas sus atenciones.

A mi familia, a mi novio y amigos, por el apoyo incondicional.

A mis mascotas por ser una distracción y un gran apoyo emocional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	xiii
Lista de acrónimos	xiv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades del sistema inmunitario	1
1.1.1 Inmunidad innata	2
1.1.2 Inmunidad adaptativa	3
1.1.2.1 Linfocitos efectores Th1	5
1.1.2.2 Linfocitos efectores Th2	6
1.1.2.3 Linfocitos efectores Th17	6
1.1.2.4 Linfocitos efectores Treg.....	7
1.1.2.5 Balance de linfocitos Th1/Th2	7
1.1.2.6 Balance de linfocitos Th17/Treg.....	8
1.1.3 Respuesta inmunitaria antiviral	8
1.1.4 Inmunomodulación	10
1.1.5 Generalidades del virus de la hepatitis C	11
1.1.5.1 Respuesta inmunitaria ante infección del HCV	11
1.2 Antecedentes	12
1.2.1 Proteína núcleo del HCV.....	12
1.3 Justificación	16
1.4 Hipótesis.....	16
1.5 Objetivos	17
1.5.1 Objetivo general	17
1.5.2 Objetivos específicos.....	17
Capítulo 2. Metodología.....	18
2.1 Muestras biológicas.....	18

2.2	Aislamiento de PBMCs	18
2.3	Proteína núcleo del HCV.....	18
2.4	Proliferación celular	19
2.4.1	Ensayo de proliferación celular	19
2.5	Citometría de flujo	21
2.5.1	Detección de la expresión de citocinas	23
2.5.2	Ensayos de agotamiento celular	23
2.6	Análisis estadístico	24
Capítulo 3.	Resultados	25
3.1	Efecto de la PN en la proliferación celular	25
3.1.1	Resazurina sódica	25
3.1.2	Carboxifluoresceína.....	27
3.2	Efecto de la PN en la activación de linfocitos T.....	29
3.3	Efecto de la PN en las funciones efectoras de linfocitos T.....	30
3.4	Efecto de la PN en la producción de citocinas solubles	32
3.5	Efecto de la PN en el agotamiento celular	32
Capítulo 4.	Discusión.....	36
Capítulo 5.	Conclusiones	40
Literatura citada		41
Anexos		48

Lista de figuras

Figura	Página
1. Inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata se compone de proteínas solubles y células con funciones especializadas: mastocitos, células asesinas naturales (NK), macrófagos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos. La inmunidad adaptativa se compone de linfocitos B, productores de anticuerpos y linfocitos T células productoras de moléculas solubles capaces de potenciar la respuesta de sí mismas o de otros tipos celulares. La respuesta inmunitaria innata y adaptativa se comunican mediante las células presentadoras de antígeno (APC) que incluyen monocitos/macrófagos, linfocitos B y células dendríticas (DC). Tomada y modificada de Dandroff <i>et al.</i> , 2004.....	2
2. Diferenciación de las células T CD4+. Los linfocitos Th, en presencia de estímulos, citocinas y otros factores, pueden diferenciarse en subpoblaciones productoras de citocinas específicas de cada subtipo.....	5
3. Genoma viral del HCV. El genoma ARN policistrónico del HCV da origen a diez proteínas virales: proteína núcleo (PN), proteínas estructurales E1 y E2, p7 y proteínas no-estructurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (RdRp). Tomada y modificada de Chevaliez y Pawlotsky, 2006.....	11
4. Respuesta inmunitaria en presencia de HCV. Las líneas color negro con flechas denotan una acción sobre un elemento mientras que las líneas rojas inhibitorias representan una inhibición por un elemento. Tomada y modificada de Obaid <i>et al.</i> , 2018.....	12
5. Dominios de la proteína núcleo. La primera escisión de la proteína núcleo (PN) por peptidasas del hospedero genera una PN inmadura de 191 aminoácidos de longitud. Una segunda escisión remueve la C-terminal de la secuencia señal E1, liberando la PN madura de 177 aminoácidos de longitud y 21 kDa de peso. La PN madura está compuesta por dos dominios distintos: dominio 1 (en la región N-terminal) y dominio 2 (en la región C-terminal). El dominio 1 es una estructura flexible que se subdivide en tres dominios básicos (BD): BD1, BD2 y BD3. Durante el ensamble el dominio 1 está involucrado en la unión a RNA y oligomerización para formar la nucleocápside. El dominio 2 contiene las regiones de hélice (H) 1 y H2, que están conectadas por un bucle hidrofóbico (HL), que contribuye en la interacción con membranas lipídicas. El dominio 3 corresponde al extremo de la región C-terminal que es escindida y por lo tanto ausente en la PN madura. Tomado y modificado de Hepatitis C online, 2021.....	13
6. Ensayo de proliferación celular con resazurina. El contenido final de los pozos final fue de 15,000 células en 150µl de medio, concanavalina A (ConA) [1mg/ml], lipopolisacárido (LPS) [1mg/ml], resazurina sódica y la proteína núcleo (PN) en tres distintas concentraciones: 0.1µg/ml, 1µg/ml y 10µg/ml. S, sujeto.....	19

7. **Ensayo de proliferación celular con CFSE.** El contenido final de los pozos fue de 1 millón de células en 1ml de medio, éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) y anti-CD4 para todos los pozos excepto para los controles. A los pozos con células activadas con PMA se agregó proteína núcleo (PN) en cuatro distintas concentraciones: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml..... 20
8. **Estrategia de análisis de datos.** A) El citograma muestra los datos singulares o “singlets”, delimitadas por el recuadro negro en el citograma, al analizar el detector de dispersión frontal (FSC) contra FSC. B) El citograma muestra las poblaciones celulares detectadas al analizar FSC contra el detector de dispersión lateral (SSC), se muestra la población de linfocitos T marcada en el recuadro negro del citograma..... 22
9. **Efecto de la PN en la proliferación de linfocitos T CD4+.** A) Células con 0.1µg/ml de proteína núcleo (PN). B,) Células con 1µg/ml de PN. C) Células con 10µg/ml de PN. D) Control células sin activación. E) Control células activadas..... 26
10. **Proliferación de linfocitos T CD4+, evaluado mediante reducción de resazurina sódica.** Efecto sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ activados con 0.1ug/ml, 1ug/ml y 10ug/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar (n=5, por concentración de PN). Control negativo, células sin activar sin PN; control positivo, células activadas. Las diferencias entre el control negativo y todas las concentraciones de PN se consideraron estadísticamente significativos (***, p<0.001). Las diferencias entre el control positivo y todas las concentraciones de PN se consideraron estadísticamente significativos (*, p=0.05 para 0.1ug/ml y ***, p<0.001 para 1ug/ml y 10ug/ml). Las diferencias entre la concentración 0.1ug/ml de PN y 1ug/ml se consideraron estadísticamente significativas (***, p<0.001). Las diferencias entre la concentración 0.1ug/ml y 10ug/ml se consideraron estadísticamente significativas (**, p=0.009)..... 26
11. **Efecto de la PN sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ no activados.** A) Citogramas correspondientes al marcaje con anti-CD4 y éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) en células activadas con cuatro concentraciones de proteína núcleo (PN): 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. B) Histogramas correspondientes a la representación de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de la CFSE en células activadas con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células activadas con PMA. Comp, compensación..... 27
12. **Efecto de la PN sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ activados.** A) Citogramas correspondientes al marcaje con anti-CD4 y éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) en células activadas con cuatro concentraciones de proteína núcleo (PN): 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. B) Histogramas correspondientes a la representación de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de la CFSE en células activadas con cuatro

- concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células activadas con PMA sin PN.Comp, compensación..... 28
13. **Efecto de la PN en la activación de linfocitos T mediante citometría de flujo.** El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CD62L respecto al marcador CD4 con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Comp, compensación..... 29
14. **Expresión del marcador CD62L.** Efecto sobre la expresión de CD62L en linfocitos T CD4+ con 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las media con desviación estándar (n=3, por concentración de PN). Control, células sin PN. Las diferencias entre el control contra todas las concentraciones de PN se consideran estadísticamente significativos (***, p<0.001)..... 30
15. **Efecto de la PN en la producción de IFN- γ por los linfocitos T.** El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador IFN- γ respecto al marcador CD4 con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células sin PN. Comp, compensación..... 31
16. **Efecto de la PN en la producción de IL-10 por los linfocitos T.** El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador IL-10 respecto al marcador CD4 con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células sin PN. Comp, compensación..... 31
17. **Efecto de la PN en la producción de citocinas solubles.** Efecto sobre la producción de citocinas solubles en linfocitos T CD4+ con 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar (n=3, por concentración de PN). Control, células sin PN. Las diferencias entre la producción de IL-6 y las demás citocinas se consideran estadísticamente significativos (***, p<0.001)..... 32
18. **Efecto de la PN en la expresión de PD-1 por los linfocitos T mediante citometría de flujo.** El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) sobre la expresión del marcador PD-1 en células T CD4+ desde 0 hasta 144 horas, leídas cada 24 horas. Control, células sin PN. Comp, compensación..... 33
19. **Efecto de la PN en la expresión del marcador PD-1.** Efecto sobre la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ con 500ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan la medias con desviación estándar (n=3, por cada tratamiento). Control, células sin PN. Las diferencias entre el tratamiento y el control se consideran estadísticamente significativos (*, p<0.04)..... 34
20. **Efecto de la PN en la expresión de CTLA-4 por los linfocitos T mediante citometría de flujo.** El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) sobre

la expresión del marcador CTLA-4 en células T CD4+ desde 0 hasta 144 horas, leídas cada 24 horas. Control, células sin PN. Comp, compensación.....	34
21. Expresión del marcador CTLA-4. Efecto sobre la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4+ con 500ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar (n=3, por cada tratamiento). Control, células sin PN. Las diferencias entre el tratamiento y el control se consideran estadísticamente significativos (***, p<0.001).....	35
22. Efecto de la PN sobre la muerte celular de linfocitos T mediante citometría de flujo. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) sobre la expresión de yoduro de propidio (PI) en células T CD4+. Control, células sin PN. Comp, compensación.....	35
23. Estandarización de número de células cultivadas en placa de 96 pozos. El contenido final de los pozos final fue de células en 150µl de medio, concanavalina A (ConA) [1mg/ml], lipopolisacárido (LPS) [1mg/ml] y resazurina sódica.....	48
24. Estandarización de número de células. El contenido final de los pozos final fue de células en 150µl de medio, concanavalina A (ConA) [1mg/ml], lipopolisacárido (LPS) [1mg/ml] y resazurina sódica.....	49
25. Ensayo de estandarización de la activación de linfocitos con PMA. El contenido final de los pozos final fue de 1 millón de células en 1ml de medio, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en tres distintas concentraciones: 10ng/ml, 20ng/ml y 25ng/ml y éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). Control autofluorescencia, únicamente células. Control de muerte, células teñidas con yoduro de propidio (PI). Control de proliferación, únicamente células con CFSE.....	51
26. Estandarización de activación celular con PMA. El análisis muestra la proliferación de linfocitos T con tres concentraciones distintas de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA): 10ng/ml, 20ng/ml y 25ng/ml. Comp, compensación.....	51
27. Titulación de anti-CD4. Expresión de CD4 en células marcadas con anti-CD4.....	52
28. Titulación de anti-CD25. Expresión de CD25 en células marcadas con anti-CD25.....	53
29. Titulación de anti-CD45RA. Expresión de CD45RA en células marcadas con anti-CD45RA.....	53
30. Titulación de anti-CD62L. Expresión de CD62L en células marcadas con anti-CD62L.....	53
31. Titulación de anti-IFN-γ. Expresión de IFN-γ en células marcadas con anti-IFN-γ.....	54

32. Titulación de anti-IL-4. Expresión de IL-4 en células marcadas con anti-IL-4....	54
33. Titulación de anti-IL-10. Expresión de IL-10 en células marcadas con anti-IL-10.....	54
34. Titulación de anti-IL-17A. Expresión de IL-17A en células marcadas con anti-IL-17A.....	55
35. Titulación de anti-Foxp3. Expresión de Foxp3 en células marcadas con anti-Foxp3.....	55
36. Efecto de la PN sobre la expresión del marcador CD62L en linfocitos T. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CD62L respecto al marcador CD4 de tres sujetos con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.....	60
37. Expresión del marcador CD62L en células sin PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CD62L de tres sujetos sin PN.....	60
38. Expresión de PD-1 en linfocitos T con PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador PD-1 de tres sujetos con 500ng/ml de PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación...	61
39. Expresión de PD-1 en linfocitos T sin PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador PD-1 de tres sujetos sin PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.....	61
40. Expresión de CTLA-4 en linfocitos T con PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CTLA-4 de tres sujetos con 500ng/ml de PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.....	62
41. Expresión de CTLA-4 en linfocitos T sin PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CTLA-4 de tres sujetos sin PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.....	62

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Resumen de antecedentes sobre inmunomodulación del HCV.....	15
2. Paneles para detección de subpoblaciones de linfocitos T.....	22
3. Panel de anticuerpos.....	52
4. Análisis estadísticos de proliferación celular con resazurina.....	56
5. Análisis estadísticos de la expresión del marcador CD62L.....	56
6. Análisis estadísticos producción de citocinas solubles.....	57
7. Análisis estadísticos de la expresión del marcador PD-1.....	59
8. Análisis estadísticos de la expresión del marcador CTLA-4.....	59

Lista de acrónimos

APC	Célula presentadora de antígeno (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
BCR	Receptor de linfocito B (<i>B Cell Receptor</i>)
BD	Dominio básico (<i>Basic Domain</i>)
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína (<i>CarboxyFluoresceinSuccinimidyl Ester</i>)
ConA	Concanavalina A
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (<i>Cytotoxic T-LymphocyteAntigen 4</i>)
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
DCm	Células dendríticas maduras
dH₂O	Agua destilada
E	Estructural
FSC	Dispersión frontal (<i>Frontal Scatter</i>)
FT	Factor de Transcripción
gC1qR	Receptor de la proteína globular soluble C1q
GITR	Glucocorticoides (<i>Glucocorticoid-Induced TNFR-Related</i>)
H	Hélice
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (<i>4-(2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>)
HCC	Carcinoma hepatocelular (<i>Hepatocellular Carcinoma</i>)
HCV	Virus de la Hepatitis C (<i>Hepatitis C Virus</i>)
HL	Bucle hidrofóbico (<i>Hydrophobic Loop</i>)
IFN	Interferón
IKKβ	Inhibidor del factor nuclear de la cinasa kappa beta (<i>Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase</i>)
IL	Interleucina
IRF	Factores de regulación de interferón (<i>Interferon Regulatory Factor</i>)

iTreg	T reguladores inducidos
JAK	Cinasas Jano (<i>Janus Kinases</i>)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LPS	Lipopolisacárido
MDSC	Células supresoras derivadas de mieloides (<i>Myeloid-Derived Supressor Cells</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NFκB	Factor nuclear kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa B</i>)
NK	Asesinas naturales (<i>Natural Killer</i>)
NLR	Receptor para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (<i>NOD Like Receptor</i>)
NOM	Norma Oficial Mexicana
NS	No structural
P	Proteína
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Pathogen associated molecular patterns</i>)
PBLC	Células linfocíticas de sangre periférica (<i>Peripheral Blood Linfocitic Cell</i>)
PBMC	Células mononucleares provenientes de sangre periférica(<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	Buffer fosfatosalino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PD-1	Proteína 1 de muerte programada 1 (<i>Programmed cell Death protein 1</i>)
PD-L1	Ligando de proteína 1 de muerte programada 1 (PD-L1, <i>Programmed Death Ligand 1</i>)
PI	Yoduro de propidio (<i>Propidium Iodide</i>)

PKC	Proteína cinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato (<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PN	Proteína núcleo
PPR	Patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Phatogen Pattern Recognition</i>)
RLR	Receptores tipo RIG (<i>RIG Like Receptor</i>)
ROR	Receptor gamma huérfano relacionado a RAR (<i>Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma</i>)
SA-PE	Estreptavidina-ficoeritrina (<i>Streptavidin-Phycoerythrin</i>)
SCC	Dispersión lateral (<i>Side Scatter</i>)
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TA	Temperatura ambiente
TAP	Transportador de MHC de clase I (<i>Transporter Associated with Antigen Processing</i>)
TCR	Receptores de los linfocitos T (<i>T Cell Receptor</i>)
TIM-3	Inmunoglobulina de células T dominio mucina 3 (<i>T-cellimmunoglobulin mucin-3</i>)
TGF-β	Factor de crecimiento transformador beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)
Th	T colaboradores (<i>T helper</i>)
TLR	Receptores tipo toll (<i>Toll Like Receptor</i>)
Treg	T reguladores
VHS	Virus del herpes simple
VIH	Virus de inmunodeficiencia Humana

Capítulo 1. Introducción

La incidencia y complicaciones relacionadas al virus de la hepatitis C (HCV) continúa aumentando globalmente, aproximadamente 58 millones de personas en el mundo están infectados con HCV crónica (Organización Mundial de la Salud, 2021). La persistencia de esta infección viral puede causar carcinoma hepatocelular (HCC), el primer padecimiento del hígado y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Solo un 15% de los individuos infectados eliminan la infección viral por HCV (Organización Mundial de la Salud, 2021). Los individuos que no logran eliminar el virus, desarrollan una infección crónica que causa una falla inmunitaria, que se caracteriza por alteración del equilibrio celular. El virus aparentemente provoca el agotamiento funcional de las células T específicas al virus, incluyendo supresión mediante el aumento de marcadores de muerte, pérdida de co-estimulación positiva y expansión de los linfocitos T reguladores (Treg) (Barathan *et al.*, 2015). A pesar de la identificación de estos factores relacionados, la causa exacta de la mayoría de los casos de esta persistencia viral se desconoce, sugiriendo la contribución de otros factores, en particular el estado inmunitario del hospedero y la inmunomodulación mediante los elementos virales del HCV (Zhai *et al.*, 2015; Sghaier *et al.*, 2017).

En este trabajo nos centramos en la proteína núcleo (PN) del HCV por su efecto inmunosupresivo. Los datos obtenidos nos ayudan a comprender mejor el efecto modulador del virus sobre las subpoblaciones de linfocitos T humanos.

1.1 Generalidades del sistema inmunitario

El sistema inmunológico es una red compleja compuesta por una variedad de células, órganos y moléculas solubles. Esta red se encarga de la detección y eliminación de agentes extraños al organismo, células anómalas y sustancias nocivas mediante mecanismos coordinados entre sus componentes (Abbas *et al.*, 2015). El sistema inmunológico se divide en dos respuestas principales, inmunidad innata e inmunidad adaptativa (Figura 1). La respuesta inmunitaria innata es la primera línea de defensa que reconoce, mediante receptores celulares, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), patrones moleculares asociados a daño (DAMPS) y antígenos propios y no propios (Herwald y Egesten, 2016).

También, cumple un papel importante en la activación y regulación de la inmunidad adaptativa (Riera-Romo *et al.*, 2016). Por otro lado, la respuesta inmunitaria adaptativa se distingue por presentar mayor especificidad y aumentar la capacidad de reacción con cada exposición a un mismo antígeno específico (Warrington *et al.*, 2011).

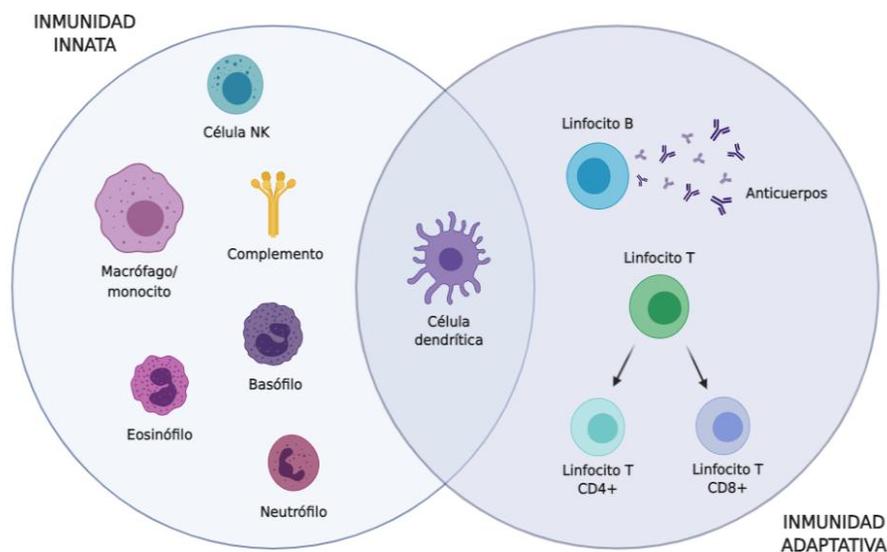


Figura 1. Inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata se compone de proteínas solubles y células con funciones especializadas: mastocitos, células asesinas naturales (NK), macrófagos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos. La inmunidad adaptativa se compone de linfocitos B, productores de anticuerpos y linfocitos T células productoras de moléculas solubles capaces de potenciar la respuesta de sí mismas o de otros tipos celulares. La respuesta inmunitaria innata y adaptativa se comunican mediante las células presentadoras de antígeno (APC) que incluyen monocitos/macrófagos, linfocitos B y células dendríticas (DC). Tomada y modificada de Dandroff *et al.*, 2004.

1.1.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera respuesta que previene y elimina infecciones mediante distintos mecanismos efectores que, cuando se necesita una respuesta más específica, estimulan a la inmunidad adaptativa. Los mecanismos constan de barreras físicas (piel, mucosa, epitelio ciliado bronquial, moco), barreras químicas (pH de los fluidos, lípidos, poliaminas), barreras bioquímicas (enzimas, proteínas de fase aguda, citocinas), barreras microambientales (como la microbiota intestinal), proteínas solubles como el complemento, quimiocinas, citocinas, cascada de coagulación y elementos celulares con funciones especializadas: neutrófilos, monocitos/macrófagos y células asesinas naturales (NK) (Delves *et al.*, 2017).

La inmunidad innata y la inmunidad adaptativa se comunican mediante las células presentadoras de antígeno (APC), que pueden ser macrófagos, linfocitos B o células dendríticas (DC), que reconocen

antígenos que posteriormente son presentados a elementos de la inmunidad adaptativa (Warrington *et al.*, 2011). La presentación de antígeno comienza con la fagocitación de antígenos, procesamiento del antígeno y termina con la presentación de los péptidos de origen exógeno o endógeno mediante complejos péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II según corresponda. Las APC migran de los sitios de adquisición de antígeno hacia los órganos linfáticos secundarios e interactúan físicamente con los linfocitos T (Théry y Amigorena, 2001).

El tipo de respuesta efectora inmunitaria de los linfocitos T depende selectivamente de las APC especialmente las DC. Los diversos subtipos de DC en distintas etapas de maduración expresan ciertas moléculas de superficie (lectinas) y secretan distintas citocinas (IL-12, IL-1 y TNF- α) que determinan la respuesta que se induce (Vázquez *et al.*, 2012). Las DC son las únicas células capaces de activar linfocitos T vírgenes y de iniciar una respuesta inmunológica adaptativa (Théry y Amigorena, 2001; Guermonprez *et al.*, 2002).

1.1.2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa es un mecanismo de respuesta específica, que se estimula después de la exposición a antígenos, y cuya habilidad defensiva aumenta después de cada exposición gracias a su capacidad de memoria a largo plazo. La respuesta adaptativa se divide en dos tipos: inmunidad humoral y celular. La inmunidad humoral tiene como elementos efectores a las citocinas y anticuerpos. La inmunidad celular por su parte involucra a los linfocitos B productores de anticuerpos y los linfocitos T, que son los principales efectores de la inmunidad celular (Mak y Saunders, 2006; Delves *et al.*, 2017).

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea y se caracterizan por sus receptores de linfocitos B (BCR). Cuando el BCR entra en contacto con un antígeno, se generan señales intracelulares que promueven la diferenciación hacia células plasmáticas y proliferación para el desarrollo de células B de memoria. Las células plasmáticas, son las encargadas de producir y secretar anticuerpos (Pieper *et al.*, 2013; Tobón *et al.*, 2013).

Los linfocitos T son las células encargadas de la respuesta celular adaptativa que participan principalmente en la defensa contra patógenos y células malignas. El linaje hematopoyético de los linfocitos T es de origen linfoide proveniente de médula ósea, terminando su maduración y selección en

el Timo (Martín *et al.*, 2013). Una vez maduros, los linfocitos se trasladan a los nódulos linfáticos mediante las vénulas del endotelio alto, tejido que presenta moléculas de adhesión (integrinas) y quimiocinas (CCR7) para permitir el alojamiento de ciertas poblaciones de linfocitos (Martín *et al.*, 2013). Esta migración es esencial para mantener la homeostasis y proveer una defensa eficiente contra patógenos. Los linfocitos T vírgenes se encuentran en los nódulos linfáticos principalmente, aunque también se encuentran en circulación, y su nombre se debe a que aún no han sido expuestos a ningún antígeno (Lewis *et al.*, 2008).

Los linfocitos T vírgenes necesitan de tres señales para ser activados: la primera es la presentación del antígeno mediante la unión MHC clase II al receptor de linfocitos T (TCR); la segunda, es la presencia de moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 para sintetizar la cadena α del receptor de la interleucina (IL) 2, necesario para la supervivencia de los linfocitos T; y la tercera, la señalización autocrina por medio de citocinas, como la IL-2, a los receptores de los linfocitos T activados (Fainboim y Geffner, 2005).

Los linfocitos T se diferencian en citotóxicos (CD8+) y colaboradores (CD4+). Los linfocitos T CD8+ reconocen péptidos presentados por moléculas del MHC clase I, expresado en todas las células nucleadas. Una vez activados, los linfocitos CD8+ son capaces de eliminar células infectadas con patógenos intracelulares o células tumorales mediante contacto célula-célula por liberación de perforinas y granzimas, también pueden producir citocinas pro-inflamatorias y de activación de macrófagos (interferón (IFN)- γ e IFN- α) (Chávez-Galán, 2009).

Por otro lado, los linfocitos T colaboradores (Th) CD4+ reconocen a un complejo formado por un antígeno peptídico y moléculas del MHC clase II que es presentado específicamente por las APC. Los linfocitos T CD4+, debido a su plasticidad, pueden diferenciarse en varias subpoblaciones, entre las que destacan los linfocitos efectoras Th1, Th2, Th17 y Treg, dependiendo de la intensidad de la estimulación, el microambiente y factores de transcripción que se expresen (Figura 2). Las citocinas específicas de cada subpoblación son importantes para la activación de otros tipos celulares como: macrófagos, eosinófilos, células B y neutrófilos, y para la coordinación de mecanismos de la respuesta inmunitaria (Zygmunt y Veldhoen, 2011). La plasticidad que presentan los linfocitos T colaboradores les da la capacidad de compartir algunas características entre subtipos e incluso perder sus cualidades originales para diferenciarse en otra subpoblación (Baranovski *et al.*, 2015) lo que le permite al sistema inmunitario adaptarse y responder rápidamente frente a agentes infecciosos (Ivanova y Orekhov, 2015).

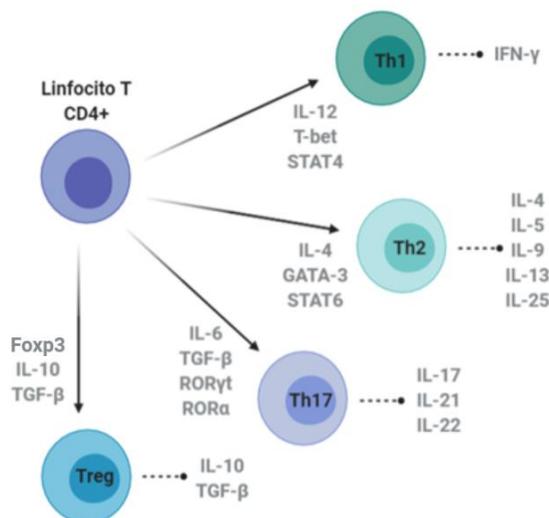


Figura 2. Diferenciación de las células T CD4. Los linfocitos Th, en presencia de estímulos, citocinas y otros factores, pueden diferenciarse en subpoblaciones productoras de citocinas específicas de cada subtipo.

1.1.2.1 Linfocitos efectores Th1

Los linfocitos Th1 ayudan a la respuesta inflamatoria mediante la activación de linfocitos B, linfocitos T CD8+, células NK y regulan la respuesta de los macrófagos, su diferenciación depende de IL-12 y de la expresión de los factores de transcripción T-bet y el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) 4 (Fainboim y Geffner, 2005).

Este subtipo se caracteriza por la producción de IFN-γ que activa macrófagos en tejidos periféricos. El IFN-γ facilita la presentación de antígeno mediante el aumento de expresión de moléculas MHC-II y moléculas co-estimuladoras de macrófagos (Rich *et al.*, 2019). Además, los linfocitos Th1 producen IL-12, involucrada en la generación de linfocitos T citotóxicos de memoria y en la supervivencia de los linfocitos T reguladores, así como el TNF-α un factor importante para la regulación de la inflamación, y la IL-10 que suele tener capacidad inmunosupresora (Luckheeram, 2012).

El factor de transcripción T-bet suprime la diferenciación a Th2 y Th17 mientras que las células efectoras Th1 se auto-regulan mediante retroalimentación negativa de la inducción y expresión de IL-10 (Dobrzanski, 2013).

1.1.2.2 Linfocitos efectores Th2

Los linfocitos Th2 se caracterizan por promover una respuesta antiparasitaria principalmente contra helmintos y su diferenciación está dada por la presencia de IL-4 y la expresión del factor de transcripción GATA3 dependiente de STAT6 (Fainboim y Geffner, 2005).

Este subtipo produce IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y la IL-25 que promueven la quimiotaxis y la activación de eosinófilos y mastocitos, favoreciendo la producción de IgE mediante los linfocitos B. La IL-4 activa el factor de transcripción STAT6 que, en conjunto con señales del TCR, inducen la expresión de GATA-3, el cual actúa como un regulador maestro de la diferenciación de los Th2 y, a su vez, aumenta la expresión de genes propios de las citocinas IL-4, IL-5 y la IL-13 (Martín *et al.*, 2013).

1.1.2.3 Linfocitos efectores Th17

Los linfocitos T CD4+ se diferencian en este subtipo debido a la presencia de IL-6, el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), el receptor gamma huérfano relacionado a RAR (ROR γ t) dependiente de STAT3 y ROR α , aunque se ha demostrado que TGF- β no es esencial para que ocurra la diferenciación (Dobrzanski, 2013). Este subtipo produce IL-17, IL-21 y la IL-22, causando un proceso inflamatorio para eliminar bacterias y hongos (Fainboim y Geffner, 2005).

Los linfocitos Th17 se encuentran especialmente en tejidos mucosos que influyen en la generación de este subtipo por la concentración local de citocinas. Además, este tipo de células tienen un papel importante en la inducción y el desarrollo de la autoinmunidad (O'shea, 2009).

Los linfocitos Th17 complementan, en parte, la función de los subtipos Th1 y Th2, pero su diferenciación es independiente de las citocinas requeridas para estas dos subpoblaciones (Dobrzanski, 2013).

1.1.2.4 Linfocitos efectores Treg

Los linfocitos T reguladores se desarrollan en el timo y son un subtipo de células T CD4⁺ CD25⁺, que se identifican por expresar un factor de transcripción denominado Foxp3, aunque también pueden ser células T reguladoras inducidas (iTreg), que no expresan Foxp3 hasta que se diferencian a partir de células T activadas en la periferia o en cultivos celulares, en presencia de IL-10 o TGF- β . Expresan altos niveles de la cadena α del receptor de IL-2, antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) inducida por glucocorticoides (GITR) (Beyer, 2006; Dobrzanski, 2013).

Los linfocitos Treg son los responsables de mediar el efecto supresor sobre la actividad de distintas poblaciones de linfocitos T/B, mediante la inhibición de IL-2, y de restablecer la homeostasis inmunológica después de la eliminación de un patógeno (Fainboim y Geffner, 2005).

1.1.2.5 Balance de linfocitos Th1/Th2

Los linfocitos Th tienen la habilidad de adoptar características de otras subpoblaciones de Th de una manera reversible debido a la co-expresión de factores de transcripción, quimiocinas y citocinas, capacidad conocida como plasticidad celular (Wang *et al.*, 2010).

Las células Th1 y Th2 se producen de una población no-comprometida de células T precursoras. La diferenciación ocurre con la presentación del antígeno mediante las APCs provocando un estado de pre-activación en las células, a este proceso se le conoce como polarización. El microambiente de citocinas es una clase de señal que interactúa con el receptor de superficie de los linfocitos T para determinar hacia qué subpoblación se diferenciará. También, los receptores de quimiocinas que expresan los linfocitos T están involucrados en la amplificación de las respuestas de los subtipos Th1 y Th2 (Kidd, 2003).

Las subpoblaciones Th1 y Th2 son balanceadas mediante retroalimentación positiva, mientras el IFN- γ promueve el desarrollo de Th1, la IL-4 favorece la diferenciación a Th2. Y al mismo tiempo, ocurre una regulación cruzada entre IFN- γ /T-bet y la IL-4 que suprimen a Th2 y Th1 respectivamente (Dobrzanski, 2013).

1.1.2.6 Balance de linfocitos Th17/Treg

Existe evidencia que indica que las células Treg pueden ser sujetas a una transdiferenciación a Th17. La diferenciación de ambas subpoblaciones requiere de TGF- β , pero depende de distintos factores de transcripción: RORc para Th17 y Foxp3 para Treg. En bajas concentraciones TGF- β , junto con la IL-6, promueven la diferenciación a Th17, mientras que altas concentraciones de TGF- β favorece el desarrollo de células T reguladoras. Las células que presentan ambos factores de transcripción (RORc y Foxp3), tienen menor tendencia a diferenciarse a Th17 debido a la inhibición de RORc por Foxp3, sin embargo, si se expresan IL-6 e IL-21 se mitiga la inhibición de RORc y ocurre la diferenciación a Th17 (Zhou *et al.*, 2008).

El balance que existe entre cada una de las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores y reguladores es importante para la homeostasis inmunológica del organismo y puede verse modificado de manera no natural mediante inmunomoduladores.

1.1.3 Respuesta inmunitaria antiviral

Los virus son detectados por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de localización intracelular. Los PRR intracelulares se clasifican en tres tipos: receptores tipo RIG (RLR), receptores tipo toll (TLR) y receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLR). Los RLR son detectores citosólicos de ácido ribonucleico (ARN) vírico que responden induciendo la producción de IFN- γ (Takeuchi y Akira, 2010). Los TLR son glicoproteínas integrales de membrana del tipo 1. Existen nueve tipos funcionales de TLR en los seres humanos, de los cuales cuatro (TLR3, 7, 8 y 9) se encuentran localizados dentro de las células y son responsables de la detección de ARN monocatenario o bicatenario. Este tipo de receptores se encargan de fomentar el ambiente antivírico dentro de la célula mediante la activación de los factores de regulación de interferón (IRF), que permite la secreción de citocinas como el IFN- γ , esta citocina inhibe la replicación vírica en las células infectadas e impide que se infecten células no infectadas (Fainboim y Geffner, 2005).

Los antígenos detectados mediante los diferentes tipos de PPR se presentan a las células efectoras de la inmunidad adaptativa mediante el reconocimiento TCR-MHC/antígeno que activa vías apoptóticas y puede desencadenar lisis de células dañadas (Muntané *et al.*, 2007). Cuando el sistema inmunitario no logra eliminar antígenos, se establece una infección viral persistente, permitiendo a las proteínas virales

replicarse indefinidamente (Obaid *et al.*, 2018). Dicha persistencia se atribuye a la capacidad de los virus para evadir la respuesta inmunitaria del hospedero (Chigbu *et al.*, 2019).

Los virus han desarrollado distintos mecanismos para evadir la respuesta inmunológica del hospedero, como mutaciones propias o a través de la expresión de proteínas con capacidad inmunomoduladora. Tienen la capacidad de alterar sus antígenos, que son reconocidos por los linfocitos T, para dejar de ser dianas de las respuestas inmunitarias. Estas alteraciones pueden ser la recombinación de genomas entre virus-hospedero o mutaciones puntuales en las proteínas de superficie como la mutación HA-E391K del virus A de la influenza subtipo H1N1 (Maurer-Strohet *et al.*, 2010). También, inhiben la presentación de antígenos proteínicos citosólicos asociados al MHC de clase I produciendo diversas proteínas que bloquean pasos en el procesamiento, transporte y presentación del antígeno, por ejemplo, el virus del herpes simple (VHS) utiliza este mecanismo para bloquear al transportador de MHC de clase I (TAP) (Ahn *et al.*, 1996).

Otro mecanismo, es la producción de moléculas que pueden actuar como antagonistas competitivos de las citocinas, unirse a ellas e inhibir la respuesta inmunitaria, como en el caso de los poxvirus que codifican moléculas que secretan las células infectadas que tienen la capacidad de unirse a distintas citocinas y quimiocinas (Martín Pontejo, 2012). Los virus como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) causan agotamiento de las células inmunológicas, ya que pueden infectar, matar o inactivar a los linfocitos T inmunocompetentes (Tasca *et al.*, 2012).

El agotamiento celular es un estado de disfunción de las células T que surge durante infecciones virales crónicas y cáncer. Se define por una función efectora deficiente, expresión continua de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto al de los linfocitos T efectores o de memoria funcionales (Wherry, 2011).

En infecciones crónicas causadas por virus, como HCV, se ha reportado que las células T CD4+ se encuentran funcionalmente agotadas. La pérdida de la producción de IL-2 es el primer indicador. Subsecuentemente, la producción de algunas citocinas, incluyendo TNF- α e IFN- γ , se reduce dramáticamente y por lo tanto las actividades citotóxicas son más resilientes a la inactivación. También se alteran las habilidades proliferativas y metabólicas, y aumentan los receptores co-inhibitorios de muerte programada1 (PD-1) y CTLA-4 (Barathan *et al.*, 2018; Saeidi *et al.*, 2018).

Los marcadores PD-1 y CTLA-4, son moléculas co-estimuladoras inhibitoras de superficie celular, expresadas en linfocitos T activados, que regulan la respuesta inmunitaria adaptativa (Riley, 2009). PD-1 limita la respuesta de subpoblaciones de linfocitos T efectores para evitar daño como resultado de una mayor actividad de la inmunidad. Al interactuar con sus ligandos PD-1 envía señales intracelulares que se traducen en la disminución de la producción de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Bell *et al.*, 2018). Por su parte, la estimulación de CTLA-4 frena la actividad de los linfocitos T disminuyendo su función, frenando su proceso de proliferación y provocando su muerte. La activación de CTLA-4 mediante TCR-MHC/Antígeno causa elevación de calcio intracitosólico activando genes de transcripción de IL-2 e IL-4 (Bell *et al.*, 2018).

Otra característica de las células agotadas es que presentan bajos niveles del marcador CD62L (Yi *et al.*, 2010). El marcador CD62L media la adhesión de los linfocitos T vírgenes a los nódulos linfáticos y de linfocitos T CD8+ a sitios de infección viral. Es comúnmente utilizado como marcador de activación celular (Watson *et al.*, 2019) ya que se ha demostrado que las células T que mantienen la expresión de CD62L conservan la capacidad de entrar a los nódulos linfáticos y que esta expresión se mantiene después de la activación de células T. La señalización a través de CD62L ha demostrado que co-estimula la proliferación de TCR, por lo tanto es posible que el nivel de expresión de CD62L también pueda regular la proliferación, diferenciación y supervivencia de células T activadas (Richards *et al.*, 2008).

1.1.4 Inmunomodulación

El sistema inmunitario es capaz de protegernos de una variedad de agentes, virus, bacterias y células cancerosas que pueden ser identificados y eliminados rápidamente por células inmunitarias. Sin embargo, los patógenos exitosos han desarrollado una amplia variedad de mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria inhibiendo la fagocitosis, bloqueando la presentación de antígeno, o directamente eliminando células de defensa (Feng *et al.*, 2019). La habilidad de estos patógenos para regular la respuesta inmunitaria, mediante sus componentes y proteínas, se conoce como inmunomodulación.

Las proteínas inmunomoduladoras (PI) virales son proteínas que tienen la capacidad de estimular o inhibir la respuesta inmunitaria (Diccionario de cáncer del NCI, 2021). Las PI, codificadas en los genomas virales, incluidas las proteínas que regulan la expresión del antígeno, funcionan como citocinas o como sus antagonistas inhibiendo la apoptosis, regulan la presentación de antígeno y afectan la producción de

factores de crecimiento importantes para la activación y diferenciación de las células inmunitarias del hospedero (Spriggs, 1996). Aprovechar la ventaja que presentan las PI virales sobre la respuesta inmunitaria del hospedero representa una estrategia atractiva para conocer mejor la interacción virus-inmunidad, así como la posibilidad de utilizarlas como inmunomoduladores. Para este trabajo se utilizó la PN del HCV para evaluar su efecto en células del sistema inmunitario humano.

1.1.5 Generalidades del virus de la hepatitis C

El HCV pertenece a la familia *Flaviridae* y al género *Hepacivirus*. Es un virus envuelto, posee una forma esférica con un tamaño de aproximadamente 50nm de diámetro y contiene dos proteínas de membrana que forman dímeros en su superficie. Su genoma es lineal, posee ARN monocatenario positivo de aproximadamente 10 kbp (ICTV, 2020). El genoma es un ARN policistrónico y da origen a diez proteínas mediante proteasas de origen viral y del hospedero. En la Figura 3, se observan las diez proteínas codificadas: PN, proteínas de envoltura E1 y E2, proteína (p) 7 formadora del canal iónico, las proteasas NS2/NS3 y cuatro proteínas no-estructurales necesarias para la replicación: NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (RdRp) (UniProt, 2020).



Figura 3. Genoma viral del HCV. El genoma ARN policistrónico del HCV da origen a diez proteínas virales: proteína núcleo (PN), proteínas estructurales E1 y E2, p7 y proteínas no-estructurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (RdRp). Tomada y modificada de Chevaliez y Pawlotsky, 2006.

1.1.5.1 Respuesta inmunitaria ante infección del HCV

Cuando el HCV infecta una célula, el ARN viral se libera y es detectado por la respuesta inmunitaria innata mediante los PRR que activan factores de transcripción y desencadenan las cascadas de señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B) e IRF (Figura 4), lo que ocasiona la liberación de IFN- γ para establecer un

estado antiviral en la célula y en células adyacentes. El IFN- γ a su vez, permite la activación de células dendríticas maduras (DCm) que reclutan a los elementos celulares de la inmunidad adaptativa.

El HCV ha desarrollado diversas estrategias de evasión de la respuesta inmunitaria que se describen a continuación: 1) la proteína E2 tiene como objetivo bloquear el receptor CD81 de las células NK reduciendo la liberación de IFN- γ por estas células; 2) los hepatocitos infectados incrementan la expresión de MHC de clase I por efecto de la PN reduciendo la actividad de las células NK contra las células infectadas; 3) aumenta la proporción de células T reguladoras en el hígado, afectando la actividad de las células NK mediante la secreción de IL-10 y TGF- β , mientras que la respuesta humoral es activada mediante los linfocitos T CD4+ que liberan IL-4, IL-6, IL-15 y la IL-21 (Obaid *et al.*, 2018).

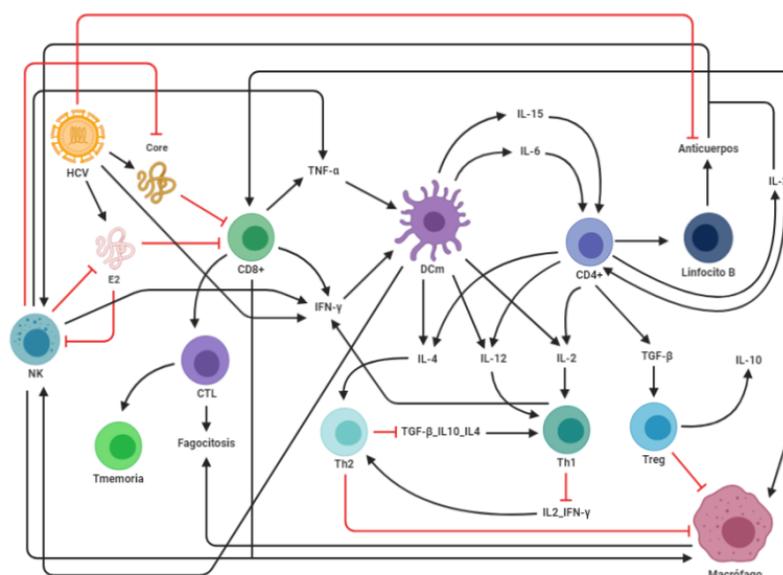


Figura 4. Respuesta inmunitaria en presencia de HCV. Las líneas color negro con flechas denotan una acción sobre un elemento mientras que las líneas rojas inhibitorias representan una inhibición por un elemento. Tomada y modificada de Obaid *et al.*, 2018.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Proteína núcleo del HCV

La PN es una proteína de 191 aminoácidos de longitud y consta de tres dominios (Figura 5): un dominio hidrofílico de ≈ 120 aminoácidos localizado en la región N-terminal (dominio D1), un dominio hidrofóbico de ≈ 50 aminoácidos ubicado en la región C-terminal (dominio D2) y los últimos 20 aminoácidos que sirven

como péptido señal de la proteína E1 (dominio D3). El D1 incluye una alta cantidad de aminoácidos cargados positivamente y está involucrado en la unión al ARN. La región N-terminal contiene sitios antigénicos inmunodominantes y presenta un motivo de hélice-bucle-hélice en sus aminoácidos 17-37. El D2 es el encargado de la asociación de la PN con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en las células de mamíferos y con las membranas del RE. La proteína núcleo presenta una modificación postraduccional que le confiere sus propiedades inmunomoduladoras, la proteína inmadura se genera a partir de la escisión de la poliproteína que posteriormente es cortada por una peptidasa celular para producir la PN madura (Boulant *et al.*, 2005).

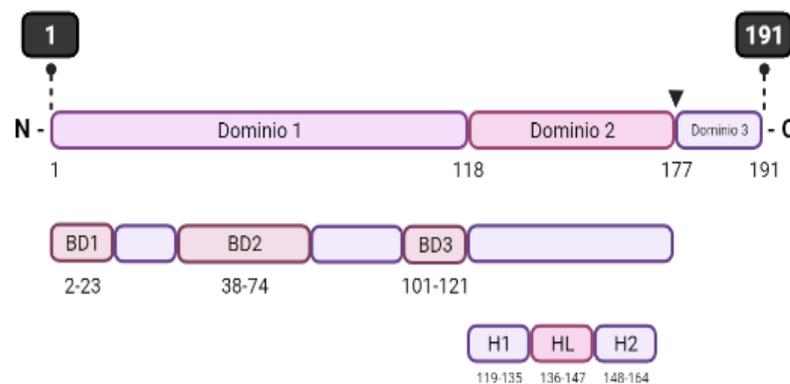


Figura 5. Dominios de la proteína núcleo. La primera escisión de la proteína núcleo (PN) por peptidasas del hospedero genera una PN inmadura de 191 aminoácidos de longitud. Una segunda escisión remueve la C-terminal de la secuencia señal E1, liberando la PN madura de 177 aminoácidos de longitud y 21 kDa de peso. La PN madura está compuesta por dos dominios distintos: dominio 1 (en la región N-terminal) y dominio 2 (en la región C-terminal). El dominio 1 es una estructura flexible que se subdivide en tres dominios básicos (BD): BD1, BD2 y BD3. Durante el ensamble el dominio 1 está involucrado en la unión a RNA y oligomerización para formar la nucleocápside. El dominio 2 contiene las regiones de hélice (H) 1 y H2, que están conectadas por un bucle hidrofóbico (HL), que contribuye en la interacción con membranas lipídicas. El dominio 3 corresponde al extremo de la región C-terminal que es escindida y por lo tanto ausente en la PN madura. Tomado y modificado de Hepatitis C online, 2021.

La PN contiene propiedades inmunomoduladoras importantes para evadir la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

En hepatocitos infectados se ha observado que la PN tiene la capacidad de bloquear la señalización de la producción de IFN- γ debido a la interacción con el dominio SH2 del factor de transcripción STAT1, proceso que evita que STAT1 interactúe con las cinasas Jano (JAK) y trasloque al núcleo para activar la respuesta antiviral (Lin *et al.*, 2006). Además de interactuar con la proteína supresora de tumores p53, aumentando la expresión de TAP1 originando un incremento de la expresión del MHC en la superficie celular. Este mecanismo lo utiliza el HCV para evadir mecanismos efectores no asociados a patógenos en

las células hepáticas infectadas con el virus y permitir la replicación viral (Herzer *et al.*, 2003). Además, la PN inhibe la respuesta antiviral basada en silenciamiento de ARN limitando la función de la proteína Dicer (Wang *et al.*, 2006). La PN también interactúa con el inhibidor del factor nuclear de la cinasa kappa beta (IKK β) y así modula la actividad NF- κ B (Ray *et al.*, 2002) alterando la respuesta de interferones, así como la proliferación y diferenciación de linfocitos T (Moorman *et al.*, 2003; Joo *et al.*, 2005; Krishnadas *et al.*, 2010). También, los hepatocitos infectados con HCV expresan niveles incrementados de Gal-9 y TGF- β , causando un incremento de la expresión de inmunoglobulina de células T dominio mucina 3 (TIM-3) y de las citocinas IL-10 y TGF- β en co-cultivos con células T CD4+ (Li *et al.*, 2017).

En células NK, se ha demostrado que se debilita su actividad citotóxica al disminuir la expresión de perforinas e IFN, y aumentando la expresión de CD94/NKG2A, IL-10 y TGF- β .

En células dendríticas, la PN disminuye la expresión de los receptores HLA-DR, CD86 y la citocina IL-12p70 y también aumenta la producción de IL-10 y la expresión de PD-1 y su ligando B7-H1 (Fernández-Ponce *et al.*, 2017). En las células dendríticas plasmocitoides actúa como modulador de los PPR y suprime la producción de IFN- γ que se ve asociado a niveles bajos de IRF-7 y niveles altos del STAT-1 no fosforilado (Fernández-Ponce *et al.*, 2017) y la disminución de la expresión del MHC-II (Krishnadas *et al.*, 2010; Semmo *et al.*, 2007).

En células CD4+ transfectadas con la PN se disminuye la secreción de IL-2 y aumenta la secreción de IL-4, IL-10 y la IL-17, así como el aumento en el calcio intracelular y en la activación-traslocación de NFAT (Eckels *et al.*, 1999; Ulsenheimer *et al.*, 2003; Sundström *et al.*, 2005; Krishnadas *et al.*, 2010; Tu *et al.*, 2012). También, se ha reportado que el HCV induce células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) mediante las vías de señalización TLR2/PI3K/AKT/STAT3 para entrenar a las células T reguladoras e inhibir la activación de CD4+ autólogas (Li *et al.*, 2017).

En células T CD8+ disminuye la expresión de CD127 y suprime la producción de IFN, TNF- α y granzimas B (Fernández-Ponce *et al.*, 2017).

En células B, la PN aumenta la expresión del marcador de activación CD69, la producción de inmunoglobulina (Ig) M e IgG, la expresión de quimiocinas co-estimuladoras CD86, CD154 y CD195 en células B CD20+, y promueve la proliferación de células B (Fernández-Ponce *et al.*, 2017).

Tabla 1. Resumen de antecedentes de inmunomodulación por HCV.

Inmunomodulador viral	Células involucradas	Citocinas o FT involucrados	Efecto	Observaciones	Referencias
Proteína Núcleo	Hepatocitos	STAT1	Inhibidor	-	Lin <i>et al.</i> , 2006
Proteína núcleo	Hepatocitos	NFκB	Inhibidor	-	Ray <i>et al.</i> , 2002
Proteína núcleo	Hepatocitos	MHC-I	Activador	Interactúa con p53 que aumenta TAP1	Herzer <i>et al.</i> , 2003
Proteína núcleo	Hepatocitos	DICER	Inhibidor	-	Wang <i>et al.</i> , 2006
Proteína núcleo	T CD4+	IL-4, IL-10, IL-17	Activador	-	Eckels <i>et al.</i> , 1999; Ulsenheimer <i>et al.</i> , 2003; Sundström <i>et al.</i> , 2005; Krishnadas <i>et al.</i> , 2010; Tu <i>et al.</i> , 2012
		IL-2	Inhibidor	-	
		NFAT	Activador	Aumenta Ca intracelular y activa traslocación	
Proteína núcleo	T CD8+	CD127	Inhibidor	Inhíbe activación neutrófilos	Fernández-Ponce <i>et al.</i> , 2017
		IFN		-	
		TNF-α		-	
		Granzimas		-	
Proteína núcleo	Th1	IL-12	Inhibidor	Interactúa con gC1qR	Kittlesen <i>et al.</i> , 2000; Waggoner <i>et al.</i> , 2007; Fernández-Ponce <i>et al.</i> , 2017
HCV	CD4+ autólogas	-	Inhibidor	Induce MDSC	Li <i>et al.</i> , 2017
HCV	CD4+	TGF-β, IL-10	Activador	En co-cultivos con hepatocitos	Li <i>et al.</i> , 2017
		Tim-3			
Proteína núcleo	NK	IFN/Perforinas	Inhibidor	Disminuye actividad citotóxica	Fernández-Ponce <i>et al.</i> , 2017
		CD94/NKG2A	Activador		
		IL-10, TGF-β	Activador		
Proteína núcleo	Dendríticas	HLA-DR/CD86/IL-12/p70	Inhibidor	Supresión de presentación de antígeno	Semmo <i>et al.</i> , 2007; Krishnadas <i>et al.</i> , 2010; Fernández-Ponce <i>et al.</i> , 2017
		IL-10	Activador		
		PD-1	Activador		
Proteína núcleo	Dendríticas plasmocitoides	IFN	Inhibidor	Modulador de PPR	Fernández-Ponce <i>et al.</i> , 2017
		MHC-II	Inhibidor		
Proteína núcleo	Células B	CD96	Activador	Marcador de activación	Fernández-Ponce <i>et al.</i> , 2017
		IgM e IgG	Activador	-	
Proteína núcleo	-	Complemento	Inhibidor	Interactúa con gC1qR	Kittlesen <i>et al.</i> , 2000
Proteína núcleo	Kupffer	IFN-α/IFN-β/TNF	Inhibidor	-	Zhai <i>et al.</i> , 2015
Proteína núcleo	Dendríticas	PD-L1	Activador	Se inhibe diferenciación de las DC	Zhai <i>et al.</i> , 2015

* FT: Factor de transcripción.

La PN se ha reportado soluble en plasma en pacientes con infección crónica de HCV y se ha asociado a la inhibición de la activación de la vía clásica del complemento mediante la unión de su región de aminoácidos 26-124 a la región de aminoácidos 188-259 del receptor de la proteína globular soluble C1q (gC1qR), evitando la unión a la membrana celular (Kittlesen *et al.*, 2000). La unión PN-gC1qR también inhibe la diferenciación a Th1 de las CD4+ al suprimir la producción de IL-12 en células dendríticas y macrófagos (Kittlesen *et al.*, 2000; Waggoner *et al.*, 2007; Fernández-Ponce *et al.*, 2017).

La PN se une al TLR2 de las células Kupffer, induciendo citocinas pro y anti-inflamatorias pero inhibe la secreción de citocinas anti-virales IFN- α , IFN- β y el ligando asociado al receptor de TNF inductor de apoptosis en la superficie celular. También, sesga la diferenciación de DCs elevando la expresión de marcadores asociados a macrófagos y el ligando de PD-1 (PD-L1) (Zhai *et al.*, 2015). En la siguiente tabla (Tabla 1) se resumen los efectos de la interacción de la PN con diferentes tipos celulares pertenecientes al sistema inmunitario y células diana del virus.

1.3 Justificación

Los virus como el HCV contienen proteínas capaces de modular la respuesta de las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores CD4+. La proteína núcleo ha demostrado propiedades moduladoras importantes, por lo tanto, este trabajo aportará información de la interacción de la proteína viral y su posible efecto modulador sobre los linfocitos T colaboradores humanos *in vitro*. Además de conocer mejor la interacción del HCV y los linfocitos T.

1.4 Hipótesis

La proteína núcleo del HCV incrementa el número y la función efectora de linfocitos T reguladores, disminuyendo la proporción y actividad de linfocitosTh1.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto *in vitro* de la proteína núcleo del HCV sobre la proliferación, activación y función efectora de los linfocitos T humanos.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la proteína núcleo del HCV sobre la proliferación de linfocitos T CD4+.
2. Analizar el efecto de la proteína núcleo del HCV sobre la activación celular de los linfocitos T CD4+.
3. Determinar los perfiles de expresión de citocinas de las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg tratados con la proteína núcleo del HCV.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Muestras biológicas

Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas mediante el método de venopunción de donadores según la declaración de Helsinki y las leyes mexicanas, bajo consentimiento informado, a través del puesto de sangrado del Hospital General de Zona 8 IMSS Ensenada y del banco de sangre del Hospital general de Ensenada con los siguientes criterios de inclusión: individuos de sexo masculino sanos de entre 18-40 años de edad. Proceso especificado en la Norma Oficial Mexicana (NOM)-253-SSA1-2012 para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

2.2 Aislamiento de PBMCs

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por gradiente de densidad. Después de purificarse, las células se cultivaron las PBMC en placas de 24 pozos o tubos de 5ml con medio RPMI-1640, suplementado con 5% de suero bovino fetal, 1mM ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES), 2mM L-Glutamina, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 50 µg/ml gentamicina y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ (Seeligmüller, 2019).

2.3 Proteína núcleo del HCV

Se utilizó el genotipo 2a de la proteína núcleo soluble a una concentración de 0.5mg/0.5ml de Prospec Bio® (cat#hcv-214-b).

2.4 Proliferación celular

2.4.1 Ensayo de proliferación celular

La proliferación de los linfocitos se determinó con dos reactivos, resazurina y éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE).

La resazurina sódica es un compuesto azul no fluorescente que se reduce, mediante la acción del metabolismo celular, a resorufina, un compuesto rosa fluorescente (O'Brien *et al.*, 2000).

El ensayo con resazurina se realizó en tres placas de 96 pozos y por triplicado para cada individuo de estudio: S1, S2, S3, S4 y S5. El contenido final de los pozos final fue de 15,000 células en 150µl de medio, concanavalina A (ConA) [1mg/ml], lipopolisacárido (LPS) [1mg/ml], resazurina y la proteína núcleo en tres distintas concentraciones: 0.1µg/ml, 1µg/ml y 10µg/ml. Se realizaron dos lecturas por día a diferentes longitudes de onda, en el espectrofotómetro de microplacas Epoch, una a 570nm y otra a 600nm. Se consideraron los siguientes controles: un control con células sin proteína, un control con células sin activar, un control con medio únicamente y un control para cada individuo sin proteína ni activación. El diseño experimental se muestra en la Figura 6 y los cálculos necesarios para obtener las concentraciones de la proteína en el Anexo A.

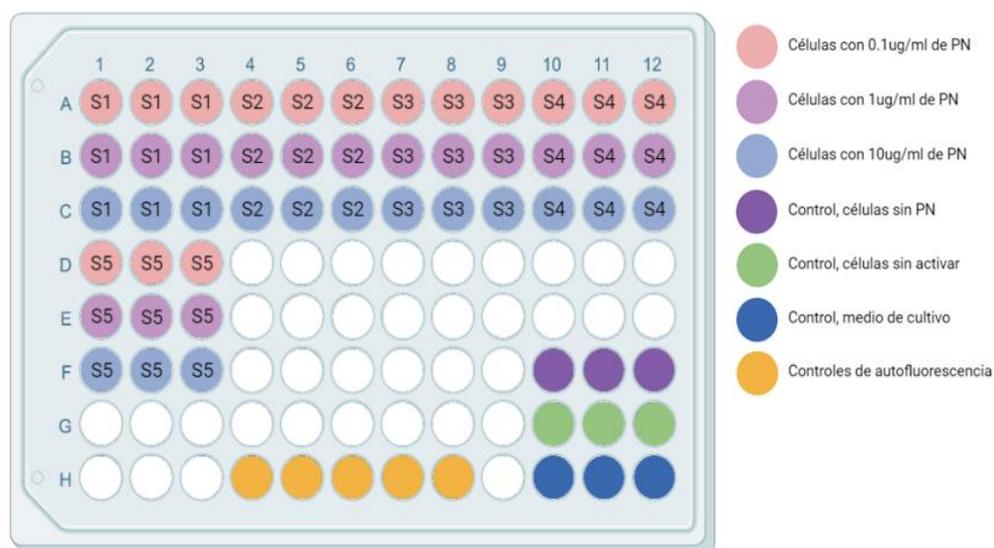


Figura 6. Ensayo de proliferación celular con resazurina. El contenido final de los pozos final fue de 15,000 células en 150µl de medio, concanavalina A (ConA) [1mg/ml], lipopolisacárido (LPS) [1mg/ml], resazurina sódica y la proteína núcleo (PN) en tres distintas concentraciones: 0.1µg/ml, 1µg/ml y 10µg/ml. S, sujeto.

El CFSE por su parte, es un producto capaz de permear la membrana celular y emitir fluorescencia al unirse a los grupos amino libres de las proteínas citoplasmáticas. En la división celular, este producto se distribuye en las células hijas y disminuye su intensidad de fluorescencia en las generaciones sucesivas. Las intensidades de fluorescencia se interpretan mediante un citómetro de flujo (Quah y Parish, 2010).

Para el ensayo con CFSE, se utilizaron placas de 24 pozos, un ensayo con células sin activar y otro ensayo con células activadas. Se consideraron controles de autofluorescencia, control CD4 y control con células activadas o no activadas según cada ensayo. El contenido de los pozos fue de 1 millón de células en 1ml de medio, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) para las células activadas y CFSE para todos los pozos excepto para el control de autofluorescencia. A los pozos con células se agregó PN en cuatro distintas concentraciones: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml.

Al transcurrir cuatro días las células se recolectaron de la placa y se transfirieron a tubos de 1.5ml y después se tiñeron todas las muestras con anti-CD4. El diseño experimental se muestra en la Figura 7.

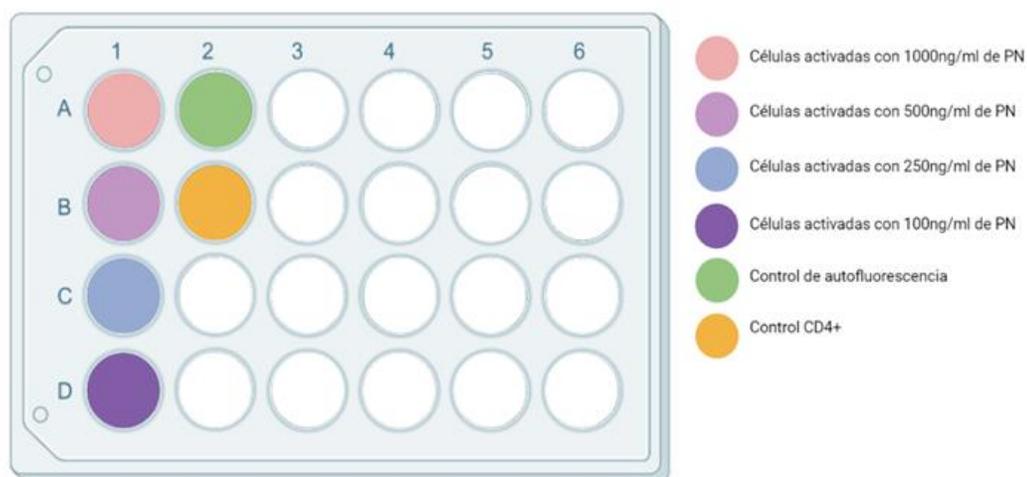


Figura 7. Ensayo de proliferación celular con CFSE. El contenido final de los pozos fue de 1 millón de células en 1ml de medio, éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) y anti-CD4 para todos los pozos excepto para los controles. A los pozos con células activadas con PMA se agregó proteína núcleo (PN) en cuatro distintas concentraciones: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml.

2.5 Citometría de flujo

La citometría de flujo permite la detección de eventos o moléculas dentro y fuera de la célula, mediante la adición de anticuerpos fluorescentes específicos para moléculas de interés en los linfocitos T colaboradores (anti-CD4) (Liu *et al.*,2011). Esta técnica se utilizó para identificar las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, utilizando los marcadores antes y después del tratamiento con la proteína núcleo. Se formaron paneles para la detección de subpoblaciones específicas de linfocitos T colaboradores. En la Tabla 2, se muestran los paneles utilizados y su interpretación. Los fluorocromos de cada anticuerpo y los canales que se utilizaron para leer en el citómetro se encuentran en la Tabla 3 y los citogramas obtenidos de la titulación para cada anticuerpo se observan en el Anexo B.

Se utilizó el citómetro de enfoque acústico Attune® que utiliza un dispositivo resonante que enfoca células o partículas en una sola línea. Esta tecnología permite tiempos de interrogación de células más prolongados y un mayor rendimiento, lo que permite simultáneamente una mejor interrogación de células así como el análisis de un mayor número de células (Zhang y Bradford, 2011). Este equipo contiene ocho lasers detectores:

1. Tamaño, dispersión frontal (FSC)
2. Complejidad, dispersión lateral (SSC)
3. Azul 1 (BL1)
4. Azul 2 (BL2)
5. Azul 3 (BL3)
6. Azul 4 (BL4)
7. Rojo 1 (RL1)
8. Rojo 2 (RL2)

En la Figura 8 se muestra la estrategia de análisis a seguir para eliminar ruido adquirido en la obtención de datos y evitar resultados erróneos en el análisis. Los datos se obtienen como eventos singulares o “*singlets*” al analizar FSC contra FSC (Figura 8A). Estos datos singulares se delimitan, excluyendo el ruido, y posteriormente se analiza FSC contra SSC para obtener las distintas poblaciones celulares que se diferencian por su tamaño y complejidad. En la Figura 8B se observa el área marcada con el recuadro negro de la población celular correspondiente a los linfocitos T. Por último, si esta población de linfocitos T fue marcada anteriormente con CFSE u otro fluorocromo con longitud de onda adecuada para alguno de los

detectores (BL1, BL2, BL3, BL4, RL1 o RL2) se puede observar al analizar el canal del detector correspondiente contra SSC.

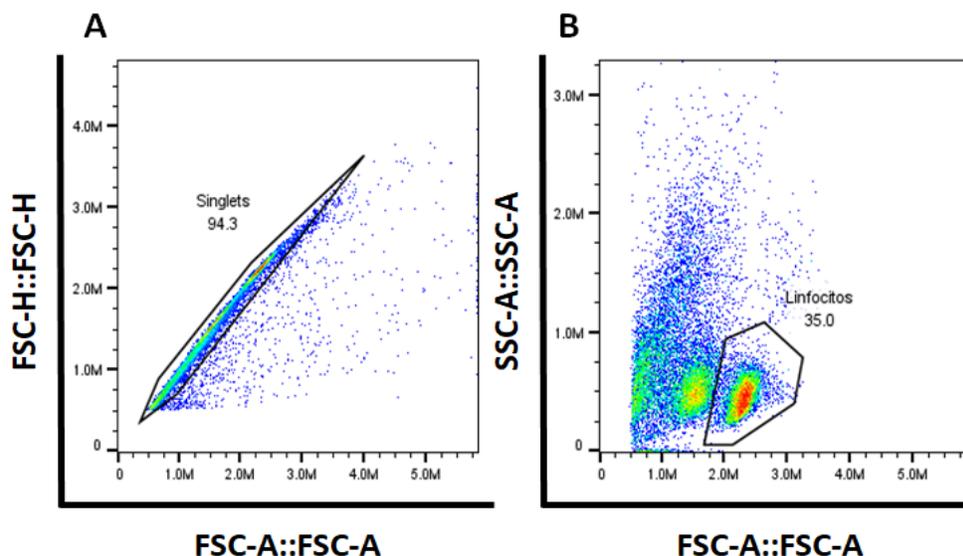


Figura 8. Estrategia de análisis de datos. A) El citograma muestra los datos singulares o “singlets”, delimitadas por el recuadro negro, al analizar el detector de dispersión frontal (FSC) contra FSC. B) El citograma muestra las poblaciones celulares detectadas al analizar FSC contra el detector de dispersión lateral (SSC), se muestra la población de linfocitos T marcada en el recuadro negro del citograma.

Tabla 2. Paneles para detección de subpoblaciones de linfocitos T.

Población celular	Marcadores	Canal de lectura
Linfocitos T colaboradores (Proliferación)	CFSE	BL1
	CD4	BL4
	Y-pro	BL3
Linfocitos T colaboradores efectores	CFSE	BL1
	CD4	BL4
	CD25	BL3
	IL-10	BL2
Linfocitos T vírgenes	CD4	BL4
	CD62L	RL1
	IFN- γ	BL2
Agotamiento celular	CD8	BL1
	PD-1	BL2
	CD3	BL3
	CD4	BL4
	CTLA-4	RL1
Apoptosis y muerte celular	AnexinaV	BL1
	Y-pro	BL3

2.5.1 Detección de la expresión de citocinas

También, se evaluó la secreción de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ y TNF- α con un panel de perlas de detección LEGENDplex[®].

Esta técnica es un inmunoensayo basado en microesferas que utiliza los mismos principios básicos de los inmunoensayos tipo sándwich, en los que un analito soluble es capturado entre dos anticuerpos. Las poblaciones de perlas vienen en dos tamaños y diferentes niveles de fluorescencia para un fluorocromo, lo que las distingue entre sí. Cada juego de perlas se conjuga con un anticuerpo específico en la superficie y sirve como perla de captura para ese analito en particular. Cuando un panel de captura se mezcla e incuba con una muestra desconocida que contiene analitos objetivo, cada analito se une a su perla de captura específica. Después de lavar, se agregan los anticuerpos de detección biotinilados y cada anticuerpo de detección se une a su analito específico unido a las perlas de captura, formando así un complejo perla de captura-analito-anticuerpo de detección. Posteriormente se añade la estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) que se une a los anticuerpos de detección biotinilados, proporcionando una señal fluorescente con intensidades proporcionales a la cantidad de analito unido. Para cada población de perlas, la intensidad de fluorescencia de la señal de ficoeritrina (PE) se cuantifica mediante el citómetro de flujo. La concentración de un analito particular se determina en base a una curva estándar conocida utilizando el software de análisis de datos LEGENDplex[™] (LEGENDplex, 2022).

2.5.2 Ensayos de agotamiento celular

Los ensayos de agotamiento se realizaron por triplicado en tubos de ensayo de 5ml con células tratadas con PN y sus controles sin PN. Se realizó una cinética de cinco días con una sola concentración de 500ng/ml de PN para las células con tratamiento durante 96hrs y sin PN para las células sin tratamiento. Todas las células se marcaron con anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-PD1 y anti-CTLA4. Para cada sujeto se leyó un tubo por día incluidos los controles de autofluorescencia y controles para los marcadores: CD3, CD4, CD8, PD-1 y CTLA-4.

Se realizó un ensayo de muerte celular, para asegurar que el marcador PD-1 se expresara por agotamiento celular. Se utilizó yoduro de propidio (PI), reactivo que atraviesa las membranas celulares

que han perdido su integridad, se intercala con el ADN y produce una fluorescencia que se detecta con el citómetro de flujo.

2.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y la elaboración de gráficas se utilizó el software GraphPadPrism 8. Los datos se expresaron como media \pm la desviación estándar de tres o cinco, dependiendo, experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey o Sidak dependiendo los datos. Las diferencias entre resultados se consideraron estadísticamente significativos por $p < 0.001$, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), y 0.001 (***)

Capítulo 3. Resultados

3.1 Efecto de la PN en la proliferación celular

En este trabajo se evaluó el efecto de la PN del HCV sobre la proliferación de linfocitos T colaboradores con el objetivo de determinar si es una proteína capaz de modular las funciones de estas células. La proliferación se evaluó mediante: resazurina sódica y CFSE.

El ensayo de resazurina se realizó con el propósito de observar proliferación en presencia de la proteína núcleo mediante cambios de coloración de la sal inducidas por reacciones óxido-reducción, mientras que para CFSE se utilizaron las diferencias de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) que indican división celular.

3.1.1 Resazurina sódica

La Figuras 9 muestra las imágenes observadas en microscopio de los resultados del ensayo de proliferación celular en el que se cultivaron 15,000 células por pozo, activadas con ConA y LPS, con tres distintas concentraciones de proteína: 0.1µg/ml, 1µg/ml y 10µg/ml.

En la Figura 9A-C y 9E se observan aglomeraciones de células, que se interpretan como células activadas, a diferencia de la Figura 9D, que es el control de células sin activación, donde no se observó esta aglomeración celular. Esta activación celular puede ser resultado de la activación previa con ConA y LPS o por la presencia de la PN. Visualmente no hay una diferencia marcada entre el control de células activadas y las distintas concentraciones de PN utilizadas.

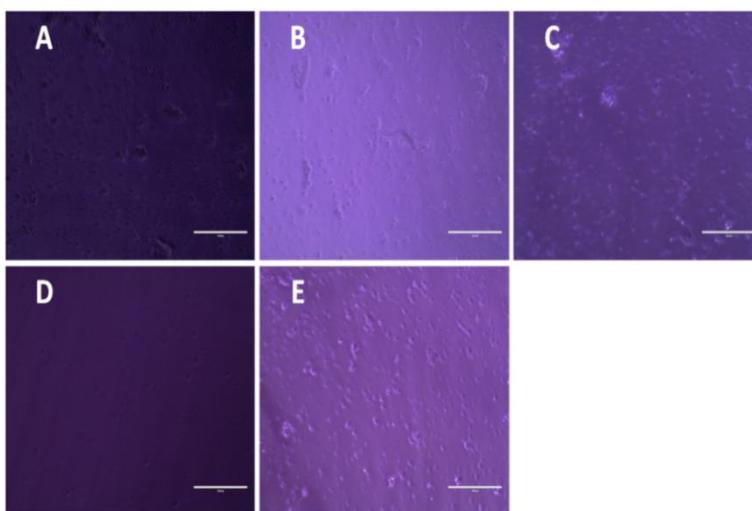


Figura 9. Efecto de la PN en la proliferación de linfocitos T CD4+. A) Células con 0.1µg/ml de proteína núcleo (PN). B) Células con 1µg/ml de PN. C) Células con 10µg/ml de PN. D) Control células sin activación. E) Control células activadas.

Para el ensayo con resazurina, se decidió utilizar las células de cinco sujetos de estudio para observar la reproducibilidad biológica y se realizaron por triplicado para verificar la reproducibilidad técnica del ensayo. La Figura 10 muestra los porcentajes de reducción obtenidos de las lecturas de absorbancia a 570/600nm de los controles y los distintos sujetos de estudio.

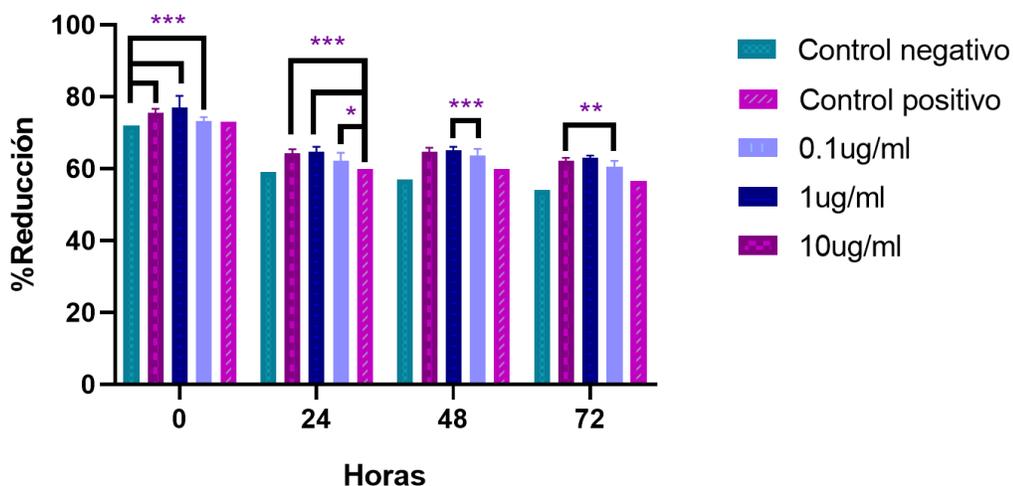


Figura 10. Proliferación de linfocitos T CD4+, evaluado mediante la reducción de resazurina sódica. Efecto sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ activados con 0.1ug/ml, 1ug/ml y 10ug/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar (n=5, por concentración de PN). Control negativo, células sin activar sin PN; Control positivo, células activadas sin PN. Las diferencias entre el control negativo y todas las concentraciones de PN se consideraron estadísticamente significativas (***, p<0.001). Las diferencias entre el control positivo y todas las concentraciones de PN se consideraron estadísticamente significativas (*, p=0.05 para 0.1ug/ml y ***, p<0.001 para 1ug/ml y 10ug/ml). Las diferencias entre la concentración 0.1ug/ml de PN y 1ug/ml se consideraron estadísticamente significativas (***, p<0.001). Las diferencias entre la concentración 0.1ug/ml y 10ug/ml se consideraron estadísticamente significativas (**, p=0.009).

Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (Tabla 4 Anexo C) al comparar el control negativo contra todas las concentraciones de PN evaluadas ($p < 0.001$), al igual que la comparación del control positivo contra todas las concentraciones de PN ($p = 0.05$ para 0.1ug/ml y $p < 0.001$ para 1ug/ml y 10ug/ml). También, se obtuvieron diferencias significativas al comparar la concentración 0.1ug/ml de PN y 1ug/ml con $p < 0.001$ mientras que las diferencias entre la concentración 0.1ug/ml y 10ug/ml se consideraron estadísticamente significativas con $p = 0.009$.

3.1.2 Carboxifluoresceína

El ensayo con carboxifluoresceína se utilizó para evaluar si la PN tiene un efecto sobre el aumento de la proliferación de linfocitos T.

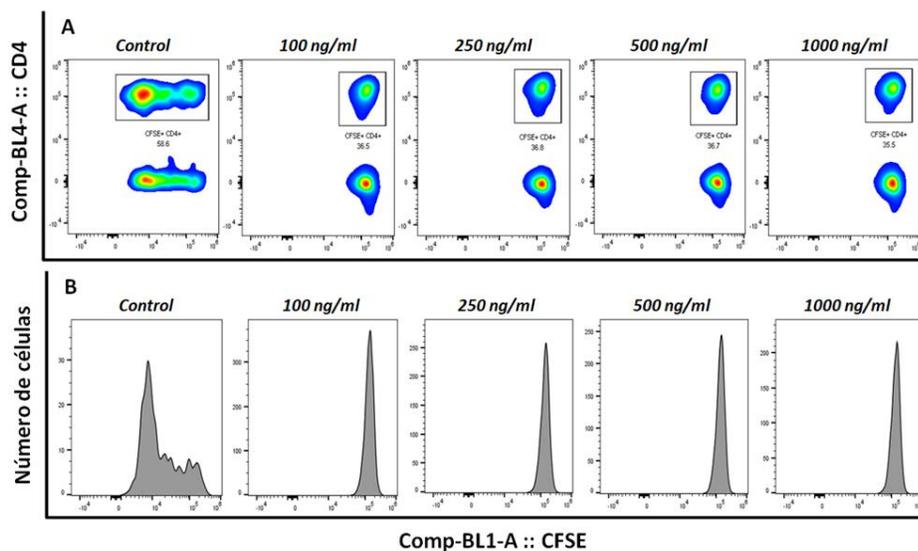


Figura 11. Efecto de la PN sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ no activados. A) Citogramas correspondientes al marcaje con anti-CD4 y éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) en células activadas con cuatro concentraciones de proteína núcleo (PN): 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. B) Histogramas correspondientes a la representación de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de la CFSE en células activadas con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células activadas con PMA. Comp, compensación.

La Figura 11A muestra los citogramas de la proliferación de células CD4+ con cuatro concentraciones distintas de PN y el control, que son células activadas con PMA. En donde se observa que en ninguno de los tratamientos hay desplazamiento hacia la izquierda y las células tienen la misma IMF en

las cuatro concentraciones en la población positiva a CD4. El control muestra el desplazamiento de la población CD4+ hacia IMF menores, que se interpreta como división celular, por lo tanto si hay proliferación. La Figura 11B muestra los histogramas respectivos a la Figura 10A que permite observar el número de células que presentaron la misma IMF de CFSE.

Los resultados previamente descritos permiten la interpretación de que no se observó ningún efecto positivo sobre la proliferación en presencia de la PN. Por lo que se decidió utilizar un activador celular (PMA) para observar si la PN tiene un efecto en el aumento de la proliferación con la inducción de un mitógeno.

La Figura 12A muestra los citogramas de la proliferación de células CD4+ con concentraciones distintas de PN en células activadas con PMA y el control con PMA sin estímulo de PN, y la Figura 12B muestra los histogramas respectivos a la Figura 12A. En donde se observa que para todos los tratamientos hay desplazamiento hacia la izquierda, que se interpreta como división celular, por lo tanto si hay proliferación. La Figura 12B muestra los histogramas respectivos a la Figura 12A que permite observar el número de células que presentaron la misma IMF de CFSE.

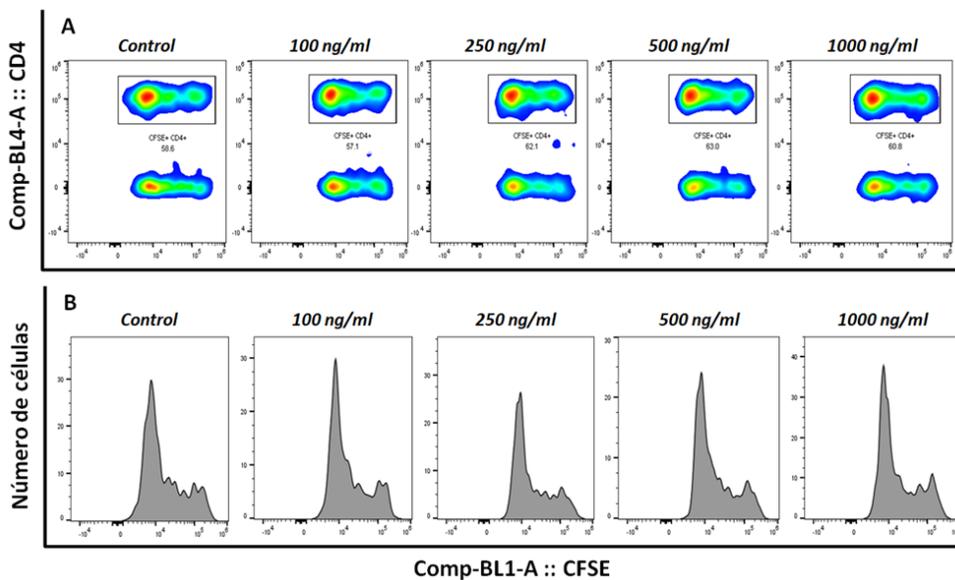


Figura 12. Efecto de la PN sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ activados. A) Citogramas correspondientes al marcaje con anti-CD4 y éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) en células activadas con cuatro concentraciones de proteína núcleo (PN): 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. B) Histogramas correspondientes a la representación de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de la CFSE en células activadas con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células activadas con PMA sin PN. Comp, compensación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las Figuras 11-12 la PN no ejerce ningún efecto sobre la proliferación de linfocitos T por sí sola, solo con la inducción de un mitógeno, en las concentraciones evaluadas.

3.2 Efecto de la PN en la activación de linfocitos T

El siguiente ensayo se realizó para observar la activación de linfocitos T CD4+ después de ser tratadas con la PN (n=3, por concentración de PN). La Figura 13 muestra los resultados para la proteína de membrana CD62L+ que se expresa después de cuatro días de tratamiento con la PN. En los citogramas podemos observar dos poblaciones celulares, la que se muestra en la parte posterior es una población que no tiene un marcaje positivo con anti-CD4 y la población superior que es CD4 positiva. Dentro de esta población CD4+ se observa un desplazamiento de la IMF a la derecha de las células que expresan CD62L.

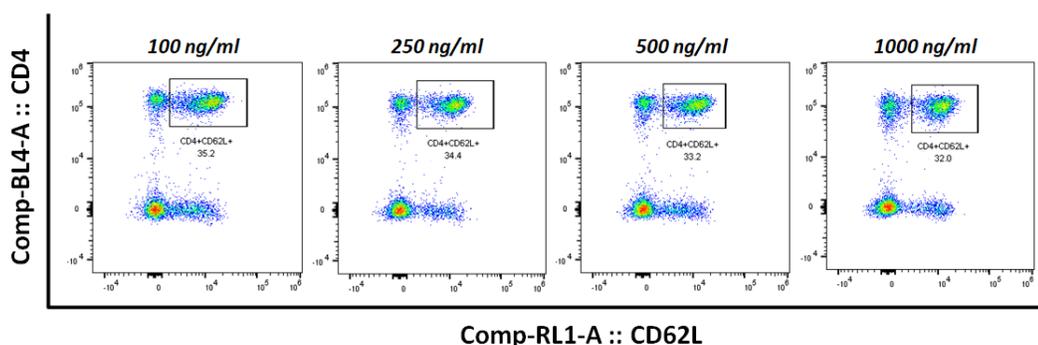


Figura 13. Efecto de la PN en la activación de linfocitos T mediante citometría de flujo. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CD62L respecto al marcador CD4 con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Comp, compensación.

Los recuadros dentro de los citogramas nos indican el porcentaje de CD62L+. Existe unadisminución en las células tratadas con distintas concentraciones de la PN, de 35.2% con una concentración de 100ng/ml a 32% con una concentración de 1000ng/ml.

Se realizó una gráfica de barras (Figura 14) para representar los resultados promediados de las células provenientes de tres sujetos evaluados y las desviaciones estándar por cada concentración de PN. Los citogramas para el ensayo por triplicado, de células con y sin PN, se muestran en el Anexo D.

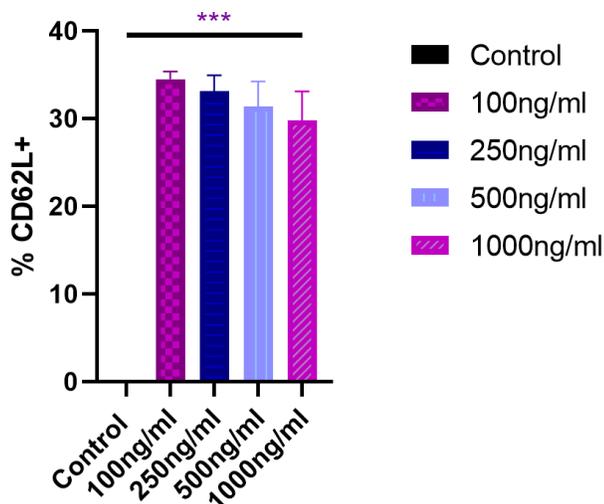


Figura 14. Expresión del marcador CD62L. Efecto sobre la expresión de CD62L en linfocitos T CD4+ con 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar (n=3, por concentración de PN). Control, células sin PN. Las diferencias entre el control contra todas las concentraciones de PN se consideran estadísticamente significativos (***, $p < 0.001$).

Los resultados obtenidos con una comparación múltiple de Tukey (Tabla 5 Anexo C) mostraron que había una significancia < 0.001 entre todas las concentraciones de PN contra el control. En los citogramas como en la gráfica de barras podemos observar que a menor cantidad de proteína núcleo el porcentaje de CD62L positivo en células activadas es mayor, por lo que la expresión de CD62L es dependiente de la concentración.

3.3 Efecto de la PN en las funciones efectoras de linfocitos T

Se realizaron ensayos para determinar si las células mantienen su función efectora en presencia de la PN. Se utilizaron cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. En las Figura 15 y 16 se observa la producción de las citocinas IL-10 e IFN- γ respectivamente.

En los citogramas de la Figura 15 podemos observar dos poblaciones celulares, la que se muestra en la parte posterior es una población que no se marcó con anti-CD4 y la población superior que es CD4 positiva. Dentro de esta población CD4+ se observa a la derecha las células que expresan IFN- γ .

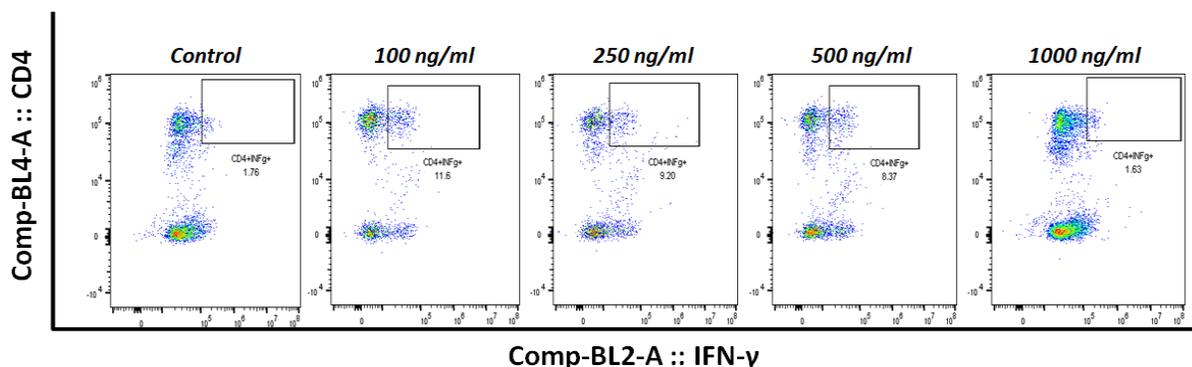


Figura 15. Efecto de la PN en la producción de IFN- γ por los linfocitos T. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador IFN- γ respecto al marcador CD4 con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células sin PN. Comp, compensación.

Se observa una disminución en la producción de IFN- γ al aumentar la concentración de la PN (Figura 15), de 11.6% con una concentración de 100ng/ml de PN a 1.63% con una concentración de 1000ng/ml de PN.

En los citogramas de la Figura 16, observamos que dentro de la población CD4+, a la derecha se encuentran las células que expresan IL-10.

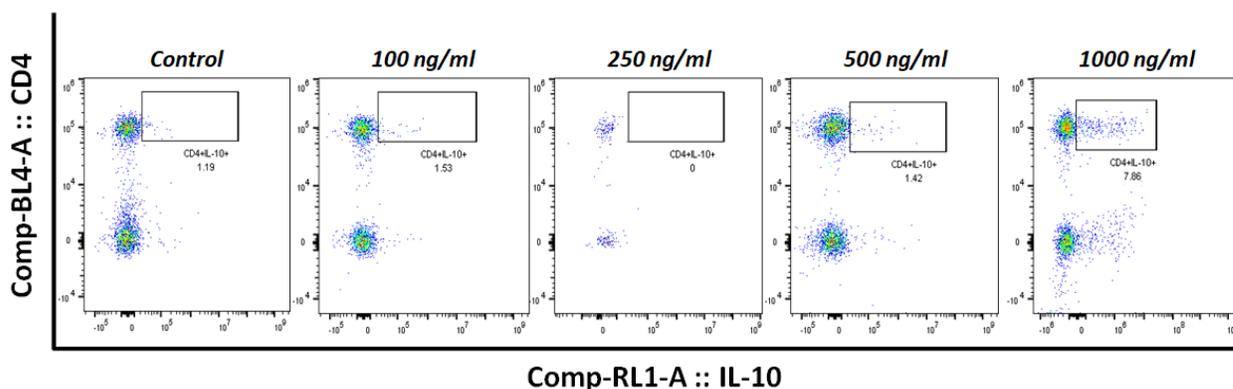


Figura 16. Efecto de la PN en la producción de IL-10 por los linfocitos T. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador IL-10 respecto al marcador CD4 con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. Control, células sin PN. Comp, compensación.

Para la IL-10 (Figura 16), se observa un aumento al utilizar concentraciones mayores de PN, de 1.53% con una concentración de 100ng/ml a 7.86% con una concentración de 1000ng/ml. Por lo que la expresión de ambas citocinas, IFN- γ e IL-10, es dependiente de la concentración de PN.

3.4 Efecto de la PN en la producción de citocinas solubles

Se realizó un ensayo para evaluar la secreción de citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ y TNF- α con un panel de perlas de detección. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos ($n=3$, por concentración de PN) con el tratamiento de cuatro concentraciones distintas de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml, y para el control sin PN.

Los resultados obtenidos por ANOVA de dos vías (Tabla 6 Anexo C) muestran que existe una significancia de $p<0.001$ en la producción de IL-6 con respecto a la producción de otras citocinas.

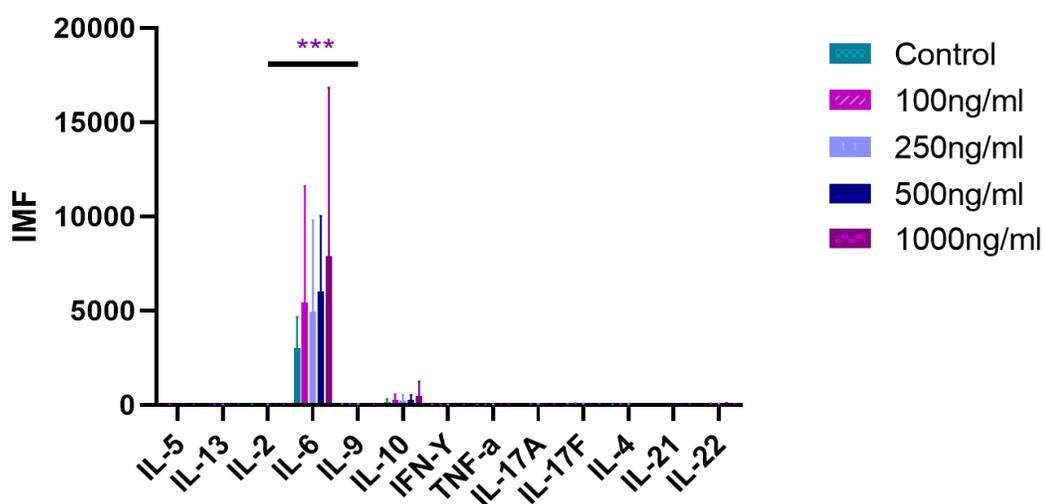


Figura 17. Efecto de la PN en la producción de citocinas solubles. Efecto sobre la producción de citocinas solubles en linfocitos T CD4+ con 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar ($n=3$, por concentración de PN). Control, células sin PN. Las diferencias entre la producción de IL-6 y las demás citocinas se consideran estadísticamente significativas (***, $p<0.001$).

3.5 Efecto de la PN en el agotamiento celular

En presencia de la PN, no se observó efecto sobre la proliferación, no hubo producción de citocinas, la expresión de CD62L disminuyó al igual que el IFN- γ y la IL-10 aumentó. Por lo tanto, surgió una hipótesis alterna: La PN induce agotamiento celular en células T CD4+.

De acuerdo con los resultados anteriores, las células T mostraban características de agotamiento celular en presencia de la PN. El agotamiento celular suele ser una consecuencia de una infección viral

crónica, por lo que evaluamos la PN en este proceso mediante la expresión de los marcadores PD-1 y CTLA-4.

Se analizó la cinética del efecto de la PN sobre los marcadores PD-1 y CTLA-1 en células tratadas y no tratadas con PN. Los citogramas obtenidos de la expresión de estos marcadores en células de tres sujetos se muestran en el Anexo D.

En los citogramas de la Figura 18 se muestra el recuadro que delimita las células positivas para el marcador PD-1. En los citogramas superiores se observa el sujeto tratado con 500ng/ml de proteína núcleo de 0 hasta 96 horas, observadas cada 24 horas. A las 96 horas se retiró la PN y a las 144 horas (6 días) se midió el marcador PD-1. Se puede observar que este marcador disminuyó de 18.7% a las 96 horas en presencia de PN a 7.93% a las 144 horas sin presencia de PN. En los citogramas inferiores se muestra el control sin PN, que también muestra presencia de PD-1 en valores que van de 12% a las 0hrs hasta 7.87% a las 96hrs. Por lo tanto, en presencia de PN, el marcador PD-1 aumenta.

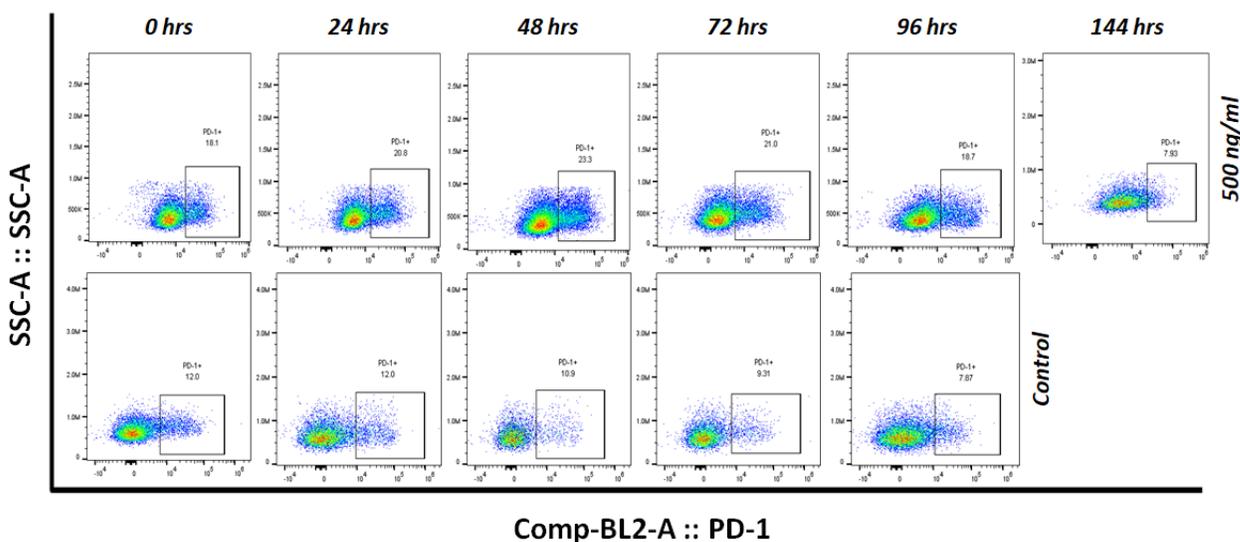


Figura 18. Efecto de la PN en la expresión de PD-1 por los linfocitos T mediante citometría de flujo. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) sobre la expresión del marcador PD-1 en células T CD4+ desde 0 hasta 144 horas, leídas cada 24 horas. Control, células sin PN. Comp, compensación.

Los resultados obtenidos por ANOVA de dos vías (Tabla 7 Anexo C) muestran que existe una diferencia significativa de $p=0.003$ en la expresión del marcador PD-1 con respecto al control (Figura 19).

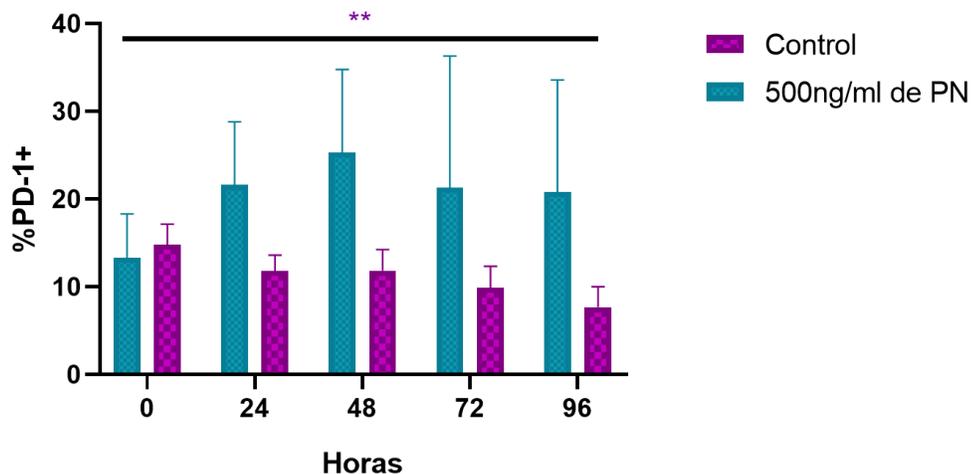


Figura 19. Efecto de la PN en la expresión del marcador PD-1. Efecto sobre la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ a una concentración de 500ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar (n=3, por cada tratamiento). Control, células sin PN. Las diferencias entre el tratamiento y el control se consideran estadísticamente significativos (**, p=0.003).

Los citogramas de la Figura 20 muestran el recuadro que delimita las células positivas para el marcador CTLA-4. Se puede observar que en el sujeto tratado con 500ng/ml a las 96 horas, que están en presencia de PN, el marcador CTLA-4 se expresa en un 1.21%, en comparación a la hora 144 que ya no está en presencia de PN, expresado en un 1.05%. También, en comparación con el control sin PN, con un 0% desde las 0 hasta las 96 horas. Por lo tanto, en presencia de PN el marcador CTLA-4 se expresa.

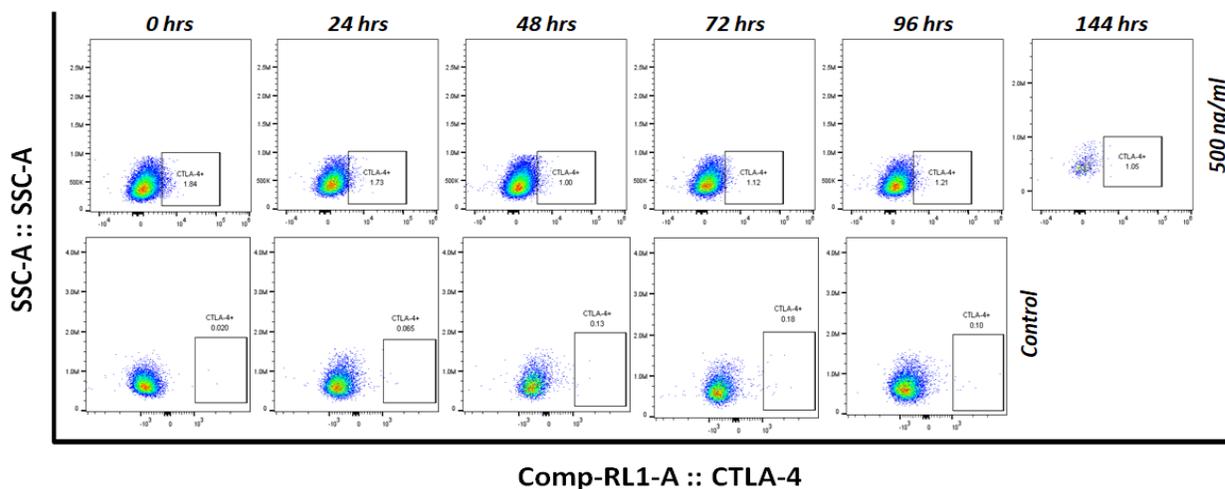


Figura 20. Efecto de la PN en la expresión de CTLA-4 por los linfocitos T mediante citometría de flujo. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) sobre la expresión del marcador CTLA-4 en células T CD4+ desde 0 hasta 144 horas, leídas cada 24 horas. Control, células sin PN. Comp, compensación.

Los resultados obtenidos por ANOVA de dos vías (Tabla 8 Anexo C) muestran que existe una significancia de $p < 0.001$ en la expresión del marcador CTLA-4 con respecto al control (Figura 21).

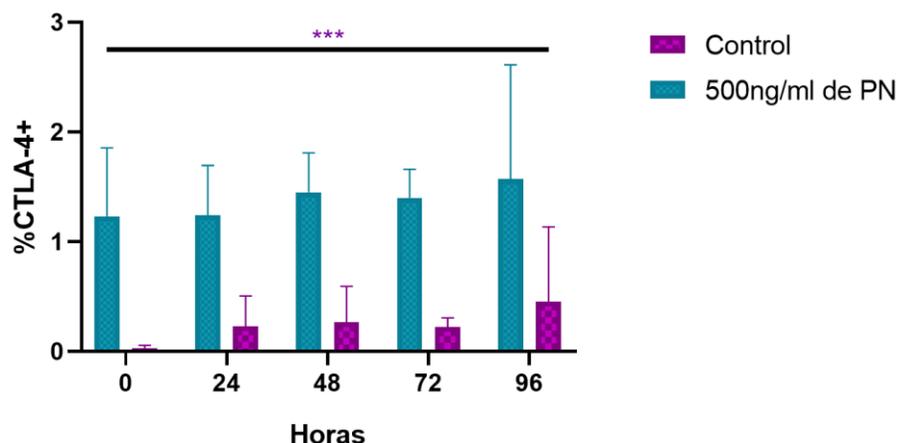


Figura 21. Expresión del marcador CTLA-4. Efecto sobre la expresión de CTLA-4 en linfocitos T CD4+ con 500ng/ml de proteína núcleo (PN). Las barras verticales representan las medias con desviación estándar ($n=3$, por cada tratamiento). Control, células sin PN. Las diferencias entre el tratamiento y el control se consideran estadísticamente significativos (***, $p < 0.001$).

Por último, se observó muerte celular para descartar que las células no presenten agotamiento celular, sino muerte celular, ya que PD-1 también es un marcador de muerte celular programada (Figura 22).

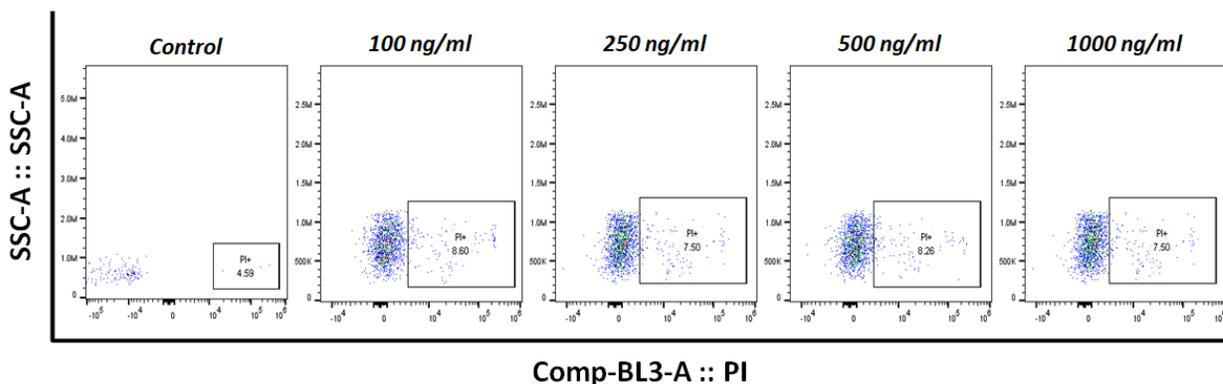


Figura 22. Efecto de la PN sobre la muerte celular de linfocitos T mediante citometría de flujo. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) sobre la expresión de yoduro de propidio (PI) en células T CD4+. Control, células sin PN. Comp, compensación.

Se puede observar que el porcentaje de células positivas a PI, delimitadas por el recuadro, es únicamente de 7.50% para la concentración de 1000ng/ml. Por lo tanto, las células presentan el marcador PD-1, sin embargo, las células no están muriendo.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se evaluó el efecto de la proteína núcleo del HCV sobre la proliferación, activación y función de linfocitos T colaboradores. Los resultados obtenidos revelan efectos significativos en la modulación de los procesos de activación y secreción de citocinas de los linfocitos T pero no hubo ningún efecto en la proliferación celular.

En la primera fase del trabajo se evaluó el efecto de la PN sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ a través del ensayo colorimétrico de resazurina sódica (Figura 10) y la tinción con carboxifluoresceína (Figuras 11-12). La resazurina es un indicador de crecimiento fluorométrico-colorimétrico que se basa en la detección de la actividad metabólica mediante un indicador óxido-reducción, y sirve para medir cuantitativamente la proliferación celular. Al evaluar el porcentaje de reducción, se puede medir la proliferación celular. Los resultados obtenidos mediante resazurina sódica mostraron una diferencia estadística entre el control negativo contra todas las concentraciones de PN evaluadas. Estos resultados concuerdan con los datos de Eckels *et al.*, 1999; Ulsenheimer *et al.*, 2003; Sundström *et al.*, 2005; Krishnadas *et al.*, 2010; Tu *et al.*, 2012 y Li *et al.*, 2017, trabajos en los que se demuestra que la PN, con la inducción de un mitógeno, afecta de manera significativa la proliferación de linfocitos T. Mediante CFSE, un reactivo que es capaz de permear la membrana celular y emitir diferencias en las intensidades medias de fluorescencia que indican división celular, se obtuvieron los mismos resultados, la PN afecta la proliferación de linfocitos T únicamente con la inducción de un mitógeno.

Los resultados indican que la proteína núcleo (PN) no afecta la proliferación de linfocitos T CD4+, evaluada con ambas metodologías; sin embargo, en presencia de PMA o ConA con LPS, proliferan significativamente. Lo anterior puede deberse a los distintos blancos moleculares. La PMA, es un mitógeno utilizado para inducir la proliferación de linfocitos T, que activa la proteína cinasa C (PKC) y promueve la transducción de señales implicadas en la activación y la proliferación de linfocitos T (Lisbona, 2002; Hyogo *et al.*, 2010). Así mismo, la ConA al unirse a α -D-manosilo resulta en la transducción de señales desde la membrana hasta el núcleo de los linfocitos, activándolos (Norian *et al.*, 2015). El LPS, por su parte, se une al TLR4, que al ser activado da lugar a la vía de señalización NF κ B y a la producción de citocinas pro-inflamatorias que se encargan de activar el sistema inmunitario innato (Aldapa-Vega *et al.*, 2016). Por otro lado, la PN presenta especificidad por el TLR2 que está involucrado en la activación de respuestas anti y pro-inflamatorias (Zhai *et al.*, 2015). Según Zhai *et al.*, 2015 la PN como ligando de TLR2, desencadena la activación y expansión de Treg CD4+CD25+ para inhibir las respuestas inmunitarias del hospedero. Estos

resultados sugieren que la PN puede desempeñar un papel en la activación de la proliferación de Treg e inducir su función supresora sobre los linfocitos T CD4+.

En la segunda fase del trabajo se evaluó el efecto de la PN sobre la activación celular de linfocitos T CD4+ mediante de citometría de flujo (Figuras 13-14).

Los resultados obtenidos muestran que en presencia de PN existe un aumento en la expresión de CD62L, marcador que se expresa en la superficie celular de linfocitos T activados (Yang *et al.*, 2011), y es dependiente de la concentración. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al comparar las diferencias entre el control y todas las concentraciones utilizadas de PN. Este resultado podría significar que los linfocitos T se activan en presencia de la PN, sin embargo, no proliferan.

Otro de los objetivos fue evaluar el efecto de la PN sobre la producción de citocinas, IL-10 e IFN- γ , de los linfocitos T CD4+. Este ensayo se realizó mediante la tinción intracelular con anticuerpos que reconocen específicamente a cada citocina.

Los resultados obtenidos muestran que la PN tiene un efecto inhibitorio de la producción de IFN- γ (Figura 15), ya que al aumentar la concentración de proteína la producción de esta citocina disminuyó de 11.6% a un 1.63%. Caso contrario a la IL-10 (Figura 16), que aumentaba su producción de 1.53% a 7.86% al incrementar la concentración de proteína viral. Estos resultados concuerdan con Bolacchiet *al.*, 2006, Li *et al.*, 2018 y con la hipótesis de este trabajo, la función efectora de los T reguladores aumenta y la función de los Th1 disminuye. Por lo tanto, la PN afecta la producción de IFN- γ e IL-10, y es dependiente de la concentración.

También, se analizó el efecto de la PN en la producción de citocinas solubles: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ y TNF- α . Se observaron diferencias significativas en la producción de IL-6, en comparación con las demás citocinas (Figura 17). La IL-6, a pesar de ser una citocina pro-inflamatoria puede tener efecto anti-inflamatorio (Sghaier *et al.*, 2017). Se especula que para este caso la IL-6 tiene efecto anti-inflamatorio, ya que según lo reportado puede inhibir la producción de IFN- γ por las células T CD4+ y evitar la diferenciación al subtipo celular Th1 (Diehl y Rincón, 2002).

Otra citocina que se encontró en los sobrenadantes fue la IL-10. Una citocina anti-inflamatoria que es producida principalmente por linfocitos T reguladores y que suprime a los demás subtipos de T

colaboradores. En presencia de la PN, no hubo presencia de otras citocinas, y esto puede estar relacionado con la producción elevada de IL-6 e IL-10 y su capacidad supresora.

Los resultados obtenidos de los objetivos específicos fueron que la PN no tiene efecto sobre la proliferación de linfocitos T colaboradores o sobre la producción de citocinas, con excepción de la IL-6 y la IL-10, y que tiene un efecto sobre la expresión del marcador de activación celular CD62L, dependiente de la concentración de la proteína núcleo viral.

Con los resultados obtenidos mediante los objetivos específicos surgió la nueva hipótesis: los linfocitos T colaboradores presentan agotamiento celular en presencia de la proteína núcleo ya que algunas de las características de agotamiento celular son principalmente disminución de la proliferación, disminución en la producción de citocinas, disminución del marcador de activación CD62L, aumento de IL-10 y aumento en los marcadores co-estimuladores inhibidores PD-1 y CTLA-4, entre otras características. Según Yi *et al.*, 2010 y Barathan *et al.*, 2018, el HCV causa agotamiento celular en linfocitos T CD8+ y posiblemente también en linfocitos T CD4+.

Debido a estos antecedentes, se decidió analizar los marcadores inhibidores PD-1 y CTLA-4 (Figuras 18-21).

Se observaron diferencias significativas al comparar la expresión de PD-1 (Figura 19) y CTLA-4 (Figura 21) en células tratadas con PN. Los marcadores inhibidores PD-1 y CTLA-4 se expresan en células activadas (Manzoor, 2015), al igual que CD62L. El marcador PD-1 interactúa con sus ligandos enviando señales intracelulares que se traducen en la disminución de la producción de citocinas como IFN- γ , TNF α e IL-2, afectando la diferenciación y el balance de linfocitos T (Manzoor, 2015). El marcador CTLA-4 de manera similar a PD-1, cuando se expresa, frena la actividad de los linfocitos T disminuyendo su función, evitando la proliferación (Manzoor, 2015). Hipotetizamos que la PN del HCV por sí sola puede tener un papel importante en el agotamiento celular que se ha observado en la infección crónica (Yi *et al.*, 2010)

Por último, se decidió realizar un ensayo para evaluar la posible muerte celular y descartar que las células estuvieran muriendo en presencia de la PN en lugar de presentar agotamiento celular, ya que PD-1 también es un marcador de muerte celular programada (Manzoor, 2015). Con este fin, se marcaron las células con PI y se observó únicamente un 10.3% de expresión con la concentración de 1000ng/ml de PN (Figura 22). Estos resultados indican que las células presentan el marcador PD-1, sin embargo, las células no están muriendo.

Se puede deducir que la PN tiene un efecto sobre la activación celular y la producción de citocinas. Este efecto puede ser causado por el agotamiento celular de linfocitos T colaboradores inducido por la proteína viral. En presencia de la PN se expresa el marcador de activación y migración a nódulos linfáticos CD62L y los marcadores inhibidores PD-1 y CTLA-4, regulando negativamente a los linfocitos evitando la proliferación celular sin provocar muerte celular, y la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ . La producción de IL-6 e IL-10 aumenta, por lo que se hipotetiza que estas citocinas podrían inhibir la producción de otros procesos inmunológicos.

Capítulo 5. Conclusiones

A continuación, se presentan las principales conclusiones del trabajo.

- La PN inhibe la proliferación de linfocitos T colaboradores.
- La PN tiene un efecto en la activación de linfocitos T, indicado por la expresión del marcador CD62L.
- La PN tiene un efecto sobre la producción de citocinas, IL-10 e IFN- γ , y es dependiente de la concentración de la proteína viral.
- La PN tiene un efecto sobre la secreción de IL-6.
- La PN tiene un efecto sobre el aumento en la expresión de los marcadores PD-1 y CTLA-4.
- La PN puede estar causando agotamiento celular de los linfocitos T colaboradores.

Literatura citada

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., y Pillai, S. 2015. *Inmunología celular y molecular (1-12)*. (9a. ed) Elsevier
- Ahn, K., Meyer, T. H., Uebel, S., Sempé, P., Djaballah, H., Yang, Y., ... y Tampé, R. 1996. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *The EMBO journal*, 15(13), 3247-3255.
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., y Chen, H. 2013. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 3834-3842.
- Aldapa-Vega, G., Pastelín-Palacios, R., Isibasi, A., Moreno-Eutimio, M. A., y López-Macías, C. 2016. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. *Rev. Alerg. Mex*, 63(3), 293-302.
- Baranovski, B. M., Freixo-Lima, G. S., Lewis, E. C., y Rider, P. 2015. T Helper Subsets, Peripheral Plasticity, and the Acute Phase Protein, α 1-Antitrypsin. *BioMed Research International*, 2015, 14. <https://doi.org/10.1155/2015/184574>.
- Barathan, M., Gopal, K., Mohamed, R., Ellegård, R., Saeidi, A., Vadivelu, J., ... y Shankar, E. M. 2015. Chronic hepatitis C virus infection triggers spontaneous differential expression of biosignatures associated with T cell exhaustion and apoptosis signaling in peripheral blood mononucleocytes. *Apoptosis*, 20(4), 466-480.
- Barathan, M., Mohamed, R., Yong, Y. K., Kannan, M., Vadivelu, J., Saeidi, A., ... y Shankar, E. M. 2018. Viral persistence and chronicity in hepatitis C virus infection: role of T-cell apoptosis, senescence and exhaustion. *Cells*, 7(10), 165.
- Bell, R. B., Feng, Z., Bifulco, C. B., Leidner, R., Weinberg, A., y Fox, B. A. 2018. 15—Immunotherapy. *Oral, Head and Neck Oncology and Reconstructive Surgery*, 314-340.
- Beyer, M., y Schultze, J. L. 2006. Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 108(3), 804-811.
- Bolacchi, F., Sinistro, A., Ciaprini, C., Demin, F., Capozzi, M., Carducci, F. C., ... y Bergamini, A. 2006. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clinical & Experimental Immunology*, 144(2), 188-196.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., y Lavergne, J. P. 2005. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of virology*, 79(17), 11353-11365.
- Chavez-Galan, L., Angel, A. D., Zenteno, E., Chavez, R., y Lascrain, R. 2009. Cell death mechanisms Induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology*, 6(1), 15-25.

- Chevaliez, S., y Pawlotsky, J. M. 2006. HCV genome and life cycle. In Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology. Horizon Bioscience.
- Chigbu, D. I., Loonawat, R., Sehgal, M., Patel, D., y Jain, P. 2019. Hepatitis C Virus infection: Host–virus interaction and mechanisms of viral persistence. *Cells*, 8(4), 376.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., y Roitt, I. M. 2017. *Roitt's essential immunology*. John Wiley y Sons.
- Diehl, S., y Rincón, M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular immunology*, 39(9), 531-536.
- Diccionario de cáncer del NCI. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 11 de abril de 2021, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/inmunomodulador>
- Dobrzanski, M. J. 2013. Expanding roles for CD4 T cells and their subpopulations in tumor immunity and therapy. *Frontiers in oncology*, 3, 63.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11-22.
- Eckels, D. D., Tabatabail, N., Bian, T. H., Wang, H., Muheisen, S. S., Rice, C. M., y Gill, J. 1999. In vitro human Th-cell responses to a recombinant hepatitis C virus antigen: failure in IL-2 production despite proliferation. *Human immunology*, 60(3), 187-199.
- Fainboim, L., y Geffner, J. 6ta Edición. 2005. Introducción a la inmunología humana (235-260). Ed. Médica Panamericana.
- Feng, X., Xu, W., Li, Z., Song, W., Ding, J., y Chen, X. 2019. Immunomodulatorynanosystems. *Advancedscience*, 6(17), 1900101.
- Fernández-Ponce, C., Dominguez-Villar, M., Muñoz-Miranda, J. P., Arbulo-Echevarria, M. M., Litrán, R., Aguado, E., y García-Cozar, F. 2017. Immune modulation by the hepatitis C virus core protein. *Journal of viral hepatitis*, 24(5), 350-356.
- Guermonez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., y Amigorena, S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, 20(1), 621-667.
- Herwald, H., yEgsten, A. 2016. On PAMPs and DAMPs. *Journal of innate immunity*, 8(5), 427.
- Herzer, K., Falk, C. S., Encke, J., Eichhorst, S. T., Ulsenheimer, A., Seliger, B., y Krammer, P. H. 2003. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *Journalofvirology*, 77(15), 8299-8309.

- Hyogo, A., Kobayashi, T., Garcia del Saz, E., y Seguchi, H. 2010. Efectos Antioxidantes del Ácido Protocatéquico, Ácido Ferúlico y el Ácido Caféico usando una Sustancia Fluorescente en los Neutrófilos Humanos. *International Journal of Morphology*, 28(3), 911-920
- ICTV. 2020. International Committee on Taxonomy of Viruses. Consultado el 29 de Junio del 2020. Sitio web:https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rnaviruses/w/flaviviridae/362/genus-hepacivirus
- Ivanova, E. A., y Orekhov, A. N. 2015. T helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: an overview. *BioMed research international*, 2015.
- Joo, M., Hahn, Y. S., Kwon, M., Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., y Christman, J. W. 2005. Hepatitis C virus core protein suppresses NF- κ B activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with I κ B kinase β . *Journal of virology*, 79(12), 7648-7657.
- Kidd, P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review*, 8(3), 223-246.
- Kittlesen, D. J., Chianese-Bullock, K. A., Yao, Z. Q., Braciale, T. J., y Hahn, Y. S. 2000. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *The Journal of clinical investigation*, 106(10), 1239-1249.
- Krishnadas, D. K., Ahn, J. S., Han, J., Kumar, R., y Agrawal, B. 2010. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. *International immunology*, 22(6), 491-502.
- Lewis, M., Tarlton, J. F., y Cose, S. 2008. Memory versus naive T-cell migration. *Immunology and cell biology*, 86(3), 226-231.
- Li, H., Li, T., Crispe, I. N., y Tu, Z. 2018. HCV immune evasion and regulatory T cell activation: cause or consequence?. *Cellular & molecular immunology*, 15(5), 536-538.
- Liu, L., Johnson, C., Fujimura, S., Teque, F., y Levy, J. A. 2011. Transfection optimization for primary human CD8+ cells. *Journal of immunological methods*, 372(1-2), 22-29.
- Lin, W., Kim, S. S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Kim, K. A., ...y Chung, R. T. 2006. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1SH2 domain. *Journal of virology*, 80(18), 9226-9235.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., y Xia, B. 2012. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12. doi:10.1155/2012/925135
- Mak, T. W., y Saunders, M. E. 2006. The immune response. Part I: Basic Immunology, 373-401.
- Manzoor Ahmad Mir. 2015. Costimulation in Lymphomas and Cancers. *Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases (185-254)*. Academic Press

- Martín, D. D., Rodríguez, H. B., Corte, M. B., y Soto, M. Á. M. 2013. Funciones efectoras de los linfocitos T. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1742-1751.
- Martín Pontejo, J. S. 2012. Características moleculares y funcionales de los receptores solubles del TNF con capacidad anti-quimioquinas de poxvirus [Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/11175>
- Maurer-Stroh, S., Lee, R. T. C., Eisenhaber, F., Cui, L., Phuah, S. P., y Lin, R. T. 2010. A new common mutation in the hemagglutinin of the 2009 (H1N1) influenza A virus. *PLoS Currents*, 2.
- Moorman, J. P., Prayther, D., McVay, D., Hahn, Y. S., y Hahn, C. S. 2003. The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fasoligomerization. *Virology*, 312(2), 320–329. doi:10.1016/s0042-6822(03)00208-3
- Muntané, J., González, R., Ranchal, I., Collado, J. A., López-Sánchez, L. M., Herencia, C., ... y De la Mata, M. 2007. Mecanismos de lesión hepatocelular. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(7), 405-410.
- Norian, R., Delirez, N., y Azadmehr, A. 2015. Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 6, No. 4, p. 265). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Obaid, A., Naz, A., Ikram, A., Awan, F. M., Raza, A., Ahmad, J., y Ali, A. 2018. Model of the adaptive immune response system against HCV infection reveals potential immunomodulatory agents for combination therapy. *Scientificreports*, 8(1), 1-19.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., y Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- O'Shea, J. J., Steward-Tharp, S. M., Laurence, A., Watford, W. T., Wei, L., Adamson, A. S., y Fan, S. 2009. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes and Infection*, 11(5), 599-611.
- Pieper, K., Grimbacher, B., y Eibel, H. 2013. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
- Quah, B. J., y Parish, C. R. 2010. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (44), e2259.
- Ray, R. B., Steele, R., Basu, A., Meyer, K., Majumder, M., Ghosh, A. K., y Ray, R. 2002. Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF- κ B regulation is linked to genomic variation. *Virus Research*, 87(1), 21–29. doi:10.1016/s0168-1702(02)00046-1
- Rich, R. R., Fleisher, T. A., Shearer, W. T., Schroeder, H., Frew, A. J., Frick, M. D., y Weyand, C. M. 2019. *Inmunología clínica: principios y práctica* (235-242). Elsevier.

- Richards, H., Longhi, M. P., Wright, K., Gallimore, A., y Ager, A. 2008. CD62L (L-selectin) down-regulation does not affect memory T cell distribution but failure to shed compromises anti-viral immunity. *The Journal of Immunology*, 180(1), 198-206.
- Riera-Romo, M., Pérez-Martínez, D., y Castillo-Ferrer, C. 2016. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Riley, J. L. 2009. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological reviews*, 229(1), 114-125.
- Saeidi, A., Zandi, K., Cheok, Y. Y., Saeidi, H., Wong, W. F., Lee, C. Y. Q., ... y Shankar, E. M. 2018. T-cell exhaustion in chronic infections: reversing the state of exhaustion and reinvigorating optimal protective immune responses. *Frontiers in immunology*, 9, 2569.
- Seeligmüller, N. 2019. Aislamiento más rápido de PBMC usando Ficoll-Paque® Plus en las centrifugas de sobremesa multiusos 5920 R y 5910 R Eppendorf. Consultado el 29 de junio de 2020 en: <http://www.eppendorf.com>
- Semmo, N., Krashias, G., Willberg, C., y Klenerman, P. 2007. Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 14(7), 492–502. doi:10.1111/j.1365-2893.2007.00842.x
- Sghaier, I., Mouelhi, L., Rabia, N. A., Alsaleh, B. R., Ghazoueni, E., Almawi, W. Y., y Loueslati, B. Y. 2017. Genetic variants in IL-6 and IL-10 genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in HCV infected patients. *Cytokine*, 89, 62-67.
- Spriggs, M. K. 1996. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annual review of immunology*, 14(1), 101-130.
- Sundström, S., Ota, S., Dimberg, L. Y., Masucci, M. G., y Bergqvist, A. 2005. Hepatitis C virus core protein induces an anergic state characterized by decreased interleukin-2 production and perturbation of mitogen-activated protein kinase responses. *Journal of virology*, 79(4), 2230-2239.
- Takeuchi, O., y Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- The human protein atlas. 2021. Blood atlas. Consultado el 02 de octubre del 2021 de: <https://www.proteinatlas.org/>
- Théry, C., y Amigorena, S. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology*, 13(1), 45-51.
- Tobón, G. J., Izquierdo, J. H., y Cañas, C. A. 2013. B lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity - Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Diseases*, 2013, 17. <https://doi.org/10.1155/2013/827254>
- Tu, Z., Hamalainen-Laana, H. K., Nishitani, C., Kuroki, Y., Crispe, I. N., y Orloff, M. S. 2012. HCV core and NS3 proteins manipulate human blood-derived dendritic cell development and promote Th 17 differentiation. *International immunology*, 24(2), 97-106.

- Ulsenheimer, A., Gerlach, J. T., Gruener, N. H., Jung, M. C., Schirren, C. A., Schraut, W., ...y Diepolder, H. M. 2003. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4+ T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*, 37(5), 1189-1198.
- UniProt. (2020). Genome poly protein Hepatitis C virus genotype 1a. Consultado el 02 de Junio del 2020. Sitio web: <https://www.uniprot.org/uniprot/P27958>
- Vázquez, M. B., Sureda, M., y Rebollo, J. 2012. Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1), 21-30.
- Waggoner, S. N., Hall, C. H., y Hahn, Y. S. 2007. HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *Journal of leukocyte biology*, 82(6), 1407-1419.
- Wang, Y., Kato, N., Jazag, A., Dharel, N., Otsuka, M., Taniguchi, H., ...y Omata, M. 2006. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*, 130(3), 883-892.
- Wang, Y.-H., Voo, K. S., Liu, B., Chen, C.-Y., Uygungil, B., Spoede, W., y Liu, Y.-J. 2010. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2479–91. <http://doi.org/10.1084/jem.20101376>
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., y Antonetti, F. R. 2011. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Watson, H. A., Durairaj, R. R., Ohme, J., Alatsatianos, M., Almutairi, H., Mohammed, R. N., ... y Ager, A. 2019. L-selectin enhanced T cells improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 10, 1321.
- World Health Organization. Cancer today. Consultado el 04 marzo del 2022 en: <http://gco.iarc.fr/today,2020>.
- World Health Organization. Hepatitis C. Consultado el 4 de Marzo del 2022. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c, 2022>.
- Yang, S., Liu, F., Wang, Q. J., Rosenberg, S. A., y Morgan, R. A. 2011. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One*, 6(7), e22560.
- Yi, J. S., Cox, M. A., y Zajac, A. J. 2010. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*, 129(4), 474-481.

- Zhai, N., Chi, X., Li, T., Song, H., Li, H., Jin, X., ... y Tu, Z. 2015. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. *Cellular & molecular immunology*, 12(6), 743-749.
- Zhang, Y. Z., Anderson, A., y Bradford, J. 2011. Acoustic flow cytometry for multicolor immunophenotyping analysis (65.23).
- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., ... y Littman, D. R. 2008. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*, 453(7192), 236-240.
- Zygmunt, B., y Veldhoen, M. 2011. T Helper Cell Differentiation. *Advances in Immunology*, 159–196. doi:10.1016/b978-0-12-387664-5.00005-4

Anexos

Anexo A. Estandarización

Estandarización de número de células en placa de 96 pozos

Se realizó el ensayo en placas de 96 pozos para estandarizar el número de células adecuado. En cada pozo se cultivaron tres cantidades de células distintas: 15,000; 150,000 y 200,000; todas en 150µl de medio. Las células se activaron con ConA [1mg/ml] y LPS [1mg/ml] que son mitógenos capaces de inducir proliferación en linfocitos T, y se adicionó 0.15mg/ml de resazurina por pozo. También, se consideraron dos controles, uno con células sin activar y otro con medio únicamente.

Las células se purificaron un día antes de sembrarse por triplicado en la placa y se conservaron a -4°C. Se utilizaron dos placas de 96 pozos, una placa estéril para incubar las células y otra no estéril para leerlas en el espectrofotómetro por cada día (tres días en total). El diseño experimental se presenta en la Figura 23.

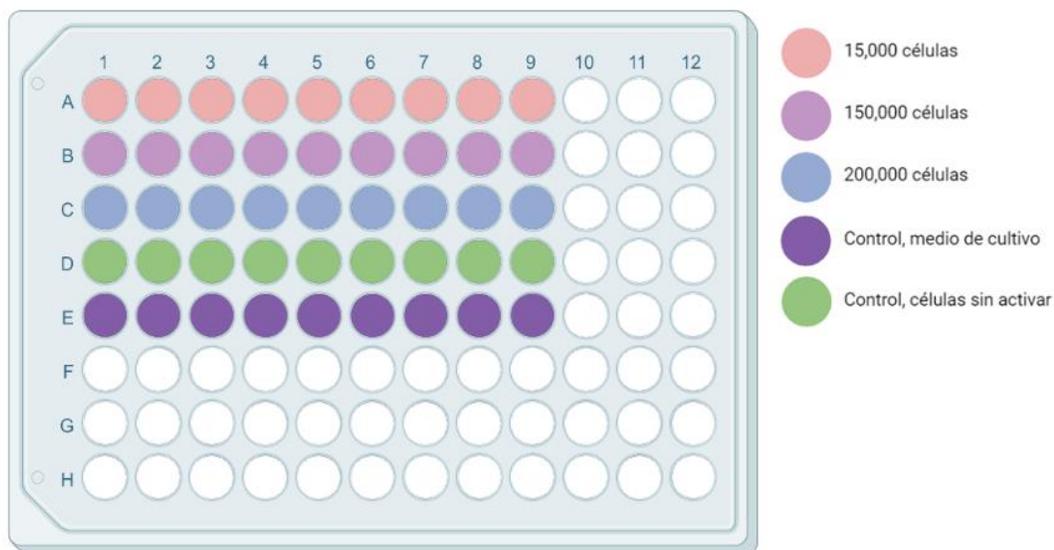


Figura 23. Estandarización de número de células cultivadas en placa de 96 pozos. El contenido final de los pozos final fue de células en 150µl de medio, concanavalina A (ConA) [1mg/ml], lipopolisacárido (LPS) [1mg/ml] y resazurina sódica.

Se obtuvo que la concentración adecuada fue de 15,000 células por pozo, debido a que se mantiene la proliferación sin agotar los nutrientes del medio y causar muerte celular. Los linfocitos activados se dividen cada 6-8 horas y el experimento se cuantificó cada 24 horas por tres días. Los resultados se muestran en la Figura 24.

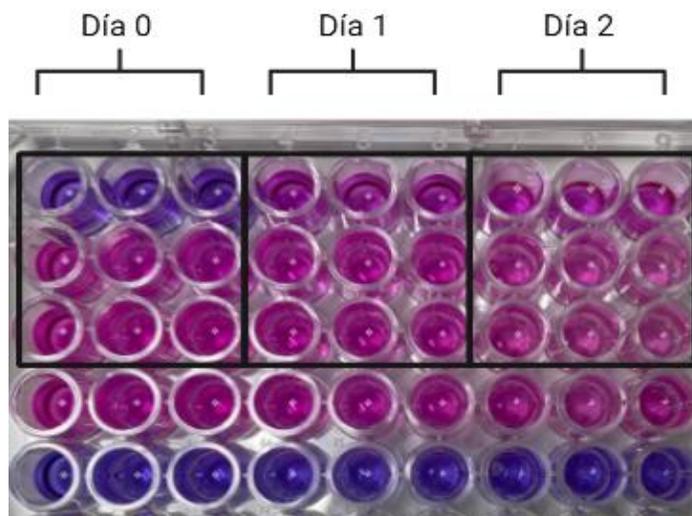


Figura 24. Estandarización de número de células. El contenido final de los pozos final fue de 15,000, 150,000 y 200,000 células en 150 μ l de medio, concanavalina A (ConA) [1mg/ml], lipopolisacárido (LPS) [1mg/ml] y resazurina sódica.

Estandarización concentraciones de proteína

Cálculos para obtener las concentraciones de proteína: [0.1 μ g/ml] (2), [1 μ g/ml] (3) y [10 μ g/ml] (4) de un stock de [1 μ g/ μ l]. Se preparó stock de 10 μ g/ml con 400 PBS y 4 μ l de stock de [1 μ g/ μ l] para concentraciones de [0.1 μ g/ml] (3) y [1 μ g/ml].

$$400\mu l \frac{10\mu g}{1000\mu l} \frac{1\mu l}{1\mu g} = 4\mu l \quad (1)$$

$$200\mu l \frac{0.1\mu g}{1000\mu l} \frac{1000\mu l}{10\mu g} = 2\mu l \quad (2)$$

$$200\mu l \frac{1\mu g}{1000\mu l} \frac{1000\mu l}{1\mu g} = 20\mu l \quad (3)$$

$$200\mu l \frac{10\mu g}{1000\mu l} \frac{1\mu l}{1\mu g} = 2\mu l \quad (4)$$

Estandarización de activación celular

Se realizó la estandarización de la activación celular de linfocitos T con PMA/ionomicina. El PMA es un compuesto que sirve para estimular la división celular de linfocitos T, mientras que la ionomicina es un ionóforo que aumenta el nivel intracelular de calcio causando la producción de citocinas como IL-2 (Ai et al., 2013).

Para este ensayo se utilizaron placas de 24 pozos con un millón de células, tres concentraciones distintas de PMA: 10ng/ml, 20ng/ml y 25ng/ml, ionomicina 1μg/ml y tres controles: control de autofluorescencia, control de muerte y control de proliferación. Para el control de autofluorescencia se utilizaron células activadas sin teñir, para el control de muerte se utilizaron células pre-calentadas a 60°C durante 30 minutos y se teñieron posteriormente con yoduro TO-PRO-3 y finalmente, para el control de proliferación se utilizaron células teñidas con CFSE sin activar. El diseño experimental se muestra en la Figura 25.

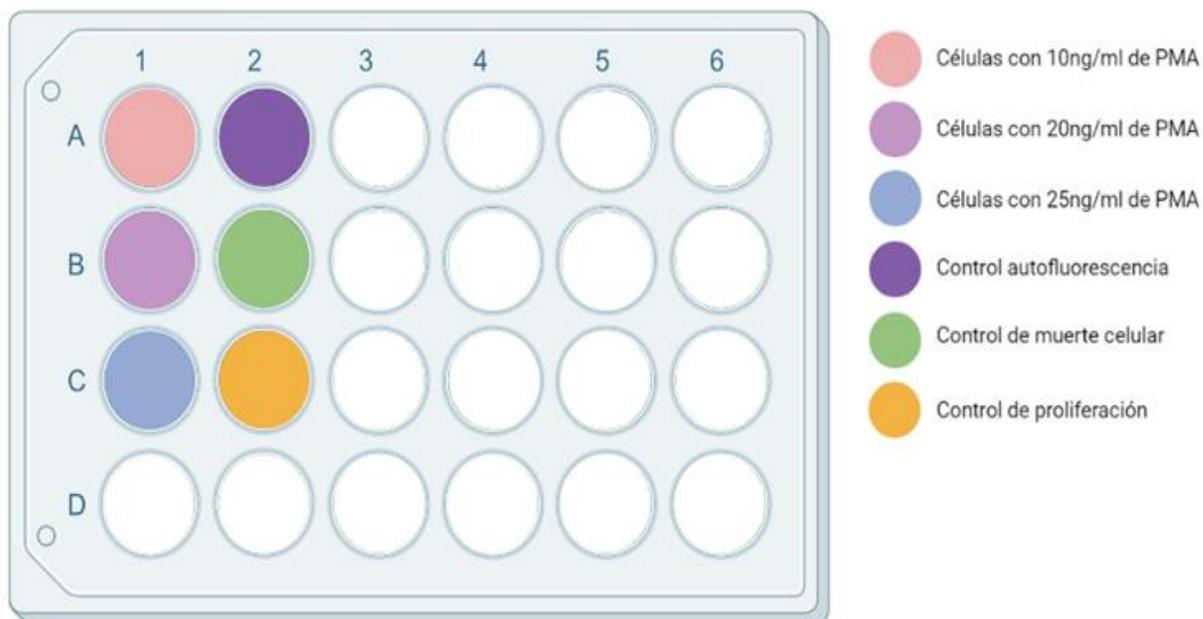


Figura 25. Ensayo de estandarización de la activación de linfocitos con PMA. El contenido final de los pozos final fue de 1 millón de células en 1ml de medio, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en tres distintas concentraciones: 10ng/ml, 20ng/ml y 25ng/ml y éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). Control autofluorescencia, únicamente células. Control de muerte, células teñidas con yoduro de propidio (PI). Control de proliferación, únicamente células con CFSE.

Los citogramas obtenidos se observan en la Figura 26.

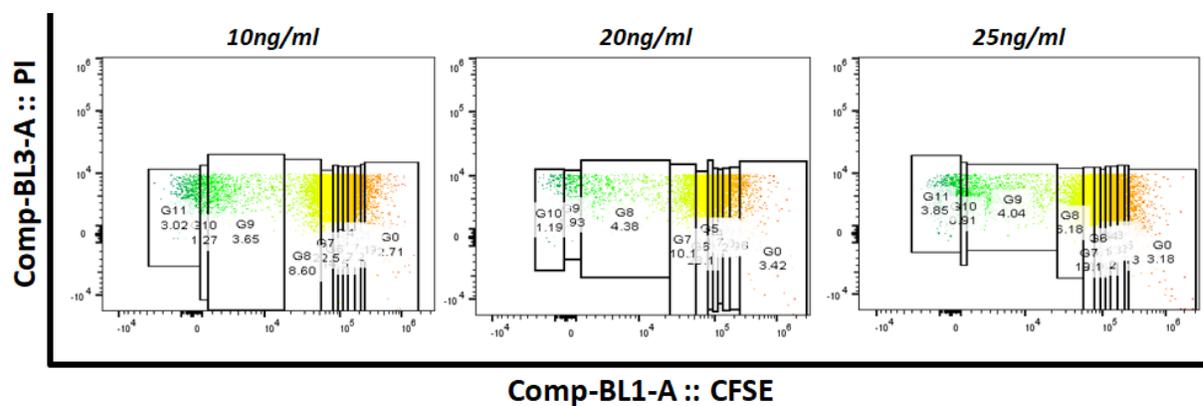


Figura 26. Estandarización de la activación celular con PMA. El análisis muestra la proliferación de linfocitos T con tres concentraciones distintas de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA): 10ng/ml, 20ng/ml y 25ng/ml. Comp, compensación.

Anexo B. Titulación de anticuerpos

La titulación de anticuerpos por citometría de flujo se realizó para optimizar el consumo del reactivo y aumentar la sensibilidad de los ensayos. Se realizaron diluciones 1-20, 1-50, 1-100 y 1-200 para anti-CD4 (Figura 27); 1-50, 1-100, 1-200 y 1-400 para anti-CD25 (Figura 28), anti-CD45RA (Figura 29) y anti-CD62L (Figura 30); y 1-4, 1-8, 1-10 y 1-20 para anti-IFN- γ (Figura 31), anti-IL-4 (Figura 32), anti-IL-10 (Figura 33), anti-IL-17A (Figura 34) y anti-Foxp3 (Figura 35). Se analizaron 50,000 eventos para cada anticuerpo tomando en cuenta un control de autofluorescencia.

Tabla3. Panel de anticuerpos.

Anticuerpo	Tipo	Fluorocromo	Canal	Población celular
Anti-CD4	Extracelular	PE-Cy7	BL4	Linfocitos T colaboradores
Anti-CD25	Extracelular	PE-Cy5	BL3	Linfocitos T reguladores
Anti-CD62L	Extracelular	APC	RL1	Linfocitos T vírgenes
Anti-IFN- γ	Intracelular	PE	BL2	Linfocitos Th1
Anti-Foxp3	Intracelular	APC	RL1	Linfocitos T reguladores
Anti-IL-4	Intracelular	APC-Cy7	BL4	Linfocitos Th2
Anti-IL-10	Intracelular	PE	BL2	Linfocitos T reguladores
Anti-IL-17A	Intracelular	APC	RL1	Linfocitos Th17

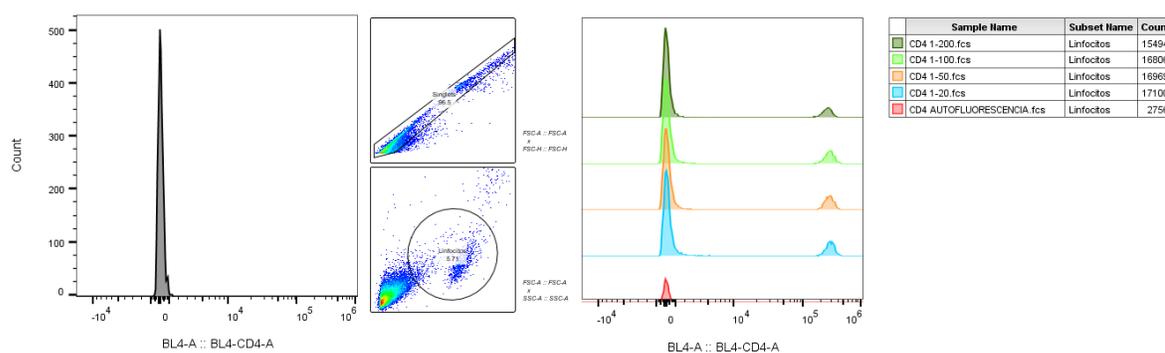


Figura 27. Titulación de anti-CD4. Expresión de CD4 en células marcadas con anti-CD4.

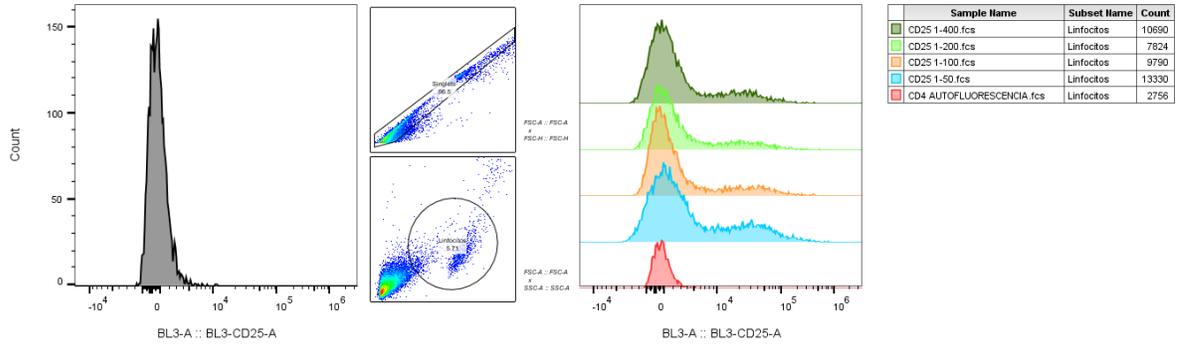


Figura 28. Titulación de anti-CD25. Expresión de CD25 en células marcadas con anti-CD25.

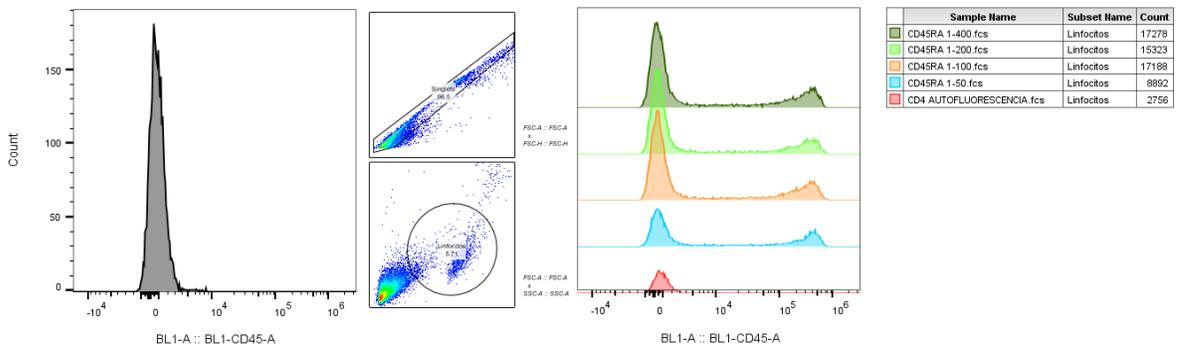


Figura 29. Titulación de anti-CD45RA. Expresión de CD45RA en células marcadas con anti-CD45RA.

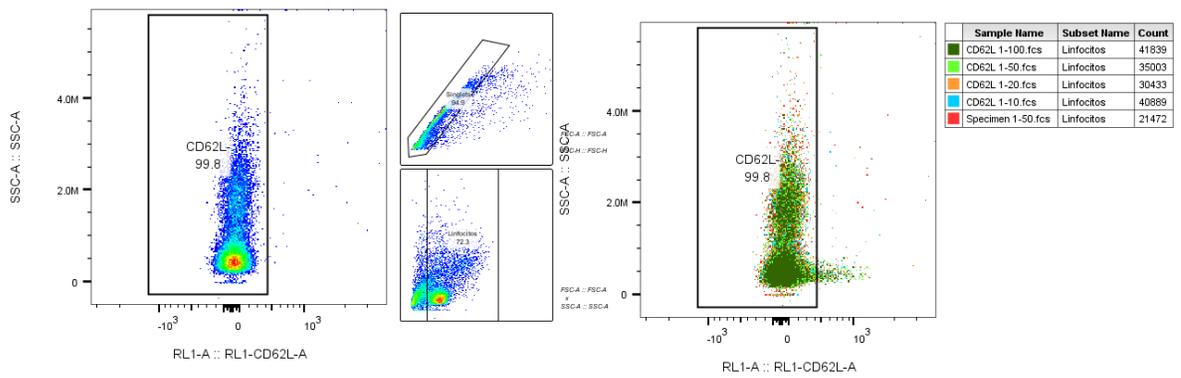


Figura 30. Titulación de anti-CD62L. Expresión de CD62L en células marcadas con anti-CD62L.

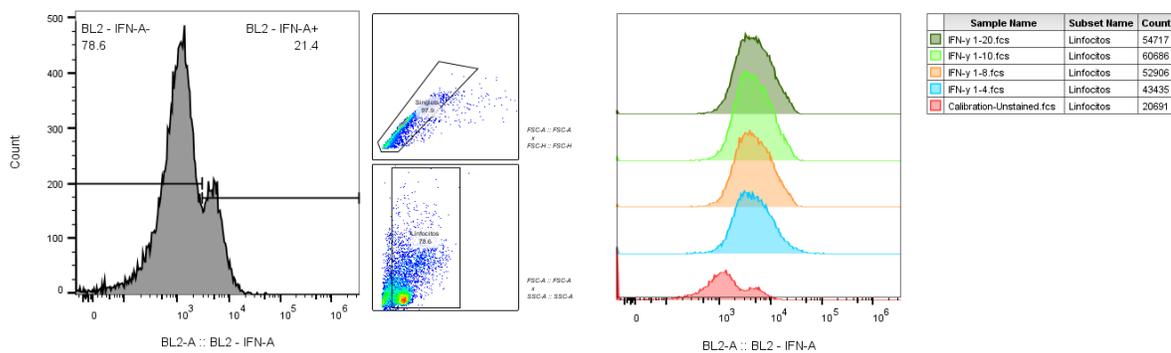


Figura 31. Titulación de anti-IFN-γ. Expresión de IFN-γ en células marcadas con anti-IFN-γ.

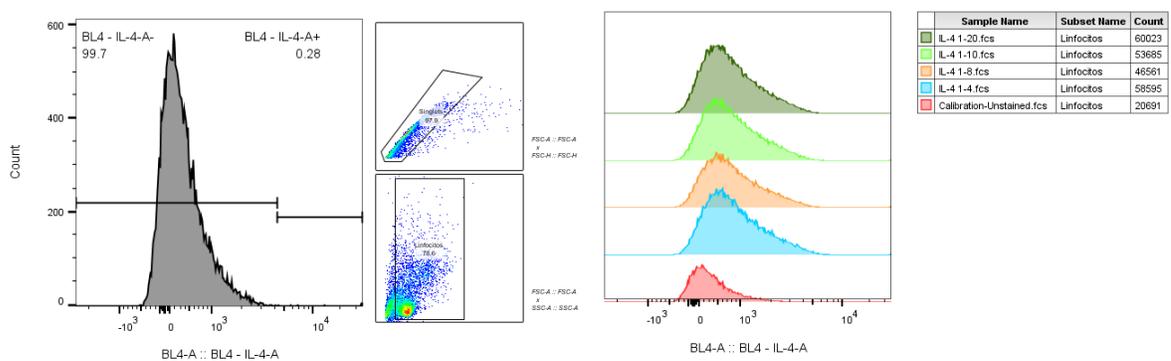


Figura 32. Titulación de anti-IL-4. Expresión de IL-4 en células marcadas con anti-IL-4.

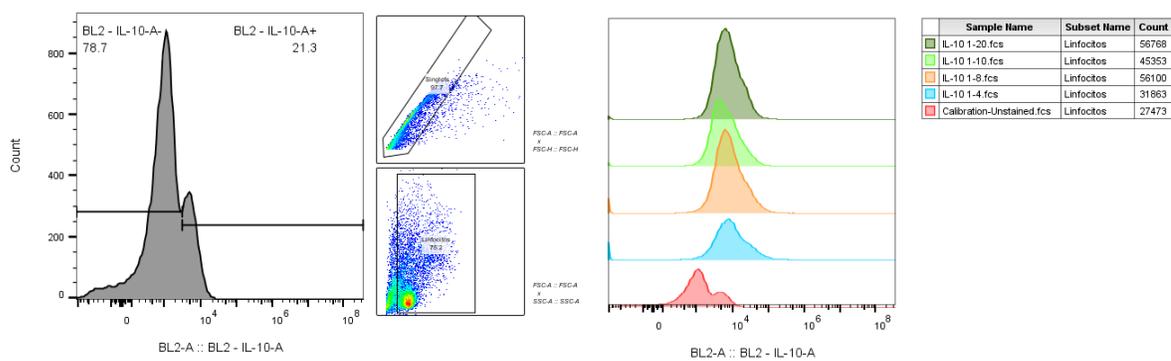


Figura 33. Titulación de anti-IL-10. Expresión de IL-10 en células marcadas con anti-IL-10.

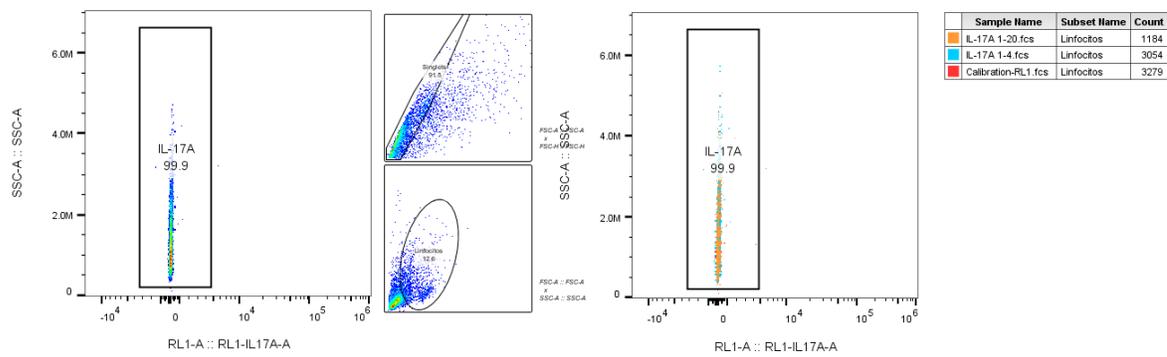


Figura 34. Titulación de anti-IL-17A. Expresión de IL-17A en células marcadas con anti-IL-17A.

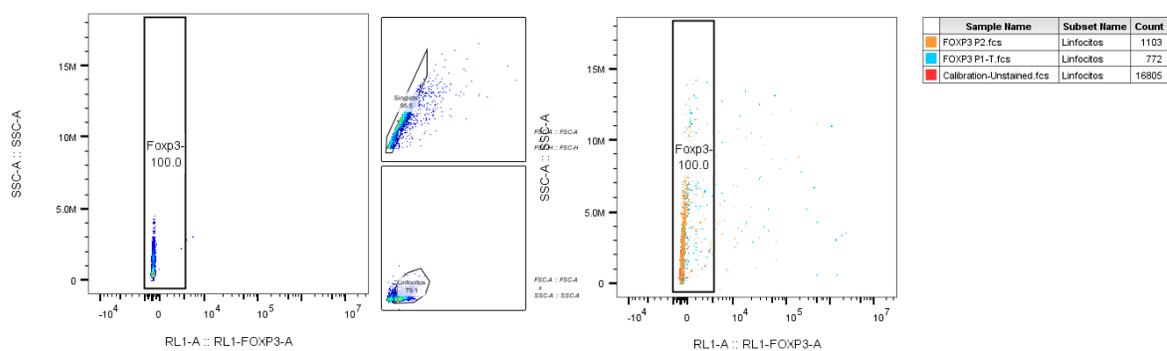


Figura 35. Titulación de anti-Foxp3. Expresión de Foxp3 en células marcadas con anti-Foxp3.

Anexo C. Análisis estadísticos

Tabla 4. Análisis estadísticos de proliferación celular con resazurina.

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0.05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	2.376	0.13	ns	No	
Horas	49.95	<0.001	***	Yes	
Tratamiento	10.17	<0.001	***	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	58.50	15	3.900	F (15, 48) = 1.537	P=0.13
Horas	1230	3	409.9	F (3, 48) = 161.5	P<0.001
Tratamiento	250.5	5	50.11	F (5, 48) = 19.74	P<0.001
Residual	121.8	48	2.538		

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Control negativo vs. 10ug/ml	-6.285	-8.875 to -3.695	Yes	***	<0.001
Control negativo vs. 1ug/ml	-6.960	-9.550 to -4.370	Yes	***	<0.001
Control negativo vs. 0.1ug/ml	-4.470	-7.060 to -1.880	Yes	***	<0.001
Control negativo vs. Control positivo	-1.850	-5.193 to 1.493	No	ns	0.58
Control negativo vs. Control - -	-6.097	-9.441 to -2.754	Yes	***	<0.001
10ug/ml vs. 1ug/ml	-0.6750	-2.170 to 0.8202	No	ns	0.76
10ug/ml vs. 0.1ug/ml	1.815	0.3198 to 3.310	Yes	**	0.009
10ug/ml vs. Control positivo	4.435	1.845 to 7.025	Yes	***	<0.001
10ug/ml vs. Control - -	0.1875	-2.402 to 2.777	No	ns	>0.99
1ug/ml vs. 0.1ug/ml	2.490	0.9948 to 3.985	Yes	***	<0.001
1ug/ml vs. Control positivo	5.110	2.520 to 7.700	Yes	***	<0.001
1ug/ml vs. Control - -	0.8625	-1.727 to 3.452	No	ns	0.92
0.1ug/ml vs. Control positivo	2.620	0.03022 to 5.210	Yes	*	0.05
0.1ug/ml vs. Control - -	-1.627	-4.217 to 0.9623	No	ns	0.44
Control positivo vs. Control - -	-4.247	-7.591 to -0.9041	Yes	**	0.006

Tabla 5. Análisis estadísticos de la expresión del marcador CD62L.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary
Control vs. 100ng/ml	-34.40	-40.22 to -28.59	Yes	***
Control vs. 250ng/ml	-33.00	-38.82 to -27.19	Yes	***
Control vs. 500ng/ml	-31.30	-37.12 to -25.49	Yes	***
Control vs. 1000ng/ml	-29.70	-35.52 to -23.89	Yes	***

Tabla 6. Análisis estadísticos producción de citocinas solubles.

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	4.423	>0.99	ns	No	
Citocina	53.05	<0.001	***	Yes	
Tratamiento	0.4355	0.85	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	33887032	48	705980	F (48, 130) = 0.2846	P>0.99
Citocina	406418072	12	33868173	F (12, 130) = 13.65	P<0.001
Tratamiento	3336414	4	834104	F (4, 130) = 0.3363	P=0.85
Residual	322458692	130	2480451		

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
IL-5					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-11.95	-3569 to 3546	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-15.32	-3573 to 3542	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-10.27	-3568 to 3547	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-11.61	-3569 to 3546	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-3.367	-3561 to 3554	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	1.683	-3556 to 3559	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	0.3366	-3557 to 3558	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	5.050	-3552 to 3563	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	3.703	-3554 to 3561	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	-1.347	-3559 to 3556	No	ns	>0.99
IL-13					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-11.45	-3569 to 3546	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-13.61	-3571 to 3544	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-13.30	-3571 to 3544	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-11.45	-3569 to 3546	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-2.162	-3560 to 3555	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-1.852	-3559 to 3556	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	0.000	-3557 to 3557	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	0.3100	-3557 to 3558	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	2.162	-3555 to 3560	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	1.852	-3556 to 3559	No	ns	>0.99
IL-2					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-5.387	-3563 to 3552	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-10.77	-3568 to 3547	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-7.912	-3565 to 3550	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-8.922	-3566 to 3549	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-5.387	-3563 to 3552	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-2.525	-3560 to 3555	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-3.535	-3561 to 3554	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	2.862	-3555 to 3560	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	1.852	-3556 to 3559	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	-1.010	-3558 to 3556	No	ns	>0.99
IL-6					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-4840	-8398 to -1283	Yes	**	0.002
Control negativo vs. 500ng/ml	-2999	-6556 to 558.9	No	ns	0.14
Control negativo vs. 250ng/ml	-1884	-5442 to 1673	No	ns	0.59
Control negativo vs. 100ng/ml	-2413	-5970 to 1145	No	ns	0.34
1000ng/ml vs. 500ng/ml	1842	-1716 to 5399	No	ns	0.61
1000ng/ml vs. 250ng/ml	2956	-601.5 to 6513	No	ns	0.15
1000ng/ml vs. 100ng/ml	2428	-1130 to 5985	No	ns	0.33
500ng/ml vs. 250ng/ml	1114	-2443 to 4672	No	ns	0.91
500ng/ml vs. 100ng/ml	586.0	-2971 to 4143	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	-528.4	-4086 to 3029	No	ns	>0.99

IL-9					
Control negativo vs. 1000ng/ml	6.228	-3551 to 3564	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-1.683	-3559 to 3556	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	7.238	-3550 to 3565	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-3.198	-3561 to 3554	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-7.912	-3565 to 3550	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	1.010	-3556 to 3558	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-9.427	-3567 to 3548	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	8.922	-3549 to 3566	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	-1.515	-3559 to 3556	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	-10.44	-3568 to 3547	No	ns	>0.99
IL-10					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-344.9	-3902 to 3213	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-106.6	-3664 to 3451	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-88.54	-3646 to 3469	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-106.4	-3664 to 3451	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	238.4	-3319 to 3796	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	256.4	-3301 to 3814	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	238.5	-3319 to 3796	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	18.01	-3539 to 3575	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	0.1683	-3557 to 3558	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	-17.84	-3575 to 3540	No	ns	>0.99
IFN- γ					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-1.520	-3559 to 3556	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-12.63	-3570 to 3545	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-13.64	-3571 to 3544	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-13.64	-3571 to 3544	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-11.11	-3569 to 3546	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-12.12	-3570 to 3545	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-12.12	-3570 to 3545	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	-1.010	-3558 to 3556	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	-1.010	-3558 to 3556	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	0.000	-3557 to 3557	No	ns	>0.99
TNF- α					
Control negativo vs. 1000ng/ml	1.683	-3556 to 3559	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-16.16	-3574 to 3541	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-13.97	-3571 to 3543	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-12.29	-3570 to 3545	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-17.84	-3575 to 3540	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-15.65	-3573 to 3542	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-13.97	-3571 to 3543	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	2.188	-3555 to 3560	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	3.872	-3554 to 3561	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	1.683	-3556 to 3559	No	ns	>0.99
IL-17A					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-14.14	-3572 to 3543	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-30.47	-3588 to 3527	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-25.25	-3583 to 3532	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-24.07	-3582 to 3533	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-16.33	-3574 to 3541	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-11.11	-3569 to 3546	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-9.932	-3567 to 3548	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	5.218	-3552 to 3563	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	6.397	-3551 to 3564	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	1.178	-3556 to 3559	No	ns	>0.99
IL-17F					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-5.555	-3563 to 3562	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	57.28	-3500 to 3615	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-20.71	-3578 to 3537	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-13.80	-3571 to 3544	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	62.83	-3495 to 3620	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-15.15	-3573 to 3542	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-8.248	-3566 to 3549	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	-77.98	-3635 to 3479	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	-71.08	-3629 to 3486	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	6.902	-3551 to 3564	No	ns	>0.99

IL-4					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-20.37	-3578 to 3537	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-38.88	-3596 to 3519	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-29.63	-3587 to 3528	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-25.76	-3583 to 3532	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-18.52	-3576 to 3539	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-9.258	-3567 to 3548	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-5.387	-3563 to 3552	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	9.258	-3548 to 3567	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	13.13	-3544 to 3571	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	3.872	-3554 to 3561	No	ns	>0.99
IL-21					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-7.743	-3565 to 3550	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-14.81	-3572 to 3543	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-21.55	-3579 to 3536	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-16.98	-3574 to 3540	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-7.070	-3565 to 3550	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-13.80	-3571 to 3544	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-9.242	-3567 to 3548	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	-6.733	-3564 to 3551	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	-2.172	-3560 to 3555	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	4.562	-3553 to 3562	No	ns	>0.99
IL-22					
Control negativo vs. 1000ng/ml	-9.932	-3567 to 3548	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 500ng/ml	-31.14	-3589 to 3526	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 250ng/ml	-22.22	-3580 to 3535	No	ns	>0.99
Control negativo vs. 100ng/ml	-24.75	-3582 to 3533	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 500ng/ml	-21.21	-3579 to 3536	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 250ng/ml	-12.29	-3570 to 3545	No	ns	>0.99
1000ng/ml vs. 100ng/ml	-14.81	-3572 to 3543	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 250ng/ml	8.922	-3549 to 3566	No	ns	>0.99
500ng/ml vs. 100ng/ml	6.397	-3551 to 3564	No	ns	>0.99
250ng/ml vs. 100ng/ml	-2.525	-3560 to 3555	No	ns	>0.99

Tabla 7. Análisis estadísticos de la expresión del marcador PD-1.

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0.05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	10.86	0.44	ns	No	
Horas	3.947	0.83	ns	No	
Tratamiento	30.38	0.003	**	Yes	

Tabla 8. Análisis estadísticos de la expresión del marcador CTLA-4.

Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0.05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	0.2384	>0.99	ns	No	
Horas	3.176	0.75	ns	No	
Tratamiento	63.34	<0.001	***	Yes	

Anexo D. Citogramas

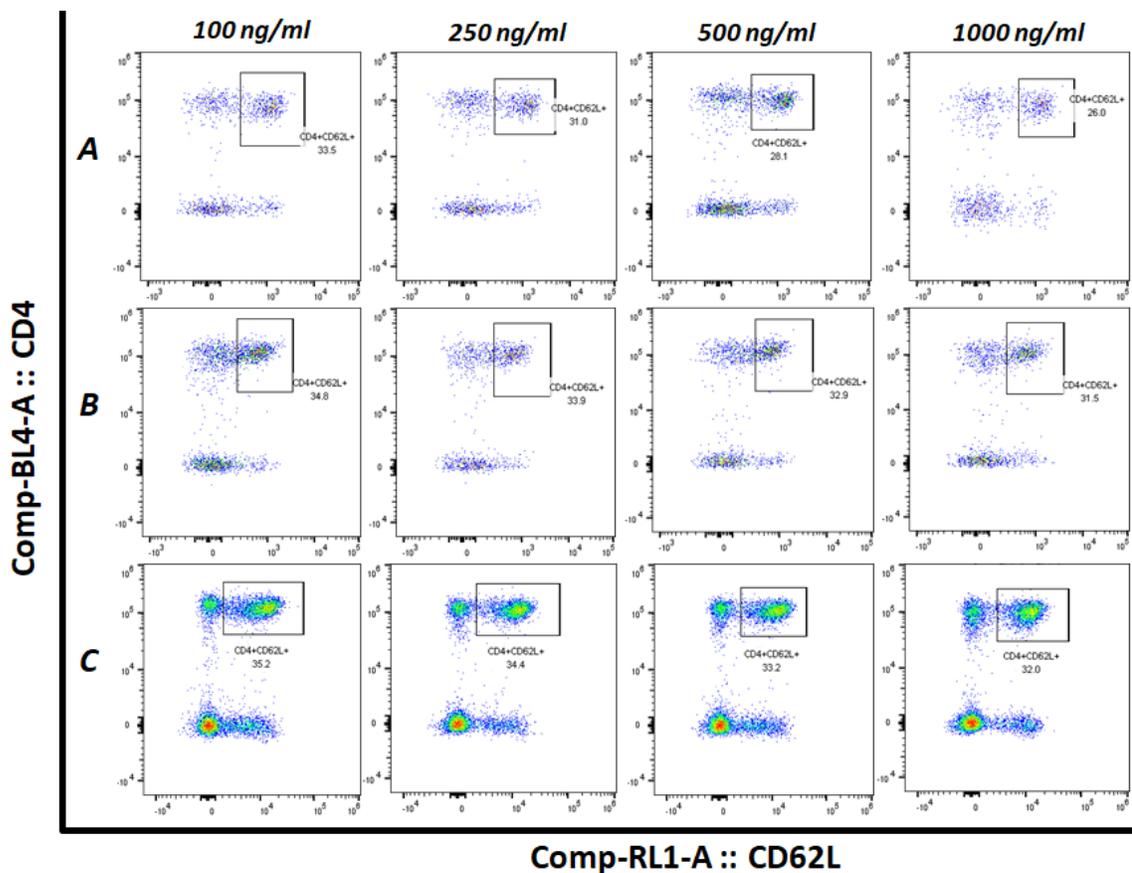


Figura 36. Efecto de la PN sobre la expresión del marcador CD62L en linfocitos T. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CD62L respecto al marcador CD4 de tres sujetos con cuatro concentraciones de PN: 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml y 1000ng/ml. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.

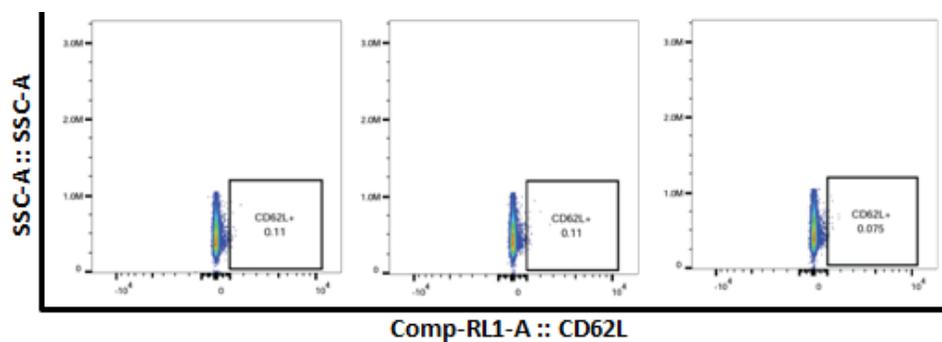


Figura 37. Expresión del marcador CD62L en células sin PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CD62L de tres sujetos sin PN.

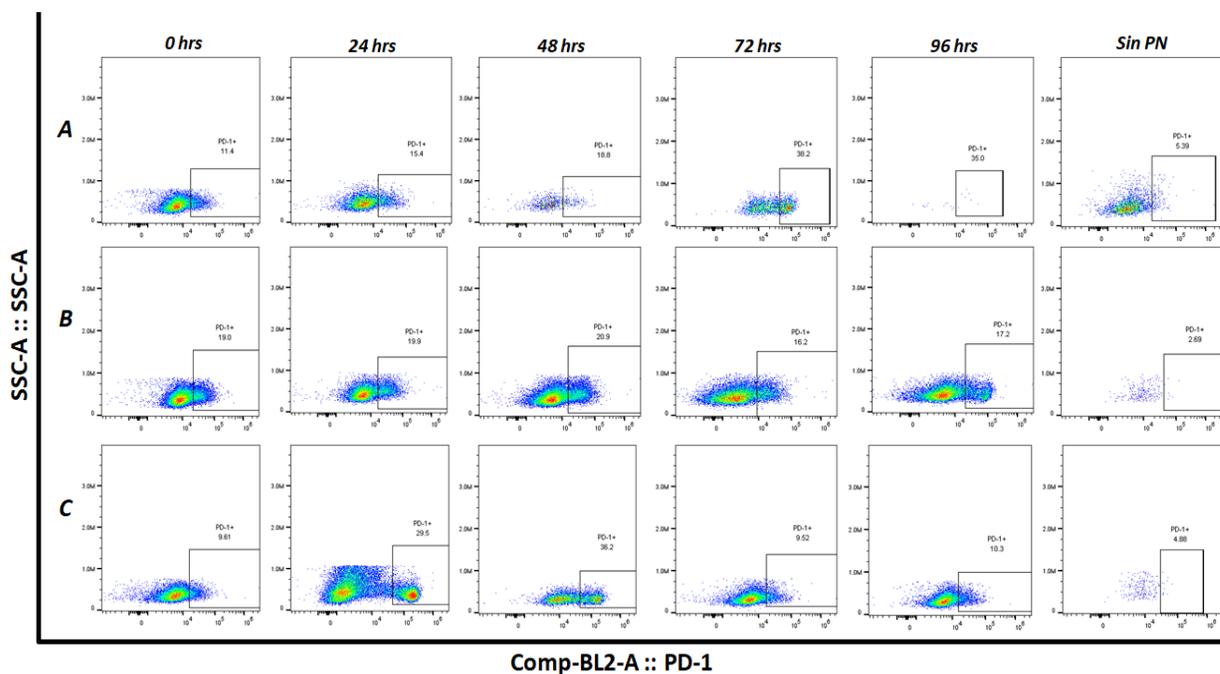


Figura 38. Expresión de PD-1 en linfocitos T con PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador PD-1 de tres sujetos con 500ng/ml de PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.

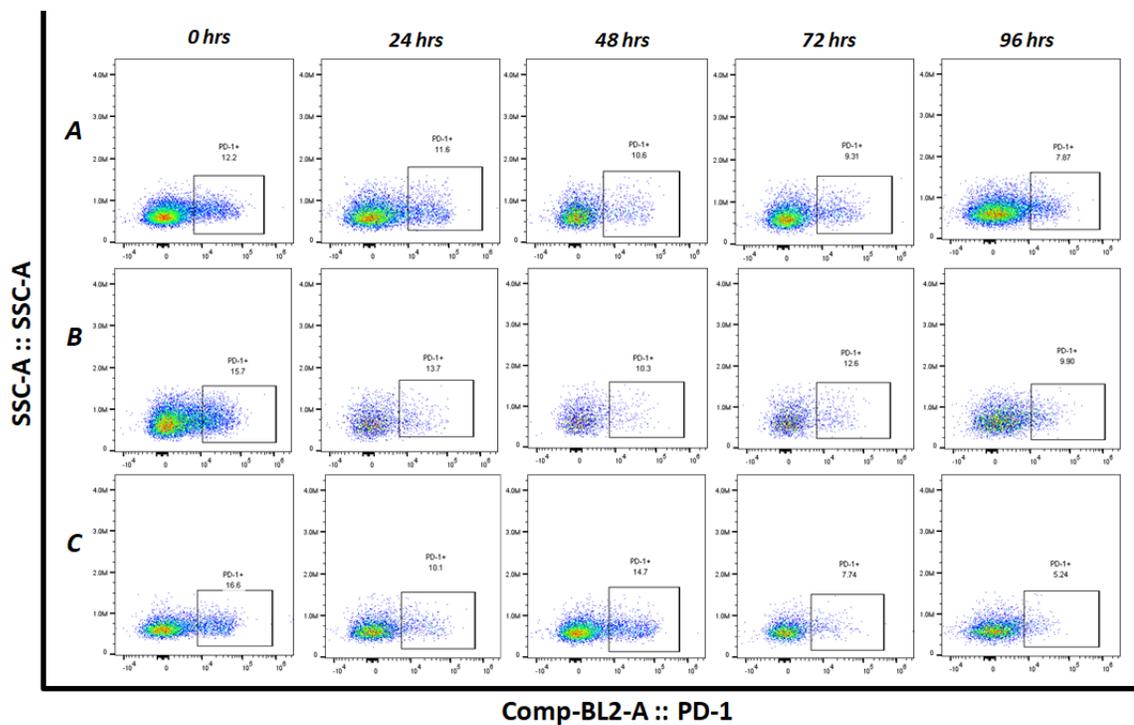


Figura 39. Expresión de PD-1 en linfocitos T sin PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador PD-1 de tres sujetos sin PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.

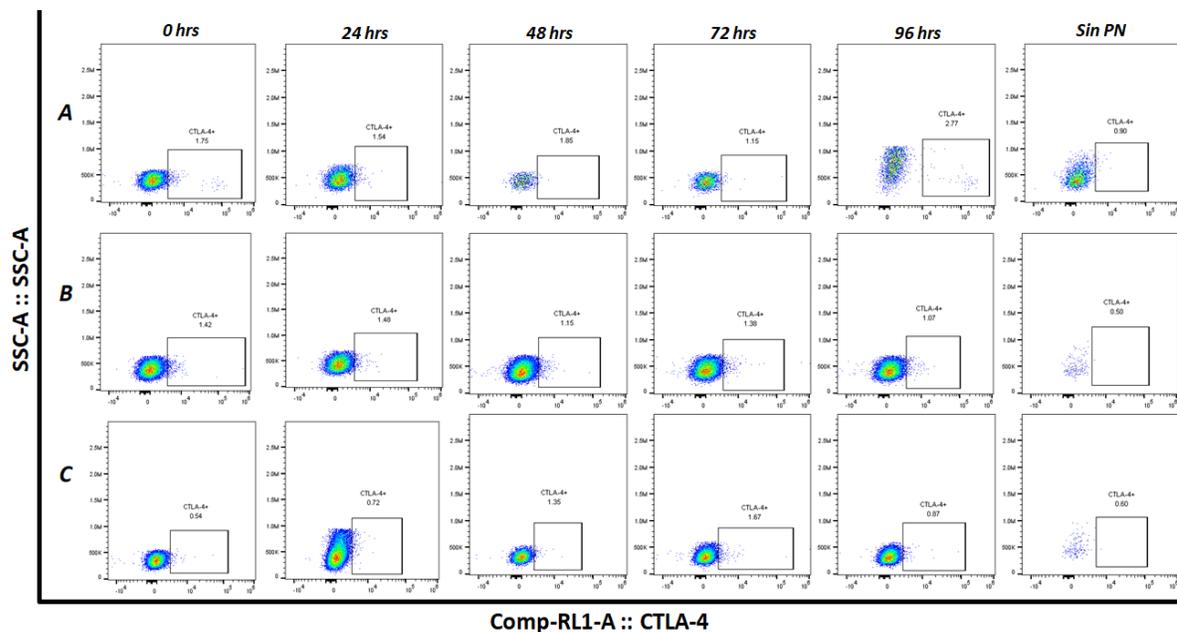


Figura 40. Expresión de CTLA-4 en linfocitos T con PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CTLA-4 de tres sujetos con 500ng/ml de PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.

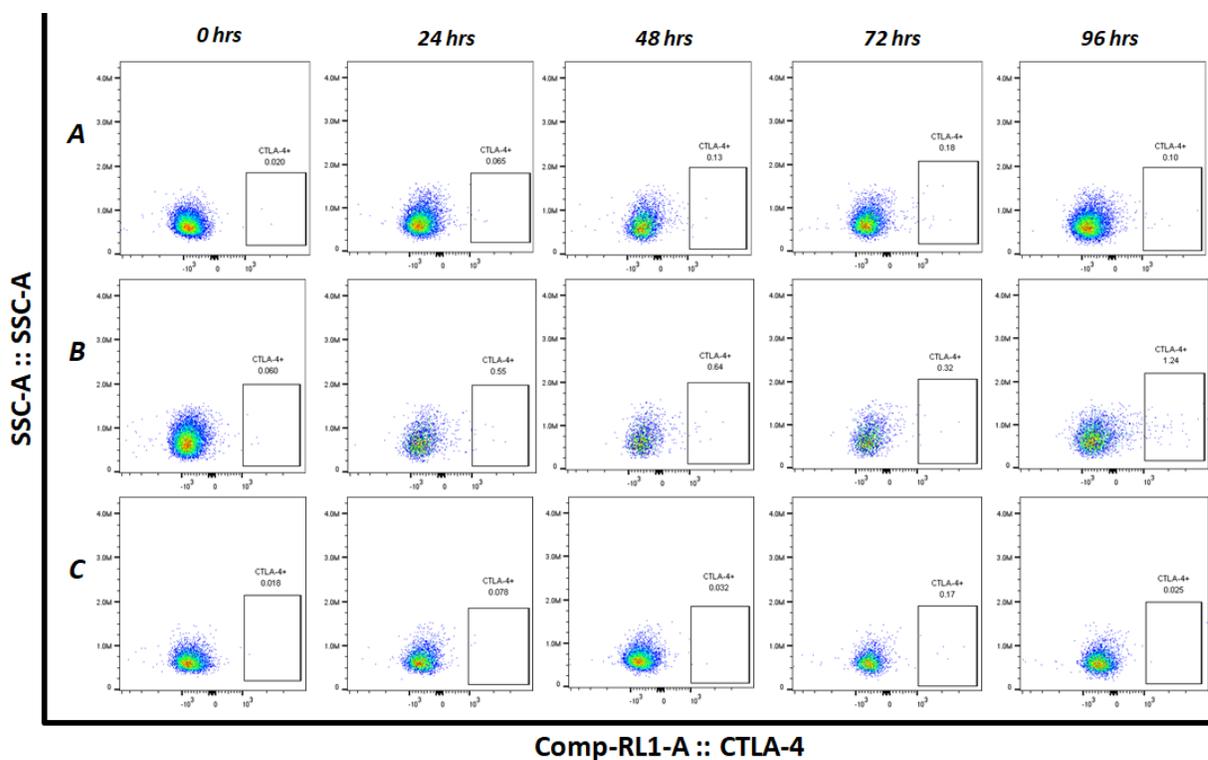


Figura 41. Expresión de CTLA-4 en linfocitos T sin PN. El análisis indica el efecto de la proteína núcleo (PN) en la expresión del marcador CTLA-4 de tres sujetos sin PN. A) Sujeto 1. B) Sujeto 2. C) Sujeto 3. Comp, compensación.