



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**REDES COMPLEJAS REGULADORAS EN EL ESTUDIO  
DE PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR DE  
LINFOCITOS T CD4**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**Ilean Zitlali Aguilar Elguea**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Carlos Villarreal Luján**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno:  
Aguilar  
Elguea  
Ilean Zitlali  
5573926207  
Universidad Nacional Autónoma de Mexico  
Facultad de Ciencias  
Biología  
312182083
2. Datos del Tutor:  
Dr.  
Carlos  
Villarreal  
Luján
3. Datos del sinodal 1:  
Dr.  
Pedro Eduardo  
Miramontes  
Vidal
4. Datos del sinodal 2:  
Dra.  
Leonor  
Huerta  
Hernández
5. Datos del sinodal 3:  
Dr.  
Enrique Salvador  
Buzo  
Córdova
6. Datos del sinodal 4:  
Dra.  
Nora Alma  
Fierro  
González

## AGRADECIMIENTOS.

A José Marcos Aguilar y Guillermina Elguea, sería imposible describir ahora todo por lo que les agradezco, lo son todo.

Al Dr. Carlos Villarreal por toda su guía, enseñanza y paciencia.

# CONTENIDO

I.	<b>CONTENIDO</b>	<b>4</b>
II.	<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
III.	<b>JUSTIFICACION, OBJETIVOS E HIPOTESIS</b>	<b>8</b>
1.	<b>JUSTIFICACION</b>	<b>8</b>
2.	<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
3.	<b>HIPOTESIS</b>	<b>10</b>
IV.	<b>SISTEMA INMUNE: FUNDAMENTOS.</b>	<b>11</b>
1.	<b>CELULAS T, SU DESARROLLO Y FUNCION EN EL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO.</b>	<b>11</b>
	Ontogenia de los linfocitos T.	11
	Desarrollo de células T.	13
	Desarrollo temprano de timocito.	14
	Etapas dobles negativo de los timocitos.	15
	Receptores TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$ de los timocitos.	16
	La selección $\beta$ de los timocitos DN	17
	Selecciones positiva y negativa.	18
	Compromiso de línea.	20
	Salida del timo y maduración final.	22
	Regulación negativa de respuestas inmunitarias por medio de las células Treg	22
	Activación, diferenciación y memoria de células T.	22
	Activación de célula T, y la hipótesis de las dos señales.	24
	Las citocinas proporcionan la señal 3.	26
	Los superantígenos son una clase especial de activadores de células T.	27
	Diferenciación de células T.	28
2.	<b>SUBTIPOS DE CELULAS T AUXILIARES.</b>	<b>30</b>
	La diferenciación de subgrupos de células auxiliares T está regulada por citocinas polarizantes.	31
	Th1.	33
	Th2.	34
	Th17.	34
	Treg.	35
	Regulación cruzada de Th1 y Th2.	37
	Regulación cruzada de Th17 y Treg.	39
	Las células T auxiliares quizá no queden comprometidas de manera irrevocable a una línea.	39

<b>3. MEMORIA DE CELULAS T.</b>	<b>39</b>
Las células T vírgenes, efectoras y de memoria despliegan amplias diferencias de la expresión de proteína de superficie.	40
Señales que inducen compromiso hacia célula de memoria	41
<b>4. CITOCINAS</b>	<b>41</b>
Importancia de las citocinas en la activación de subpoblaciones de células T específicas.	44
Receptores y moléculas de adhesión en la activación celular.	44
Interleucinas.	45
IL1	45
IL2	45
IL4	46
IL6	46
IL10	46
IL12	47
IL21	47
Interferones.	47
Factor de necrosis tumoral.	48
<b>5. MOLECULAS DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO Y COESTIMULATORIAS.</b>	<b>48</b>
Reconocimiento antigénico en el linfocito T.	48
Estructura del TCR.	49
CD3.	51
Señalización en los linfocitos T y B.	52
<b>6. MHC. Complejo mayor (principal) de histocompatibilidad y presentación de antígeno.</b>	<b>52</b>
Estructura de las moléculas clase II.	53
Interacción MHC clase II-péptido.	54
Función del MHC y patrones de expresión.	55
Células presentadoras de antígeno.	56
Emisión de señales mediada por citocina.	58
El procesamiento de antígeno.	58
Vías de procesamiento y presentación de antígeno.	59
La vía exógena de procesamiento y presentación de antígeno.	60
<b>V. SISTEMAS COMPLEJOS Y REDES REGULADORAS EN LA BIOLOGIA</b>	<b>64</b>
<b>1. SISTEMAS COMPLEJOS Y REDES REGULADORAS EN LA BIOLOGIA</b>	<b>64</b>
<b>2. REDES REGULADORAS COMPLEJAS: APROXIMACION DISCRETA BOOLEANA</b>	<b>64</b>
<b>3. CONCEPTOS BASICOS EN EL ESTUDIO DE REDES BOOLENAS</b>	<b>66</b>
<b>4. PROTOCOLO GENERAL PARA POSTULAR UN RRG</b>	<b>67</b>
<b>5. MAPEOS DINAMICOS DISCRETOS Y REDES REGULADORAS BOOLEANAS</b>	<b>69</b>

6. VALIDACION DEL RRG, ATRACTORES SIMULADOS VS. ATRACTORES ESPERADOS	70
7. ANALISIS DE MUTACIONES	72
8. ANALISIS DE ROBUSTEZ	72
9. REDES REGULADORAS CONTINUAS Y LOGICA DIFUSA	72
10. OBTENCION DE LA RED COMPLEJA DE INTERACCION DE ELEMENTOS MOLECULARES DE LINFOCITOS T	75
VI. <i>RESULTADOS</i>	77
1. <i>SUBTIPO Th1</i>	77
2. <i>SUBTIPO Th2</i>	78
3. <i>SUBTIPO Th17</i>	79
4. <i>SUBTIPO Treg</i>	81
VII. <i>DISCUSION</i>	85
1. <i>SUBTIPO Th1</i>	85
2. <i>SUBTIPO Th2</i>	85
3. <i>SUBTIPO Th17</i>	86
4. <i>SUBTIPO Treg</i>	86
VIII. <i>CONCLUSION</i>	88
IX. <i>ANEXO</i>	89
X. <i>BIBLIOGRAFIA</i>	92

## RESUMEN

En esta tesis se presentará un modelo matemático de la respuesta inmune basado en redes reguladoras complejas para estudiar las interrelaciones involucradas en los procesos de diferenciación de los linfocitos T CD4+ en respuesta a estímulos extra- e intracelulares derivada de la presencia de agentes patógenos en el organismo. En este marco, se investigarán, por un lado, los fenotipos inducidos por microambientes extracelulares determinados por las concentraciones relativas y diversas clases de citocinas; por otro lado, se estudiará la influencia de los tiempos de expresión característicos de componentes intracelulares involucrados en las vías de señalización, determinados por sus tasas de decaimiento, así como por parámetros que caracterizan la especificidad de las interacciones involucradas. Para ello, se consideró una red de interacciones celulares con reglas de interacción discretas definidas por una lógica Booleana, la cual fue extendida en este trabajo a un marco continuo basado en lógica continua difusa, y cuya dinámica está determinada por un conjunto de ecuaciones diferenciales acopladas. La influencia de los estímulos mencionados en la diferenciación celular fué estudiada mediante el análisis de los fenotipos finales resultantes tanto de la variación de las concentraciones iniciales de diversos elementos que componen la red, como de la variación de sus tasas de decaimiento y de parámetros de saturación que caracterizan la especificidad de las interacciones. El análisis permitió establecer un esquema teórico del grado de influencia relativa de los diferentes componentes involucrados en el complejo proceso de diferenciación de los linfocitos T CD4+.



# JUSTIFICACION, OBJETIVOS E HIPOTESIS

## JUSTIFICACION

La biología necesita de métodos cuantitativos potentes, simples (al menos en su manejo), robustos (capaces de operar bajo cambios significativos en los parámetros involucrados) y de carácter modular, permitiendo así añadir esquemas nuevos a modelos preestablecidos, de modo que la interconexión entre lo nuevo y lo viejo sea fácil. Así pues, la biología brinda a las matemáticas, la posibilidad de sumergirse en problemas profundos conducidos por el ímpetu de resolver y comprender problemas biológicos. Cabe observar que el desarrollo de grandes áreas de las Matemáticas en el siglo XX (como son la estadística, la teoría de ecuaciones diferenciales, etc.) se ha visto en gran medida estimulado, cuando no dirigido, por la necesidad de comprender fenómenos biológicos relevantes. (Herrero, 2011).

En este breve escrito se tratara de introducir a los sistemas complejos, específicamente a las redes complejas, que son de intima utilidad en el estudio de la biología, en particular; el sistema inmune adaptativo del ser humano, pues, las redes complejas ayudan a integrar y comprender las relaciones existentes en los procesos que regulan la diferenciación celular, sirviendo como herramienta para entender la dicotomía dinámica de los sistemas biológicos a través de la interacción de sus componentes, como son las propiedades de robustez y evolucionaridad que caracterizan a las células vivas.

La hipótesis de los subconjuntos de células T helper 1 (Th1) y Th2 defendidas por Mosmann y Coffman en la década de 1980, y otros desde entonces, proporcionó un marco para comprender cómo las células T CD4<sup>+</sup> dirigen diversas respuestas inmunitarias. Al examinar poblaciones clonales de células T CD4<sup>+</sup>, encontraron que diferentes clones expresaban patrones seleccionados de citocinas, principalmente interleucina 4 (IL 4) en células Th2 o interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) en células Th1, delineando así las células T CD4<sup>+</sup> en subconjuntos especializados sobre la base de las citocinas que producían y proporcionando un paradigma central de cómo las células T CD4<sup>+</sup> podrían vincularse a diferentes patologías o asociarse con el control de diferentes tipos de infección. Desde entonces, la amplitud de los subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> se ha ampliado, desde los subconjuntos de células Th1 y Th2 estudiados durante mucho tiempo, a una colección más amplia, que incluye células Th17, Th9 y células auxiliares foliculares T (TFH), así como células derivadas tímicamente y células T reguladoras inducidas periféricamente (células tTReg y células pTReg, respectivamente). Cada subconjunto de células T puede caracterizarse por su capacidad para detectar diferentes citocinas inductivas, programar la expresión de distintos factores de transcripción y funcionar produciendo citocinas seleccionadas y receptores de quimiocinas para controlar mejor patógenos específicos o prevenir patología inmunitaria (DuPage, 2016).

## OBJETIVOS

Estudiar la dependencia de la expresión de factores transcripcionales implicados en redes reguladoras complejas que conllevan a la diferenciación de subtipos celulares con la concentración, tasas de decaimiento y tasas de saturación de elementos promotores o inhibidores del factor, que constituyen el modelo matemático continuo obtenido a partir de las reglas de interacción de sus componentes, principalmente citocinas, que definen la red reguladora determinante para el desarrollo fenotípico de linfocitos T CD4+.

## HIPOTESIS

Los procesos de desarrollo celular de linfocitos T CD4+ pueden modelarse mediante redes reguladoras de interacciones de activación e inhibición de elementos celulares. Los patrones de expresión desarrollados pueden modificarse alterando los valores de concentración de agentes que definen el microambiente externo celular y los factores intrínsecos involucrados en vías de señalización, por medio de modelación continua.

# SISTEMA INMUNE: FUNDAMENTOS.

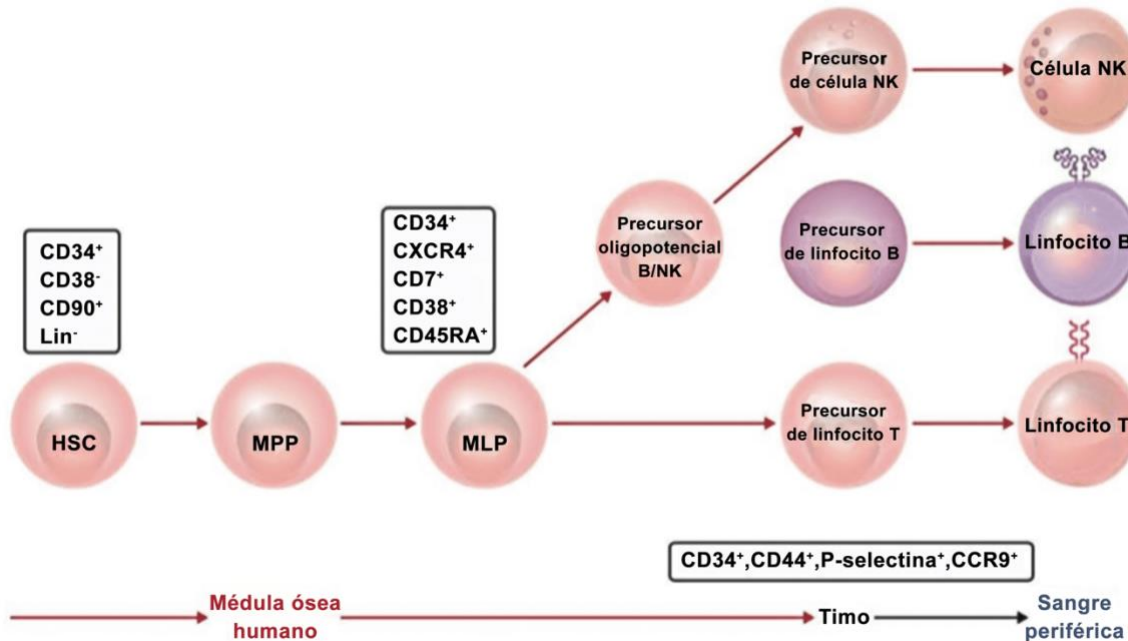
## CELULAS T, SU DESARROLLO Y FUNCION EN EL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO.

La respuesta inmune es una serie de reacciones que tienen lugar dentro de un organismo para identificar y eliminar agentes invasores foráneos. Dichos invasores constituyen una amplia gama de microorganismos tales como virus, bacterias, parásitos y hongos. Existen dos tipos diferentes de la respuesta inmune, denominados innato y adaptativo, que colaboran para desarrollar una respuesta protectora. La respuesta innata es rápida e inespecífica, y está dirigida a diversos tipos de patógenos que expresan motivos característicos en sus superficies, tales como carbohidratos y lípidos. Además de barreras físicas como la piel y las mucosas, la respuesta inmune innata involucra a los neutrófilos, macrófagos y monocitos, y factores solubles como el complemento y citocinas, las cuales funcionan como mensajeros químicos. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa es de carácter más lento, dado que está dirigida hacia antígenos específicos, con la consecuente dilación en la activación de sus componentes. Esta rama incluye elementos tales como las células dendríticas, linfocitos T CD4<sup>+</sup> (colaboradores o coadyuvantes) y T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos), así como linfocitos B y anticuerpos (inmunoglobulinas), los cuales interactúan directamente con los antígenos, dando lugar a una respuesta intensa y específica contra agentes invasores patógenos. La coordinación de los diferentes tipos de respuesta inmune está a cargo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Al efectuarse la respuesta inmune, las células T CD4<sup>+</sup> naive se diferencian en diversas clases de células T CD4<sup>+</sup> especializadas, de las cuales existen cuatro subtipos principales denotados por Th1, Th2, Th17 y Treg. Dichas células coadyuvan, respectivamente, al desarrollo de diferentes tipos de respuesta inmune: celular, humoral, inflamatoria y reguladora. El fenotipo adquirido y su respuesta asociada está determinado por el ambiente extracelular conformado por la presencia de diversas citocinas y la prevalencia de un tipo u otro de respuesta dependerá de los agentes patógenos específicos que dan lugar a ella.

### *ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS T.*

Todos los linajes y estados de diferenciación de linfocitos T provienen de un precursor hematopoyético común o HSC (del inglés *Hemopoietic Stem Cells* o célula troncal hematopoyética). Las HSC son células autorrenovables que a lo largo de la vida pueden dar lugar a todos los tipos de células sanguíneas, tanto de linaje linfóide como mieloide. En los mamíferos, después del nacimiento, la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea, donde las células estromales y los factores microambientales guían la diferenciación de progenitores linfóides a partir de las HSC. Cabe mencionar que en la etapa embrionaria estas HSC se encuentran en el saco vitelino, en donde ocurre la hematopoyesis en humanos a partir de la tercera semana de gestación, y que a partir de la quinta semana la hematopoyesis se da en el hígado fetal, por la aparente movilización de las HSC del saco vitelino al hígado. Según se mencionó, en mamíferos, las HSC se encuentran en la médula ósea después del nacimiento y se diferencian, en humanos, hacia un MPP (del inglés *Multipotent Progenitor*, o progenitor multipotencial), y de ahí a un MLP (del inglés *Multilymphoid Progenitor*, o progenitor multilinfoide). La fracción MLP se diferencia de manera directa hacia precursores T, o bien da lugar a progenitores oligopotenciales B/NK, los cuales darán origen a precursores B y

precursores NK. La diferenciación de todos estos precursores da lugar a linfocitos T, B o células NK (Figura 1).



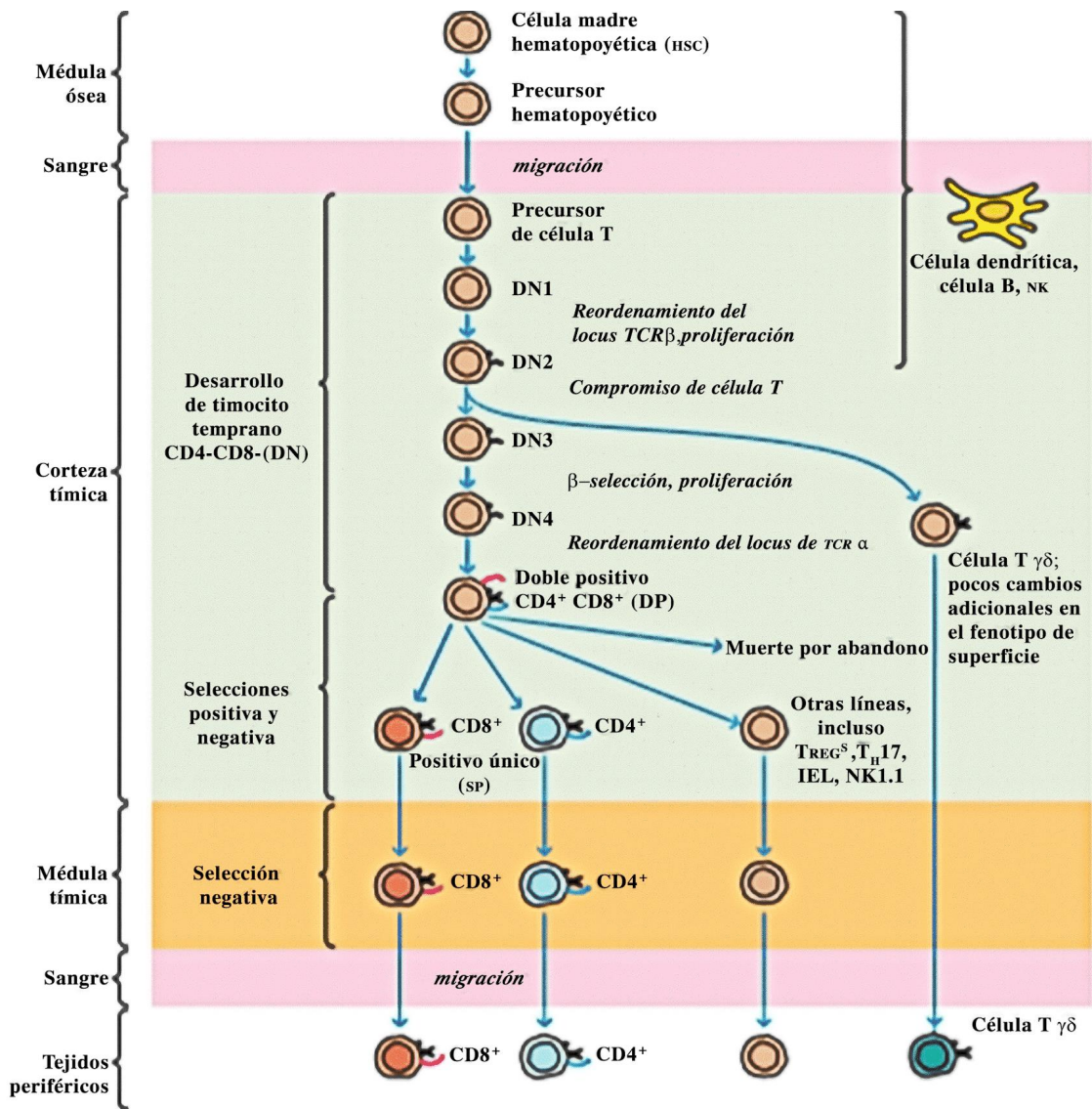
**FIGURA 1. Linfopoyesis en humano.** A partir de la célula troncal hematopoyética (HSC) se genera en médula ósea el progenitor multipotente (MPP) que dará origen, al diferenciarse, al progenitor multilineal (MLP), que da origen a los precursores de células T. Éstos se movilizan, vía sangre periférica, al timo y allí dan lugar a linfocitos T maduros que salen a circulación, donde algunos se mantienen y otros se dirigen a las zonas específicas de órganos linfoides secundarios. Tomado y modificado de Lenin, 2001.

No deben olvidarse ni soslayarse las diferencias en el fenotipo de los precursores linfoides de humano y de ratón, ya que esto revela diferencias en la funcionalidad y requerimientos para la diferenciación que impiden que varios de los hallazgos en los modelos de ratón se apliquen de forma directa en la hematopoyesis y linfopoyesis de humano. En el caso de los linfocitos T, los precursores migran de la médula ósea hacia el timo, un órgano linfóide primario en el que se da el proceso de maduración. En ratón se han encontrado en la sangre periférica tanto LMPP, CLP y ELP, lo que sugiere que éstos son los precursores que viajan de la médula al timo por la circulación sanguínea. Esta migración de médula ósea al timo requiere de la expresión de CD44, P-selectina o CD62p y CCR9. En ratón, los progenitores linfoides de médula capaces de colonizar el timo son LMPP y ELP, mismos que producen ETP (del inglés Early Thymocytes Progenitors, o progenitores tempranos de timocitos); al diferenciarse, los ETP dan lugar a los timocitos. Al inicio, estos timocitos se caracterizan por ser CD4-CD8-, aunque después dan lugar a células CD4+CD8+ y cuando maduran se vuelven CD4+ o CD8+. En humanos se han encontrado progenitores multipotenciales comunes que expresan el antígeno de superficie CD34 y que, como el ratón, expresan el receptor de quimiocinas CXCR4, CD7, CD38, CD45RA y la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal, o TdT, encargada de generar mutaciones puntuales. En humanos los ETP pertenecen al grupo de células con el fenotipo CD34+CD1a-CD381-CD44+IL-7R+. La importancia de IL7 en el desarrollo de linfocitos T se hace evidente en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave que poseen mutaciones en el gen para la cadena y del receptor de IL7. Por otro lado, hace poco se describió que los factores de transcripción resultan primordiales en diferentes estadios de la linfopoyesis. De hecho, es posible seguir

estos procesos de linfopoyesis de acuerdo con los factores de transcripción involucrados. La linfopoyesis temprana depende de Ikaros y PU.1, que permiten la expresión de Flt3, mientras que los factores de la familia Notch median la decisión de linaje T /B (Lenin, 2001).

#### *DESARROLLO DE CÉLULAS T.*

Las células T inician la respuesta inmunitaria adaptativa al interactuar, por medio de sus receptores de célula T, con complejos de MHC/péptido sobre células presentadoras de antígeno que han quedado expuestas a agentes patógenos. El rango de agentes patógenos a los cuales el ser humano queda expuesto es considerable, y los vertebrados han adquirido por evolución un extraordinario mecanismo para generar un rango comparable de especificidades de receptor de célula T (y de célula B). Cada uno de los varios millones de células T que circulan en el organismo expresa un receptor de célula T distinto. La generación de esta población diversa, con su repertorio de receptores diverso, tiene lugar en el timo, un órgano que se requiere para el desarrollo de células T, y que está dedicado a dicho desarrollo. Las células inmaduras que entran al timo provenientes de la médula ósea no expresan características de linfocito maduro, y no expresan receptores de antígeno; los que salen del timo son células T maduras que son diversas en sus especificidades de receptor, y son tolerantes a lo propio y están restringidas a MHC propio. El timo es propiamente el órgano que genera linfocitos T maduros. En este órgano linfoide primario dichas células adquieren sus moléculas clásicas, que incluyen TCR, CD3, CD2 y CD4 o CD8. En el timo también se da una primera ronda de selección de células autorreactivas, cuya eliminación es indispensable para evitar enfermedades autoinmunes. Lo anterior se conoce como educación tímica e incluye la selección positiva y la selección negativa.



**FIGURA 2. Desarrollo de células T en ratón.** Los precursores de célula T provenientes de la médula ósea viajan hacia el timo mediante el torrente sanguíneo, se desarrollan hacia células T maduras, y son exportados a la periferia, donde pueden pasar por activación y diferenciación hacia células efectoras y células de memoria, inducidas por antígeno. Cada etapa de desarrollo ocurre en un microambiente específico, y se caracteriza por eventos intracelulares específicos y marcadores de superficie celular distintivos. Los timocitos más inmaduros son CD4-CD8-(doble negativo, DN) y pasan por varias etapas (DN1 a DN4) durante las cuales se comprometen a la línea de células T y empiezan a reordenar sus loci de gen que codifica para receptor de célula T (TCR). Los que reordenan exitosamente su cadena TCR $\beta$  proliferan, inician el reordenamiento de sus cadenas TCR $\alpha$ , y se convierten en timocitos CD4+CD8+ (doble positivo, DP), que dominan el timo. Los timocitos DP pasan por selecciones negativa y positiva en la corteza del timo. Los timocitos seleccionados de manera positiva siguen madurando y migran hacia la médula, donde quedan sujetos a otra ronda de selección negativa contra antígenos propios que incluyen proteínas específicas para tejido. Las células T maduras expresan CD4 o CD8 (positivo único, SP) y salen del timo con el potencial de iniciar una respuesta inmunitaria. Si bien casi todos los timocitos se desarrollan hacia células T CD4+ o CD8+ TCR $\alpha\beta$  convencionales, algunas células timocito DN y DP se desarrollan hacia otras líneas de células, entre ellas células dendríticas linfoides, células T TCR $\gamma\delta$ , células T asesinas naturales (NKT), células T reguladoras (TREG), y linfocitos intraepiteliales (IEL), cada una de las cuales tiene una función distinta. Tomado modificado de Kuby, 2013.

#### DESARROLLO TEMPRANO DE TIMOCITO.

El desarrollo temprano de timocito es independiente de receptor de célula T, y lleva a células a través de etapas CD4-CD8- (doble negativo, DN) no comprometidas hasta la etapa

CD4+CD8+ (doble positivo, DP) que expresa receptor de célula T. Los eventos específicos en esta etapa temprana comprenden:

1. Compromiso de precursores hematopoyéticos a la línea de células T.
2. El inicio de reordenamientos de gen que codifica para receptor de antígeno, y
3. La selección y expansión de células que han reordenado exitosamente uno de sus genes que codifican para receptor de célula T (selección  $\beta$ ).

La segunda fase del desarrollo de células T depende en su mayor parte de interacciones con receptor de células T, y conduce a las células a la madurez desde las etapas CD4+CD8+ hasta la etapa CD4+ o CD8+ positivo único (SP). Los eventos en esta última fase de desarrollo comprenden:

1. Selección positiva, selección para las células cuyos receptores de célula T muestran respuesta a MHC propio,
2. Selección negativa, selección contra las células cuyos receptores de célula T reaccionan fuertemente a combinaciones de péptido/MHC propio, y
3. Compromiso de línea, compromiso de timocitos a líneas de células efectoras, entre ellas poblaciones auxiliares CD4+ o citotóxicas CD8+.

El entendimiento del desarrollo de células T ayuda a tener en mente el propósito fundamental del proceso: generar una población grande de células T que expresen una gama diversa de especificidades de receptor que puedan interactuar con MHC propio, pero que no muestren respuesta a proteínas propias.

El desarrollo de célula T ocurre en el timo y empieza con la llegada de pequeños números de precursores linfoides que migran desde la médula ósea y la sangre hacia el timo, donde proliferan, se diferencian, y pasan por procesos de selección que dan lugar al desarrollo de células T maduras. La identidad precisa del precursor celular de la médula ósea que da lugar a células T aún es motivo de debate. Sin embargo, está claro que este precursor, que es dirigido hacia el timo por medio de receptores de quimiocina, retiene el potencial para dar lugar a más de un tipo de célula, aun células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC), células B, e incluso células mieloides. Este precursor sólo queda por completo comprometido a la línea de células T al final de la etapa DN2 del desarrollo de células T. Diversos estudios revelan que el compromiso hacia la línea de células T dependió de un receptor, Notch, que clásicamente se ha asociado con el desarrollo de células embrionarias. De hecho, Notch regula la decisión de un precursor linfocito de convertirse en un linfocito T en contraposición con uno B. Zuniga-Pflucker y colaboradores demostraron que las células T podían ser inducidas para que se desarrollaran cuando células madre de la médula ósea se cultivaban en una línea de células del estroma que expresaba un ligando para Notch. El crecimiento de células madre hematopoyéticas (HSC) sobre células del estroma que expresan ligando Notch impulsa el desarrollo de estas células madre multipotentes hacia la línea de células T. Este sistema de ensayo ha sido inestimable para definir interacciones que controlan el desarrollo temprano de células T, y ha ayudado a los investigadores a revelar, por ejemplo, que el factor de transcripción GATA-3 es un participante crucial en el compromiso hacia células T mediado por Notch (Kuby, 2013).

#### *ETAPAS DOBLES NEGATIVO DE LOS TIMOCITOS.*

El desarrollo de células T está muy bien organizado desde los puntos de vista espacial y temporal. Diferentes etapas de desarrollo tienen lugar en distintos microambientes que proporcionan señales unidas a membrana y solubles que regulan la maduración. Después de



llegar al timo provenientes de la médula ósea por medio de vasos sanguíneos en la frontera corticomedular, los precursores de célula T encuentran ligandos Notch, que son expresados en abundancia por el epitelio tímico. Recuerde que los precursores de célula T primero viajan a la corteza externa, donde proliferan lentamente, después pasan por la médula del timo antes de salir en la unión corticomedular. Durante el tiempo que tardan las células en desarrollarse en el timo (una a tres semanas), los timocitos pasan por una serie de etapas definidas por cambios en su fenotipo de superficie (figura 2). Las células T más tempranas carecen de CD4 y CD8 detectable y, por ende, se denominan células doble negativo (DN). Las células T DN pueden subdividirse en cuatro subgrupos (DN1 a DN4) con base en la presencia o ausencia de otras moléculas de superficie celular, entre ellas c-kit (CD117), el receptor para factor de crecimiento de células madre; CD44, una molécula de adhesión, y CD25, la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2 (Tabla 1). Los timocitos DN1 son los primeros en entrar al timo, y aún son capaces de dar lugar a múltiples tipos de células. Sólo expresan c-kit y CD44 (c-kit<sup>++</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), pero una vez que encuentran el ambiente del timo y se hacen residentes en la corteza, proliferan y expresan CD25, con lo cual se convierten en timocitos DN2 (c-kit<sup>++</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). Durante esta etapa crucial del desarrollo, los genes que codifican para las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$  de TCR empiezan a reordenarse; empero, el locus TCR $\alpha$  no se reordena, probablemente porque la región de DNA que codifica para los genes que codifican para TCR $\alpha$  todavía no está accesible a la maquinaria de recombinasa. En la etapa de DN2 tardía, los precursores de célula T se comprometen por completo a la línea de células T y reducen la expresión tanto de c-kit como de CD44. Las células en la transición desde las etapas DN2 a DN3 (c-kit<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) continúan el reordenamiento de las cadenas TCR $\gamma$ , TCR $\delta$  y TCR $\beta$ , y toman la primera decisión importante en el desarrollo de células T: si se unen a la línea de células T TCR $\gamma\delta$  o TCR $\alpha\beta$ . Las células T DN3 que reordenan exitosamente su cadena  $\beta$  y, por ende, se comprometen a la línea de células T TCR $\alpha\beta$ , pierden la expresión de CD25, suspenden la proliferación, y entran a la fase final de su etapa de desarrollo DN, DN4 (c-kit<sup>bajo</sup>/<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), que maduran directamente hacia timocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP (Kuby, 2013)

#### *RECEPTORES TCR $\alpha\beta$ O TCR $\gamma\delta$ DE LOS TIMOCITOS.*

Los vertebrados generan dos categorías amplias de células T: las que expresan cadenas de receptor TCR $\alpha$  y  $\beta$ , y las que expresan cadenas de receptor TCR $\gamma$  y  $\delta$ . Las células TCR $\alpha\beta$  son los participantes dominantes en la respuesta inmunitaria adaptativa en órganos linfoides secundarios; con todo, las células TCR $\gamma\delta$  también desempeñan un papel importante, particularmente en la protección de los tejidos mucosos contra infección externa. Ambos tipos de células son generados en el timo. En gran parte, la elección de convertirse en una célula T  $\gamma\delta$  o  $\alpha\beta$  es dictada por cuándo y qué tan rápido los genes que codifican para cada una de las cuatro cadenas de receptor se reordenan exitosamente. Recuérdese que los genes que codifican para TCR son generados por el barajado (reordenamiento) de los segmentos V y J (y a veces D), lo cual se encarga de la vasta diversidad de especificidades de receptor. El reordenamiento de los locus  $\alpha\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  empieza durante la etapa DN2. Para convertirse en una célula T  $\alpha\beta$ , una célula debe generar una cadena TCR $\beta$ , lo que depende de un reordenamiento VDJ dentro de marco único. Aun así, para convertirse en una célula  $\gamma\delta$ , un timocito debe generar dos proteínas funcionales que dependen de dos eventos de reordenamiento dentro de marcos separados. Probablemente favorece el primer destino mencionado y, de hecho, las

células T tienen al menos tres veces más probabilidades de convertirse en células TCR $\alpha\beta$  que en células TCR $\gamma\delta$  (Kuby, 2013).

#### LA SELECCIÓN B DE LOS TIMOCITOS DN

Los timocitos doble negativo (DN) que han reordenado exitosamente sus cadenas TCR $\beta$  son valiosos, y son identificados y expandidos por un proceso que se conoce como selección  $\beta$  (figura 2). Este proceso involucra una proteína que es expresada de manera singular a esta etapa del desarrollo, una glucoproteína invariante de 33 kDa conocida como la cadena pre-T $\alpha$ . Pre-T $\alpha$  actúa como un sustituto para la cadena TCR $\alpha$  real, que todavía tiene que reordenarse, y se monta con una cadena  $\beta$  reordenada y traducida exitosamente, así como proteínas del complejo CD3. Este complejo TCR/CD3 precursor se conoce como el pre-TCR y actúa como un detector para iniciar una vía de transducción de señal. La señalización que el complejo pre-TCR inicia es dependiente de muchas de las mismas cinasas específicas para célula T usadas por un TCR maduro, pero no parece ser dependiente de unión a ligando. De hecho, poco del complejo se expresa sobre la superficie celular, si es que se expresa algo; más bien, el montaje exitoso del complejo puede ser suficiente para activar los eventos de señalización. La emisión de señales de pre-TCR da lugar a la cascada de eventos que siguen:

1. Maduración a la etapa DN4 (c-kitbajo/–CD44–CD25–)
2. Proliferación rápida en la corteza subcapsular
3. Supresión de reordenamiento adicional de genes que codifican para cadena  $\beta$  de TCR, lo que da lugar a exclusión alélica del locus de la cadena  $\beta$
4. Desarrollo hacia la etapa CD4+CD8+ doble positivo (DP)
5. Cese de la proliferación
6. Inicio del reordenamiento de cadena TCR $\alpha$

Tiene importancia notar que la fase proliferativa antes de reordenamiento de la cadena  $\alpha$  aumenta considerablemente la diversidad de receptor al generar clonas de células con el mismo reordenamiento de cadena  $\beta$  de TCR. Cada una de las células dentro de una clona a continuación puede reordenar un gen que codifica para cadena  $\alpha$  diferente, lo que genera así una población aún más diversa que si la célula original hubiera pasado por reordenamiento en los loci de la cadena  $\beta$  y de la cadena  $\alpha$  antes de proliferación. El reordenamiento del gen que codifica para cadena  $\alpha$  de TCR no empieza sino hasta que timocitos doble positivo dejan de proliferar. Casi todas las células T reordenan por completo y expresan una cadena TCR $\beta$  proveniente de sólo uno de sus dos alelos de TCR fenómeno conocido como exclusión alélica.

Genotipo		Ubicación	Descripción
DN1	c-kit (CD117)++,CD44+,CD25-	De la médula ósea al timo	Migración al timo.
DN2	c-kit (CD117)++,CD44+,CD2+	Corteza subcapsular	Reordenamiento de cadena TCR $\gamma$ , $\delta$ y $\beta$ ; compromiso hacia línea de células T.

DN3	c-kit (CD117)+, CD44-, CD25+	Corteza subcapsular	Expresión de pre-TCR; selección $\beta$ .
DN4	c-kit (CD117)low/ CD44-, CD25-	De la corteza subcapsular a la corteza	Proliferación, exclusión alélica de locus de cadena $\beta$ ; empieza el reordenamiento del locus de cadena $\alpha$ ; se convierte en timocito DP.

**Tabla 1. Desarrollo de timocito doble negativo.** Tomado y modificado de Kuby, 2013.

Una vez que un timocito doble positivo (DP) joven reordena y expresa exitosamente una cadena TCR $\alpha$ , esta cadena se asociará con la cadena TCR $\beta$  ya producida, y tomará el lugar de la cadena pre-TCR $\alpha$  sustituto, que ya no es expresada de manera activa. En este punto, el timo ha alcanzado varias “metas”: los precursores de células hematopoyéticas se han expandido en la corteza subcapsular, se han comprometido a la línea de células T, y reordenado un grupo de genes que codifican para TCR. También han “elegido” convertirse en una célula T TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$ . Esta población TCR $\alpha\beta$  ahora expresa tanto CD4 como CD8, y está lista para la segunda etapa del desarrollo de célula T: la selección (Kuby, 2013).

#### SELECCIONES POSITIVA Y NEGATIVA.

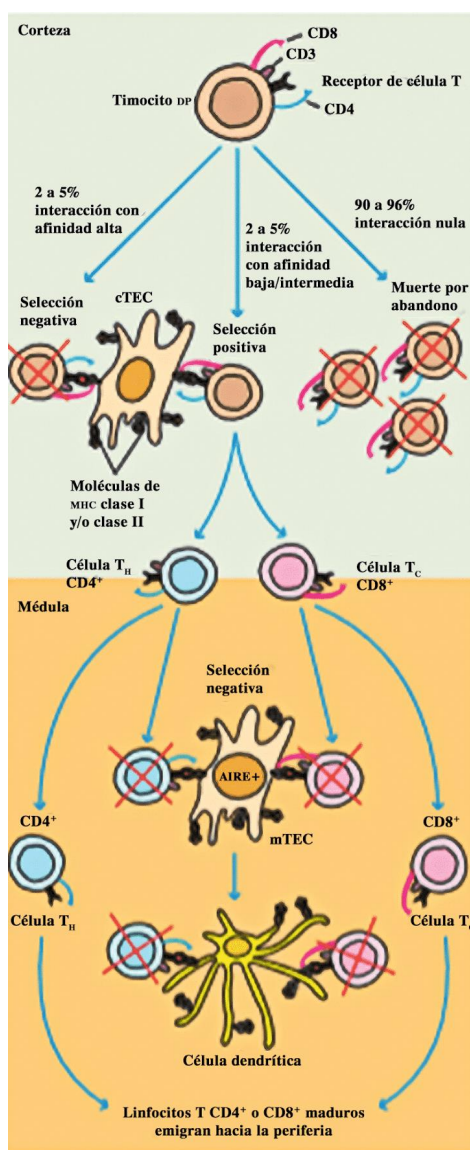
Los timocitos CD4+CD8+ (DP), células pequeñas que no proliferan y que residen en la corteza del timo, son la subpoblación más abundante en el timo; comprende más de 80% de las células. Lo que es más importante, son la primera subpoblación de timocitos que expresan un complejo TCR $\alpha\beta$ /CD3 de superficie por completo maduro y, por ende, son los blancos primarios de la selección tímica (figura 2). La selección tímica conforma el repertorio de TCR de timocitos DP con base en la afinidad de sus receptores de célula T por los MHC/péptidos que encuentran conforme recorren la corteza tímica.

¿Por qué es necesaria la selección tímica? La propiedad más distintiva de las células T maduras es que sólo reconocen antígeno extraño combinado con moléculas de MHC propias; sin embargo, TCR generados al azar ciertamente no tendrán afinidad inherente por “antígeno extraño más moléculas de MHC propias”. Podrían simplemente también reconocer combinaciones de MHC/péptido extrañas, lo cual no sería útil, o combinaciones de MHC propio/péptido propio, lo cual podría ser peligroso. Se requieren dos procesos de selección distintos:

- Selección positiva, que selecciona para aquellos timocitos que portan receptores capaces de unirse a moléculas de MHC propias, lo que da lugar a restricción a MHC.
- Selección negativa, que selecciona contra timocitos que portan receptores de alta afinidad para complejos de MHC/péptido propios, lo que da lugar a autotolerancia.

Dado que sólo péptidos propios son presentados en el timo, y sólo en asociación con moléculas de MHC propias, estos dos procesos de selección aseguran que los timocitos sobrevivientes expresen TCR que tengan afinidad baja por péptidos propios en MHC propio. Por otro lado, los procesos no aseguran que las células T generadas portarán receptores con afinidad alta por cualquier combinación específica de MHC propio/péptido extraño. La capacidad del sistema inmunitario para mostrar respuesta a un antígeno extraño depende de la probabilidad de que una de los millones de células T que sobreviven a la selección se unirá a una de las muchas combinaciones de MHC/péptido expresadas por una célula presentadora

de antígeno que ha procesado proteínas patógenas fuera del timo. Casi todos los timocitos DP (~ 98%) nunca satisfacen los criterios de selección, y mueren por apoptosis dentro del timo (figura 3). La mayor parte de las muertes de timocitos DP (~ 95%) ocurre entre timocitos que fracasan en la selección positiva porque sus receptores no reconocen de manera específica moléculas de MHC propias. Estas células no reciben señales de supervivencia por medio de sus TCR, y mueren mediante un proceso conocido como muerte por abandono. Un pequeño porcentaje de células (2 a 5%) es eliminado por medio de selección negativa. Sólo 2 a 5% de los timocitos DP en realidad sale del timo como células T maduras.



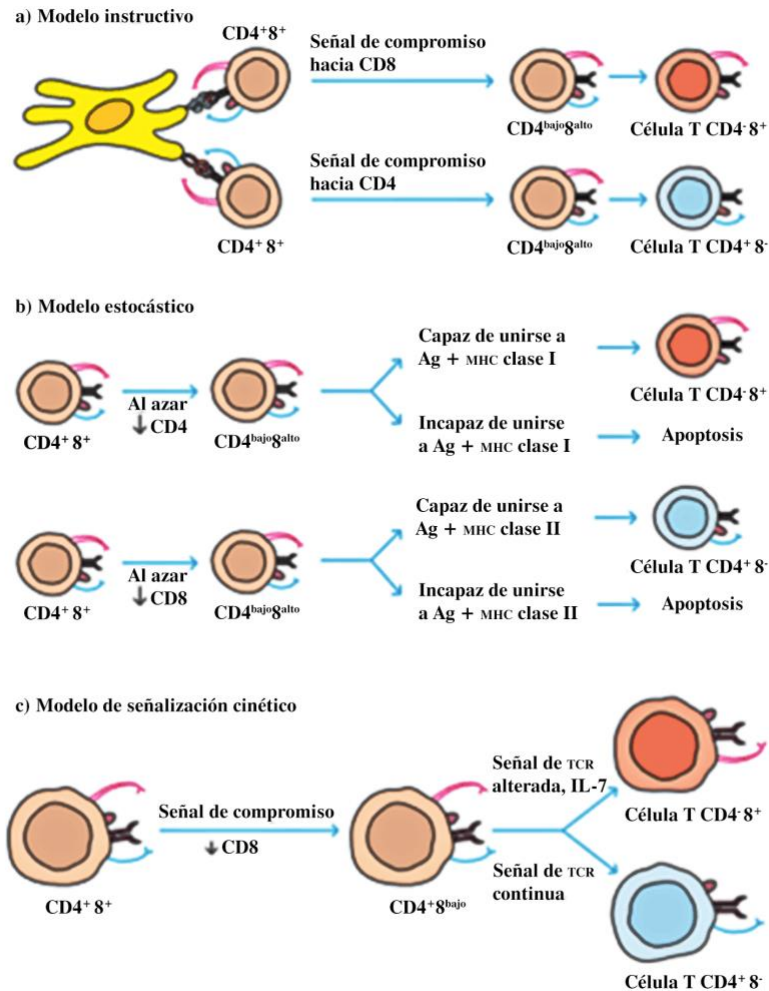
**FIGURA 3. Selección positiva y negativa de timocitos en el timo.** La selección tímica involucra múltiples interacciones de timocitos DP y SP con las células de estroma tímicas tanto corticales como medulares, así como células dendríticas y macrófagos. La selección da lugar a una población de células T maduras que está restringida a MHC propio y es autotolerante. Los timocitos DP que expresan nuevos dímeros TCR $\alpha\beta$  recorren los complejos de MHC/péptido expresado por las células epiteliales tímicas corticales (cTEC). Casi todos los timocitos DP mueren en la corteza por abandono debido a su fracaso para unirse con suficiente afinidad a combinaciones de MHC/péptido. El pequeño porcentaje cuyos TCR se unen a MHC/péptido con afinidad alta muere por selección negativa. Los timocitos DP cuyos receptores

se unen a MHC/péptido con afinidad intermedia son seleccionados de manera positiva y maduran hacia linfocitos T positivo único (CD4+ o CD8+). Éstos migran hacia la médula, donde quedan expuestos a Células Epiteliales Tímicas Medulares (mTEC) AIRE+, que expresan antígenos específicos para tejido y pueden mediar selección negativa. Las células dendríticas medulares pueden adquirir antígenos mTEC al fagocitar mTEC, y median selección negativa (en particular de timocitos CD4+ restringidos a MHC clase II). *Tomado y modificado de Kuby, 2013.*

La evidencia temprana del papel del timo en la selección del repertorio de células T provino de experimentos en ratones quiméricos efectuados por R. M. Zinkernagel y colaboradores, en los cuales notaron que el haplotipo de MHC del timo en el cual las células T se desarrollan, determina su restricción a MHC. Las células T “aprendieron” a cuál haplotipo de MHC están restringidas durante sus primeros días en el timo. Si bien alguna vez se hizo referencia a este proceso como “educación de célula T”, ahora se sabe que es la consecuencia de un proceso de selección brutal (Kuby, 2013).

#### *COMPROMISO DE LÍNEA.*

A medida que los timocitos están siendo tamizados con base en su afinidad de TCR por antígenos propios, también están siendo guiados en sus decisiones de línea. De manera específica, un timocito doble positivo seleccionado de manera positiva debe decidir si va a unirse a la línea de células T citotóxicas CD8+ o a la línea de células T auxiliares CD4+. El compromiso de línea requiere cambios de la organización genómica y la expresión de gen que dan por resultado 1) silenciamiento de un gen que codifica para correceptor (CD4 o CD8), así como 2) expresión de genes asociados con una función de línea específica. Se han propuesto varios modelos para explicar el compromiso de línea, lo que brevemente se explica en la siguiente imagen:



**FIGURA 4. Modelos propuestos de compromiso de línea, la decisión de timocitos doble positivo para convertirse en células T CD4<sup>+</sup> auxiliares o CD8<sup>+</sup> citotóxicas.** a) De acuerdo con el modelo instructivo, la interacción de un correceptor con la molécula de MHC para la cuál es específico da lugar a regulación descendente del otro correceptor. b) De acuerdo con el modelo estocástico, la regulación descendente de CD4 o CD8 es un proceso al azar. c) De acuerdo con el modelo de señalización cinético, la decisión de comprometerse hacia la línea CD4 o CD8 se basa en la continuidad de la señal de TCR que un timocito recibe. La selección positiva da lugar a regulación descendente de CD8 en todos los timocitos. Esto no altera la intensidad de una señal de TCR/CD4/MHC clase II, y las células que reciben esta señal continuarán el desarrollo hacia la línea SP CD4. Empero, la regulación descendente de CD8 disminuye (interrumpe) una señal de TCR/CD8/MHC clase I, una experiencia que envía una célula hacia la línea CD8. Se requieren señales de IL-17 para "sellar" el compromiso hacia la línea CD8. *Tomado y modificado de Kuby, 2013*

A últimas fechas se han identificado factores de transcripción que regulan de manera específica el desarrollo hacia la línea CD4 y CD8. En la actualidad, Pok y Runx3 están desempeñando un papel protagónico como factores transcripcionales requeridos para el compromiso CD4 y CD8, respectivamente, aunque otros también participan. Los timocitos dobles positivo pueden comprometerse hacia otros tipos de linfocitos. Poblaciones pequeñas de timocitos DP también se comprometen hacia otros tipos de célula T, incluso las líneas de célula T NK, célula T reguladora, y linfocito epitelial (iel) (Kuby, 2013).

### *SALIDA DEL TIMO Y MADURACIÓN FINAL.*

Una vez que un timocito pasa exitosamente por selección y toma una decisión de línea, entra a un estado quiescente y sale del timo. Además del CCR7 (receptor de migración), existen otros receptores que controlan la salida desde el timo, el mayor estudiado es el receptor de esfingosina-1-fosfato (s1pr). Observaciones actuales sugieren que una cascada de eventos controla estas etapas finales de la maduración: las señales de TCR que seleccionan de manera positiva regulan en dirección ascendente Foxo1, un factor de transcripción que controla la expresión de varios genes relacionados con la función de célula T. Foxo1 regula la expresión de Klf2, que, a su vez, regula en dirección ascendente s1pr. Foxo1 también regula tanto el IL-7R, que ayuda a mantener la supervivencia de células T maduras, como CCR7, el receptor de quimiocina que dirige el tráfico de células T maduras hacia los ganglios linfáticos. Las células T maduras que salen del timo se denominan emigrantes tímicos recientes (RTE). Ahora está claro que los emigrantes tímicos recientes no son tan funcionalmente maduros como casi todas las células T vírgenes en la periferia (Kuby, 2013).

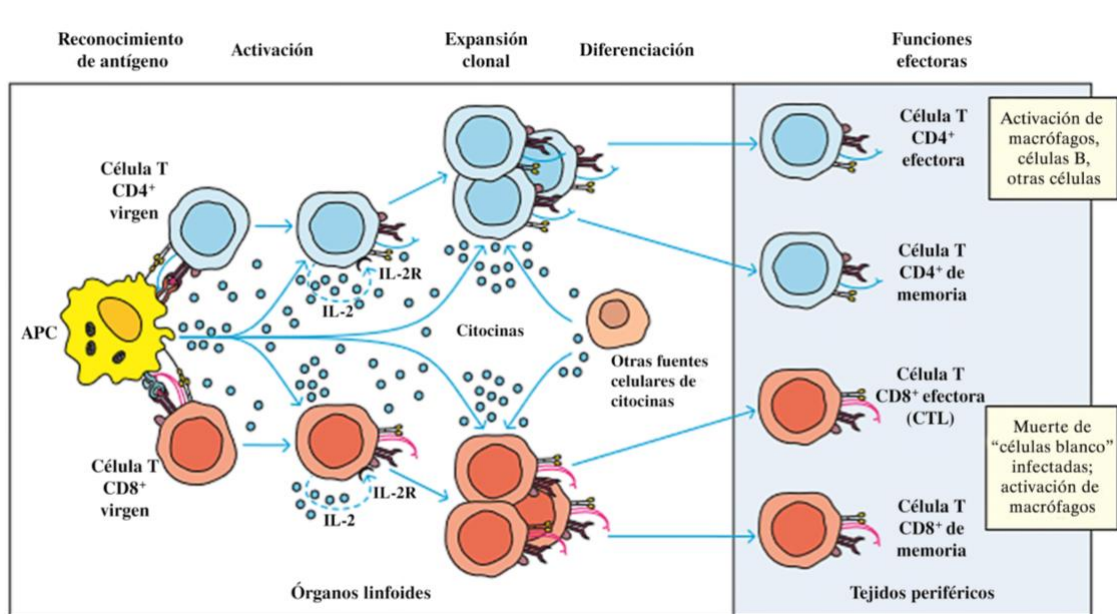
### *REGULACIÓN NEGATIVA DE RESPUESTAS INMUNITARIAS POR MEDIO DE LAS CÉLULAS TREG*

Las células T reguladoras (células Treg) pueden inhibir la proliferación de otras poblaciones de células T in vitro, lo que suprime con eficacia respuestas inmunitarias autorreactivas. Expresan sobre su superficie CD4, así como CD25, la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2. Empero, las células Treg son identificadas de manera más definitiva por su expresión de un regulador transcripcional maestro, FoxP3, cuya expresión es necesaria y suficiente para inducir diferenciación hacia la línea Treg. Las células Treg pueden desarrollarse en el timo, y parecen representar un destino alternativo para células T autorreactivas. Como se ha observado, casi todos los timocitos que expresan receptores con afinidad alta por antígeno propio mueren por selección negativa. Con todo, una pequeña fracción parece comprometerse a la línea de células T reguladoras, y sale del timo para recorrer el organismo e impedir reacciones autoinmunitarias. Investigación reciente sugiere que las Treg se desarrollan en un nicho microambiental singular dentro del timo, y que el espacio disponible para células en desarrollo en este nicho es limitado. Estos datos sugieren que los timocitos que se comprometen hacia la línea de células T reguladoras tienen probabilidades de recibir señales estimuladoras únicas. Estas Treg naturales comparten la periferia con Treg inducidas que pueden desarrollarse a partir de células T maduras convencionales que son expuestas a citocinas TGF $\beta$  e IL10 (Kuby, 2013).

### *ACTIVACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y MEMORIA DE CÉLULAS T.*

La interacción entre una célula T virgen y una célula presentadora de antígeno (APC) es el evento iniciador de la respuesta inmunitaria adaptativa. Antes de esto, el sistema inmunitario innato ha sido avisado en el sitio de infección o de daño de tejido, y las APC, típicamente células dendríticas, han sido activadas por medio de sus receptores de reconocimiento de patrones. Estas células pueden haber fagocitado agentes patógenos extracelulares (u opsonizado agentes patógenos intracelulares), o pueden haber sido infectadas por un agente patógeno intracelular. En uno u otro caso, han procesado y presentado péptidos provenientes de estos agentes patógenos en complejo con moléculas de superficie del MHC clase I y clase II, y han llegado a un ganglio linfático local (de drenaje), y/o al bazo. Las APC se han quedado a residir en las zonas de células T del ganglio linfático o el bazo para unirse a redes

de otras células que son examinadas continuamente por células T CD8+ y CD4+ vírgenes ambulantes. Se ha observado que cada célula T madura expresa un receptor de antígeno singular que ha sido montado por medio de reordenamiento de gen al azar durante el desarrollo de la célula T en el timo. Puesto que las células T en desarrollo pasan por eventos de selección dentro del timo, cada célula T virgen, madura, es tolerante a antígenos propios, y está restringida a MHC propio. Algunas células T vírgenes se han comprometido a la línea de células T citotóxicas CD8+, y algunas a la línea de células T auxiliares CD4+. Cuando una célula T CD8+ o CD4+ virgen se une estrechamente a un complejo de MHC-péptido expresado por una célula dendrítica activada, queda activada por señales generadas por medio del TCR. Estas señales, conjuntamente con señales provenientes de otros factores, estimulan a las células T para que proliferen y se diferencien hacia una célula efectora. Las células T CD4+ vírgenes se convierten en células auxiliares en respuesta a unión de combinaciones de MHC clase II-péptido (figura 5). Las células T CD4+ pueden diferenciarse hacia un sorprendente número de subgrupos auxiliares distintos, cada uno de los cuales tiene una función diferente en el combate de infección.



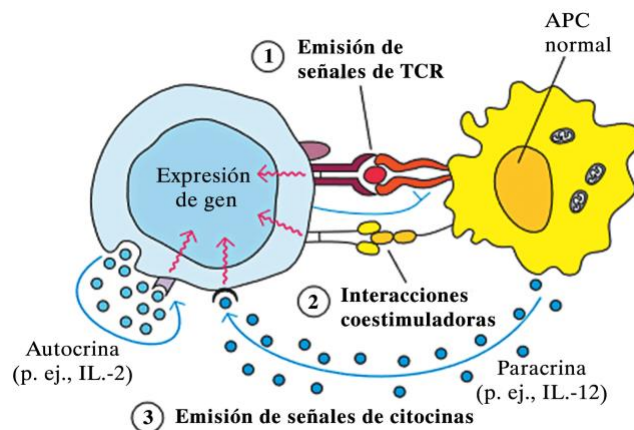
**FIGURA 5. Activación y diferenciación de célula T.** La activación de una célula T virgen en un órgano linfoide secundario da lugar a la generación de células T efectoras y de memoria. La activación requiere varias interacciones receptor-ligando entre la célula T y una célula dendrítica, señales por medio de citocinas producidas por la APC activadora, así como otras células de apoyo en el órgano linfoide. Las células T CD4+ efectoras se convierten en células T auxiliares ( $T_H$ ) y secretan citocinas que aumentan la actividad de muchas otras células inmunitarias. Las células T CD8+ efectoras son células citotóxicas ( $T_C$ ) que matan células infectadas. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

El subgrupo auxiliar en el cual la célula T CD4+ virgen se convierte depende de los tipos de señales (p. ej., citocinas, señales coestimuladoras) que recibe a partir de las células dendríticas a las que se une por medio de sus TCR. Las señales que las células dendríticas son capaces de suministrar dependen en gran parte del agente patógeno al cual han quedado expuestas (Kuby, 2013).



### ACTIVACIÓN DE CÉLULA T, Y LA HIPÓTESIS DE LAS DOS SEÑALES.

Las células T CD4+ y CD8+ salen del timo y entran a la circulación como células en reposo en la etapa G0 del ciclo celular; estas células T vírgenes están maduras, pero todavía no han encontrado antígeno. Su cromatina está condensada, tienen muy poco citoplasma, y muestran poca actividad transcripcional. Sin embargo, son células móviles y recirculan continuamente entre la sangre, la linfa y los tejidos linfoides secundarios, incluso ganglios linfáticos, en búsqueda de antígeno. Dado que sólo alrededor de 1 de cada 105 células T vírgenes es probable que sea específica para cualquier antígeno dado, esta recirculación a gran escala incrementa las probabilidades de que una célula T encuentre antígeno apropiado. Si una célula T virgen no se une a cualquiera de los complejos de MHC-péptido encontrado conforme recorre las superficies de células del estroma de un ganglio linfático, sale por los linfáticos eferentes, y finalmente drena hacia el conducto torácico y vuelve a incorporarse a la sangre. Empero, si una célula T virgen encuentra una APC que exprese un MHC-péptido al cual pueda unirse, iniciará un programa de activación que produce una gama diversa de células que dirigen los esfuerzos destinados a eliminar la infección. Los complejos de TCR/MHC-péptido y correceptores son agregados en la parte central de esta sinapsis (complejo activador supramolecular central, o cSMAC). La afinidad intrínseca entre las superficies del TCR y del MHC-péptido es bastante baja (la Kd varía de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup> M), y es estabilizada por la actividad de varias moléculas que, juntas, aumentan la avidéz (la afinidad combinada de todas las interacciones célula-célula) de la interacción celular. Los correceptores CD4 y CD8, que se encuentran en el cSMAC, estabilizan la interacción entre TCR y MHC al unirse a moléculas de MHC clase II y moléculas de MHC clase I, respectivamente. Las interacciones entre moléculas de adhesión y sus ligandos ayudan a sostener las señales generadas al permitir interacciones celulares a largo plazo. Estas moléculas están organizadas alrededor del agregado central, y forman el smac periférico o "p". Con todo, incluso la avidéz funcional aumentada ofrecida por correceptores y moléculas de adhesión aún es insuficiente para activar por completo una célula T. Las interacciones entre receptores coestimuladores sobre células T (p. ej., CD28) y ligandos coestimuladores sobre células dendríticas (p. ej., CD80/86) proporcionan una segunda señal requerida. Además, un tercer grupo de señales, proporcionado por citocinas locales (señal 3), dirige la diferenciación de células T hacia tipos de células efectoras distintos.



**FIGURA 6.** Se requieren tres señales para la activación de una célula T virgen. La interacción de TCR/MHC-péptido, junto con correceptores CD4 y CD8 y moléculas de adhesión, proporcionan la señal 1. La coestimulación por un grupo de

moléculas separado, incluso CD28 (o ICOS, que no se muestra), proporciona la señal 2. Juntas, la señal 1 y la señal 2 inician una cascada de transducción de señales que da lugar a activación de factores de transcripción y citocinas (señal 3) que dirigen la proliferación (IL2) y diferenciación (citocinas polarizantes) de célula T. Las citocinas pueden actuar de una manera *autocrina*, al estimular las mismas células que las producen, o de una manera *paracrina*, al estimular células vecinas. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

Estudios realizados por Helen Quill y Ron Schwartz llevaron a la noción simple pero poderosa de que para la activación de célula T se requería no una señal, sino dos señales: la señal 1 es proporcionada por unión a TCR específico para antígeno (que puede ser unido por correceptores y moléculas de adhesión), y la señal 2 es proporcionada por contacto con un ligando coestimulador, que sólo puede ser expresado por una APC funcional. Cuando una célula T recibe tanto señal 1 como señal 2, será activada para producir citocinas que aumentan la entrada hacia el ciclo celular y proliferación (figura 6). Ahora se sabe que la señal 2 se produce por una interacción entre receptores coestimuladores específicos sobre células T y ligandos coestimuladores sobre células dendríticas (Tabla 2). Recuerde que las células dendríticas y otras APC quedan activadas por unión de antígeno a pMHC, para expresar ligandos coestimuladores (p. ej., CD80 y CD86) y producir citocinas que aumentan su capacidad para activar células T. CD28 es el ejemplo más comúnmente citado de un receptor coestimulador. Dado que estas moléculas aumentan la emisión de señales de TCR, se denominan en conjunto receptores y ligandos coestimuladores “positivos”. También se han identificado receptores coestimuladores negativos, que inhiben la emisión de señales de TCR. Si bien el entendimiento de sus funciones específicas es incompleto, como grupo desempeñan funciones importantes en 1) el mantenimiento de la tolerancia de células T periféricas, y 2) la reducción de la inflamación tanto después de la evolución natural de una infección como durante respuestas a infección crónica. Como puede imaginarse, la expresión y actividad de moléculas coestimuladoras negativas y positivas deben ser reguladas con cuidado desde los puntos de vista temporal y espacial.

Receptor coestimulador sobre célula T	Ligando coestimulador	Actividad
<b>Coestimulación positiva</b>		
CD28	CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) <i>Expresada por APC profesionales (y epitelio tímico medular)</i>	Activación de células T vírgenes.
ICOS	ICOS-L <i>Expresado por células B, algunas APC y células T.</i>	Mantenimiento de la actividad de células T diferenciadas; una característica de interacciones entre células T y B.
<b>Coestimulación negativa</b>		
CTLA-4	CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) <i>Expresada por APC profesionales (y epitelio tímico medular)</i>	Regulación negativa de la respuesta inmunitaria (p. ej., mantenimiento de tolerancia de células T periféricas; reducción de la inflamación; contracción

PD-1		del fondo común de células T después de que se elimina infección)
	PD-L1 o PD-L2 <i>Expresado por APC profesionales, algunas células T y B, y células tumorales</i>	Regulación negativa de la respuesta inmunitaria, regulación de la diferenciación de Treg.
BTLA	HVEM <i>Expresado por algunas APC, células T y B</i>	Regulación negativa de la respuesta inmunitaria, regulación de la diferenciación de Treg (?).

**Tabla 2. Moléculas coestimuladoras de células T y sus ligandos.** Tomado y modificado de Kuby, 2013.

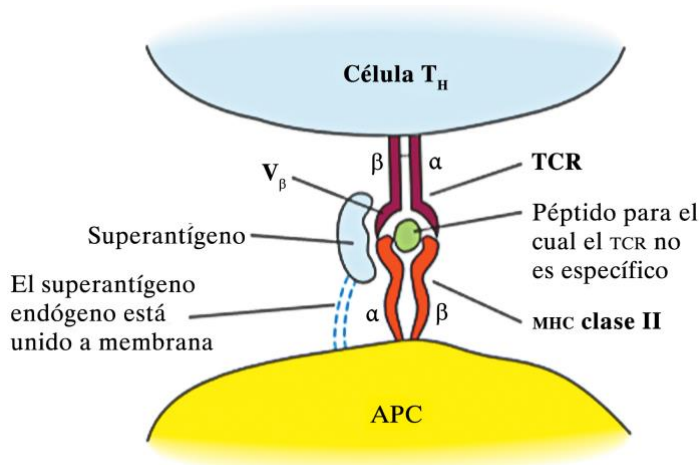
### LAS CITOCINAS PROPORCIONAN LA SEÑAL 3.

Ahora se ha visto que las células T vírgenes inician la activación cuando son coestimuladas por unión tanto con complejos de MHC-péptido como con ligandos coestimuladores sobre células dendríticas. Empero, las consecuencias y la magnitud de la activación de célula T también están conformadas de manera crucial por la actividad de citocinas solubles producidas tanto por APC como por células T. Algunos denominan señal 3 a estas citocinas ayudantes (figura 6). Las citocinas se unen a receptores de citocina de superficie, lo cual estimula una cascada de señales intracelulares que pueden aumentar la proliferación y/o la supervivencia. La IL2 es una de las citocinas mejor conocidas involucradas en la activación de células T, y desempeña un papel clave en la inducción de proliferación óptima de células T, en particular cuando el antígeno y/o los ligandos coestimuladores son limitantes. Las señales coestimuladoras inducen transcripción de genes que codifican tanto para IL2 como para la cadena  $\alpha$  (CD25) del receptor de IL2 de alta afinidad. Las señales también aumentan la estabilidad del mRNA que codifica para IL2. El incremento combinado de la transcripción de IL2 y la estabilidad mejorada del mRNA que codifica para IL2 da lugar a un aumento de 100 veces la producción de IL2 por la célula T activada. La secreción de IL2 y su unión subsiguiente al receptor de IL2 de alta afinidad induce a las células T vírgenes activadas a proliferar vigorosamente. La señal 3 también es proporcionada por otras citocinas (producidas por APC, células T, células NK y otras), conocidas como citocinas polarizantes, que desempeñan roles fundamentales no sólo en el aumento de la proliferación, sino también en la determinación de en qué tipos de células efectoras se convertirán las células T vírgenes. Las células presentadoras de antígeno tienen propiedades coestimuladoras características ¿Cuáles células son capaces de proporcionar tanto señal 1 como señal 2 a una célula T virgen? Si bien casi todas las células en el cuerpo expresan MHC clase I, sólo las APC profesionales —células dendríticas, macrófagos activados y células B activadas— expresan las cifras altas de moléculas del MHC clase II que se requieren para la activación de células T. Es importante el hecho de que estas mismas APC profesionales figuran entre los dos únicos tipos de células capaces de expresar ligandos coestimuladores. Las APC profesionales son más diversas en cuanto a función y origen que lo que originalmente se imaginó, y cada subpoblación difiere tanto en la capacidad para desplegar antígeno como en la expresión de ligandos coestimuladores. Durante las etapas tempranas de la respuesta inmunitaria en órganos linfoides secundarios, las células T encuentran dos tipos principales de APC profesionales:

la célula dendrítica y la célula B activada. Células dendríticas maduras que han sido activadas por componentes microbianos por medio de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR) están presentes en todas las zonas de células T. Expresan péptidos antigénicos en complejo con cifras altas de moléculas de MHC clases I y II. También expresan ligandos coestimuladores, y son los activadores más potentes de células T CD4+ y CD8+. Las células B en reposo que residen en los folículos adquieren la capacidad de activar células T después de que se unen a antígeno por medio de su receptor de célula B (BCR). Esta unión estimula la regulación ascendente de MHC clase II y CD80/86 coestimuladora, lo que permite a la célula B presentar antígeno a células T CD4+ que encuentran en la frontera entre el folículo y la zona de células T. Debido a su capacidad singular para internalizar antígeno (p. ej., agentes patógenos) por medio de BCR específicos, y presentarlos en el MHC clase II, las células B son más eficientes para activar células T CD4+ que son específicas para el mismo agente patógeno para el cual aquéllas son específicas. Esta situación sirve muy bien a la respuesta inmunitaria, al enfocar la atención de células T CD4+ específicas para antígeno activadas en la zona de células T sobre células B activadas por el mismo antígeno en el folículo vecino. Los macrófagos también se encuentran en órganos linfoides secundarios, pero pueden activar células T en una amplia gama de otros tejidos periféricos. También deben ser activados para que revelen su capacidad presentadora de antígeno plena. Regulan en dirección ascendente moléculas de MHC y ligandos coestimuladores en respuesta a interacciones con agentes patógenos, así como en respuesta a citocinas producidas por otras células, incluso IFN $\gamma$  (Kuby, 2013).

#### *LOS SUPERANTÍGENOS SON UNA CLASE ESPECIAL DE ACTIVADORES DE CÉLULAS T.*

Los superantígenos son proteínas virales o bacterianas que se unen de manera simultánea a regiones V $\beta$  específicas de receptores de células T, y a la cadena  $\alpha$  de moléculas de MHC clase II. Las regiones V $\beta$  son codificadas por más de 20 genes que codifican para V $\beta$  diferentes en ratones, y 65 genes distintos en seres humanos. Cada superantígeno muestra una “especificidad” para una de estas versiones de V $\beta$ , que pueden ser expresadas por hasta 5% de células T, independientemente de su especificidad de antígeno. Esta conexión tipo pinza imita una interacción TCR-MHC fuerte e induce activación, lo cual elude la necesidad de especificidad de antígeno de TCR (figura 7). Aun así, la unión a superantígenos no evita la necesidad de coestimulación; aún se requieren APC profesionales para activación completa de célula T por estas proteínas microbianas (Kuby, 2013).



**FIGURA 7. Enlace covalente, mediado por superantígeno, de receptor de célula T y molécula MHC clase II.** Un superantígeno se une a todos los TCR que portan una secuencia V<sub>β</sub> particular independientemente de su especificidad de antígeno. Los superantígenos exógenos son proteínas bacterianas secretadas solubles, incluso varias exotoxinas. Los superantígenos endógenos son proteínas embebidas en la membrana, producidas por ciertos virus; incluyen antígenos MIs codificados por virus de tumor mamario de ratón. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

### *DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T.*

Una interacción coestimulante, activadora entre una célula T virgen y una APC, típicamente dura 6 a 8 h, periodo que permite el desarrollo de una cascada de eventos de emisión de señales que alteran programas de gen e inducen diferenciación hacia diversos subtipos de células efectoras y de memoria distintas. Bastan sólo algunas interacciones de TCR-MHC (Tabla 3) para estimular una cascada de emisión de señales que, en combinación con coestimulación y señales recibidas por citocinas solubles, culminan en la activación de moléculas “efectoras” que regulan 1) la supervivencia celular, 2) la entrada al ciclo celular y 3) la diferenciación celular. En uno a dos días después de unión exitosa con una célula dendrítica en la zona de células T de un órgano linfóide secundario, una célula T virgen se agrandará hacia una célula blasto y empezará a pasar por rondas de división celular repetidas. Las señales 1 más 2 inducen regulación ascendente de la expresión y la actividad de genes prosupervivencia (p. ej., bcl2), así como la transcripción de genes que codifican tanto para IL2 como para la cadena α (CD25) del receptor de IL2 de alta afinidad (figura 8). El efecto combinado sobre una célula T virgen es la activación y proliferación robusta. Las células T activadas se dividen dos a tres veces al día durante cuatro a cinco días, lo cual genera una clona de células progenie que se diferencian hacia poblaciones de células T de memoria y efectoras. Las células T activadas y su progenie adquieren capacidades funcionales singulares; se convierten en células T auxiliares o citotóxicas efectoras que de manera indirecta o directa actúan para eliminar un agente patógeno. Las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> salen de los tejidos linfoides secundarios y circulan hacia sitios de infección, donde se unen a células infectadas y las matan. Las células T auxiliares CD4<sup>+</sup> secretan citocinas que dirigen la actividad de varios otros tipos de células, incluso células B, macrófagos y otras células T. Algunas células T CD4<sup>+</sup>, en particular las que “ayudan” a células B, y las que generan memoria de linfocito, permanecen dentro del tejido linfóide secundario para seguir regulando la generación de la respuesta. Otras regresan a los sitios de infección y aumentan la actividad de macrófagos y células citotóxicas. Las células efectoras tienden a ser de vida breve, y tienen lapsos de vida que varían de algunos días a algunas semanas. De cualquier modo, la progenie

de una célula T activada también puede convertirse en células T de memoria de vida prolongada que residen en tejidos secundarios y terciarios durante periodos importantes, y proporcionan protección contra una infección secundaria. Las células T CD8+ activadas adquieren la capacidad para inducir la muerte de células blanco, y se convierten en linfocitos T “asesinos” o “citotóxicos” (ct1 o TC). Las células T CD4+ activadas (células T auxiliares o Th) adquieren la capacidad para secretar factores que aumentan la activación y proliferación de otras células. De modo específico, regulan la activación de células B y la producción de anticuerpos por las mismas; aumentan la capacidad fagocítica, antimicrobiana, citolítica y de presentación de antígeno de macrófagos; además de que son indispensables para el desarrollo de memoria de células B y T CD8+. Las células T auxiliares CD4+ son en particular diversas; se diferencian hacia varios subtipos diferentes, cada uno de los cuales secreta un grupo de citocinas característico. Las citocinas secretadas por células Th CD4+ pueden actuar de modo directo sobre la misma célula que las produjo (actuar de una manera autocrina) o pueden unirse a receptores y actuar sobre células en la vecindad (actuar de un modo paracrino).

	Citocinas polarizantes	Reguladores de gen maestros	Citocinas efectoras	Funciones
Th1	IL12	Tbet	IFN $\gamma$	Aumenta la actividad de APC.
	IFN $\gamma$		TNF	Aumenta la activación de Tc.
	IL18			Protege contra agentes patógenos intracelulares. Involucradas en hipersensibilidad de tipo retardado, autoinmunidad.
Th2	IL4	GATA3	IL4	Protege contra agentes patógenos extracelulares (en particular respuestas IgE).
			IL2	
Th17	TGF $\beta$	ROR $\gamma$ t	IL13	Involucrada en la alergia
	IL6		IL17A IL17F	Protege contra algunas infecciones micóticas y bacterianas.
	IL21		IL21	Contribuye a la inflamación
Treg	TGF $\beta$	FoxP3	IL10	Inhibe la inflamación
	IL2		TGF $\beta$	
Tfh	IL6	Bcl6	IL4	

	IL21		IL21	Ayudan a células B en folículos y centros germinales.
--	------	--	------	---

Tabla 3. Regulación y función de subtipos auxiliares T. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

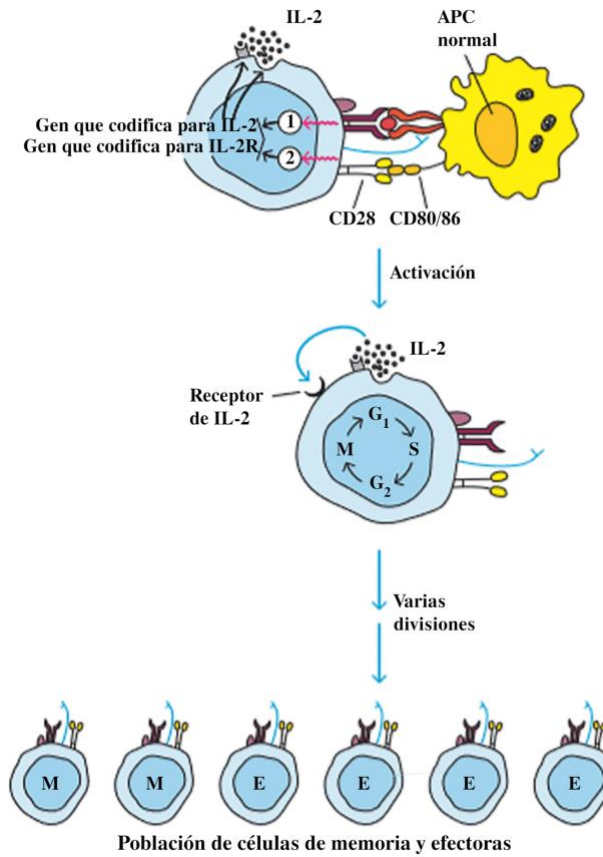


FIGURA 8. La activación de una célula T virgen regula en dirección ascendente la expresión de IL2 y el receptor de IL2 de afinidad alta. La señal 1 y la señal 2 cooperan para aumentar la transcripción y la estabilidad de mRNA que codifica para IL2 e IL2R. La IL2 secretada se unirá al IL2R, lo que genera señales que aumentan la entrada de la célula T hacia el ciclo celular, e inicia varias rondas de proliferación. Casi todas las células se diferencian hacia células efectoras o células de memoria centrales. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

## SUBTIPOS DE CELULAS T AUXILIARES.

Puede atribuirse a Tim Mosmann, Robert Coffman y colegas, uno de los experimentos más tempranos que demuestran en definitiva que las células T CD4<sup>+</sup> auxiliares tuvieron fenotipo y función más heterogéneos de lo que originalmente se supuso. Investigaciones más tempranas, que muestran que las células T auxiliares produjeron una gama diversa de citocinas, orientaron hacia esta posibilidad. No obstante, Mosmann y Coffman identificaron en definitiva dos subgrupos funcionales separados, Th1 y Th2, cada uno de los cuales produjo un grupo diferente de citocinas. Más aún, mostraron que estas diferencias fueron propiedades de clones de células T separadas; cada célula T activada se expandió hacia una población de células T efectoras que secretaron una gama distinta de citocinas. De manera específica, estos investigadores desarrollaron más de 50 clones de células T individuales a partir de una mezcla de células T con diferentes especificidades de receptor (esto es, una población de

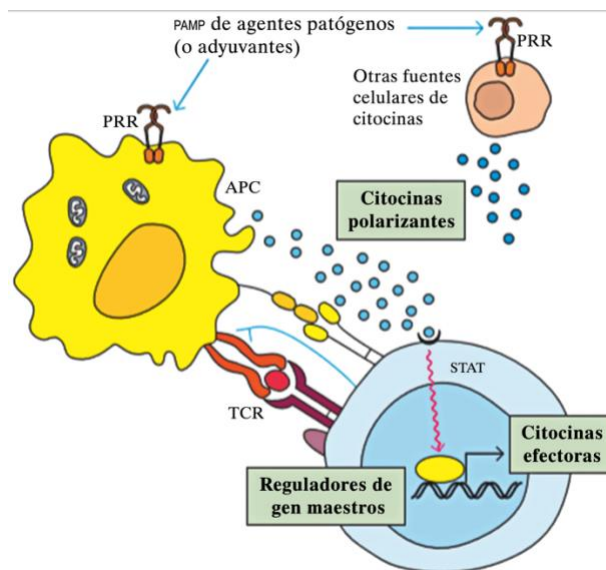
células T policlonal) que se había aislado a partir del bazo de un ratón inmunizado. El subgrupo Th1 secreta IL2, INF $\gamma$  y linfotóxina  $\alpha$  (TNF $\beta$ ), y se encarga de muchas funciones clásicas mediadas por células, incluso activación de linfocitos T citotóxicos y macrófagos. El subgrupo Th2 secreta IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13, y regula la actividad de células B y la diferenciación de las mismas. Estos experimentos prepararon el terreno para el descubrimiento durante el último decenio de que las células T CD4+ pueden adoptar no sólo dos sino al menos cinco destinos efectores separados después de activación. Las subpoblaciones Th1 y Th2 han sido unidas en definitiva por las subpoblaciones Th17 y Treg, cada una de las cuales produce un perfil de citocina distinto y regula diferentes actividades dentro del organismo. A últimas fechas se ha caracterizado aún otra subpoblación, las células auxiliares foliculares T (Tfh), y ha alcanzado membresía entre los subgrupos auxiliares principales. El tipo de célula Th efectora en el que una célula T virgen (también llamada una célula Th0) se convierte depende en gran parte de la clase de infección que ocurre. Por ejemplo, las infecciones bacterianas extracelulares dan lugar a la diferenciación de células T CD4+ activadas hacia células Th2, que ayudan a activar células B para que secreten anticuerpos que pueden opsonizar bacterias y neutralizar las toxinas que producen. Por otro lado, la infección por un virus o una bacteria intracelular induce diferenciación de células T CD4+ hacia auxiliares Th1 que aumentan la actividad citolítica de macrófagos y células T CD8+, que entonces pueden matar células infectadas. Las respuestas a hongos estimulan la diferenciación de respuestas auxiliares diferentes que las respuestas a gusanos, y así sucesivamente. La realidad es, por supuesto, más compleja. Las infecciones desencadenan la diferenciación de más de un subtipo auxiliar, algunos de los cuales tienen papeles que se superponen (Kuby, 2013).

#### *LA DIFERENCIACIÓN DE SUBGRUPOS DE CÉLULAS AUXILIARES T ESTÁ REGULADA POR CITOCINAS POLARIZANTES.*

La activación de células T requiere TCR y unión de receptor coestimulador, ambos de los cuales son proporcionados por una APC activada. Ahora está claro que el destino funcional de células T activadas está determinado por señales que reciben desde citocinas adicionales generadas durante la respuesta. Estas citocinas (señal 3) se denominan citocinas polarizantes porque se encargan de guiar una célula T auxiliar hacia uno de varios destinos efectores diferentes. Por ejemplo, las células T que son activadas en presencia de IL2 e INF $\gamma$  tienden a diferenciarse, o polarizarse, hacia la línea Th1, mientras que las células T que son activadas en presencia de IL4 e IL6 se polarizan hacia la línea Th2. Las citocinas polarizantes pueden ser generadas por la APC estimulante misma, o por células inmunitarias vecinas que también han sido activadas por antígeno. Cuáles citocinas se producen durante una respuesta inmunitaria depende de 1) la célula de origen (DC, macrófago, célula B, célula NK, etc.), 2) su estado de maduración y activación, 3) los agentes patógenos y otros mediadores inflamatorios que encuentra, y 4) en qué ambiente tisular encuentra ese agente patógeno. Por consiguiente, las interacciones innatas tienen un papel crucial en la conformación de respuestas adaptativas. De modo específico, al influir sobre las secreciones de APC en la superficie y el paisaje microambiental que una célula T encuentra, las respuestas inmunitarias innatas influyen de manera directa sobre el destino funcional de células T auxiliares. Recuérdese que las APC y otras células inmunitarias innatas son activadas por interacción con agentes patógenos que portan patrones moleculares asociados a agentes patógenos (PAMP). Estos PAMP se unen a PRR, lo cual incluye, pero no se limita a, receptores tipo



Toll (TLR). Las interacciones de PRR activan células dendríticas al estimular la regulación ascendente de MHC y proteínas coestimuladoras. También determinan el tipo de citocina(s) que las células dendríticas y otras células inmunitarias secretarán. Por ende, las señales de PRR regulan el destino que una célula T adoptará después de la activación (figura 9). Por ejemplo, el RNA bicatenario, un producto de muchos virus, se une a receptores TLR3 sobre células dendríticas, lo cual inicia una cascada de emisión de señales que da lugar a la producción de IL12, que promueve de manera directa la diferenciación Th1. Por otro lado, los gusanos estimulan PRR sobre células inmunitarias innatas, incluso mastocitos, que generan IL4. La IL4 promueve de manera directa la polarización de células T activadas hacia el subgrupo Th2, que coordina la respuesta de IgE a helmintos. En este caso, la principal citocina polarizante no es sintetizada por la célula dendrítica activadora, sino que es generada por una célula inmunitaria vecina. Ahora se entiende que los adyuvantes, que se han usado durante décadas para mejorar la eficacia de vacunas, ejercen su influencia sobre el sistema inmunitario innato al regular la expresión de ligandos y citocinas coestimuladoras por APC, eventos que finalmente conforman las consecuencias de la activación de células T. Los PAMP y las citocinas como la IL12, producidas por las APC mismas, se consideran adyuvantes naturales.



**FIGURA 9. Eventos generales y factores que impulsan la polarización del subgrupo Th.** La interacción de agente patógeno con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) sobre células dendríticas y otras células inmunitarias vecinas determina cuáles citocinas polarizantes son producidas, y por ende, hacia cuál subgrupo auxiliar T se diferenciará una célula virgen. En general, las citocinas polarizantes que surgen a partir de células dendríticas u otras células vecinas interactúan con receptores de citocina y generan señales que inducen la transcripción de reguladores de gen maestros. Estos reguladores maestros, a su vez regulan la expresión de diversos genes, entre ellos los que codifican para citocinas efectoras, que definen la función de cada subgrupo. *Tomado y modificado de Kuby, 2013.*

Cada subgrupo de célula T auxiliar es definido por una gama de características. Algunas generalizaciones proporcionan un marco conceptual útil para organizar algunos detalles. Considere lo siguiente:

- Cada uno de los subgrupos de células auxiliares T principales se caracteriza por 1) un juego de citocinas polarizantes distinto que induce la expresión de 2) un regulador de gen maestro que regula la expresión de 3) un grupo característico de citocinas efectoras que la

población de células T produce una vez que está por completo diferenciada (figura 9 y tabla 3).

- El subgrupo efector en el cual una célula auxiliar activada se convierte depende de la calidad y la cantidad de señales que su precursor celular virgen recibe desde APC en un órgano linfóide secundario; esa actividad, a su vez, depende de la naturaleza del agente patógeno que la APC encontró en el sitio de infección.

- En términos generales, las células Th1 y Th17 regulan la inmunidad mediada por células (células T CD8+ y macrófagos), y las células Th2 y Tfh regulan la inmunidad humoral (células B). Empero, es importante reconocer que todos los subgrupos de células T efectoras CD4+ pueden tener el potencial de proporcionar ayuda a células B. Los subgrupos Th1 y Th17 por lo general estimulan células B para que produzcan anticuerpos que contribuyen a la inmunidad mediada por células (p. ej., isotipos como IgG2a que pueden “armar” células NK para citotoxicidad). Las células Th2 estimulan a las células B para que produzcan anticuerpos que median la eliminación de agentes patógenos extracelulares (p. ej., isotipos como IgE que inducen la liberación de moléculas que dañan parásitos extracelulares).

- Los subgrupos de células T auxiliares a menudo se “regulan de manera cruzada” uno a otro. Las citocinas que secretan típicamente aumentan su propia diferenciación y expansión, e inhiben el compromiso hacia otras líneas de células T auxiliares. Esto es en particular cierto del par Th1 y Th2, así como del par Th17 y Treg.

- Las líneas de células auxiliares pueden no estar fijadas. Algunos subgrupos pueden asumir el perfil de secreción de citocina de otros subgrupos si quedan expuestos a un grupo de citocinas diferente, particularmente en etapas tempranas del proceso de diferenciación.

- La función biológica precisa y los sitios de diferenciación y actividad de cada subgrupo se siguen investigando de manera activa (Kuby, 2013).

De acuerdo con Lenin y colaboradores, en *Inmunología molecular, celular y traslacional*, y Owen y colaboradores, en *Kuby. Inmunología*, se describen a continuación los distintos subtipos de linfocitos T CD4+:

### *Th1.*

Los linfocitos Th1 son linfocitos CD3+CD4+ que expresan el fenotipo IL12R+/IFN $\gamma$ R+/CXCR3+. Las citocinas polarizantes clave que inducen la diferenciación de células T vírgenes hacia células Th1 son IL12, IL18 e IFN $\gamma$ . La IL12 es producida por células dendríticas después de un encuentro con agentes patógenos por medio de PRR (p. ej., TLR4, TLR3). También es regulada en dirección ascendente en respuesta a IFN $\gamma$ , que es generado por células T activadas y células NK activadas. La IL18, que también es producida por células dendríticas, promueve la proliferación de células Th1 en desarrollo, y aumenta su propia producción de IFN $\gamma$ . Estas citocinas polarizantes desencadenan vías de emisión de señales que regulan en dirección ascendente la expresión del regulador de gen maestro TBet. Dicho factor de transcripción maestro induce compromiso hacia la línea Th1, lo cual induce expresión de las citocinas efectoras Th1 características, entre ellas IFN $\gamma$  y TNF, en conjunto, TNF $\alpha$  y  $\beta$  estimulan las células fagocíticas de la respuesta inmunológica innata y las respuestas citotóxicas. El IFN $\gamma$  es una citocina efectora en particular potente. Activa macrófagos, y estimula estas células para que aumenten la actividad microbicida; regula en dirección ascendente la cifra de MHC clase II y, como se mencionó, secreta citocinas como IL12, que aumentan más la diferenciación Th1. La secreción de IFN $\gamma$  también induce cambio de clase de anticuerpos en células B hacia clases IgG (como IgG2a en el ratón) que apoyan

la fagocitosis y la fijación de complemento. Por último, la secreción de IFN $\gamma$  promueve la diferenciación de células TC por completo citotóxicas desde precursoras CD8 $^{+}$  al activar las células dendríticas que se unen a células TC vírgenes. Estos efectos combinados hacen que el subgrupo Th1 sea en particular idóneo para mostrar respuesta a infecciones virales y otros agentes patógenos intracelulares. Del mismo modo que la diferenciación del subgrupo Th1 es promovida por IL2 e IFN $\gamma$ .

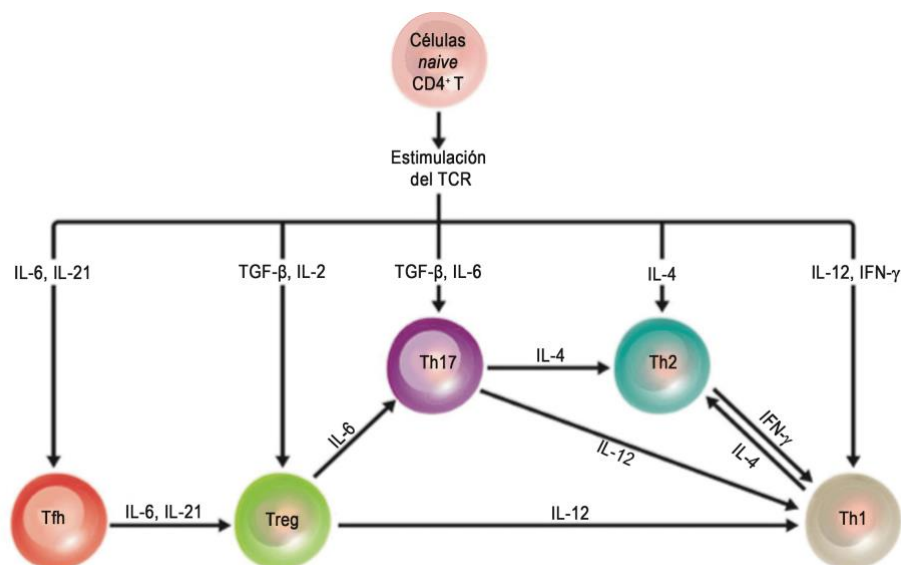
### *TH2.*

Los linfocitos Th2 son linfocitos CD3 $^{+}$  CD4 $^{+}$  que expresan el fenotipo IL-4R $^{+}$ /JL-33R $^{+}$ /CCR4 $^{+}$ . La diferenciación hacia el subgrupo Th2 es promovida por una citocina polarizante definitoria, la IL4. La exposición de células T auxiliares vírgenes a IL4 al principio de una respuesta inmunitaria hace que se diferencien hacia células Th2. Despierta interés que el desarrollo hacia Th2 es muy favorecido sobre el desarrollo hacia Th1. Incluso en presencia de IFN $\gamma$  e IL12, las células T vírgenes se diferenciarán hacia efectoras Th2 en presencia de IL4. La IL4 induce la expresión del factor de transcripción STAT6 y la proteína de unión a GATA3. desencadena una vía de emisión de señales dentro de la célula T que regula en dirección ascendente el regulador de gen maestro GATA3, que, a su vez, regula la expresión de citocinas específicas para Th2, entre ellas IL4, IL5, IL10, IL9 e IL13. Las células dendríticas no sintetizan IL4, de modo que los mastocitos, los basófilos y las células NKT pueden ser inducidos para que sinteticen IL4 después de exposición a agentes patógenos, y podrían influir sobre el destino de células T auxiliares en la periferia. Las células B de centro germinal y las células Tfh también pueden producir IL4, que podría influir sobre la polarización de células T auxiliares en los ganglios linfáticos y el bazo. Además, las células Th2 mismas son una excelente fuente de IL4 adicional que puede aumentar eventos de polarización. Con todo, los investigadores aún están trabajando para identificar en definitiva la fuente de la IL4 que inicia la polarización Th2 en tejidos linfoides secundarios. Las citocinas efectoras producidas por células Th2 ayudan a eliminar infecciones parasitarias extracelulares, incluso las causadas por helmintos. La IL4, la citocina efectora Th2 definitoria, actúa tanto sobre células B como sobre eosinófilos. Induce diferenciación, activación y migración de eosinófilos, y promueve la activación de células B y el cambio de clase hacia IgE. Estos efectos actúan de manera sinérgica porque los eosinófilos expresan receptores de IgE (Fc R) que, cuando están unidos por enlaces covalentes, liberan mediadores inflamatorios que son en particular buenos para atacar gusanos redondos. Así, los anticuerpos IgE pueden formar un puente entre el gusano y el eosinófilo, y unirse a antígenos de gusano por medio de sus regiones variables y unión a Fc R por medio de su región constante. Por último, la IL4 misma puede suprimir la expansión de poblaciones de células Th1.

### *TH17.*

Los linfocitos Th17 son linfocitos CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$  y que expresan el fenotipo IL23R $^{+}$ /JL-1R $^{+}$ /CCR6 $^{+}$ . El descubrimiento del subgrupo Th17 de células T, que, al igual que el subgrupo Th1, está involucrado en la inmunidad mediada por células, surgió en parte a partir de un reconocimiento de que la IL12, una de las citocinas polarizantes que induce el desarrollo hacia Th1, fue un miembro de una familia de citocinas que compartió una subunidad (p40) con IL23. Las células Th17 son generadas cuando células T vírgenes son activadas en presencia de IL6 y de TGF $\beta$ , la citocina polarizante clave para la diferenciación iTreg. La IL23 también está involucrada en la finalización del compromiso al destino Th17,

y es inducida en APC mediante interacciones con PAMP, que incluyen componentes de la pared micótica, con TLR2 y el receptor de lectina tipo C (CLR) lectina-1. Al igual que la diferenciación de Th1 y Th2, la diferenciación de células Th17 también está controlada por un regulador transcripcional maestro cuya expresión es inducida por citocinas polarizantes. En este caso, el regulador maestro es el receptor de esteroide huérfano ROR $\gamma$ t, que también desempeña un papel en el desarrollo de células T. Las células Th17 se llaman así porque producen IL17A, una citocina asociada con respuestas inflamatorias y autoinmunitarias crónicas, incluso las que dan lugar a enfermedad inflamatoria intestinal, artritis y esclerosis múltiple. Las células Th17 son el tipo de célula inflamatoria dominante asociada con trastornos autoinmunitarios crónicos. También producen IL17F e IL22, citocinas asociadas con inflamación de tejido. Hata ahora se ha empezado a entender la función fisiológica verdadera de las células Th17, que en humanos sanos se han encontrado en superficies epiteliales (p. ej., pulmón e intestino) y quizá desempeñen un papel en la evitación de infecciones micóticas e infecciones bacterianas extracelulares.



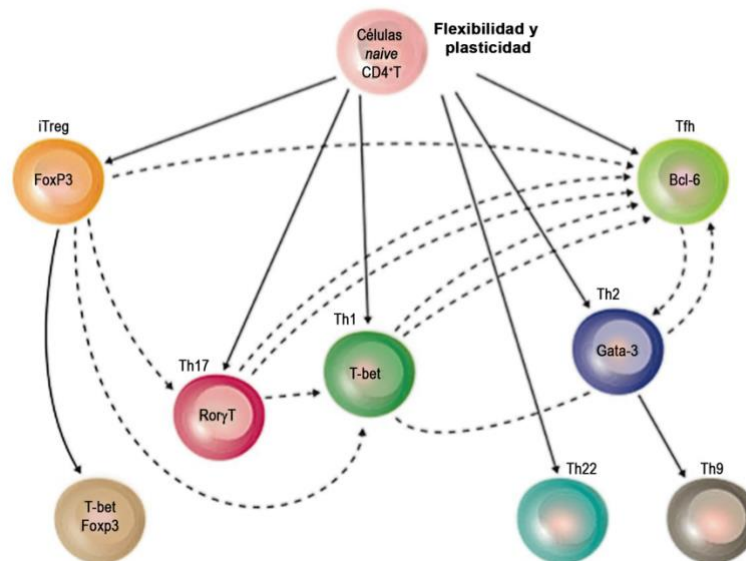
**FIGURA 10. Dinámica de diferenciación de las células T.** Las células *naive*, al ser estimuladas por su antígeno presentado en el contexto de MHC II, podrán, con el ambiente correcto de citocinas, diferenciarse hacia fenotipos Th1, Th2, Th17, Treg o Tfh, sin embargo, en presencia de otras citocinas como IL6, IL12 o IL21 pueden llevar a una citocina aparentemente ya comprometida de un fenotipo hacia otro. *Tomado y modificado de Lenin, 2001.*

### TREG.

Los linfocitos Treg son linfocitos CD3+CD4+ que también expresan CD25+CTLA-4+. Pueden ser clasificados según su origen en naturales; es decir, aquellos que obtienen el fenotipo de Treg por instrucción desarrollada en el timo (Treg naturales; nTreg), o en los que expresan el fenotipo de Treg por diferenciarse en sitios extratímicos en presencia de TGF $\beta$  (Treg inducidas; iTreg). A diferencia de otros linfocitos Th CD4+, los linfocitos Treg son inmunomoduladores negativos y participan en el mantenimiento de la autotolerancia y la homeostasis inmunológica. Se ha propuesto que las Treg controlan los aparentemente escasos linfocitos T autorreactivos que no fueron eliminados en el timo. La activación de estos linfocitos requiere de TGF $\beta$  e IL10, y del contacto directo por medio del CTLA4 (del inglés Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4, o antígeno 4 del linfocito T citotóxico). Sin embargo, no todos los linfocitos Treg dependen de las mismas condiciones ya que, por

ejemplo, a pesar de que en los linfocitos iTreg es indispensable la presencia del TGFβ, al parecer en las nTreg no. El TGFβ induce expresión de FoxP3, el regulador transcripcional maestro del cual depende el compromiso de iTreg. Las células iTreg secretan las citocinas efectoras IL10 y TGFβ, que regulan en dirección descendente la inflamación por medio de sus efectos inhibidores sobre APC, y pueden ejercer también su función supresora al interactuar de manera directa con células T. Como ya se dijo, para este tipo de linfocitos, el factor de transcripción Foxp3 es reconocido como el regulador maestro para su función y diferenciación. Aunque algunos investigadores proponen que las funciones inhibitorias de estos Treg dependen de la inhibición en la transcripción de IL2, al parecer se requiere que esto sea algunas horas después de que los linfocitos T efectores se activaron, ya que también dependen de IL2 para proliferar.

La clasificación de los diferentes linfocitos Th CD4+ ha sido de utilidad para comprender la manera en que modulan o potencian la respuesta inmunológica. Sin embargo, dichos subtipos funcionales de linfocitos no son estados estáticos e inmodificables como se pensaba cuando se describieron. De hecho, hoy en día se aplica el concepto de plasticidad de la respuesta Th que, según propone el modelo presentado en la figura 11 vuelve más dinámicas, complejas e interesantes estas respuestas de microambientes de citocinas que favorecen uno u otro tipo de respuesta inmunológica. Múltiples evidencias apuntan a que estos procesos dinámicos o flexibles de diferenciación Th son más fisiológicos, lo que contradice la desafortunada idea, imperante durante algún tiempo, de que los ambientes de citocinas son un evento finalista que condena a los leucocitos a comprometerse a un tipo de respuesta (el modelo monolítico de William E. Paul, profesor distinguido de los Institutos Nacionales de Salud-NIH de Estados Unidos). Una de las más peligrosas consecuencias de este tipo de pensamiento finalista es que, para controlar en forma terapéutica estas respuestas, se deben utilizar fármacos anticitocinas. Así, se debe tener cuidado en los esfuerzos por antagonizar alguna de estas vías, ya que, como se muestra en la figura 11 los factores de transcripción, que en algún momento se creyeron restringidos a direccionar el destino de las Th, en realidad parecen formar parte de vías de diferenciación comunes que se direccionan según múltiples condiciones.

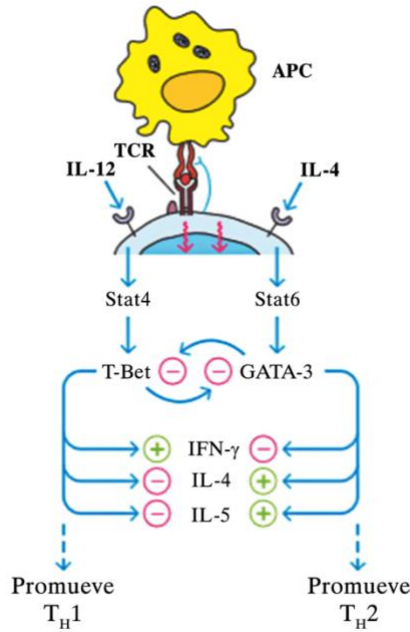


**FIGURA 11. Diferentes factores de transcripción participan en la diferenciación Th.** Después de la activación de la célula naïve CD4+, se expresan los factores de transcripción característica de Th1 (T-bet), Th2 (Gata-3), Th17 (RorγT),

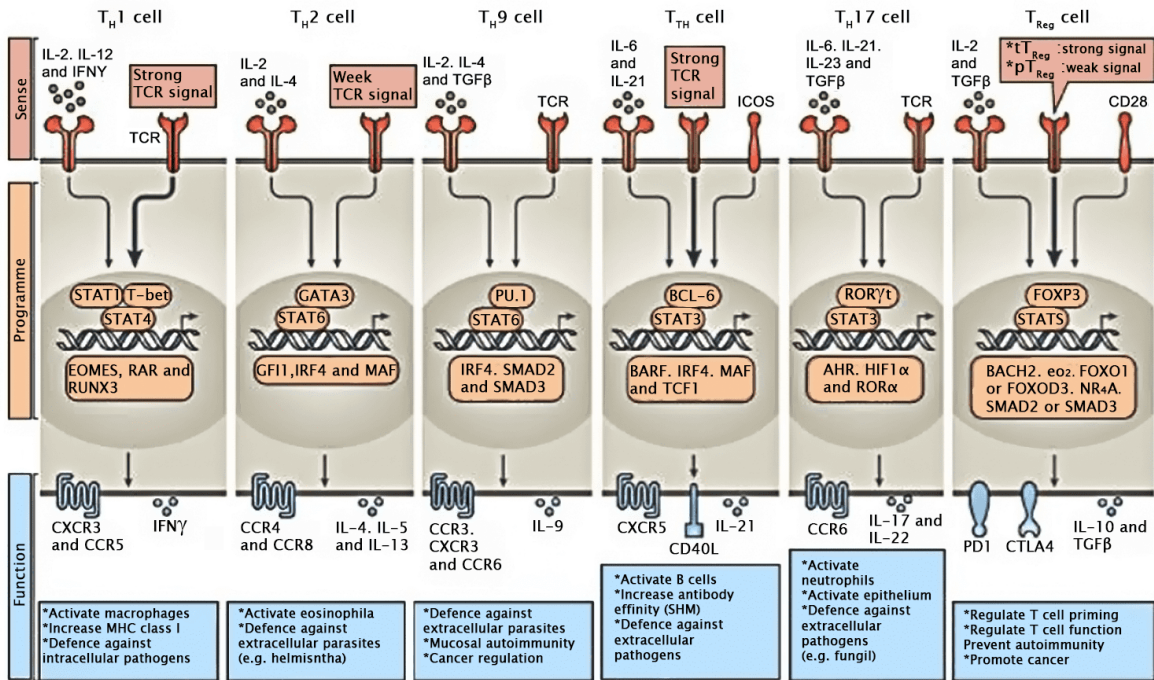
iTreg (Foxp3) y Tfh (Bcl-6). Sin embargo, como lo sugieren las líneas punteadas, estas células pueden cambiar su fenotipo de activación. *Tomado y modificado de Lenin, 2001.*

### **REGULACIÓN CRUZADA DE TH1 Y TH2.**

Las principales citocinas efectoras producidas por los subgrupos Th1 y Th2 (IFN $\gamma$  e IL4, respectivamente) no sólo influyen sobre la respuesta inmunitaria general, sino también sobre los subgrupos de células T auxiliares. En primer lugar, promueven el crecimiento (y en algunos casos incluso la polarización) del subgrupo que las produce; en segundo lugar, inhiben el desarrollo y la actividad del subgrupo opuesto, efecto que se conoce como regulación cruzada. Por ejemplo, el IFN $\gamma$  (secretado por el subgrupo Th1) inhibe la proliferación del subgrupo Th2, y la IL4 (secretada por el subgrupo Th2) regula en dirección descendente la secreción de IL12 por APC, lo que inhibe la diferenciación hacia Th1. Además, la IL4 aumenta el desarrollo de células Th2 al hacer a las células Th menos susceptibles a las señales de citocina promotoras de Th1 (y viceversa). De modo similar, estas citocinas tienen efectos opuestos sobre células blanco que no son subgrupos Th. En ratones, donde los subgrupos Th1 y Th2 se han estudiado de manera más extensa, las citocinas tienen efectos distintos sobre el tipo de anticuerpo sintetizado por células B. El IFN $\gamma$  secretado por el subgrupo Th1 promueve la producción de IgG2a por células B, pero inhibe la producción de IgG1 y de IgE. Por otro lado, la IL4 secretada por el subgrupo Th2 promueve la producción de IgG1 e IgE, y suprime la producción de IgG2a. Así, estos efectos sobre la producción de anticuerpos son congruentes con las tendencias generales de los subgrupos Th1 y Th2 a promover la inmunidad mediada por células en contraposición con la humoral, respectivamente. La IL10 secretada por células Th2 también inhibe (regula de manera cruzada) el desarrollo de células Th1, pero no de manera directa. En lugar de eso, la IL10 actúa sobre monocitos y macrófagos, e interfiere con su capacidad para activar el subgrupo Th1 al abolir su activación, de modo específico al 1) inhibir la expresión de moléculas de MHC clase II, 2) suprimir la producción de metabolitos bactericidas (p. ej., óxido nítrico) y diversos mediadores inflamatorios (p. ej., IL1, IL6, IL8, GM-CSF; G-CSF y TNF $\beta$ ), e incluso al 3) inducir apoptosis. Los reguladores maestros Tbet y GATA3 también desempeñan un papel importante en la regulación cruzada (figura 12). De manera específica, la expresión de Tbet impulsa a las células a diferenciarse hacia células Th1 y suprime su diferenciación a lo largo de la vía Th2. La expresión de GATA3 hace lo opuesto; promueve el desarrollo de células T vírgenes hacia células Th2, mientras que suprime su diferenciación hacia células Th1. En consecuencia, las señales de citocina que inducen uno de estos factores de transcripción ponen en marcha una cadena de eventos que reprimen el otro (Kuby, 2013).



**FIGURA 12. Regulación cruzada de subgrupos de células auxiliares T por reguladores transcripcionales.** GATA3 y Tbet regulan de manera recíproca la diferenciación de las líneas Th1 y Th2. La IL12 promueve la expresión del factor de transcripción definitorio de Th1, Tbet, que induce la expresión de citocinas efectoras Th1, incluso IFN $\gamma$ . Al mismo tiempo, Tbet reprime la expresión del regulado transcripcional maestro definitorio de Th2, GATA3, así como la expresión de las citocinas efectoras IL4 e IL5. De manera recíproca, la IL4 promueve la expresión de GATA3, que regula en dirección ascendente la síntesis de IL4 e IL5, y al mismo tiempo reprime la expresión de Tbet y la citocina efectora Th1, IFN $\gamma$ . Tomado y modificado de Kuby, 2013.



**FIGURA 13. Subconjuntos polarizados de células T CD4+.** Cada subconjunto de células T CD4+ puede definirse por sus distintas capacidades para detectar (rojo), programar (naranja) y funcionar (azul) en el control de patógenos específicos o patologías inmunes. Se muestran las citocinas inductivas, los factores de transcripción polarizantes y los receptores de citocinas o quimiocinas que son característicos de cada subconjunto, junto con su asociación con formas específicas de

defensa inmune. AHR, receptor de hidrocarburo de arilo; BATF, factor de transcripción activador de células B; BCL6, linfoma de células B6; CCR, receptor de quimiocina CC; CD40L, ligando CD40; CTLA4, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos; CXCR, receptor de quimiocina CXC; EOMES, eomesodermina; FOXO, caja de horquilla O; FOXP3, caja de horquilla P3; GATA3, proteína de unión a GATA 3; GFI1, factor de crecimiento independiente 1; HIF1 $\alpha$ , factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ ; ICOS, coestimulador inducible de células T; IFN $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; IL, interleucina; IRF4, factor regulador de interferón 4; MAF, factor activador de macrófagos; NR4A, receptor nuclear 4A; PD1, muerte celular programada 1; célula pTreg, célula T reguladora derivada periféricamente; RAR, receptor de ácido retinoico; ROR, receptor huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico; RUNX3, factor de transcripción relacionado con la ejecución 3; SHM, hipermutación somática; STAT, transductor de señal y activador de transcripción; TCF1, factor 1 de células T; TCR, receptor de células T; Tfh, T ayudante folicular; TGF $\beta$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; TH, T ayudante; Célula Treg, célula T reguladora; célula TReg, célula T reguladora derivada del timo. *Tomado y modificado de DuPage, 2016.*

### *REGULACIÓN CRUZADA DE TH17 Y TREG.*

El TGF $\beta$  induce diferenciación Treg; no obstante, cuando se acompaña por IL6, el TGF $\beta$  induce diferenciación hacia Th17. De manera específica, el TGF $\beta$  parece regular en dirección ascendente tanto FoxP3 como ROR $\gamma$  (que controlan la diferenciación de Treg y Th17, respectivamente). En combinación con señales generadas por IL6, las señales generadas por TGF $\beta$  inhiben la expresión de FoxP3, lo que permite que ROR $\gamma$  domine e induzca el desarrollo Th17. La relación Th17 en contraposición con iTreg puede ser muy adaptativa. En reposo, un organismo sano puede favorecer el desarrollo de una población iTreg antiinflamatoria, que sería reforzada por la producción propia de células iTreg de TGF $\beta$ . Empero, la inflamación induciría la generación de proteínas de respuesta aguda, incluso IL6. En presencia de IL6, la actividad de TGF $\beta$  cambiaría el desarrollo de células T desde iTreg hacia las células Th17 proinflamatorias, de modo que podría montarse una defensa apropiada (Kuby, 2013).

### *LAS CÉLULAS T AUXILIARES QUIZÁ NO QUEDEN COMPROMETIDAS DE MANERA IRREVOCABLE A UNA LÍNEA.*

A etapas tempranas de la diferenciación, al menos, las células auxiliares deben ser capaces de cambiar su compromiso y producir la o las citocinas características de otro subgrupo. Por ejemplo, cuando quedan expuestas a IL12, células Th2 jóvenes pueden ser inducidas a que expresen la citocina de célula Th1 característica, IFN $\gamma$ . Células Th1 jóvenes también pueden ser inducidas para que expresen la citocina de Th2 característica, IL4, en condiciones polarizantes hacia Th2. Despierta interés que las células Th1 y Th2 parecen incapaces de adoptar características de Th17 o iTreg. Por otro lado, las células Th17 e iTreg son más flexibles y pueden adoptar los perfiles de expresión de citocinas de otros subgrupos, incluso Th1 y Th2. El subgrupo Th17 tal vez sea la línea más inestable o “plástica”, y puede ser inducido para que exprese IFN $\gamma$  e IL4, dependiendo de la información que proviene del ambiente. Algunas células iTreg también pueden ser inducidas para que expresen IFN $\gamma$ , y algunas pueden ser redirigidas hacia un fenotipo Th17 si quedan expuestas a IL6 y TGF $\beta$ . Esta fluidez entre subgrupos dificulta establecer en definitiva la independencia de líneas de células auxiliares. De hecho, algunos de los subgrupos que están surgiendo pueden ser variantes de subgrupos Th1, Th2, Th17 e iTreg que han quedado expuestos a otros ambientes polarizantes (Kuby, 2013).

### **MEMORIA DE CELULAS T.**

La activación de células T da lugar a un incremento repentino y acentuado de la proliferación, generación de células efectoras, y después una contracción notoria del número de células. Al menos 90% de las células efectoras muere por apoptosis después de que el antígeno es



eliminado y deja una población importante de células T de memoria específicas para antígeno. Las células T de memoria por lo general son de vida prolongada y quiescentes, pero muestran respuesta con reactividad aumentada a una exposición subsiguiente al mismo antígeno. Esta respuesta inmunitaria secundaria es tanto más rápida como más robusta y, por ende, más eficaz que una respuesta primaria. Hasta hace poco tiempo, las células de memoria eran difíciles de distinguir de las células T efectoras y las células T vírgenes por medio del fenotipo, y durante algún tiempo fueron definidas mejor con base en su función. Al igual que las células T vírgenes, casi todas las células T de memoria están reposando en la etapa G0 del ciclo celular, pero parecen tener requerimientos menos estrictos para activación que las células T vírgenes. Por ejemplo, las células T vírgenes son activadas de manera casi exclusiva por células dendríticas, mientras que las células T de memoria pueden ser activadas por macrófagos, células dendríticas o células B. Las células de memoria expresan diferentes patrones de moléculas de adhesión, y receptores coestimuladores, de superficie, que les permiten interactuar con eficacia con un espectro más amplio de APC. También parecen ser más sensibles a estimulación, y responden con mayor rapidez. Esto quizá se deba en parte a su capacidad para regular la expresión de gen más fácilmente debido a diferencias en la organización epigenética que ocurrieron durante su formación. Por último, las células de memoria muestran patrones de recirculación que difieren de los de células T vírgenes o efectoras. Algunas permanecen durante periodos prolongados en el ganglio linfático y otros órganos linfoides secundarios, en tanto que otras viajan hacia tejidos inmunitarios terciarios donde ocurrió la infección original, y permanecen en los mismos, en anticipación de la posibilidad de otra infección con el antígeno al cual son específicas. Conforme la capacidad para identificar diferentes proteínas de superficie celular mejoró, también ha mejorado la capacidad para identificar subpoblaciones de células de memoria y distinguirlas. Ahora se distinguen ampliamente dos subgrupos de células T de memoria, las células T de memoria centrales (TCM) y las células T de memoria efectoras (TEM), con base en su ubicación, sus patrones de expresión de marcadores de superficie y, hasta cierto grado, su función (Kuby, 2013)

#### *LAS CÉLULAS T VÍRGENES, EFECTORAS Y DE MEMORIA DESPLIEGAN AMPLIAS DIFERENCIAS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA DE SUPERFICIE.*

Se han usado tres marcadores de superficie para distinguir ampliamente entre células T vírgenes, efectoras y de memoria: CD44, que aumenta en respuesta a señales de activación; CD62L, una proteína de adhesión, y CCR7, un receptor de quimiocina. Tanto CD62L como CCR7 están involucradas en la vuelta hacia órganos linfoides secundarios. Las células T vírgenes expresan cifras bajas de CD44, lo que refleja su estado inactivado, y cifras altas de la molécula de adhesión CD62L, que las dirige hacia el ganglio linfático o el bazo. En contraste, las células T auxiliares y citotóxicas efectoras tienen el fenotipo recíproco. Expresan cifras altas de CD44, lo cual indica que han recibido señales de TCR, y cifras bajas de CD62L, lo cual evita que recirculen hacia tejido linfoide secundario; ello les permite sondear a fondo sitios de infección en la periferia. Ambos tipos de células T de memoria también expresan CD44, lo cual indica que son experimentadas en cuanto a antígeno (esto es, han recibido señales por medio de su TCR). Al igual que las células T vírgenes, las células de memoria centrales (TCM) expresan CD62L y el receptor de quimiocina, CCR7, congruente con su residencia en órganos linfoides secundarios. Las células de memoria efectoras (TEM), que se encuentran en diversos tejidos, pueden expresar cifras variables de

CD62L dependiendo de su ubicación; sin embargo, no expresan CCR7, lo cual refleja sus viajes por tejidos no linfoides y residencia en los mismos. Las TCM y TEM se distinguen por su ubicación y compromiso hacia función efectora

Una pequeña proporción (< 10%) de la progenie de una célula virgen que ha proliferado de manera robusta en respuesta a antígeno se diferencia hacia células TCM y TEM. En general, estos dos grupos se distinguen por dónde residen, así como por su magnitud de compromiso hacia un destino de célula efectora específico. En general, las células TCM residen en tejidos linfoides secundarios y viajan entre los mismos. Viven más tiempo y tienen la capacidad de pasar por más divisiones que sus homólogas TEM. Cuando vuelven a encontrar su agente patógeno cognado en tejido linfoide secundario, son activadas con rapidez y tienen la capacidad para diferenciarse hacia diversos subtipos de células T efectoras, dependiendo del ambiente de citocina. Por otro lado, las células TEM viajan hacia tejidos terciarios (incluso piel, pulmón, hígado e intestino) y entre los mismos. Podría decirse que se encuentran en una mejor situación para contribuir a la primera línea de defensa contra reinfección porque ya se han comprometido a una línea efectora durante la respuesta primaria, y muestran sus funciones efectoras con bastante rapidez luego de reactivación por su agente patógeno cognado. Es importante notar que algunas de estas generalizaciones pueden no resistir el escrutinio científico; por ejemplo, algunos investigadores refutan la distinción definitiva entre células TCM y TEM, y recalcan la diversidad y el continuo de variaciones entre estos subtipos (Kuby, 2013).

#### *SEÑALES QUE INDUCEN COMPROMISO HACIA CÉLULA DE MEMORIA*

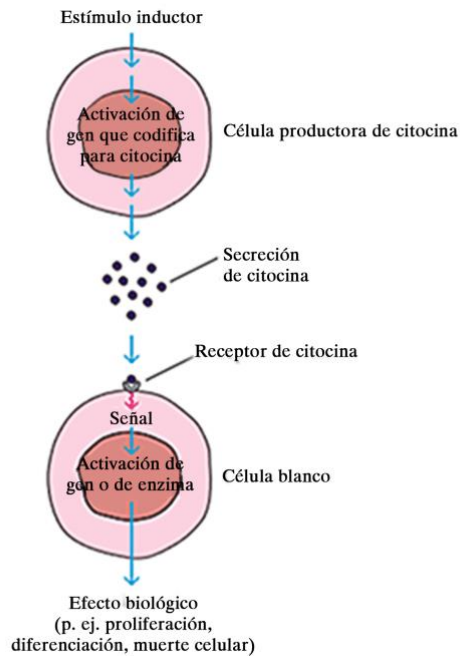
La mayoría de los investigadores concuerda en que la ayuda de células T es crucial para generar memoria duradera. Por ejemplo, las células T CD8+ pueden ser activadas en ausencia de ayuda de células T CD4+, pero este evento de activación “sin ayuda” no da células T CD8+ de memoria de vida prolongada. Aún se está investigando la importancia relativa de otras variables en el impulso del desarrollo de memoria. Si bien se creyó que la intensidad de unión a receptor de célula T es un factor en el compromiso hacia células de memoria, datos recientes sugieren que incluso las interacciones de baja afinidad pueden generar células T de memoria. Sin embargo, todos los estudios parecen concordar con el reconocimiento de que a mayor proliferación que una respuesta suscite, mejor será el fondo común de memoria (Kuby, 2013).

#### **CITOCINAS**

Las citocinas son moléculas que median la comunicación intercelular, lo mismo que las hormonas y los neurotransmisores. La acción que ejercen por lo general se asocia con la regulación del crecimiento y la diferenciación, activación y respuesta de poblaciones celulares directa o indirectamente relacionadas con la respuesta inmunológica. También son muy importantes en la regulación de la hematopoyesis, los procesos de cicatrización y el reclutamiento de poblaciones leucocitarias. (Lenin, 2001).

Las citocinas se unen a receptores específicos sobre las membranas de células blanco, y desencadenan vías de transducción de señal que finalmente alteran la actividad enzimática y la expresión génica (figura 14). La susceptibilidad de una célula blanco a una citocina

particular está determinada por la presencia de receptores de membrana específicos. Las citocinas regulan la intensidad y la duración de la respuesta inmunitaria al estimular o inhibir la activación, proliferación, o diferenciación (o varios de estos factores a la vez) de



**FIGURA 14. Perspectiva general de la inducción de citocina y la función de las mismas.** Un estímulo inductor, que puede ser un antígeno u otra citocina, interactúa con un receptor sobre una célula y la induce a secretar citocinas que, a su vez, actúan sobre receptores de una segunda célula, lo que desencadena una consecuencia biológica. En el caso de IL2, ambas células pueden ser células T activadas por antígeno que secretan IL2, que actúa tanto sobre la célula secretora como sobre células T activadas vecinas. *Tomado y modificado de Kuby, 2013.*

diversas células, al regular la secreción de otras citocinas o de anticuerpos, o en algunos casos al, en realidad, inducir muerte celular programada en la célula blanco. Además, las citocinas pueden modular la expresión de diversos receptores de superficie celular para quimiocinas, otras citocinas o incluso para sí mismas. De este modo, las citocinas secretadas por incluso un número pequeño de linfocitos activados por antígeno pueden influir sobre la actividad de muchos tipos diferentes de células involucradas en la respuesta inmunitaria. Las citocinas muestran los atributos de pleiotropía, redundancia, sinergismo, antagonismo e inducción de cascada (figura 15), que les permiten regular la actividad celular de una manera coordinada e interactiva. Algunas citocinas tienen un efecto potenciador, o sinérgico, que es resultado del efecto combinado de dos o más de ellas y que produce un efecto biológico mayor que la suma de los efectos individuales de cada una. Por el contrario, ciertas citocinas ejercen un efecto inhibitorio o antagonista sobre el efecto biológico y/o la producción de otras citocinas. El efecto de las citocinas suele darse en distintos tipos celulares e induce múltiples y diferentes efectos biológicos; este fenómeno se denomina pleiotropismo. Por su parte, varias citocinas pueden inducir el mismo efecto sobre una población celular, acción llamada redundancia. Cuando la acción de las citocinas se ejerce sobre la misma célula que la sintetiza y secreta se habla de un efecto autocrino; cuando, por el contrario, se ejerce sobre células diferentes pero cercanas a la célula que las sintetiza y secreta, se le llama efecto paracrino, y si las citocinas se producen en gran cantidad, pueden ingresar al torrente sanguíneo y actuar en sitios lejanos, se dice que presentan un efecto endocrino (Lenin, 2001). La inducción de

cascada ocurre cuando la acción de una citocina sobre una célula blanco induce a esa célula para que produzca una o más citocinas adicionales (kuby, 2013) .

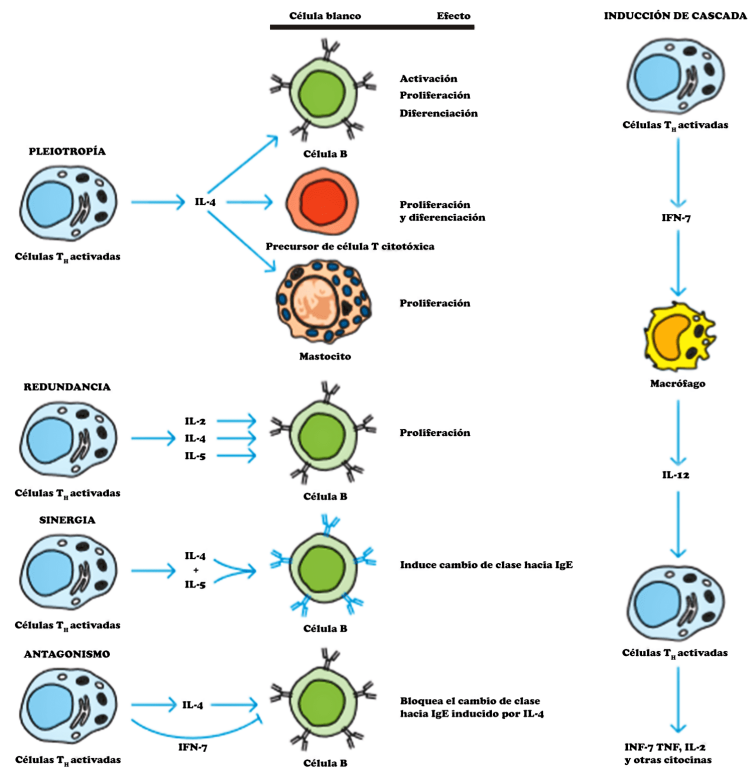


FIGURA 15. Atributos de citocinas de a) pleiotropía, redundancia, sinergismo, antagonismo e b) inducción de cascada. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

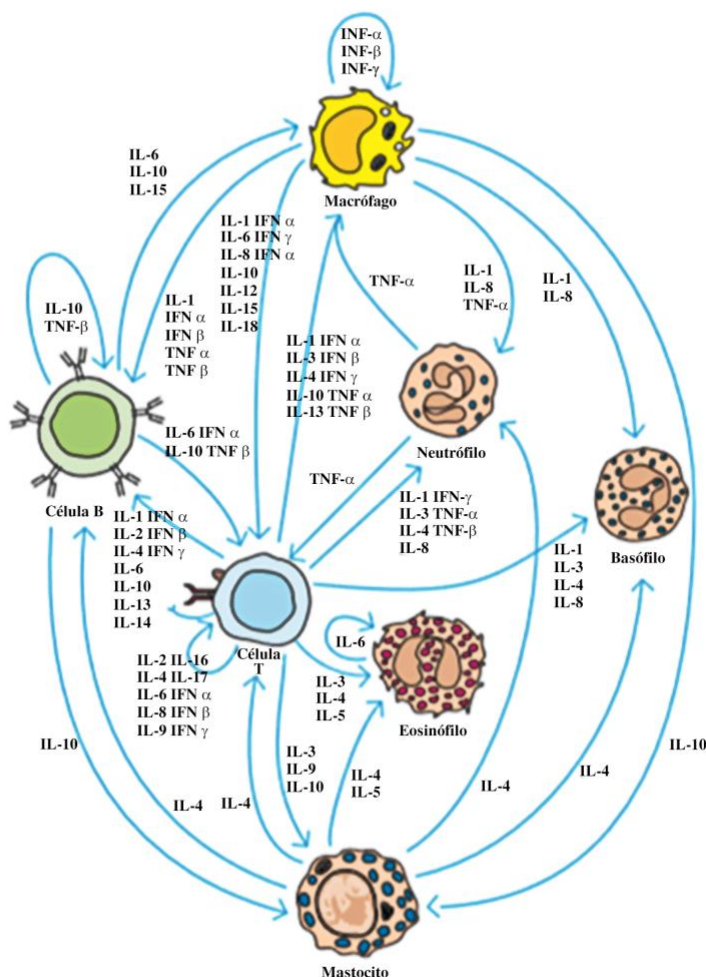
Las interacciones mediadas por citocinas también están reguladas por la comunicación intracelular que depende de la transducción de señales por medio de receptores. Éstos, a su vez, son finamente regulados por su estructura terciaria, que depende del número y la clase de dominios extracelulares, transmembranales o citoplasmáticos.

La acción de las citocinas, ya sean las interleucinas o las quimiocinas, inicia al unirse al receptor específico que expresan todos los leucocitos y muchas otras células.

Los receptores de membrana para citocinas se agrupan en cinco grandes familias establecidas por sus homologías estructurales, que se expresan de forma extracelular y median la internalización de las señales inducidas por las citocinas. Se trata de la superfamilia de las inmunoglobulinas o familia IL1/TLR (p. ej., IL1R); la familia de receptores de hematopoyetinas, también llamados receptores de citocinas tipo 1 (como IL-2R); la familia de receptores de interferones conocidos como receptores de citocinas tipo 2 (p. ej., IFNγR); la familia de receptores del TNF, o factor de crecimiento tumoral (p. ej., TNFαR y CD40R), y la familia de receptores de quimiocinas (como IL8) (Lenin, 2001).

Si bien diversas células pueden secretar citocinas que dan instrucciones al sistema inmunitario, los principales productores son células Th, células dendríticas y macrófagos. Las citocinas liberadas a partir de estos tipos de células son capaces de activar redes enteras de células que interactúan (figura 16). Entre las muchas respuestas fisiológicas que requieren la participación de citocinas están la generación de respuestas inmunitarias celulares y

humorales, la inducción de la respuesta inflamatoria, la regulación de la hematopoyesis y la cicatrización de heridas (Kuby, 2013).



**FIGURA 16.** Las células del sistema inmunitario están sujetas a control por una red de acciones de citocinas. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

### *IMPORTANCIA DE LAS CITOCINAS EN LA ACTIVACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS.*

Las células T auxiliares (cooperadoras) pueden clasificarse en subpoblaciones, cada una de las cuales se encarga de apoyar un grupo diferente de funciones inmunitarias. Por ende, la diferenciación y actividad de cada subpoblación de células T distintiva son apoyadas por la unión de diferentes combinaciones de citocinas a receptores de superficie de célula T; cada combinación de citocina induce su propia gama característica de señales intracelulares, y envía a la célula T auxiliar por una vía de diferenciación particular.

### *RECEPTORES Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA ACTIVACIÓN CELULAR.*

La capacidad de las citocinas para activar casi todos los miembros de subpoblaciones de células inmunitarias particulares, si no es que todos, parece estar en conflicto con la especificidad establecida del sistema inmunitario. Para que una célula responda a una

molécula emisora de señales, debe expresar receptores para esa molécula y, así, la capacidad de respuesta a una señal molecular puede ser controlada mediante expresión de receptor de señal. Por ejemplo, la estimulación de una célula T por antígeno induce alteraciones en la expresión de receptores de citocina en la superficie de la célula T; por ende, la recepción de señales de quimiocina por medio de estos receptores instruye sólo a las células que previamente han sido activadas por antígeno a migrar hacia ganglios linfáticos cercanos o hacia el bazo. Además, los cambios, inducidos por activación, en las moléculas de adhesión que se expresan sobre la membrana celular aseguran que las células estimuladas migren hacia, y después permanezcan en, la ubicación más idónea para su función. La activación de célula T por antígeno también regula en dirección ascendente la expresión de los receptores para citocinas que proporcionan señales proliferativas, como IL2, y para citocinas que participan en la diferenciación, como IL4. De esta manera, después del encuentro con antígeno, sólo las células T que han sido activadas por antígeno están preparadas para reubicarse y para recibir las señales para la proliferación y diferenciación que necesitan para funcionar como una célula efectora inmunitaria madura. Este patrón de alteración inducida por activación en la expresión de moléculas de adhesión, receptores de quimiocina y receptores de citocina en la superficie celular es una estrategia común empleada por el sistema inmunitario (Kuby, 2013)

### *INTERLEUCINAS.*

#### IL1

La IL1 participa en la diferenciación de linfocitos T naive hacia los diferentes perfiles. También influye en la diferenciación de los linfocitos Treg que son CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> seleccionados en el timo y los Treg tipo 1 (TRL) que son inducidos. En algunos casos actúan sobre algunas poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ , linfocitos B productores de IL10, células NK productoras de IL10, células dendríticas y macrófagos. (Lenin, 2001).

Las citocinas de la familia de la interleucina-1 (IL1) típicamente son secretadas en etapas muy tempranas de la respuesta inmunitaria por células dendríticas y monocitos o macrófagos. La secreción de IL1 es estimulada por reconocimiento de antígenos virales, parasitarios o bacterianos por receptores inmunitarios innatos. Los miembros de la familia IL1 por lo general son proinflamatorios, lo que significa que inducen un incremento de la permeabilidad capilar en el sitio de secreción de citocina, junto con amplificación de la magnitud de la migración de leucocitos hacia los tejidos infectados. Además, la IL1 tiene efectos sistémicos (en todo el organismo), y emite señales hacia el hígado para que produzca proteínas de fase aguda, como los interferones tipo I (IFN  $\alpha$  y  $\beta$ ), IL6, y la quimiocina CXCL8. Estas proteínas inducen más efectos protectores múltiples, incluso la destrucción de RNA viral y la generación de una respuesta de fiebre sistémica (que ayuda a eliminar muchas cepas de bacterias sensibles a la temperatura). La IL1 también activa células tanto T como B en el momento de la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa.

#### IL2

La IL2 promueve la proliferación de linfocitos activados al aumentar la producción de ciclinas, la expresión de Fos y de Myc, además de disminuir la producción de inhibidores del ciclo celular. También inhibe la apoptosis al favorecer la síntesis de Bcl-2 y Bcl-xL; induce la secreción de otras citocinas; limita la expansión de células linfoides mediante la expresión

de Fas y FasL, así como la disminución de la expresión de FLIP y promueve la tolerancia periférica. La IL2 es secretada por linfocitos Th CD4+ y Te CDS+ y, en conjunto con la IL15, es esencial para la diferenciación de linfocitos T naive en Treg. La IL2 es una citocina que también funciona como factor de crecimiento de linfocitos B, estimula la síntesis de anticuerpos y promueve la proliferación y diferenciación de las células NK para aumentar su función citolítica. Es la mediadora de la proliferación de linfocitos T activados, estimula el crecimiento, y la diferenciación y supervivencia de linfocitos Tc CD8+ antígeno específicos. Asimismo, es necesaria para los procesos de memoria, desarrollo y el reconocimiento de lo no propio por parte de los linfocitos T, y además actúa como mediador de la proliferación y expansión clonal de linfocitos Th2 e inhibe la diferenciación de linfocitos Th17 (Lenin, 2001).

#### IL4

La IL4 es una citocina altamente pleiotrópica que regula los procesos alérgicos y las respuestas protectoras contra helmintos y otros parásitos extracelulares. Además de inducir la diferenciación de linfocitos Th CD4 + a linfocitos Th2, induce la expresión de moléculas de MHC I y II en linfocitos B. Es un factor autocrino de los linfocitos Th2 durante su maduración. En concentraciones elevadas, la IL4 bloquea la generación de linfocitos Th1, estimula la proliferación de los linfocitos B y su maduración a células plasmáticas, aumenta la producción de IgE, bloquea la generación de linfocitos Treg Foxp3+ inducidos por TGF- $\beta$ , induce la diferenciación hacia linfocitos Th9 en combinación con TGF- $\beta$ , ya que aumenta la expresión de GATA3, además de inhibir la diferenciación de linfocitos Th17 (Lenin, 2001).

#### IL6

La IL6 es una citocina pleiotrópica que está relacionada con múltiples procesos de regulación inmunológica, respuesta de fase aguda, hematopoyesis e inflamación. Es producida por diferentes poblaciones celulares en respuesta a la IL1, la IL17 o el TNF $\alpha$  durante la inflamación sistémica. Dirige la activación y el tráfico de leucocitos, así como la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos. Inicia, junto con la IL4, la maduración de linfocitos Th2 a partir de linfocitos T naive. En concentraciones elevadas bloquea la generación de linfocitos Th1 a partir de linfocitos T naive y, al igual que la IL4, promueve la proliferación de linfocitos T, la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, favorece junto con la IL23 la transformación de linfocitos Treg y linfocitos T naive en linfocitos Th17, sinergiza con la IL15 para estimular la proliferación y la actividad citotóxica de linfocitos Tc CD8+. Además, es esencial para inducir la diferenciación de los linfocitos Tfh y aumentar la expresión de IL9 por linfocitos Th9, y es una citocina esencial en la activación del factor de transcripción ROR $\gamma$ t de los linfocitos Th17 responsables de la producción de IL17. La IL6 también regula la diferenciación de macrófagos, e inhibe la síntesis de IL11 (Lenin, 2001).

#### IL10

La IL10 regula muchos aspectos de la respuesta inflamatoria; se le considera la citocina antiinflamatoria por excelencia y es secretada por numerosos leucocitos. Su función primordial es limitar la producción de citocinas y quimiocinas inducidas por ligandos de TLR

en macrófagos y células dendríticas. Aumenta la proliferación de linfocitos B, es un autorregulador de la activación de linfocitos Th1, suprime la proliferación y la producción de citocinas en todos los linfocitos T, inhibe la secreción de citocinas e IFN $\gamma$  por linfocitos Th1, macrófagos y células dendríticas, aumenta la expresión de IL9 por linfocitos Th9 y, en consecuencia, se asocia con respuestas inflamatorias de alergia. Además, inhibe la secreción de IL12 por macrófagos y células dendríticas. Una de sus funciones es limitar el grado de infiltración de leucocitos en las zonas de inflamación, además de disminuir la expresión de moléculas del MHC II y de moléculas coestimuladoras, como CD2, CD28 e ICOS en macrófagos y monocitos, además de inhibir la expresión de citocinas como la IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL12, IL18, GM-CSF, G-CSF y TNF $\alpha$  (Lenin, 2001).

## IL12

Se relaciona con el desarrollo y el mantenimiento de linfocitos Th1 al inducir la producción de IFN $\gamma$  y las células NK. Favorece la expresión del receptor para IL18, que es una citocina que sirve como cofactor de la IL12 para inducir el desarrollo de linfocitos Th1, en oposición a la IL4 que inhibe la expresión del receptor para IL12 e inhibe el desarrollo de estos linfocitos. Las acciones opuestas del IFN $\gamma$  y la IL4 pueden ser la piedra angular de la diferenciación de los linfocitos T naive en Th1 o Th2. Promueve la supervivencia y el crecimiento de los linfocitos Th1 e inhibe la formación de los linfocitos Th2. La IL12 activa de manera indirecta la actividad antitumoral de macrófagos y promueve la actividad citolítica de las células NK. Aumenta la producción de IFN $\gamma$  y la producción de IL12 por células dendríticas, creando una retroalimentación positiva. Se le considera una de las citocinas proinflamatorias por excelencia. (Lenin, 2001).

## IL21

La IL21 regula el balance en la producción de los diferentes isotipos de anticuerpos al controlar la proliferación y la apoptosis de los linfocitos B, así como su diferenciación en células plasmáticas en los centros germinales. Aumenta la proliferación y la actividad de linfocitos Tc CD8+, de células NK y de linfocitos NKT; en estos últimos aumenta la producción de IL4, IL13 y granzima B. Actúa como factor de crecimiento autocrino para inducir y mantener la diferenciación de los linfocitos Tfh, y también para su supervivencia, e incrementa la expresión de IL9 por linfocitos Th9. Junto con la IL7 y la IL15, ejerce un efecto sinérgico para favorecer la expansión de los linfocitos Te CD8+. Refuerza la generación de células NK en ausencia de cantidades suficientes de IL2 o IL15 (Lenin, 2001).

## *INTERFERONES.*

Los interferones tipo I están compuestos de interferones  $\alpha$ , una familia de alrededor de 20 proteínas relacionadas, e interferón  $\beta$  que son secretados por macrófagos activados y células dendríticas, así como por células infectadas por virus. Los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  también son secretados por células infectadas por virus después del reconocimiento de componentes virales por receptores de reconocimiento de patrones ubicados sea en la superficie celular o dentro de la célula. Los PRR intracelulares pueden interactuar con ácidos nucleicos derivados de virus o con partículas virales que han sido objeto de endocitosis. Los interferones tipo I secretados a continuación interactúan a su vez con receptores de interferón unidos a membrana sobre las superficies de muchos tipos de células. Los resultados de su interacción incluyen la inducción de ribonucleasas que destruyen RNA viral (y celular), y el cese de la



síntesis de proteína celular. De este modo, los interferones evitan que las células infectadas por virus se repliquen, y que sintetizen nuevas partículas virales. Con todo, en forma simultánea inhiben funciones celulares normales y destruyen células infectadas por virus, de modo que la infección no pueda diseminarse. Los interferones tipo I son dímeros de polipéptidos de 18 a 20 kDa, con estructura predominantemente helicoidal, y algunos miembros de esta familia están naturalmente glucosilados. El interferón tipo II, por lo demás conocido como interferón  $\gamma$ , es producido por células T activadas y NK, y se libera como un dímero. El interferón  $\gamma$  es un poderoso modulador de la respuesta inmunitaria adaptativa; sesga el auxilio de células T hacia el tipo Th1, e induce la activación de macrófagos, con destrucción subsiguiente de cualesquiera agentes patógenos intracelulares, y la diferenciación de células T citotóxicas. Los tres interferones aumentan la expresión de proteínas del complejo MHC sobre la superficie de células, lo que incrementa sus capacidades de presentación de antígeno (Kuby, 2013).

#### *FACTOR DE NECROSIS TUMORAL.*

La familia de citocinas factor de necrosis tumoral (TNF) regula el desarrollo, la función efectora y la homeostasis de células que participan en los sistemas esquelético, neuronal e inmunitario, entre otros. Las citocinas de la familia del TNF pueden ser solubles o estar unidas a membrana. Las citocinas relacionadas con el TNF son poco comunes por cuanto suelen estar firmemente ancladas en la membrana celular. Por lo general son proteínas transmembrana tipo 2 con una región N terminal intracitoplasmática corta, y una región C terminal extracelular más larga. La región extracelular típicamente contiene un dominio de homología de TNF canónico del cual depende la interacción con los receptores de citocina. Los miembros de la familia del TNF también pueden actuar como mediadores solubles, después de división de sus regiones extracelulares y, en algunos casos, la misma citocina existe en formas tanto soluble como unida a membrana. Hay dos miembros homónimos de la familia del TNF: TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ , aunque el TNF $\beta$  es más comúnmente conocido como linfotoxina  $\alpha$ , o LT  $\alpha$ . Ambos son secretados como proteínas solubles. El TNF $\alpha$  (a menudo denominado simplemente TNF) es una citocina proinflamatoria, producida principalmente por macrófagos activados, pero también por otros tipos de células, incluso linfocitos, fibroblastos y queratinocitos, en respuesta a infección, inflamación y factores ambientales que generan estrés. El TNF desencadena sus efectos biológicos mediante unión a sus receptores, TNFR1 o TNFR2. La linfotoxina  $\alpha$  es producida por linfocitos activados, y puede emitir diversas señales. En el momento de la unión a neutrófilos, células endoteliales y osteoclastos la linfotoxina  $\alpha$  emite señales de activación; en otras células, la unión de linfotoxina  $\alpha$  puede llevar a expresión aumentada de glucoproteínas del MHC, y de moléculas de adhesión. La linfotoxina  $\beta$ , una citocina unida a membrana, es importante en la diferenciación de linfocitos (Kuby, 2013).

## MOLECULAS DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO Y COESTIMULATORIAS.

#### *RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO EN EL LINFOCITO T.*

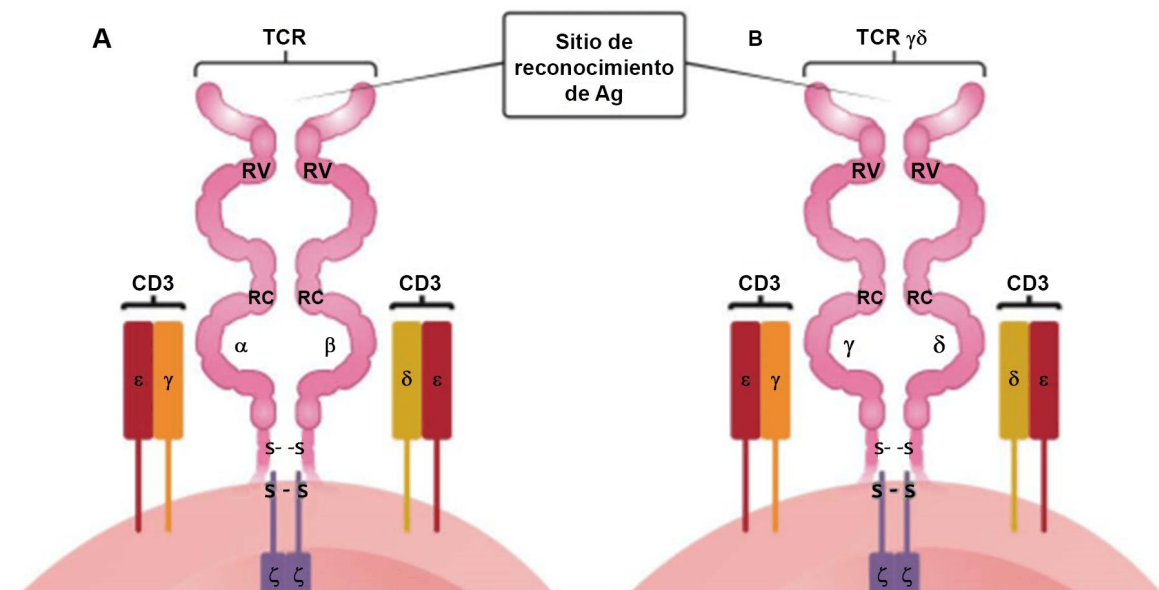
El TCR es la molécula que en los linfocitos T se encarga del reconocimiento de los epítopes de antígenos presentados en el contexto molecular del MHC. También es primordial para el proceso de selección positiva y negativa durante el desarrollo de los múltiples linajes de

linfocitos T en el timo. Existen otras moléculas correceptoras de superficie, como el CD4 y CD8, específicas para el reconocimiento del MHC II y MHC I, respectivamente, y otras que están involucradas en ambos linajes de linfocitos T en mecanismos de coactivación o coinhibición. El reconocimiento del MHC'/péptido por el TCR provoca la activación celular, lo que induce varios programas funcionales en los linfocitos T que pueden llevar tanto a la síntesis de factores de crecimiento como a la de sus receptores específicos, y también a la proliferación celular, selección clonal, apoptosis y producción de citocinas, quimiocinas y perforinas. Una vez en la circulación, o durante su migración a diversos tejidos, el linfocito T interactúa con distintos tipos celulares, sobre los cuales puede reconocer antígenos exógenos. Las APC con las que interactúa el linfocito T procesaron ya proteínas antigénicas y expresan en su superficie celular numerosos epítomos, que formarán un complejo con el MHC. Los péptidos que son reconocidos por los linfocitos T deben tener una estructura secundaria en  $\alpha$ -hélice, caracterizada por aminoácidos polares. Se ha determinado que la mayoría de los péptidos antigénicos presentados por MHC son anfipáticos, con una porción hidrofílica y otra hidrofóbica; dichas porciones interactúan de manera simultánea con el complejo TCR/CD3 y el MHC, respectivamente. Por esta razón, la asociación MHC/péptido antigénico-TCR es un proceso dinámico que depende de complejas interacciones célula-célula previas al contacto que generará la activación celular (Lenin, 2001).

#### *ESTRUCTURA DEL TCR.*

El TCR es un heterodímero estricto, está formado por dos subunidades proteínicas integrales de membrana que pueden ser de tipo alfa-beta o gamma-delta; estas cadenas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y las unen puentes disulfuro. Todos los componentes del TCR son proteínas integrales de membrana y están formados por un dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático C-terminal (Figura 17). La mayor parte de los linfocitos T en circulación o en los órganos linfoides secundarios expresan un TCR tipo alfa-beta, mientras que la variante gamma-delta del TCR se expresa en un bajo porcentaje de linfocitos T, distribuidos particularmente en tejidos linfoides asociados a mucosas. La cadena TCR $\alpha$  contiene oligosacáridos con ácido siálico y está formada por un dominio extracelular constituido por una región variable y dos cisteínas implicadas en los puentes disulfuro; una región de unión y una región constante que también contiene dos cisteínas indispensables para los puentes disulfuro intracatenarios. El dominio transmembranal contiene aminoácidos básicos, implicados en la formación del enlace iónico con las cadenas del complejo CD3, y el dominio intracelular comprende sólo cinco aminoácidos. La cadena beta del TCR es una proteína con estructura similar a la cadena alfa; también está glucosilada, consta de un péptido líder y está compuesta en la porción extracelular por una región variable, una de unión y otra constante que posee cuatro cisteínas. El dominio transmembranal está conformado por una región hidrofóbica con un residuo básico de lisina que crea un enlace iónico con el CD3. La porción intracelular la constituyen sólo cinco aminoácidos. La estructura de las cadenas alfa y beta guarda homología secuencial con los dominios de las inmunoglobulinas. El reordenamiento génico es el proceso por el cual se genera la diversidad de los anticuerpos y del TCR; depende tanto de la expresión de RAG1, RAG2 y de la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) como de la presencia de secuencias de DNA específicas adyacentes a los segmentos génicos de reordenamiento. El sitio del TCR que reconoce los determinantes antigénicos está codificado por el producto de la recombinación de segmentos VDJ para la cadena beta o la delta, lo mismo que por los

segmentos VJ de los genes alfa y gamma de las cadenas del TCR. Al igual que para la diversidad de anticuerpos, la diversidad de genes para el TCR se incrementa gracias a la adición de nucleótidos en los segmentos génicos; esta adición es catalizada por la TdT y no requiere una plantilla de DNA. Las regiones de cada molécula del TCR que interactúan con los determinantes antigénicos se denominan regiones determinantes de complementariedad o COR. En la interacción con el péptido presentado por el MHC participan tres COR; el COR3 se une al péptido mientras que el COR1 y COR2 estabilizan su unión al MHC. Este proceso ocurre en los linfocitos preT en el timo, y en cuanto la secuencia de cada TCR queda organizada se mantiene sin cambios y no desarrolla hipermutaciones somáticas. Para generar diversidad en los genes del receptor de linfocitos T intervienen diversos factores, como la unión aleatoria de los múltiples segmentos de los genes de la línea germinal, la diversidad de unión que resulta de una fusión imprecisa entre los distintos segmentos genéticos (lo que provoca deleciones y adiciones de nucleótidos y da origen así a una diferencia en el número de aminoácidos), la asociación al azar de las subunidades peptídicas que constituyen el receptor y, por último, la multiplicidad de los genes variables V. A consecuencia de la recombinación de estos factores se podrían generar hasta 5 000 tipos distintos de cadenas alfa y más de 500 cadenas beta, que tienen el potencial de formar 2.5 millones de combinaciones del TCR V(O) J. En contraste con las inmunoglobulinas, los genes del TCR no parecen diversificarse mediante mutaciones somáticas de los genes reordenados, quizá debido a la necesidad de crear dominios que serán específicos en la molécula del MHC y que generan superficie de contacto con los denominados histotopos y los paratopos. Estas características son esenciales para el correcto despliegue de la activación de los linfocitos T, de tal forma que, por estas características, el MHC de una APC de un individuo difícilmente sería reconocido por el TCR de las células de otro individuo, aunque ambos reconocieran un epítipo semejante (Lenin, 2001).

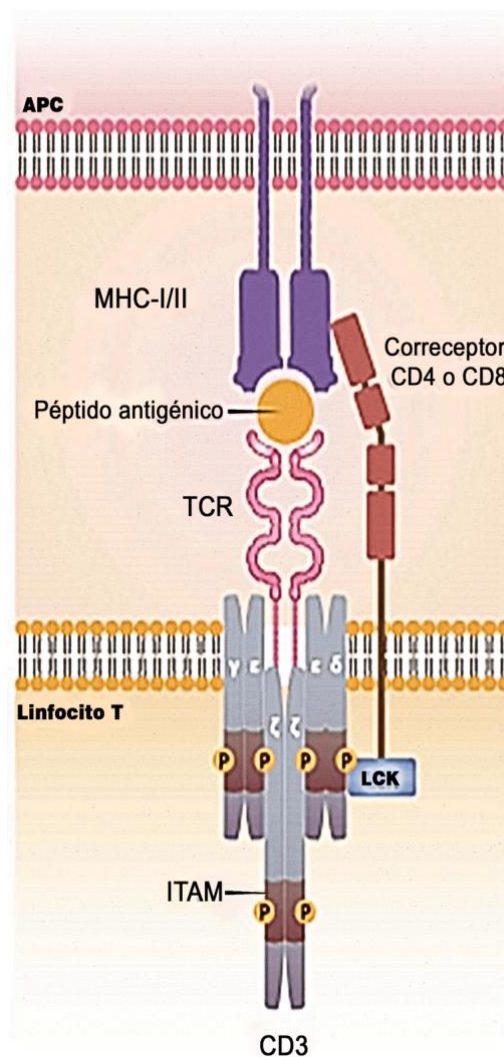


**FIGURA 17. Composición del TCR.** A. Se muestra el heterodímero del TCR con una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ , cada una de las cuáles está formada por una región variable (RV) (que reconoce al antígeno) y una región constante (RC). Este complejo TCR se asocia con dos complejos CD3, que pueden estar formados por heterodímeros de cadenas CD3 $\gamma/\epsilon$  o CD3 $\delta/\epsilon$ . Los complejos CD3 poseen regiones transmembranales más largas y son los que, junto con CD247 transducen la señal del

complejo TCR. B. Alternativa del TCR con cadenas ( $\gamma/\delta$ ). Ag=Antígeno; S-S= puentes disulfuro. Tomado y modificado de Lenin, 2001.

### CD3.

Asociados con las dos cadenas alfa-beta o con las cadenas gamma-delta del TCR, se encuentra un grupo de moléculas monomórficas de membrana denominado de manera colectiva CD3, que conforma el complejo TCR/CD3. El CD3 es la porción invariante del complejo; está formado por al menos tres monómeros unidos no covalentemente (denominados delta, épsilon y gamma). Cuando ocurre el reconocimiento antigénico entre el TCR y la molécula MHC que presenta al antígeno, el complejo TCR/CD3 se encarga de transmitir la señal de reconocimiento al desencadenar una cascada de reacciones bioquímicas en el citoplasma de la célula T, lo que da lugar al proceso de activación.



**FIGURA 18. Organización del complejo CD3/TCR.** Las cadenas  $\alpha\beta$  se encuentran asociadas al CD3. El CD3 está formado por tres cadenas denominadas  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$ , las cuales están unidas entre sí de manera covalente. Cuando TCR reconoce a su antígeno en el contexto del MHC, son las cadenas del CD3 las encargadas de la transmisión de a señal debido a sus regiones ITAM (rojo). La estabilidad de la señal se incrementa por la presencia de un correceptor, ya sea CD4 o CD8. Tomado y modificado de Lenin, 2001.

### *SEÑALIZACIÓN EN LOS LINFOCITOS T Y B.*

En 1970 se habló por primera vez de la teoría de la coestimulación, la cual propone que la primera señal proviene del BCR o del TCR identificando a la célula como competente para reconocer al antígeno y la segunda señal proviene de alguna molécula coestimuladora la cual provee señales intracelulares de progresión de activación que permite a los linfocitos activarse, proliferar, diferenciarse y ejercer sus funciones efectoras. Un ejemplo claro se da en los linfocitos T, cuando la activación del TCR sin señalización adicional es insuficiente para activarlos y los deja anérgicos; es decir, incapaces de responder a una activación posterior. De manera más reciente se sugirió que la teoría de coestimulación debería considerarse una ola de señales, ya que la activación e/o inhibición de los linfocitos parece ser, en realidad, resultado de una serie de eventos regulados tanto secuencial como temporalmente: la combinación del reconocimiento por el receptor antígeno específico, junto con la combinación y la intensidad de señales coestimuladoras y coinhibidoras que favorecerán la selección de los mecanismos celulares que se activarán en la célula. Dichas señales están influenciadas, además, por el subtipo y el estadio celular, el microambiente, las células aledañas y las citocinas, lo cual dicta el contexto de la situación. Las moléculas que coseñalizan con cualquiera de los receptores antígeno específicos pertenecen principalmente a dos familias: la superfamilia de las inmunoglobulinas (Sflg) (cuyas subfamilias CD28 y B7 son las mejor descritas) y la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), en la que se encuentran el CD40, OX40 y CD30, por mencionar algunas. El conocimiento acerca de la coseñalización en linfocitos ha crecido de modo notable, y se han descrito gran cantidad de moléculas involucradas en procesos de activación e inhibición (Lenin, 2001).

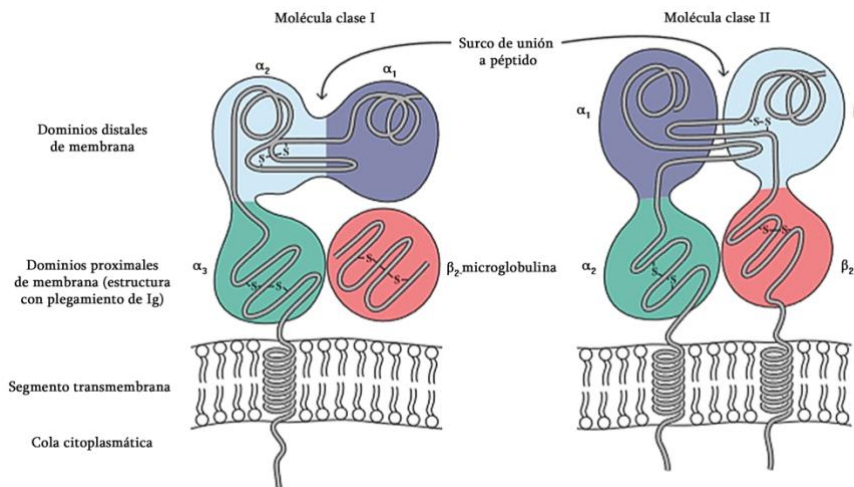
### **MHC. COMPLEJO MAYOR (PRINCIPAL) DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO.**

En contraste con anticuerpos o receptores de células B, que pueden reconocer antígenos directamente, los receptores de células T sólo reconocen fragmentos de antígeno que están posicionados sobre la superficie de otras células. Estos fragmentos de antígeno son mantenidos dentro del surco de unión de una proteína de superficie celular llamada la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), codificada por una agrupación de genes denominados en conjunto el locus de MHC. Estos fragmentos son generados dentro de la célula después de la digestión de antígeno y el complejo del péptido antigénico más la molécula de MHC a continuación aparece sobre la superficie celular. De este modo, las moléculas de MHC actúan como un recipiente de superficie celular para sostener y desplegar fragmentos de antígeno de modo que las células T que se aproximan puedan unirse con este complejo molecular por medio de sus receptores de célula T. Hay dos clases principales de moléculas de MHC: clase I y clase II. Estas dos moléculas son muy similares en su estructura cuaternaria final, aunque difieren en la manera en que crean estas formas por medio principalmente de ordenamientos de proteína cuaternarios. Las moléculas de MHC clase I y clase II también difieren en términos de cuáles células las expresan, y en la fuente de los antígenos que presentan a células T. Las moléculas clase I están presentes en todas las células nucleadas del cuerpo, y se especializan en presentar antígenos que se originan a partir del citosol, como proteínas virales. Éstas son presentadas a células T CD8+, que reconocen y matan células que expresan esos antígenos intracelulares. En contraste, las moléculas de

MHC clase II son expresadas casi de manera exclusiva sobre las APC, y se especializan en presentar antígenos que provienen de espacios extracelulares que han sido fagocitados por estas células, como hongos, y bacterias extracelulares. Una vez expresada sobre la superficie celular, la molécula de MHC clase II presenta el péptido antigénico a células T CD4+, que entonces quedan activadas y proceden a estimular inmunidad dirigida principalmente a destruir invasores extracelulares (Kuby, 2013).

### *ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS CLASE II.*

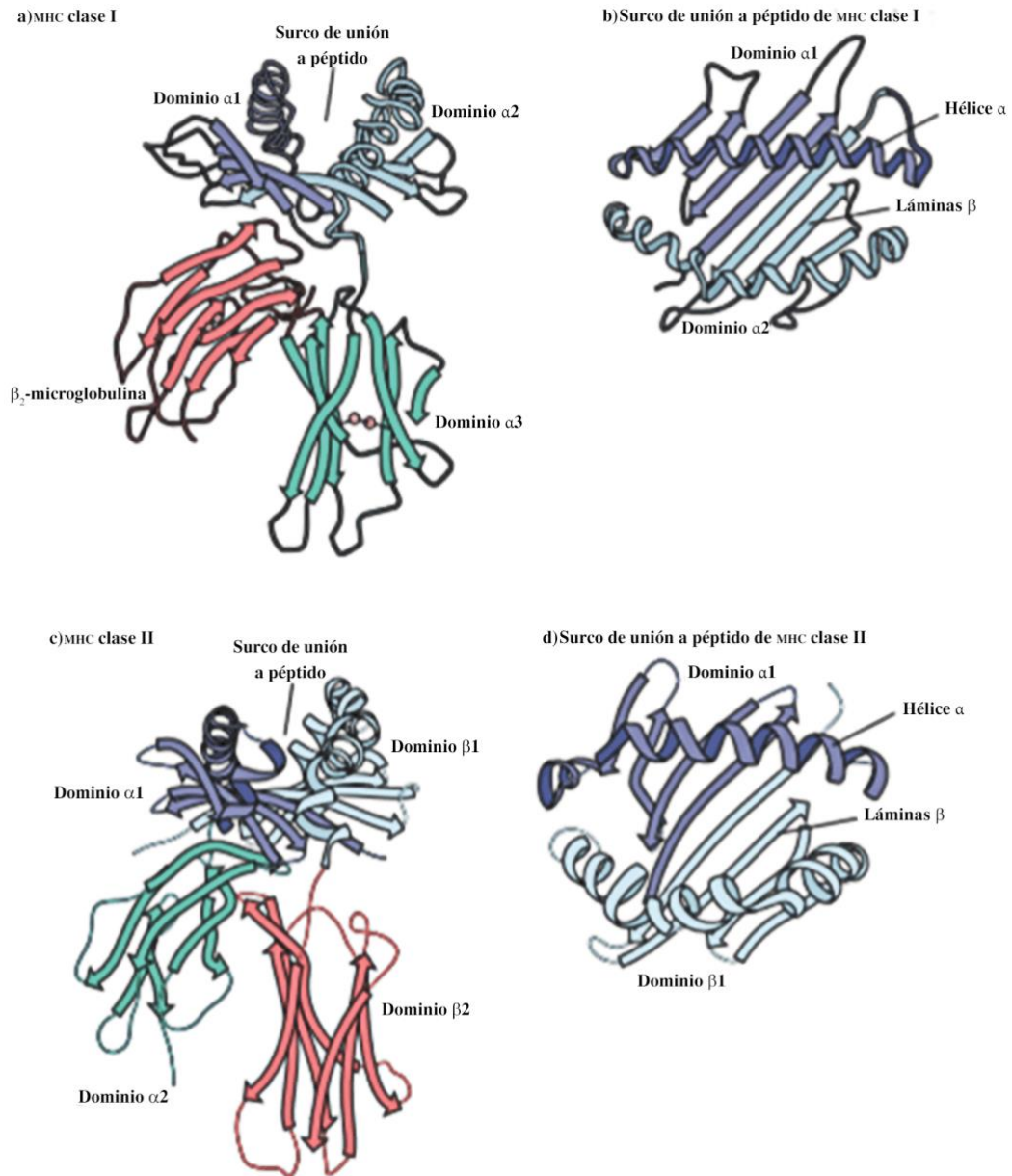
Las moléculas de MHC clase II contienen dos cadenas polipeptídicas diferentes, una  $\alpha$  de 33 kDa, y una cadena  $\beta$  de 28 kDa, que se asocian por medio de interacciones no covalentes (figura 19, derecha). Las moléculas de MHC clase II son glicoproteínas unidas a membrana que contienen dominios externos, un segmento transmembrana, y un segmento de anclaje citoplasmático. Cada cadena en una molécula clase II contiene dos dominios externos: dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  en una cadena, y dominios  $\beta_1$  y  $\beta_2$  en la otra. Los dominios  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  proximales de membrana, muestran similitud de secuencia a la estructura de pliegue de inmunoglobulina. Por esta razón, las moléculas de MHC clase II también se clasifican en la familia de la inmunoglobulina. Los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  forman el surco de unión a péptido para antígeno procesado, este surco es formado, así, por la asociación de dos cadenas separadas. El surco de unión a péptido de moléculas clase II, está compuesto de un piso de ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas, y lados de hélices  $\alpha$  antiparalelas, donde pueden unirse péptidos que típicamente varían de 13 a 18 aminoácidos. La molécula clase II carece de los residuos conservados en la molécula clase I que se unen a los aminoácidos terminales de péptidos cortos, y, por ende, forma más de una bolsa abierta. De esta manera, la clase I presenta una abertura de tipo más parecido a receptáculo, mientras que la clase II posee un surco de extremo abierto (Kuby, 2013).



**FIGURA 19. Diagramas de moléculas de MHC clase I clase II que muestran los dominios externos, los segmentos transmembrana y las colas citoplasmáticas.** El surco de unión a péptido está formado por los dominios distales de membrana en moléculas tanto clase I como clase II (azul). Los dominios proximales de membrana (verde y rojo) poseen la estructura de plegamiento de inmunoglobulina básica; así, las moléculas de MHC tanto de clase I como de clase II se clasifican como miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

### *INTERACCIÓN MHC CLASE II-PÉPTIDO.*

Las moléculas de MHC clase II se unen a péptidos y los presentan a células T CD4+. Al igual que las moléculas clase I, las moléculas de MHC clase II pueden unirse a diversos péptidos. Estos péptidos típicamente se derivan de proteínas exógenas (propias o extrañas) que son degradadas dentro de la vía de procesamiento exógeno. Casi todos los péptidos asociados con moléculas de MHC clase II se derivan de proteínas unidas a membrana propias o proteínas extrañas internalizadas por medio de fagocitosis o mediante endocitosis mediada por receptor, y después procesadas por medio de la vía exógena. Los péptidos unidos a moléculas de MHC clase II mantienen una elevación relativamente constante sobre el piso del surco de unión, otra característica que distingue la unión de péptidos a moléculas clase I y clase II. Estudios de unión a péptido y datos estructurales para moléculas clase II indican que un núcleo central de 13 aminoácidos determina la capacidad de un péptido para unirse a clase II. Péptidos más largos pueden ser adaptados dentro del surco clase II, pero las características de unión están determinadas por los 13 residuos centrales. Los péptidos que se unen a una molécula clase II particular a menudo tienen motivos de secuencia conservados internos, pero a diferencia de los péptidos de unión a clase I, parecen carecer de residuos ancla conservados. En lugar de eso, los enlaces de hidrógeno entre el esqueleto del péptido y la molécula clase II están distribuidos en todo el sitio de unión en lugar de estar agrupados predominantemente en los extremos del sitio, como se observa en los péptidos unidos a clase I. Los péptidos que se unen a moléculas de MHC clase II contienen una secuencia interna de siete a diez aminoácidos que proporcionan los principales puntos de contacto. En general, esta secuencia tiene un residuo aromático o hidrofóbico en el amino terminal, y otros tres residuos hidrofóbicos en la porción media del extremo carboxilo terminal del péptido. Además, más de 30% de los péptidos eluidos de moléculas clase II contiene un residuo prolina en la posición 2 y otra agrupación de prolina en el extremo carboxilo terminal. Esta flexibilidad relativa contribuye a la promiscuidad de unión a péptido (Kuby, 2013).



**FIGURA 20. Representaciones de la estructura tridimensional de los dominios externos de moléculas de MHC clase I y clase II de humano, basadas en análisis cristalográficos de rayos X.** a, c) Vistas laterales de las clases I y II, respectivamente, en las cuales las cadenas  $\beta$  se describen como flechas gruesas y las hélices  $\alpha$  como cintas en espiral. Los enlaces disulfuro se muestran como dos esferas interconectadas. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la clase I, y los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de la clase II, interactúan para formar el surco de unión a péptido. Note la estructura de plegamiento de inmunoglobulina de cada dominio proximal de membrana, incluso la molécula de  $\beta 2$ -microglobulina. b, d) Los dominios  $\alpha 1$  (azul oscuro) y  $\alpha 2$  (azul claro) de la clase I, y los dominios  $\alpha 1$  (azul oscuro) y  $\beta 1$  (azul claro) de la clase II, según se observan desde la parte superior; muestran los surcos de enlace a péptido, que constan de una base de cadenas  $\beta$  antiparalelas y lados de hélices  $\alpha$  para cada molécula. Este surco puede dar cabida a péptidos de ocho a 10 residuos para la clase I y de 13 a 18 residuos para la clase II. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

### *FUNCIÓN DEL MHC Y PATRONES DE EXPRESIÓN.*

Varias características genéticas ayudan a asegurar una diversidad de moléculas de MHC en poblaciones exogámicas, entre ellas poligenia, polimorfismo y expresión codominante. Toda esta atención que se pone a maximizar el número de surcos de unión sugiere que la variedad



dentro del MHC desempeña un papel importante en la supervivencia. De hecho, además de combatir la infección, la expresión del MHC en todo el organismo desempeña un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis y la salud aun en ausencia de antígeno extraño. Si bien la presentación de complejos de moléculas de MHC con antígeno extraño a células T obtiene mucha atención casi todas las moléculas de MHC pasan su vida presentando otras cosas, y a menudo a otras células. Hay varias razones por las cuales una molécula de MHC sobre la superficie de una célula es importante. En general, éstas incluyen:

- Desplegar clase I propia para demostrar que la célula está sana.
- Desplegar péptido extraño en clase I para mostrar que la célula está infectada y para unirse con células TC.
- Desplegar un péptido propio en clase I y clase II para probar células T en desarrollo respecto a autorreactividad (órganos linfoides primarios).
- Desplegar un péptido propio en clases I y II para mantener la tolerancia a proteínas propias (órganos linfoides secundarios).
- Desplegar un péptido extraño en clase II para mostrar que el cuerpo está infectado y activar células Th.

Vale la pena notar que, si bien algunos de estos casos llevan a activación inmunitaria, algunos no lo hacen. También es importante señalar que el tipo de célula, la ubicación tisular, y la cronología de la expresión varían para cada una de estas situaciones. Por ejemplo, las células T en desarrollo encuentran primero moléculas de MHC clase I y II que presentan péptidos propios en el timo, donde estas señales están diseñadas para inhibir la capacidad de las células T para atacar estructuras propias más tarde. Otras ocurren sólo después de ciertos tipos de exposición, como durante una respuesta inmunitaria a agentes patógenos extracelulares, o cuando células en el organismo están infectadas por invasores virales, y están diseñadas para activar células T para que actúen contra el agente patógeno (Kuby, 2013).

#### *CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO.*

Las moléculas de MHC clase II despliegan principalmente péptidos que provienen de los espacios extracelulares del organismo. Dado que este muestreo de contenido extracelular no es una forma de “vigilancia policial” que todas las células necesitan realizar, sólo leucocitos especializados poseen esta capacidad. Estas células, como ya mencionamos se denominan en conjunto células presentadoras de antígeno o APC, porque su trabajo es presentar antígeno extracelular a células T, y les asigna el trabajo final de coordinar la eliminación de este invasor extracelular. Si bien todas las células del organismo expresan proteínas de MHC clase I, y pueden presentar péptidos que provienen de antígenos intracelulares extraños, el término APC por lo general se reserva para células que expresan MHC clase II. Las células presentadoras de antígeno son principalmente ciertos tipos de leucocitos. Las APC están especializadas por su capacidad para avisar al sistema inmunitario de la presencia de un invasor e impulsar la activación de respuestas de células T. Entre las diversas APC, se han observado diferencias notorias de la magnitud de expresión de MHC clase II. En algunos casos, la expresión de clase II depende de la etapa de diferenciación, o de la magnitud de activación de la célula. La activación de APC por lo general ocurre después de la interacción con un agente patógeno y/o por medio de emisión de señales de citocinas, que a continuación inducen incrementos importantes de la expresión de MHC clase II. Diversas células pueden funcionar como APC fiables. Su característica distintiva es su capacidad para expresar moléculas de MHC clase II y suministrar una señal coestimuladora, o segunda señal

activadora a células T. Se sabe que tres tipos de células tienen estas características y, así, a menudo se denominan células presentadoras de antígeno profesionales (pAPC): células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Estas células difieren una de otra en sus mecanismos de captación de antígeno, en el hecho de si expresan de manera constitutiva moléculas de MHC clase II, y en su actividad coestimuladora, como sigue:

- Las células dendríticas por lo general se consideran las más eficaces de las APC. Dado que estas células expresan de manera constitutiva cifras altas de moléculas de MHC clase II, y tienen actividad coestimuladora inherente, pueden activar células Th vírgenes.
- Los macrófagos deben ser activados (p. ej., por medio de emisión de señales de TLR) antes de que expresen moléculas de MHC clase II o moléculas de membrana coestimuladoras, como CD80/86.
- Las células B expresan de manera constitutiva moléculas de MHC clase II, y poseen receptores de superficie específicos para antígeno, lo que las hace en particular eficientes para capturar su antígeno cognado y presentarlo. De cualquier modo, deben ser activadas, por ejemplo, por antígeno, citocinas o patrones moleculares asociados con agente patógeno (PAMP) antes de que expresen las moléculas coestimuladoras que se requieren para activar células Th vírgenes.

Varios otros tipos de células, clasificados como APC no profesionales, pueden ser inducidos para que expresen moléculas de MHC clase II y/o una señal coestimuladora en ciertas circunstancias (tabla 4). Estas células pueden actuar como representantes para presentación de antígeno profesional durante periodos breves y en situaciones particulares, como durante una respuesta inflamatoria sostenida.

Células presentadoras de antígeno profesionales	Células presentadoras de antígeno no profesionales	
Células dendríticas (varios tipos)	Fibroblastos (piel)	Células epiteliales tímicas
Macrófagos	Células gliales (cerebro)	Células epiteliales tiroideas
Células B	Células $\beta$ pancreáticas	Células endoteliales vasculares

TABLA 4. Células presentadoras de antígeno. Tomado y modificado de Kuby, 2013.

Como se mencionó, el MHC clase I es expresado de manera constitutiva por casi todas las células del organismo, mientras que la clase II sólo es expresada en ciertas circunstancias, y en un número muy limitado de tipos de células. Los diferentes papeles de las dos moléculas ayudan a explicar esto, y sugieren que en ciertas circunstancias cambios específicos de la expresión de MHC pueden resultar ventajosos. El locus del MHC puede mostrar respuesta a presiones reguladoras tanto positivas como negativas. La expresión de MHC clase II sobre APC ya es bastante variable, y el microambiente que rodea una APC puede modular más la

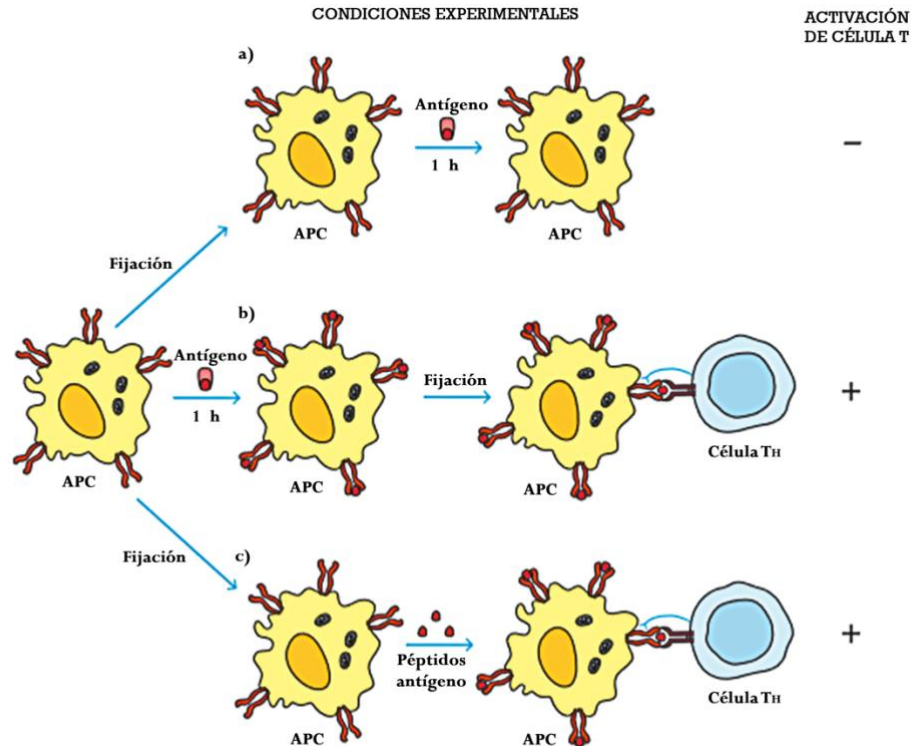
expresión; generalmente aumentando la expresión de estas moléculas. Las APC en particular están condicionadas para mostrar respuesta a indicios locales que llevan a su activación y expresión aumentada de MHC, lo que les permite armar a otras células del cuerpo para la batalla. Como podría imaginarse, esta activación y armado de APC deben estar regulados cuidadosamente; para que estas células no dirijan maniobras agresivas indeseadas contra componentes propios o acompañantes benignos, como ocurre en afecciones clínicas como autoinmunidad o alergia, respectivamente (Kuby, 2013).

#### *EMISIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR CITOCINA.*

La expresión de moléculas de MHC está regulada externamente por diversas citocinas. Entre éstas las principales son los interferones ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y los factores de necrosis tumoral (TNF $\alpha$  y linfotoxina  $\alpha$ ), cada uno de los cuales se ha mostrado que aumenta la expresión de moléculas de MHC clase I sobre células. Típicamente, las células fagocíticas que están involucradas en respuestas innatas, o células infectadas localmente, son las primeras en producir estas citocinas reguladoras del MHC. En particular, el IFN $\alpha$  (producido por una célula después de infección viral o bacteriana) y el TNF $\alpha$  (secretado por APC después de la activación) suelen ser las primeras citocinas que desencadenan un evento de regulación ascendente de MHC clase I. En las etapas más tardías, el interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), secretado por células Th activadas, así como por otros tipos de células, también contribuye a la expresión aumentada de MHC. La unión de estas citocinas a sus receptores respectivos induce cascadas de emisión de señales intracelulares que activan factores de transcripción y alteran patrones de expresión. Estos factores se unen a sus secuencias promotoras blanco y coordinan la transcripción aumentada de los genes que codifican para la cadena  $\alpha$  clase I,  $\beta$ 2-microglobulina, y otras proteínas involucradas en el procesamiento de antígeno y la presentación del mismo. Se ha mostrado que el IFN $\gamma$  induce la expresión del activador transcripcional clase II (ciita), lo que aumenta de manera indirecta la expresión de moléculas de MHC clase II sobre diversas células, incluso no APC (p. ej., queratinocitos cutáneos, células epiteliales intestinales, endotelio vascular, células placentarias y células  $\beta$  pancreáticas). Otras citocinas influyen sobre la expresión del MHC sólo en ciertos tipos de células. Por ejemplo, la IL4 aumenta la expresión de moléculas clase II en células B en reposo, y las convierte en APC más eficientes. Por el contrario, el IFN $\gamma$  regula en dirección descendente la expresión de moléculas clase II por células B. Los corticosteroides y las prostaglandinas también disminuyen la expresión de moléculas de MHC clase II. Estos compuestos naturales, permeables a membrana, se unen a receptores intracelulares y son algunos de los supresores más potentes de la inmunidad adaptativa, principalmente con base en su capacidad para inhibir la expresión de MHC (Kuby, 2013).

#### *EL PROCESAMIENTO DE ANTÍGENO.*

Durante la década de 1980-1989, Ziegler y E. R. Unanue mostraron que para activar células T se requería un paso de procesamiento intracelular por APC. Experimentos subsiguientes realizados por R. P. Shimonkevitz mostraron que la internalización y el procesamiento podían sortearse si las APC quedaban expuestas a fragmentos peptídicos ya digeridos en lugar de al antígeno natural (figura 21c).



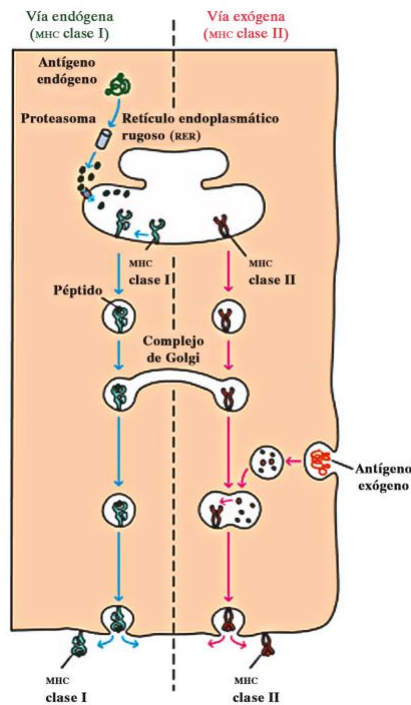
**FIGURA 21. Demostración experimental de que el procesamiento de antígeno es necesario para activación de células Th.** A) Cuando células presentadoras de antígeno (APC) son fijadas antes de exposición a antígeno, son incapaces de activar células Th. B) En contraste, las APC fijas al menos 1h después de exposición a antígeno pueden activar células Th. (En esta figura simplificada no se muestran moléculas coestimuladoras necesarias para activación de célula T.) C) Cuando las APC son fijadas antes de exposición a antígeno, e incubadas con digeridos peptídicos del antígeno (más que con el antígeno natural), también pueden activar células Th. La activación de células Th se determina al medir una respuesta de célula Th específica (p. ej., secreción de citocina). Tomado y modificado de Kuby, 2013.

Casi al mismo tiempo, varios investigadores, entre ellos W. Gerhard, A. Townsend y sus colegas, empezaron a identificar las proteínas del virus de la gripe que eran reconocidas por células TC. Al contrario de sus expectativas, encontraron que las proteínas internas del virus, como la polimerasa y proteínas de la nucleocápside, a menudo fueron reconocidas por células TC mejor que las proteínas de envoltura más expuestas que se encuentran sobre la superficie del virus. Más aún, la investigación de Townsend reveló que las células TC reconocieron secuencias peptídicas lineales cortas de proteínas del virus de la gripe. Estos datos, junto con los que se presentan a continuación, sugieren que el procesamiento de antígeno es un proceso metabólico que digiere proteínas hacia péptidos, que entonces pueden ser desplegados sobre la superficie celular junto con una molécula de MHC clase I o clase II (Kuby, 2013).

*VÍAS DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO.*

El sistema inmunitario típicamente usa diferentes vías para eliminar antígenos intracelulares y extracelulares. Como regla general, los antígenos endógenos (los generados dentro de la célula) son procesados en la vía citosólica o endógena, y presentados sobre la membrana con moléculas de MHC clase I. Los antígenos exógenos (aquellos captados desde el ambiente extracelular por medio de endocitosis) típicamente son procesados en la vía exógena y presentados sobre la membrana con moléculas de MHC clase II (figura 22). Experimentos realizados por L. A. Morrison y T. J. Braciale proporcionaron una excelente demostración de

que los péptidos antigénicos presentados por moléculas de MHC clase I y clase II siguen rutas diferentes durante el procesamiento de antígeno.



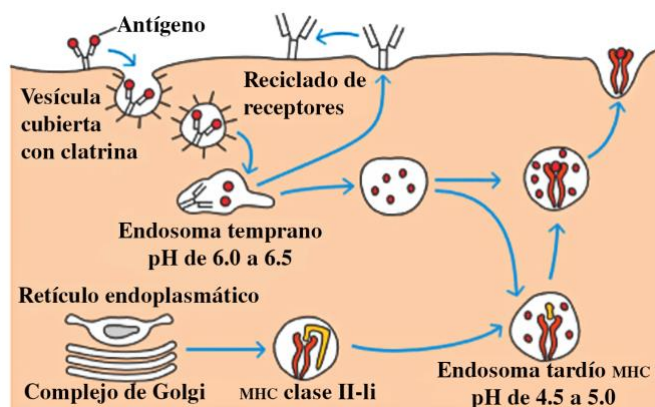
**FIGURA 22. Perspectiva general de las vías endógenas y exógenas para procesar antígeno.** En la vía endógena (izquierda), los antígenos son degradados por el proteosoma, y convierten proteínas hacia péptidos más pequeños. En la vía exógena (derecha), antígenos extracelulares son fagocitados hacia compartimentos endocíticos donde son degradados por enzimas endosomales y lisosomales dependientes de pH ácido. Los péptidos antigénicos provenientes de división de proteosoma, y los que provienen de compartimentos endocíticos se asocian con moléculas de MHC I o II, respectivamente, y los complejos de MHC péptido a continuación son transportados hacia la membrana celular. Cabe hacer notar que el destino final de casi todos los péptidos en la célula es ni una ni otra de esas vías, sino más bien, son degradados por completo hacia aminoácidos. *Tomado y modificado de Kuby, 2013.*

### LA VÍA EXÓGENA DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO.

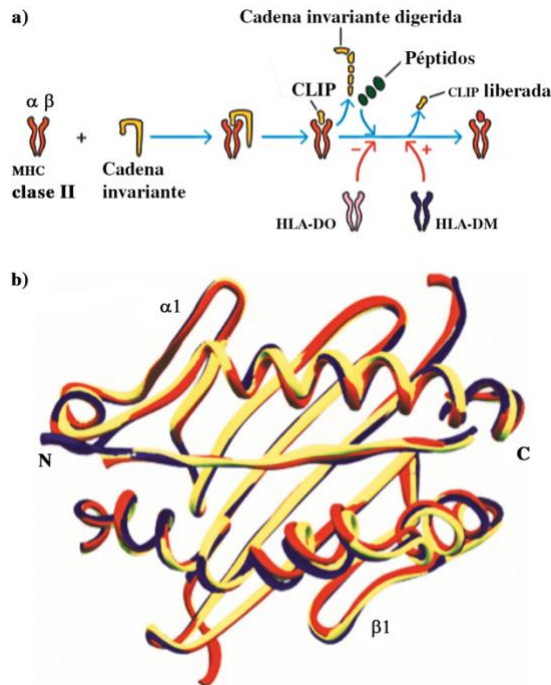
Las APC pueden internalizar material particulado mediante fagocitosis simple (también llamada “ingestión de células”), en la cual se fagocita material mediante pseudópodos de la membrana celular, o por medio de endocitosis mediada por receptor, en la que el material primero se une a receptores de superficie específicos. Los macrófagos y las células dendríticas internalizan antígeno por medio de ambos procesos. Casi todas las otras APC, sean profesionales o no, demuestran poca o ninguna actividad fagocítica y, por ende, típicamente internalizan antígeno exógeno sólo mediante endocitosis (sea endocitosis mediada por receptor o por medio de pinocitosis, “bebida de célula”). Por ejemplo, las células B internalizan antígeno con mucha eficacia por medio de endocitosis mediada por receptor al usar como el receptor su inmunoglobulina de membrana específica para antígeno.

Una vez que un antígeno es internalizado, es degradado hacia péptidos dentro de compartimentos de la vía de procesamiento endocítica. El antígeno internalizado tarda 1 a 3 h en pasar por la vía endocítica, y aparece en la superficie celular en forma de complejos de péptido-MHC clase II. La vía de procesamiento de antígeno endocítica parece comprender varios compartimentos cada vez más ácidos, incluso endosomas tempranas (pH de 6.0 a 6.5); endosomas tardíos o endolisosomas (pH de 4.5 a 5.0), y lisosomas (pH de 4.5). El antígeno internalizado progresa por estos compartimentos, y encuentra enzimas hidrolíticas y un pH

más bajo en cada compartimento (figura 23). Las células presentadoras de antígeno tienen una forma singular de endosoma tardío; el compartimento que contiene MHC clase II (miic), en el cual ocurren la degradación final de proteína y la carga de péptido hacia proteínas MHC clase II. Dentro de los compartimentos de la vía endocítica, el antígeno es degradado hacia oligopéptidos de alrededor de 13 a 18 residuos que se reúnen con moléculas de MHC clase II y se unen a las mismas en endosomas tardíos. Puesto que las enzimas hidrolíticas muestran actividad óptima en condiciones ácidas (pH bajo), el procesamiento de antígeno puede ser inhibido por agentes químicos que incrementan el pH de los compartimentos (p. ej., cloroquina), así como por inhibidores de proteasa (p. ej., leupeptina). El mecanismo mediante el cual el antígeno internalizado pasa desde un compartimento endocítico hacia el siguiente no se ha demostrado de manera concluyente. Se ha sugerido que los endosomas tempranos provenientes de la periferia se mueven hacia adentro para convertirse en endosomas tardíos y finalmente en lisosomas. De manera alternativa, las vesículas de transporte pequeñas pueden transportar antígenos desde un compartimento hacia el siguiente. Finalmente, los compartimentos endocíticos, o porciones de ellos, vuelven a la periferia celular, donde se fusionan con la membrana plasmática. De esta manera, los receptores de superficie son reciclados (Kuby, 2013).

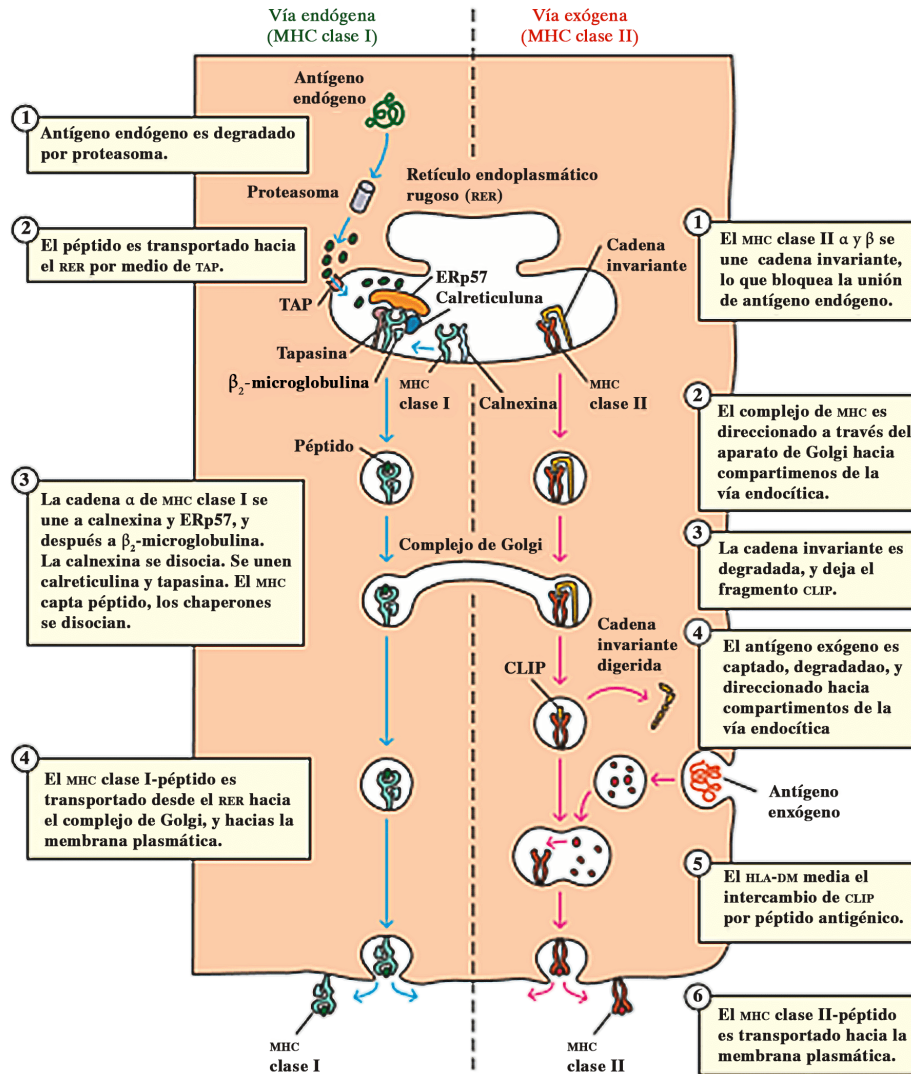


**FIGURA 23. Generación de péptidos antigénicos en la vía de procesamiento exógeno.** Antígeno exógeno internalizado pasa por varios compartimientos ácidos que terminan en endosomas tardíos MHC especializados, donde es degradado hacia fragmentos peptídicos que se asocian con moléculas de MHC clase II transportadas en vesículas desde el complejo de Golgi. La célula que se muestra aquí es una célula B, que internaliza antígeno mediante endocitosis mediada por receptor; el anticuerpo unido a membrana funciona como un receptor específico para antígeno. *Tomado y modificado de Kuby, 2013.*



**FIGURA 24. Montaje de moléculas de MHC clase II.** a) Dentro del retículo endoplasmático rugoso, una molécula de MHC II recién sintetizada se une a una cadena invariante. La cadena invariante unida evita la unión prematura de péptidos a la molécula clase II, y ayuda a dirigir el complejo hacia compartimentos endocíticos que contienen péptidos derivados de antígenos exógenos. La digestión de la cadena invariante deja CLIP, un fragmento pequeño que permanece en el surco de unión de la molécula de MHC II. HLA-DM, una molécula de MHC clase II no clásica presente dentro del compartimento de MHC, media el intercambio de péptidos antigénicos por CLIP. La molécula clase II no clásica HLA-DO puede actuar como un regulador negativo del procesamiento de antígeno por clase II al unirse a HLA-DM e inhibir su papel en la disociación de CLIP desde moléculas clase II. b) Comparación de estructuras tridimensionales que muestran el surco de unión de moléculas de HLA clase II; las líneas amarillas son HLA-DR1 con péptido de hemaglutinina del virus de la gripe, y las líneas azul oscuro son HLA-DR3 asociadas con CLIP. (N indica el amino terminal y C el carboxilo terminal de los péptidos.) No se observan diferencias importantes en las estructuras de las moléculas clase II ni en la conformación de los péptidos unidos. Esta comparación muestra que CLIP se une a la molécula clase II de una manera idéntica a la de péptidos antigénicos. *Tomado y modificado de Kuby, 2013.*

El hecho de si un péptido antigénico se asocia con moléculas clase I o con moléculas clase II está dictado parcialmente por el modo de entrada hacia la célula, sea exógeno o endógeno, por el sitio de procesamiento, y por el tipo de célula. Aun así, estas asignaciones no son absolutas, y los antígenos exógenos pueden, en algunas APC, ser presentados por antígenos clase I por medio de una vía singular.



**FIGURA 25.** Vías de presentación de antígeno separadas son utilizadas para antígenos endógenos (verde) y exógenos (rojo). El modo de entrada de antígeno hacia las células y el sitio de procesamiento de antígeno determinan si péptidos antigénicos se asocian con moléculas de MHC I en el retículo endoplasmático rugoso o con moléculas de clase II en compartimentos endocíticos.



# SISTEMAS COMPLEJOS Y REDES REGULADORAS EN LA BIOLOGIA.

## SISTEMAS COMPLEJOS Y REDES REGULADORAS EN LA BIOLOGÍA.

Un sistema complejo, en su acepción más simple, consta de componentes que interactúan y pueden modificar sus estados internos como producto de las interacciones. Normalmente, el número de componentes es suficientemente grande para que su estudio a la Newton (plantear un sistema de ecuaciones diferenciales con una por cada grado de libertad) sea imposible y, a la vez, suficientemente pequeño para que el formalismo de la mecánica estadística (en donde los promedios de magnitudes microscópicas dan sentido al uso de variables macroscópicas). Habitualmente se cuenta con la presencia de dinámicas antagónicas, lo que trae como resultado que las interacciones no sean lineales. Un sistema complejo es reconocible por su comportamiento y sus rasgos más notables: la autoorganización, la frustración y la evolución hacia la zona crítica. También exhiben leyes de escalamiento espacio-temporales y fundamentalmente, emergencia de patrones (Ramírez, 1999).

Una gran cantidad de sistemas complejos pueden estudiarse y caracterizarse mediante el análisis de redes; se han condensado unos cuantos modelos: redes simples, aleatorias, de mundo pequeño y libres de escala, y se han estudiado sus propiedades estadísticas como el grado de distribución, su longitud característica entre nodos y grado de aglutinación, que permiten establecer propiedades de su arquitectura, su vulnerabilidad, su robustez (tolerancia a fallas) y los nodos más relevantes. Newman y Girvan, Guimera y Amaral, desarrollaron los primeros trabajos en redes metabólicas (Mitchel, 2006) describiendo los “roles” desempeñados por cada nodo. Se han desarrollado una buena cantidad de trabajos en redes metabólicas estudiando principalmente microorganismos. Es posible, a partir de la gran cantidad de datos recopilados de la fenomenología de las enfermedades, la construcción de las redes metabólicas para su análisis. Para la identificación de los nodos y sus conexiones, pueden utilizarse gráficas de sustratos, de reacciones, de enzimas o combinación de las anteriores, ubicando conexiones tanto directas como indirectas. Así como pudiera estudiarse la red interna del organismo, pudiera hacerse con la red externa, es decir, los factores del ambiente, y correlacionarlas. La estrategia sería buscar los nodos o el nodo relevante, el parámetro de orden cuyo control permita vencer la enfermedad (Cocho, 2017).

Como se mencionó con anterioridad, en este trabajo nos enfocamos en el estudio de la diferenciación celular para la determinación de subtipos celulares de linfocitos T CD4+ del sistema inmune adaptativo a partir de la teoría de redes, usando otros análisis dinámicos aquí explicados, que pueden dar una mejor y más sencilla explicación del fenómeno para sus características dadas. A continuación, presentaremos una breve introducción a la teoría de las redes complejas reguladoras

## REDES REGULADORAS COMPLEJAS: APROXIMACIÓN DISCRETA BOOLEANA

Entender cómo se relacionan los genotipos con los fenotipos implica una comprensión integrativa de los procesos que regulan la diferenciación celular y la morfogénesis, los cuales comprenden el desarrollo. Tal tarea, requiere el uso de enfoques teóricos y computacionales para integrar y seguir la acción concertada de múltiples componentes genéticos y no genéticos que tienen interacciones altamente no lineales. Se han propuesto modelos de redes reguladoras de genes (RRG) para abordar tal tarea. Los modelos RRG se han vuelto muy

útiles para entender como estos tipos de interacciones restringen los patrones de la expresión multigénica que caracterizan los distintos destinos celulares. Más recientemente, cada uno de los modelos temporales de una única célula, se han extendido para recuperar los componentes temporales y espaciales de la morfogénesis. Ya que el RRG genómico completo es aún desconocido e intratable para cualquier organismo, y algunos módulos claros de desarrollo se han identificado. Uno de los primeros RRG experimentalmente fundamentado que fue propuesto y validado corresponde al módulo regulador involucrado en la determinación de órganos florales. A continuación, presentaremos en forma los principales aspectos de la teoría de las redes reguladoras tomando como base la Ref. (Azpeitia, 2014), como un ejemplo de las metodologías involucradas en: (1) la formalización e integración de datos genéticos moleculares en las funciones lógicas (funciones booleanas) que son las reglas que gobiernan las interacciones y dinámicas de genes en un RRG booleano; (2) los algoritmos y enfoques computacionales utilizados para recuperar los estados estables que corresponden a cada tipo de célula, así como el conjunto de configuraciones RRG iniciales que dirigen a cada uno de tales estados (i.e., cuencas de atracción); (3) los enfoques usados para validar un modelo RRG usando tipos salvajes y mutantes o datos sobreexpresados, o para probar la robustez del RRG propuesto; (4) las metodologías utilizadas para aproximar una RRG booleana discreta a sistemas continuos y su uso en otros análisis dinámicos. Se podrá notar que las metodologías explicadas para la RRG de determinación de órganos florales desarrolladas aquí en detalle pueden ser aplicadas a cualquier otro módulo funcional.

El mapeo del genotipo a los fenotipos implica la acción concertada de múltiples componentes durante la diferenciación celular y la morfogénesis que comprenden el desarrollo. Estos componentes son parte de los motivos regulatorios, los cuales mantienen las interacciones no lineales que producen comportamientos complejos. Tal complejidad no puede ser entendida en términos de componentes individuales, y más bien emerge como resultado de las interacciones entre los componentes de todo el sistema. Para integrar la acción de múltiples componentes moleculares y seguir su dinámica, es indispensable postular modelos matemáticos y computacionales. Los modelos de redes reguladoras de genes (RRG) han aparecido como una de las herramientas más poderosas para el estudio de sistemas moleculares complejos.

Pequeñas RRG a veces pueden ser estudiados con formulaciones matemáticas analíticas, mientras que los RRG de tamaño medio o grande son susceptibles a análisis solo con simulaciones en un ordenador. Como la dinámica de los interactomas genómicos son aún intratables incluso con las más poderosas computadoras, y dado que las redes genéticas están compuestas de múltiples módulos estructurales y funcionales, algunos autores han propuesto buscar tales módulos para el estudio de sistemas dinámicos biomoleculares usando modelos RRG. Los modelos booleanos son probablemente el tipo más simple de formalismo empleado para el estudio de RRG, sin embargo, los modelos booleanos no proporcionan información significativa acerca del sistema. Es importante mencionar, que los RRG Booleanos pueden ser aproximados a modelos que permiten el uso de herramientas matemáticas adicionales. Dado que: (a) la lógica de los RRG es formalizada adecuadamente con modelos booleanos; (b) la obtención de parámetros biológicos reales a partir de sistemas biológicos moleculares es aún una tarea complicada; y (c) el uso de modelos realistas puede ser computacionalmente costoso, se cree que los modelos Booleanos y sus aproximaciones continuas se están convirtiendo en una herramienta práctica y fundamental para el estudio de

la dinámica de la RRG y comprender los comportamientos complejos observados en los procesos de desarrollo. (Azpeitia, 2014).

### CONCEPTOS BÁSICOS EN EL ESTUDIO DE REDES COMPLEJAS.

- **Nodos y Aristas de la RRG:** en las RRG, los nodos representan genes, proteínas u otros tipos de componentes moleculares como RNAm y hormonas, mientras que las aristas representan las interacciones reguladoras entre los componentes. Usualmente, las interacciones son positivas (activaciones) o negativas (inhibiciones), pero se pueden incluir otros tipos de interacciones (por ejemplo, interacciones proteína-proteína).
- **Variables:** Las variables son los elementos que describen el sistema bajo estudio (generalmente los nodos) y que pueden tomar valores diferentes en cada momento.
- **Variable/ Estado del gen:** El valor que toma un nodo en un determinado momento representa su estado. El estado puede ser un valor discreto o continuo. En el caso de las redes booleanas los estados sólo pueden ser "0" cuando el gen se considera "apagado" y "1" cuando se considera "encendido".
- **Estado de red/configuración:** El vector compuesto por un conjunto de valores, donde cada valor corresponde al estado de un gen específico de la red. En una red booleana, tales vectores o configuraciones de red son matrices de "0" y "1".
- **Atractores:** Configuraciones de red estacionarias. Las configuraciones estacionarias de un solo estado se conocen como atractores de punto fijo (figura 26a) y éstas son generalmente las que corresponden a las matrices de estados de activación génica que caracterizan diferentes tipos de células. Mientras que un conjunto de estados de red que ordenadamente se repiten cíclicamente corresponden a atractores cíclicos (figura 26b).
- **Validación del modelo:** la tarea de evaluar un modelo mediante el contraste de sus predicciones con resultados experimentales. Para las RRG Booleanas, la validación del modelo implicaría, entre otros; recuperar las configuraciones de genes observados para las células bajo estudio en condiciones silvestres y mutantes o sobreexpresadas, análisis de robustez, etc.
- **Robustez:** La capacidad de un sistema para mantener una respuesta frente perturbaciones. Para el caso de un modelo RRG booleano, se evalúa, por ejemplo, evaluando si los atractores del sistema todavía se recuperan bajo diferentes mutaciones transitorias y permanentes (alteraciones en las funciones booleanas, los nodos o la topología RRG) (Azpeitia, 2014).

a			b				c				
Time	GEN	GEN	GEN	Time	GEN	GEN	GEN	Time	GEN	GEN	GEN
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
2	1	0	0	2	1	0	1	2	1	1	0
3	1	0	0	3	0	1	1	3	0	0	1

.				.				.			
.				.				.			
.				.				.			
n-1	1	0	0	.	1	0	1	n-1	0	0	0
n	1	0	0	.	0	1	1	n	0	1	0
Fixed-point attractor				Cyclic attractor				Transitory states			

**FIGURA 26. Atractores de punto fijo, atractores cíclicos, y estados transitorios.** a) Un ejemplo de un atractor de punto fijo. Como se observa, los atractores de punto fijo tienen un único estado donde permanecen indefinidamente a no ser que algo los perturbe. b) Un ejemplo de un atractor cíclico. Los atractores cíclicos están compuestos por dos o más estados de red que se repiten ordenadamente. En este caso observamos 2 atractores cíclicos. c) Estados transitorios. Los estados transitorios son estados que conducen a un atractor, pero no son atractores por sí mismos. (Tomado y modificado de Azpeitia, 2014).

### PROTOCOLO GENERAL PARA POSTULAR UNA RRG.

Un protocolo genérico para postular un modelo de una RRG para un módulo de desarrollo particular sería: i) Identificar un módulo de desarrollo estructural o funcional. ii) Con base en los datos experimentales disponibles, se selecciona el conjunto de nodos potenciales o componentes moleculares que se incorporarán en el modelo RRG con el objetivo de integrar los componentes clave necesarios y suficientes del módulo funcional bajo análisis. Luego de explorar los datos experimentales relativos a los patrones de expresión espacio-temporal de los genes que se incorporarán en el modelo y ensamblar una tabla con un formato booleano de las configuraciones esperadas que se deben recuperar con el modelo RRG (tales configuraciones son los "atractores esperados"). iii) Integrar y formalizar los datos experimentales referentes a las interacciones entre los nodos seleccionados utilizando funciones lógicas booleanas que regirán la dinámica Booleana de la RRG IV) El RRG es modelado como un sistema dinámico explorando los estados alcanzados, dadas todas las configuraciones iniciales posibles y las funciones booleanas definidas en iii). La RRG se inicia en todas las configuraciones posibles y se sigue hasta que alcanza un atractor de punto fijo o cíclico. V) Comparar los atractores simulados con los observados experimentalmente (atractores esperados, véase el punto (ii) anterior). Una coincidencia perfecta sugeriría que un conjunto suficiente de componentes moleculares (nodos) y un conjunto bastante correcto de interacciones se han considerado en el modelo RRG postulado. Si este no es el caso, se pueden incorporar o postular componentes e interacciones adicionales, o se pueden modificar las funciones booleanas. Esto permite refinar las interpretaciones de los datos experimentales, o postular nuevas interacciones que se probarán experimentalmente en el futuro. En cualquier caso, el proceso puede repetirse varias veces basado en el comportamiento dinámico de las versiones modificadas del RRG en estudio hasta que un módulo regulador es postulado. Dicho módulo puede incluir algunas interacciones o componentes hipotéticos novedosos, integrar los datos experimentales disponibles e identificar posibles contradicciones o vacíos experimentales. VI) Para validar el modelo, se aborda si recuperan las configuraciones de activación génica silvestre y mutante (pérdida de función y ganancia de función) que caracterizan las células que se están considerando.

El análisis de la perturbación de los nodos y las interacciones, o las funciones Booleanas, también se puede utilizar para validar el modelo con el fin de probar la robustez de la RRG en estudio. Eventualmente, nuevas predicciones se pueden hacer y probar experimentalmente. VII) Para otras aplicaciones y también en casos en que las funciones continuas sean apropiadas para describir el comportamiento de algunos de los componentes, el modelo booleano puede aproximarse a un continuo. Además de ser útil para otros procedimientos de modelado, la aproximación continua también es un medio para realizar un análisis de robustez del RRG bajo estudio. Tal tarea implica, por lo tanto, también una nueva validación del modelo que se postula.

IX) Los enfoques equivalentes a los resumidos en (vi) para sistemas discretos pueden usarse en sistemas continuos.

Hay dos tipos de materiales necesarios para modelar la dinámica de las RRG. En primer lugar, los resultados esperados que se recuperan por el modelo que se extraen de la literatura y dependen de los objetivos del modelo y la naturaleza del módulo de desarrollo que se considera, pero generalmente incluyen configuraciones de genes estables (atractores), fenotipos mutantes y transiciones de desarrollo, por nombrar algunos. El segundo conjunto es el software requerido para los análisis de la RRG. Actualmente existen varios programas disponibles para análisis de la RRG.

El protocolo general para el modelado dinámico de la RRG comienza por explicar el enfoque booleano más simple en el que los nodos solo pueden alcanzar uno o dos tipos de valores posibles "1" si el nodo está "encendido" y "0" si el nodo está "apagado". Las funciones booleanas se generan a partir de pruebas experimentales, por ejemplo, si TGEN (gen diana) se expresa ectópicamente en una pérdida de función GEN1, es un regulador negativo de TGEN, y utilizamos el operador lógico "NO" para describir la regulación GEN1 sobre TGEN o su tabla de verdad equivalente. En esta función Booleana, el estado de TGEN en el instante  $t + \tau$  es 1 si el valor GEN1 es 0 en el instante  $t$ , y el valor TGEN en el momento  $t + \tau$  es 0 si el valor GEN1 es 1 en el instante  $t$ . Las funciones Booleanas del módulo de desarrollo de la RRG que se utiliza aquí como ejemplo, se basaron en la información experimental disponible en la bibliografía de (Azpeitia, 2014). Como con los atractores esperados, las funciones booleanas pueden basarse en diferentes tipos de datos experimentales, siempre y cuando se indique claramente cómo interactúan los genes. Ahora, se proporcionará un ejemplo de cómo la información experimental se integra y formaliza como una función booleana. Durante la transición de la inflorescencia a flor meristematica, la expresión de la flor terminal (TFL1) necesita ser reprimida, porque TFL1 es un promotor de la inflorescencia.

GEN1(t)	GEN2(t)	TGEN(t+τ)
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

**TGEN(t+τ) = GEN1(t) & GEN2(t)**

GEN1(t)	GEN2(t)	TGEN(t+τ)
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

**TGEN(t+τ) = GEN1(t) | GEN2(t)**

GEN1(t)	GEN2(t)	TGEN(t+τ)
0	0	0
0	1	0
1	0	1
1	1	0

**TGEN(t+τ) = GEN1(t) & ! GEN2(t)**

GEN1(t)	GEN2(t)	TGEN(t+τ)
0	0	0
0	1	1
1	0	0
1	1	0

**TGEN(t+τ) = ! GEN1(t) & GEN2(t)**

**FIGURA 27. Ejemplos de funciones booleanas comunes.** Aquí presentamos cuatro ejemplos de funciones booleanas comunes para un gen diana, en este caso TGEN, con dos reguladores, a saber, GEN1 y GEN2. (Tomado y modificado de Azpeitia, 2014).

TFL1 se transcribe en el centro del meristemo y desde allí se mueve a las células periféricas. De acuerdo a los resultados obtenidos en la bibliografía antes mencionada, EMF1 es un regulador positivo de TFL1, mientras que API Y LFY son reguladores negativos de TFL1. Estos resultados se formalizaron como una sentencia lógica como sigue:  $TFL1 = EMF1 \text{ AND } NOT \text{ API AND } NOT \text{ LFY}$ .

### MAPEOS DINÁMICOS DISCRETOS Y REDES REGULADORAS BOOLEANAS.

El modelado basado en redes reguladoras booleanas (RRB) proporciona información cualitativa significativa sobre la topología básica de las relaciones que determinan destinos celulares alternativos. La variable de estado de cada nodo toma un valor discreto de 0 (inhibido o inactivo) o 1 (expresado o activo) (Wang et al., 2012). El estado de cada nodo en el tiempo  $t + 1$  se especifica mediante un mapeo dinámico que depende del estado de sus  $k$  reguladores en un momento anterior  $t$ :

$$q_k(t + 1) = f_k(q_1(t), \dots, q_n(t)) \quad (1)$$

Donde  $f_k$  es una función discreta que representa una proposición lógica, también conocida como reglas booleanas, constituida por términos elementales relacionados por los conectivos lógicos: AND ( $\wedge$ ), OR ( $\vee$ ) y NOT ( $\neg$ ). Las proposiciones lógicas satisfacen la axiomática booleana. La dinámica inducida por el mapeo booleano se determina completamente una vez que se especifica un conjunto de valores de expresión inicial de los componentes de la red. A partir de un conjunto inicial dado, los nodos de la red actualizan iterativamente sus valores basados en las reglas de transferencia de Boole hasta que finalmente alcanzan un estado estable determinado por la condición  $qk(t + 1) = qk(t)$ . Esta última condición especifica un

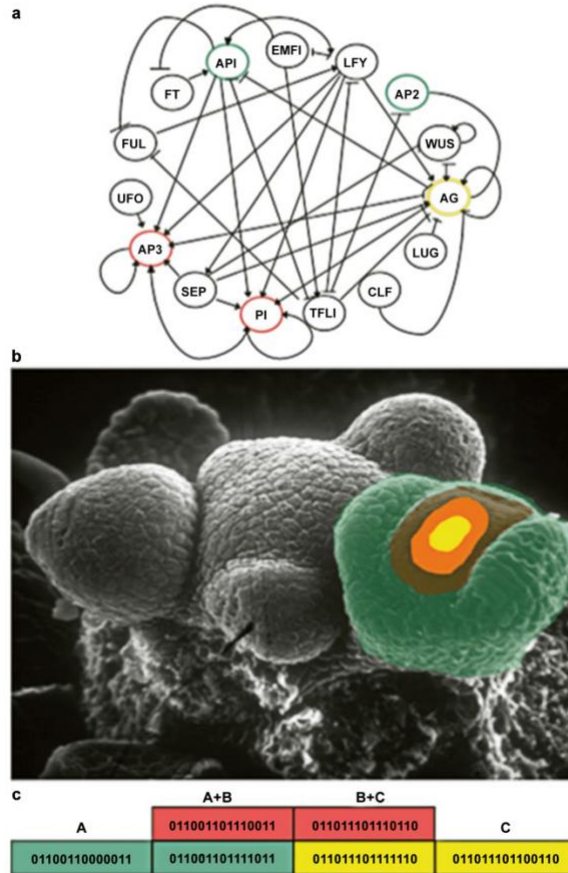
atractor de punto fijo. Luego, la dinámica del modelo se evalúa rastreando las trayectorias desde todas las configuraciones iniciales posibles en el espacio de estados hacia los atractores. El tamaño del espacio de estados de un modelo viene dado por  $\Omega = 2^n$  donde  $n$  es el número de nodos en la red. Alternativamente, un atractor cíclico asociado a la condición  $q_k(t + N) = q_k(t)q_k$ , también puede surgir después de la simulación de algunas redes reguladoras, donde el número entero  $N$  señala el período del atractor. Los atractores cíclicos generalmente se interpretan como comportamientos oscilatorios y son sostenidos por al menos un circuito de retroalimentación negativa en la topología de la red.

Este método permite determinar los patrones estacionarios de expresión celular que según la hipótesis de Kauffman describen diferentes fenotipos celulares. Esta metodología es suficiente para predecir los atractores de punto fijo interpretables como configuraciones de células meristemáticas que estamos usando para ejemplificar la construcción de una RRG, o T colaboradoras (T helper) usadas en la experimentación.

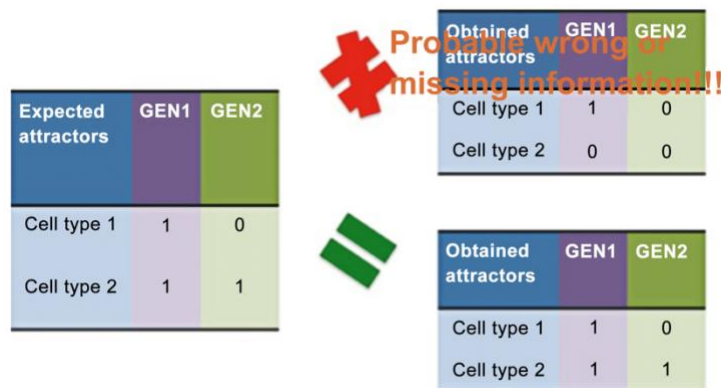
## VALIDACIÓN DEL RRG, ATRACTORES SIMULADOS VS. ATRACTORES

### ESPERADOS.

Una vez obtenidas las funciones booleanas y el conjunto de atractores esperados de la RRG, podemos proceder a realizar una primera y necesaria validación del RRG. El primer paso es utilizar simulaciones numéricas para recuperar los atractores que genera nuestro conjunto de funciones booleanas. Los atractores recuperados en las simulaciones deben coincidir con los atractores esperados, sobre la base de datos experimentales. En Espinosa-Soto y colaboradores (Espinosa, 2014) se recuperaron diez atractores. Cuatro de los diez atractores corresponden a configuraciones de activación génica que caracterizan las células meristemáticas de los meristemas de inflorescencia, mientras que el resto corresponde a las configuraciones de genes observadas en las células primordiales de sépalo, pétalo, estambre y carpelo (figura 28). En el RRG de desarrollo del sépalo, formulado por La Rota y colaboradores (La Rota, 2011), al menos dos atractores fueron recuperados; Uno correspondiente a las células abaxiales y el otro a las células adaxiales del órgano floral. (Azpeitia, 2014).



**FIGURA 28. Obtención de atractores de la especificación de órganos de flores de la RRG.** En (a) se presenta la gráfica de la especificación de órganos de flores RRG propuesta por Espinosa-Soto y colaboradores (Espinosa, 2014). El RRG recuperó 10 atractores de punto fijo. Seis de los atractores correspondían a la configuración de genes observados en la célula primordial de sépalos (un atractor), pétalos (dos atractores), estambres (dos atractores) y carpelos (un atractor). B) Un meristemo de flores en el que las células sepales primordiales están coloreadas en verde, células de pétalos primordiales en gris marrón, estambres primordiales en naranja, y células de carpelo primordiales en amarillo. En (c), el modelo ABC y la determinación de órganos florales RRG, los atractores que corresponden a las combinaciones de genes A, A + B, B + C y C, que especifican células sepales, pétalo, estambre y carpelo primordial, respectivamente. Los estados de activación corresponden a cada uno de los nodulos RRG que comienzan a la izquierda con "EMF1" y progresan consecutivamente en el sentido de las agujas del reloj el resto de los genes en el RRG mostrado en (a). Tomado y modificado de Azpeitia, 2014.



**FIGURA 29.** En los casos en que los atractores recuperados por el RRG simulado en estudio y los observados experimentalmente no coinciden, se pueden considerar nodos o interacciones adicionales, o se pueden modificar las funciones booleanas postuladas. Esas nuevas hipótesis se pueden probar ejecutando una vez más la dinámica de RRG y si



los atractores simulados y observados coinciden ahora, el modelo puede usarse para postular nuevas interacciones, datos faltantes o contradicciones entre los que se habían propuesto anteriormente. Por ejemplo, se predijeron cuatro interacciones perdidas (Espinosa, 2014). Es importante destacar que algunas de estas predicciones han sido validadas experimentalmente por investigaciones independientes y posteriores, demostrando la capacidad predictiva y la utilidad de este enfoque. *Tomado y modificado de Azpeitia, 2014.*

### ANÁLISIS DE MUTACIONES.

Un medio adicional para validar un modelo RRG es simular la pérdida de función (fijación de la mutación de la expresión génica con valor 0) y la ganancia de las funciones mutantes (fijación de la sobreexpresión de la expresión génica con valor 1). Los atractores recuperados en el modelo con tales valores de expresión fijos alterados deben corresponder a los efectos observados experimentalmente en los mutantes. Si se encuentra una discrepancia en tal proceso de validación, se pueden postular hipótesis adicionales sobre nuevos nodos o interacciones. Para el módulo subyacente RRG postulado en la determinación de los órganos florales, la mayoría de los atractores recuperados en los mutantes simulados correspondieron a las configuraciones genéticas que se han observado experimentalmente. En algunos casos, los atractores simulados y observados (esperados) no coinciden y se postulan nuevas interacciones. Las simulaciones de mutantes son también útiles cuando intentamos predecir los efectos de múltiples mutantes, los cuales son complicados de generar en el laboratorio (Azpeitia, 2014).

### ANÁLISIS DE ROBUSTEZ.

El trabajo experimental y teórico ha demostrado que los organismos vivos son robustos contra las perturbaciones. Además, a nivel molecular los procesos involucrados en diferentes comportamientos biológicos también son robustos frente a variaciones internas y externas. Tal robustez implica que la funcionalidad general del sistema permanece cuando se perturba. En el caso de las RRG, los atractores deben ser robustos cuando se alteran las funciones booleanas. En Espinosa-Soto y colaboradores (Espinosa-Soto, 2004) el valor de salida de cada línea de las tablas de verdad fue cambiado uno por uno. Curiosamente, se encontró que los atractores originales no cambiaron para más del 95% de las alteraciones de la tabla lógica, lo que indica que la funcionalidad del módulo de desarrollo postulado es robusta a este tipo de perturbación. Hay otros tipos de análisis de perturbaciones. Por ejemplo, podríamos cambiar con una cierta probabilidad el valor de una línea de la tabla de verdad, o el estado de la red. De manera similar, si perturbamos el RRG con estos otros tipos de perturbaciones, se espera que los atractores de los sistemas se mantengan (Azpeitia, 2014).

### REDES REGULADORAS CONTINUAS Y LÓGICA DIFUSA

La utilidad de los modelos discretos es limitada, ya que no pueden predecir los resultados de experimentos biológicos cuantitativos cuando se trabaja en fenómenos sensibles a la expresión gradual de factores de transcripción o gradientes bioquímicos. Este es el caso de la mayoría de las enfermedades donde los linfocitos están involucrados y las fluctuaciones no discretas en el microambiente pueden influir en la diferenciación y plasticidad celular, afectando las respuestas inmunes en la progresión de patologías crónicas (Enciso et al., 2019).

Para expresar nuestro modelo en términos de ecuaciones diferenciales como previamente mencionamos, se tradujeron las reglas lógicas booleanas (que pueden verse en el anexo) a lógica difusa, la cual puede proporcionar conocimiento cualitativo sobre la cinética de las

rutas de señalización involucradas en la transducción de variaciones microambientales, por ejemplo, eventos que se relacionan relativamente más rápido que otros, o que se unen al receptor por encima de otros ligandos. De esta forma, el fenotipo de cada célula se determinó por el estado de activación de cada uno de los nodos que integran la red interna de diferenciación Th.

Para obtener un enfoque continuo, se debe considerar que los niveles de expresión, las concentraciones y los parámetros de los sistemas biológicos puedan tener cualquier valor dentro de un rango continuo limitado solo por restricciones de funcionalidad. En este caso, la asignación dinámica discreta dada por la ecuación (1) se generalizó mediante la introducción de un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) para la tasa de cambio del nivel de expresión de los componentes de la red. Para el nodo k-ésimo, se escribe como:

$$\frac{dq_k}{dt} = \mu[w_k(q_1, \dots, q_n)] - \alpha_k q_k \quad (2)$$

$\mu[w_k]$  es una función de entrada que expresa la transformación continua de la regla booleana  $w_k$ , mientras que  $\alpha_k$  es una tasa de decaimiento. En este esquema, los estados de equilibrio del sistema están definidos por la condición de estado estable  $\frac{dq_k}{dt} = 0$ , que conduce a:

$$q_k^s = \frac{1}{\alpha_k} \mu[w_k(q_1^s, \dots, q_n^s)] \quad (3)$$

donde el superíndice s denota el valor de estado estacionario.

La traducción de las reglas booleanas interactivas al dominio continuo se logró como ya mencionamos, considerando un enfoque basado en la lógica difusa. La lógica difusa es una teoría destinada a proporcionar una base formal para el razonamiento aproximado con aplicaciones en ciencias físicas, biomédicas y conductuales. Se caracteriza por un enfoque gradual (Novak et al., 1999; Zadeh, 1975; Dubois y Prade, 1997), de modo que el grado en que un objeto exhibe una propiedad determinada se especifica por una función característica  $\mu[w_k]$ , con valores de verdad que van desde la falsedad total,  $\mu[w_k] = 0$ , hasta totalmente verdadero,  $\mu[w_k] = 1$  (Enciso et al., 2019). En los sistemas biológicos, las proposiciones difusas pueden describir casos en los que una celda muestra un patrón de expresión intermedio que no necesariamente pertenece a un fenotipo específico.

La lógica difusa satisface un axiomático similar al implícito en la lógica booleana, excepto por el principio de identidad, lo que significa que el principio de no contradicción no es válido. La ausencia de no contradicción se expresó formalmente mediante la ecuación  $w = 1 - w$ , con la solución  $w = 1/2$ . Se dedujo que el valor  $w \equiv w_{thr} = 1/2$  puede interpretarse como un umbral entre la falsedad y la verdad. De manera similar al enfoque Booleano, en el régimen continuo las interacciones reguladoras de la red se caracterizaron por proposiciones de lógica difusa denotadas aquí como  $w_k = [q_1(t), \dots, q_n(t)]$ . El esquema de traducción desde el escenario discreto al continuo se implementó de manera directa mediante la sustitución de los conectores booleanos AND, OR y NOT, por sus contrapartes difusas. Donde p y q serían nodos de la red.

Conectores Booleanos	Traducción probabilística
q AND p	q.p
Q OR p	q+p-(q)(p)
NOT p	1-p

**Tabla 5.** Equivalencia de los conectores Booleanos a sus contrapartes de lógica difusa

Un ejemplo de traducción del marco booleano al difuso es:  $W [p, q, r] = q \vee p \wedge \neg r \rightarrow w [p, q, r] = q + p - q \cdot p \cdot (1 - r)$ .

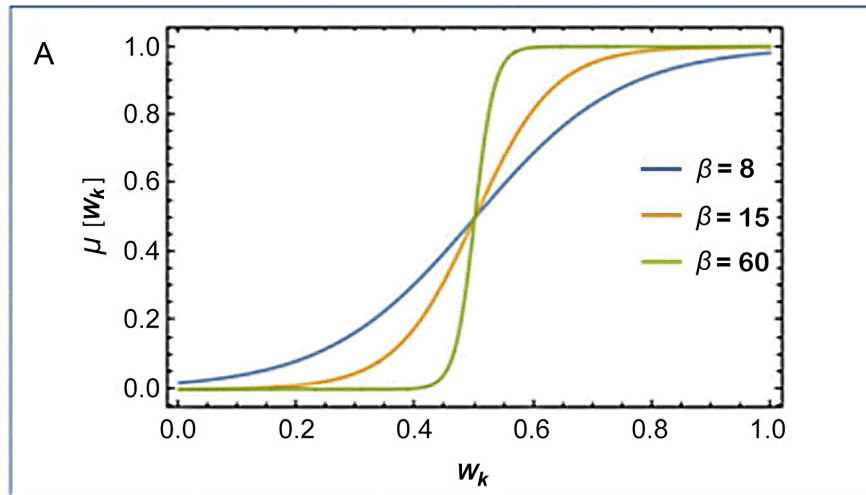
Las proposiciones lógicas continuas se pueden usar para construir una expresión explícita de la función característica  $\mu [w_k]$ . En el enfoque booleano discreto, esta función sería equivalente a una función escalonada  $\Theta$ :

$$\mu [w_k] \rightarrow \Theta \left[ w_k - \frac{1}{2} \right] = \left\{ 0 \text{ si } w_k < \frac{1}{2}, 1 \text{ si } w_k > \frac{1}{2} \right.$$

En el enfoque continuo, este comportamiento se aproximó por una función característica con una estructura sigmoidea que cambia gradualmente de un valor nulo a un valor unitario. La expresión más general que implica el menor número de supuestos con respecto a un enfoque gradual de la veracidad de una propuesta difusa es la distribución logística:

$$\mu [w_k] = \frac{1}{1 + \exp[-\beta (w_k (q_1, \dots, q_n) - w_{thr})]} \quad (4)$$

Aquí,  $w_k$  es un valor umbral tal que si  $w_k > w_{thr}$ , entonces  $w_k$  tiende a ser verdadero (o expresado). Usualmente  $w_{thr} = 1/2$ . El parámetro  $\beta$  es una tasa de saturación que mide el ritmo del tránsito de un estado no expresado a uno expresado, como se muestra en la Figura 30.



**FIGURA 30.** Distribución característica  $\mu [W_K - W^{thr}]$  para un valor umbral  $W^{thr} = 1/2$  de la proposición lógica  $W_K$  y diferentes valores del parámetro de saturación  $\beta$ . En el caso de  $\beta \gg 1$ , la distribución característica se convierte en una distribución escalonada.

Observamos en la figura 30 que este ritmo o pendiente es gradual para  $\beta$  pequeño y abrupto para  $\beta$  grande. En el caso  $\beta \gg 1$ ,  $\mu [W_K] \rightarrow \Theta [W_K - W_{thr}]$ . Este último resultado, junto con la condición de estado estable dada por la ecuación (2), implica que es la otra manifestación de la solidez de las predicciones cualitativas generadas por el enfoque difuso (Enciso et al., 2019).

Para describir las transiciones entre distintos estados estables, junto con elementos de logotipos difusos, se consideraron los conceptos generales de la teoría de las transiciones de fase sin equilibrio y la autoorganización, contemplados en los fenómenos cooperativos que surgen de las interacciones no lineales de un gran número de subsistemas elementales (representados aquí por las reglas de lógica difusa), que conducen a la aparición de patrones

o fases organizadas. La teoría se basa en dos conceptos principales, la existencia de parámetros de orden y control. Los parámetros de orden son aquellas variables que impulsan principalmente la organización del sistema, mientras que los parámetros de control son variables cuyo valor determina cuál de las posibles organizaciones se realiza realmente. En el contexto del RRG difuso presentado aquí, los parámetros de orden son los patrones de activación que especifican los diferentes fenotipos celulares, determinados a su vez, por el estado de activación de los nodos centrales o los módulos funcionales del RRG, mientras que los parámetros de control son aquellos involucrados en la lógica de las reglas, o aquellas que caracterizan las tasas de decaimiento  $\alpha_k$ .

La tasa de decaimiento es igual a:  $\alpha_k = \frac{1}{\tau_k}$ , donde  $\tau_k$  es un tiempo de expresión característico.

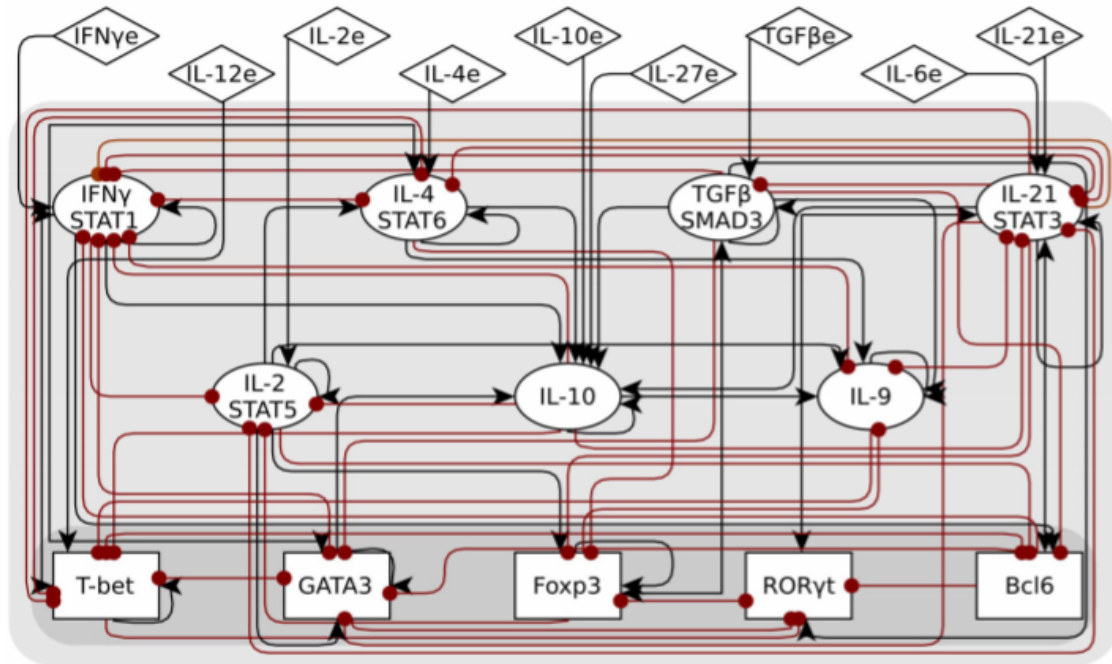
Con base en esto, se indujeron parámetros de ordenamiento modificando los parámetros de control desde la modelación computacional. Cabe aclarar que, aunque en lógica difusa se supone que los valores de las variables están restringidos al intervalo  $0 \leq q_k \leq 1$ , los valores  $\alpha_k > 1$  no están excluidos por el formalismo, y es una conveniencia el rango en el que se definen las variables.

## OBTENCIÓN DE LA RED COMPLEJA DE INTERACCIÓN DE ELEMENTOS

### MOLECULARES DE LINFOCITOS T

Con objeto de desarrollar un modelo continuo de los procesos de diferenciación de los linfocitos TCD4+ se consideró la red reguladora compleja para los linfocitos T CD4+ reportada en las referencias (Martínez-Sánchez, 2015 y Martínez-Sánchez, 2018). En dichas referencias se construyó una red compleja de interacción a partir de información compilada de datos experimentales previamente obtenidos. Se consideró que la diferenciación celular de linfocitos T CD4+ depende de las citocinas presentes en el microambiente. Estas células pueden diferenciarse en subconjuntos particulares, además de que diferentes combinaciones de citocinas exógenas han demostrado tener efectos sinérgicos o antagonistas en la diferenciación de células T CD4+. Las interacciones resultantes pueden apreciarse en la Figura 31, mientras que las reglas booleanas asociadas se indican en el Anexo. Así se ha documentado que las células Th1 requieren IL12 extrínseca e IFN $\gamma$  y expresan Tbet e IFN $\gamma$  (Hsieh, 1993; Perez, 1995; Szabo, 2003). Las células Th2 requieren IL4 extrínseca y están estabilizadas por IL2, expresan GATA3, IL4, IL5 y IL13 (Le Gros, 1990; Swain, 1990; Cote-Sierra, 2004; Ansel, 2006; Zheng, 1997). Las células Th17 requieren TGF $\beta$  extrínseca e IL-6, IL-21 o IL-23, producen ROR $\gamma$ t, IL-21, IL-17A e IL-17F (Ivanov et al., 2006; Veldhoen et al., 2006; Zhou y col., 2007; Korn et al., 2009). Las células Treg requieren TGF $\beta$  e IL-2 extrínsecas, expresan Foxp3, TGF $\beta$  y, en algunos casos, IL10 (Chen, 2003; Hori, 2003; Davidson, 2007; Zheng, 2007). Además, las células T CD4+ son altamente heterogéneas, lo que sugiere que las poblaciones celulares pasan por un continuo de niveles de polarización después del cebado inicial (Murphy y Stockinger, 2010; Magombedze, 2013; DuPage y Bluestone, 2016; Eizenberg-Magar, 2017). Por lo tanto, se pueden encontrar fenotipos celulares mixtos bajo concentraciones y combinaciones de citocinas particulares, y en algunos casos, se han documentado tipos de células híbridas tales como células reguladoras similares a Th1 y similares a Th2 o híbridos Th1 / Th2 (Koch, 2009; Hegazy, 2010; Wohlfert, 2011).

### A Regulatory network



**FIGURA 31. Red reguladora de señalización transcripcional de células T CD4+ construida utilizando los datos experimentales disponibles.** La red incluye factores de transcripción (rectángulos), citocinas autocrinas y sus vías de señalización (elipses) y citocinas exógenas (diamantes). Interacciones que conducen a la activación se representa con flechas negras, mientras que las que conducen a la inhibición con puntos rojos. (Tomado y modificado de Martínez-Sánchez, 2018).

Para analizar el comportamiento dinámico de la red, se generalizaron las interacciones discretas booleanas al caso continuo mediante las reglas de la lógica difusa, como se señaló anteriormente. En estos términos, se estudiaron los procesos de diferenciación celular mediante ecuaciones diferenciales que involucran variables y parámetros continuos. Para encontrar las soluciones del sistema constituido por ecuaciones diferenciales con las reglas lógicas difusas para las componentes IFN $\gamma$ , GATA3, IL2, IL4, ROR $\gamma$ t, IL21, FOXP3, TGF $\beta$ , IL9, IL10, BCL 6 E IL17, se realizaron cálculos empleando el programa Mathematica. Para posteriormente modificar las variables de concentración de citocinas o su nivel de expresión, así como el valor de la tasa de decaimiento  $\alpha$  y el parámetro de saturación  $\beta$ . Luego se analizó la diferencia en el tiempo y forma de expresión del factor de transcripción asociado a cada subtipo celular.

Teniendo los resultados de la expresión fenotípica con distintas concentraciones de nodos y variaciones de  $\alpha$  y  $\beta$ , se prosiguió a elegir las gráficas más representativas o interesantes, de ellas se eligieron las que tuvieran los mismos valores en los parámetros continuos, excepto en el valor de  $\beta$  (sea igual a 20, 10 o 5) y tuvieran una diferencia evidente en cuanto al tiempo de expresión. También se conservaron algunas que se expresaron significativamente con un único valor de  $\beta$ , sin embargo, no se agregaron a este trabajo.

## RESULTADOS

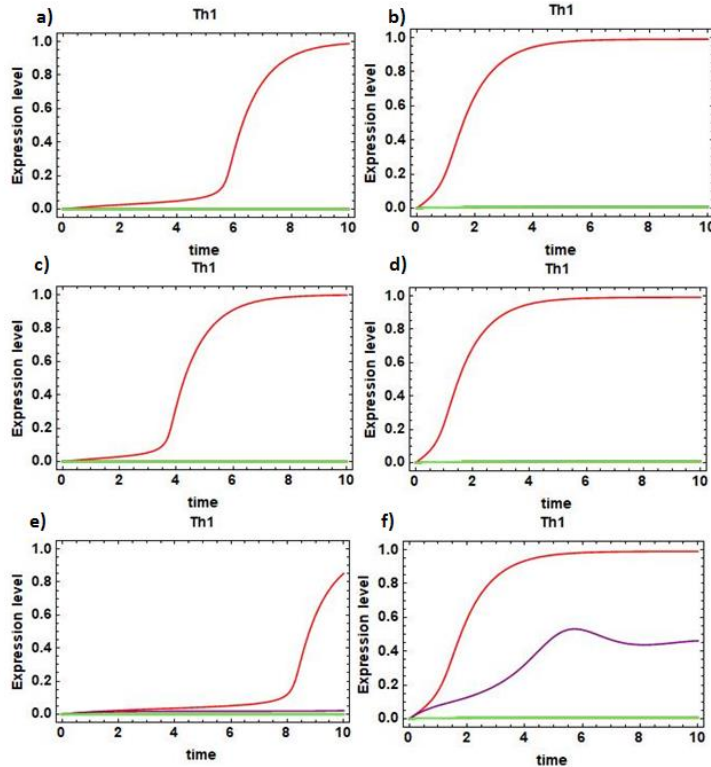
Se realizaron experimentos numéricos que simulaban distintas condiciones ambientales de citocinas asociadas con la expresión de diferentes subtipos celulares, en las que se variaban las concentraciones extracelulares y tasas de saturación y decaimiento de citocinas. De estas simulaciones se obtuvieron una serie de gráficos que reflejan su comportamiento dinámico. A continuación, se describían las propiedades usadas en los parámetros de control de cada fenotipo estudiado, de cada caso seleccionado, cuyas características fueron haber expresado el factor de transcripción característico del subtipo celular y presentar alguna dinámica de expresión peculiar. Los resultados se muestran ordenados por subtipos celulares y presentan casos con concentraciones de citocinas iguales para tasas de decaimiento y/o saturación distintas. De igual forma, se consideran valores altos de  $\beta$  si son mayores a 10 y como valores bajos si son iguales o menores a 10. En todos los subtipos se usó un valor igual a 10 como valor bajo de  $\beta$ , a excepción de Th17, donde se usó un valor igual a 5, pues considerando esto, los cambios entre un valor u otro de  $\beta$ , eran un poco más notorios. Los valores en las tasas de decaimiento se consideran iguales a 1 a menos que se indique lo contrario, considerando que es una tasa baja si es menor a 1, o alta si es mayor a 1.

### SUBTIPO TH1

Se estudió la variación temporal de la expresión de la citocina INF $\gamma$ e, secretada por el fenotipo Th1, y su dependencia con la concentración en el microambiente externo de las citocinas pro-Th1, IL12 e INF $\gamma$ , y de la citocina proinflamatoria IL10, así como las diferencias inducidas por la tasa de saturación  $\beta$  y la tasa de decaimiento de INF $\gamma$ e.

En la gráfica 32a (con  $\beta=20$ ), se consideró una concentración externa relativamente baja de INF $\gamma$  e IL12 (0.3 en ambos casos). Se observa como, a pesar de que los valores de la concentración de estas citocinas son bajos, es suficiente para inducir la producción de INF $\gamma$ e, en un tiempo característico  $t = 6$  (en unidades determinadas por el inverso de las tasas de decaimiento y las relaciones dinámicas del sistema). En comparación, la gráfica 32b muestra que, si el parámetro de saturación  $\beta$  se disminuye a la mitad, ampliando con ello el intervalo de sensibilidad a las citocinas externas, entonces INF $\gamma$  se expresa en forma inmediata. Por otro lado, si se consideran las condiciones del primer caso, pero se supone que la tasa de decaimiento de INF $\gamma$ ,  $\alpha=0.5$  (equivalente a un decaimiento relativamente lento), entonces la gráfica 32c muestra que esta citocina se comienza a expresar en un tiempo menor que en el primer caso. Si en estas mismas condiciones se supone ahora que  $\beta=10$ , entonces 32d muestra que INF $\gamma$  se expresa en forma idéntica a la observada en 32b. Por otro lado, si se bajan las condiciones anteriores, la tasa de decaimiento de INF $\gamma$  se incrementa, en vez de disminuir, entonces la dinámica del sistema es tal que el tiempo no es suficiente para expresarse.

En las gráficas 32e y 32f se estudia la acción de la citocina antiinflamatoria IL10 (también con una concentración 0.3) en el microambiente pro-Th1, para dos valores del parámetro de saturación  $\beta=20$  y  $\beta=10$ . En el primer caso, observamos que INF $\gamma$  aún se expresa, aunque con un retraso considerable respecto al caso en ausencia de IL10. En el segundo caso, vemos que INF $\gamma$  se expresa en forma normal, pero también ocurre la expresión de IL10, dando lugar a un fenotipo mixto.



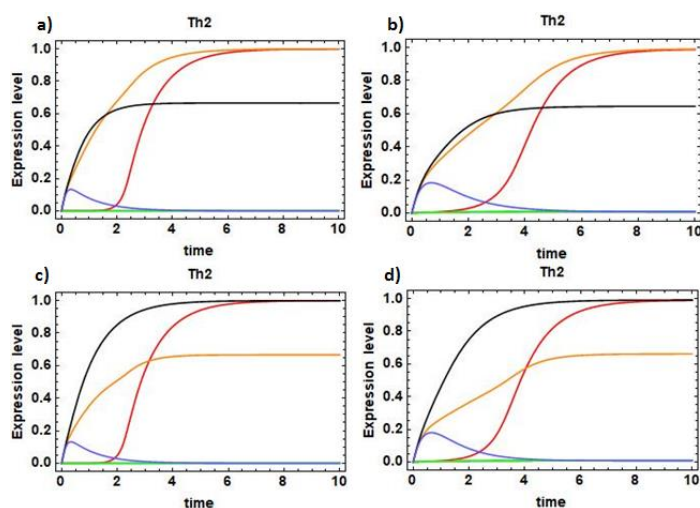
**FIGURA 32.** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Th1 para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente: a)  $\beta=20$ ,  $IL12=0.3$ ,  $INF\gamma=0.3$ . b)  $\beta=10$ ,  $IL12=0.3$ ,  $INF\gamma=0.3$ . c)  $\beta=20$ ,  $\alpha INF\gamma=0.5$ ,  $IL12=0.3$ ,  $INF\gamma=0.3$ . d)  $\beta=10$ ,  $\alpha INF\gamma=0.5$ ,  $IL12=0.3$ ,  $INF\gamma=0.3$ . e)  $\beta=20$ ,  $INF\gamma=0.3$ ,  $IL2=0.3$ ,  $IL10=0.3$ . f)  $\beta=10$ ,  $INF\gamma=0.3$ ,  $IL2=0.3$ ,  $IL10=0.3$ . Las diferentes curvas corresponden a  $INF\gamma$  (rojo) e  $IL10$  (morado).

## SUBTIPO TH2

A continuación, se describen los resultados obtenidos para el fenotipo Th2, mostrando la expresión de GATA3 a través del tiempo y su dependencia con la concentración externa de citocinas promotoras del fenotipo (IL4 e IL2) y la influencia de citocinas proinflamatorias (IL21), así como variación en las tasas de decaimiento y saturación.

En la gráfica 33a (con  $\beta=20$ ), se tomó en cuenta una concentración regular de IL2 e IL4 (0.6 en ambos casos), además de estudiarse la presencia de la interleucina proinflamatoria IL21, y suponiendo que la tasa de decaimiento de  $IL2\alpha = 1.5$ . Se muestra como GATA3 se expresa totalmente casi en seguida, similarmente hay expresión inmediata de IL4 y una expresión rápida pero no total de IL2. Por otro lado, en la gráfica 33b cuando la tasa de saturación se reduce ( $\beta=10$ ), la expresión de IL2, IL4 y GATA3 parece más gradual. Podemos ver que el tiempo en que comienza la expresión de GATA3 no cambia en presencia de IL21, pues cuando no está presente y se conservan el resto de condiciones iguales (figura 38a y b, anexo 1), GATA3 se expresa casi en el mismo tiempo. El aumento en la tasa de decaimiento de IL2, aumentó el tiempo en que comienza la expresión de GATA3, como puede deducirse. En este caso una tasa de saturación  $\beta$  mayor favoreció una expresión más súbita del factor de transcripción característico de Th2. Cuando en lugar de aumentar la tasa de decaimiento de IL2, se aumenta la de IL4, y se mantienen iguales el resto de condiciones que en 33a, como muestra la gráfica 33c, la expresión de GATA3 es igual que en dicho caso y las situaciones de IL4 y IL2 se invierten. Al disminuir la tasa de saturación a la mitad, la expresión de IL2,

IL4 y GATA3 al igual que en el caso 33b, parece más gradual. La presencia de una interleucina proinflamatoria no afectó de modo muy significativo la expresión de GATA3, pero el aumento en la tasa de decaimiento de IL4, aumento levemente el tiempo en que comenzó la expresión de GATA3, pues en (figura 38c y d, anexo 1), donde se usaron las mismas condiciones que en 33c, a excepción del aumento en la tasa de IL4, GATA3 se expresa más rápido. Al comparar los casos 33a con 33c y 33b con 33d, podemos proponer que no hay alguna evidencia de que alguna tasa de decaimiento, sea de IL2 o IL4 afecte en mayor medida la diferenciación de Th2. A diferencia del resto de los experimentos, en este caso una tasa de saturación  $\beta$  mayor fué la que favoreció una expresión más súbita del factor de transcripción característico de Th2.



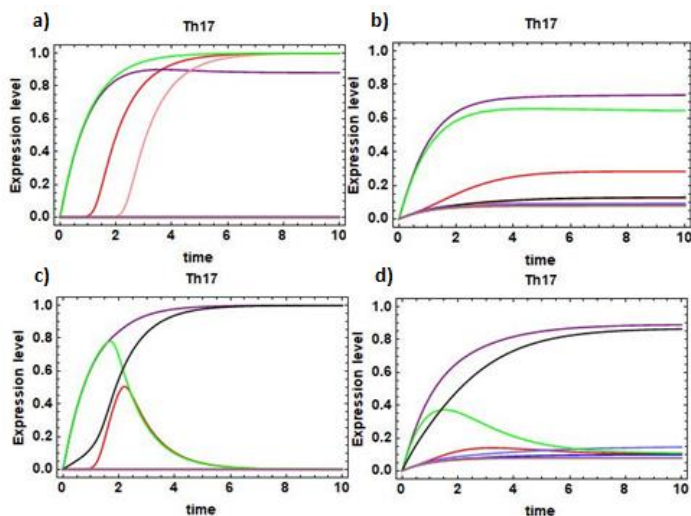
**FIGURA 33.** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Th2 para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente: a)  $\beta=20$ ,  $\alpha_{IL2}=1.5$ ,  $IL2=0.6$ ,  $IL4=0.6$ ,  $IL21=0.6$ . b)  $\beta=10$ ,  $\alpha_{IL2}=1.5$ ,  $IL2=0.6$ ,  $IL4=0.6$ ,  $IL21=0.6$ . c)  $\beta=20$ ,  $\alpha_{IL4}=1.5$ ,  $IL2=0.6$ ,  $IL4=0.6$ ,  $IL21=0.6$ . d)  $\beta=10$ ,  $\alpha_{IL4}=1.5$ ,  $IL2=0.6$ ,  $IL4=0.6$ ,  $IL21=0.6$ . Las diferentes curvas corresponden a GATA3 (rojo), IL2 (negro) e IL4 (naranja).

## SUBTIPO TH17

Asimismo, se estudió la expresión a través del tiempo de RORYt, secretada por el fenotipo Th17 y su dependencia con las concentraciones de citocinas promotoras (IL21 y TGF $\beta$ ), y la acción de citocinas antiinflamatorias como lo es IL10. De la misma forma, se analizó la variación en las tasas de decaimiento y saturación.

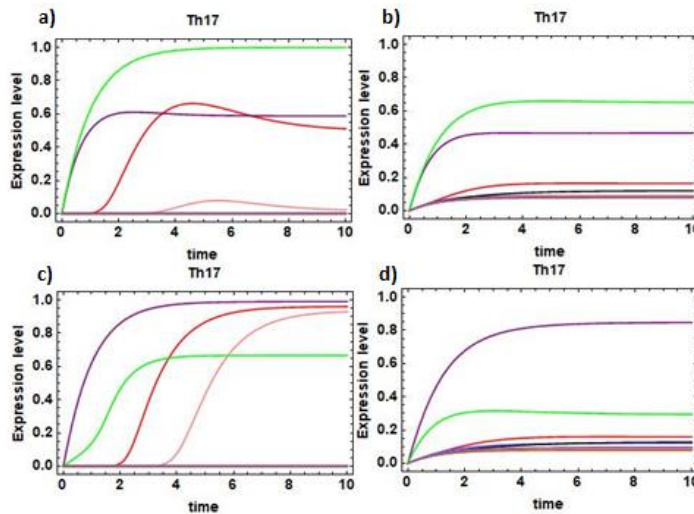
Como se puede ver en la gráfica 34a (con  $\beta=20$ ), se consideró una concentración externa de 0.6 de IL17 y TGF $\beta$ . Se puede ver como IL21 y TGF $\beta$  se expresan de inmediato, seguido por RORYt. Cuando el valor de la tasa de saturación  $\beta$  disminuye a 5, como ocurre en el caso 34b, se observa como el tiempo de expresión RORYt no cambia, pero el nivel de expresión disminuye a sólo un 0.2. Al estudiar la presencia de IL10, conservando el resto de condiciones del primer caso, como se ve en la gráfica 34c, se observa que RORYt conservó el tiempo de expresión de las gráficas anteriores, cuando no había IL10, sin embargo, su nivel de expresión disminuyó, pues dejó de expresarse cuando llegó al 0.4 y entonces decayó. Cuando en la gráfica 34d, se volvió a disminuir la tasa de saturación, de igual forma, se observa que el nivel de expresión de RORYt disminuye. Tanto en 34c y d se observa que el tiempo y nivel de expresión de IL21 disminuyó con la presencia de IL10 si consideramos su expresión con el mínimo de citocinas inductoras, que es 0.6.





**FIGURA 34** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Th17 para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente: a)  $\beta=20$ ,  $IL21=0.6$   $TGF\beta=0.6$ , b)  $\beta=5$ ,  $IL21=0.6$   $TGF\beta=0.6$ , c)  $\beta=20$ ,  $IL21=0.6$   $TGF\beta=0.6$   $IL10=0.4$ , d)  $\beta=5$ ,  $IL21=0.6$   $TGF\beta=0.6$   $IL10=0.4$ . Las diferentes curvas corresponden a ROR $\gamma$ t (rojo), TGF $\beta$  (morado), IL21 (verde), IL10 (negro) e IL17 (rosa).

Al aumentar el decaimiento de TGF $\beta$  en el caso 35a, y conservar la concentración regular de las mismas citocinas y el valor de  $\beta$  del gráfico 34a, se observa como en comparación, el nivel de expresión de ROR $\gamma$ t se reduce a 0.6, pero llega a un punto máximo mayor que en el caso 34c, donde había acción antiinflamatoria por IL10. El nivel de expresión de IL21 endógeno en 35a se mantiene igual que en 34a, mientras que la expresión de TGF $\beta$  decrece. También es posible ver que IL17 se expresa mínimamente. La disminución de  $\beta$  a un cuarto de su valor original, como se muestra en el caso 34b, inhibe casi por completo la expresión de ROR $\gamma$ t, comparable solo con el caso en el que se agregó un factor antiinflamatorio. IL21 endógeno se mantuvo similar que en los anteriores casos con igual valor de  $\beta$ , mientras que la expresión de TGF $\beta$  disminuyó. En comparación con la gráfica 35a, el nivel de expresión de ROR $\gamma$ t es evidentemente menor, por lo que una tasa grande de  $\beta$  parece favorecer el aumento en el nivel de expresión de ROR $\gamma$ t. Para comparar el efecto del aumento en el decaimiento de ambas citocinas inductoras, se usó una  $\alpha=1.5$  pero esta vez de IL21, además de reducir su concentración externa, como se ve en 35c, manteniendo el valor inicial de  $\beta=20$ . Se puede observar que el tiempo en que comenzó la expresión de ROR $\gamma$ t aumentó ligeramente en comparación de cuando no hay aumento en la tasa de decaimiento de IL21. Observamos que únicamente IL21 endógena disminuyó su nivel de expresión. El nivel de expresión de IL17 aumenta en comparación de la gráfica 35a. En la gráfica 35d la tasa  $\beta$  tiene valor de 5. Podemos ver que el nivel de expresión de ROR $\gamma$ t disminuyó con el aumento en la tasa  $\alpha$ , al igual que TGF $\beta$  e IL21. Comparando las gráficas 35c y d, la disminución en el valor de  $\beta$  afectó negativamente el nivel de expresión de ROR $\gamma$ t y las demás citocinas endógenas.



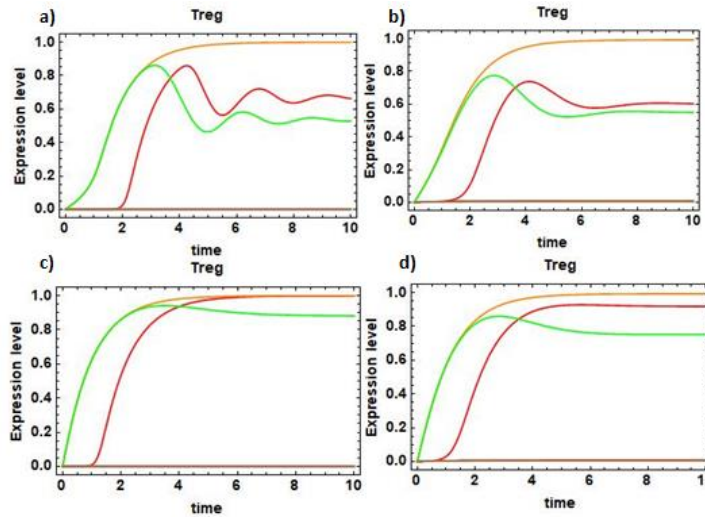
**FIGURA 35.** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Th17 para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente: a)  $\beta=20$ ,  $\alpha\text{TGF}\beta=1.5$ ,  $\text{IL21}=0.6$ ,  $\text{TGF}\beta=0.6$ , b)  $\beta=5$ ,  $\alpha\text{TGF}\beta=1.5$ ,  $\text{IL21}=0.6$ ,  $\text{TGF}\beta=0.6$ , c)  $\beta=20$ ,  $\alpha\text{IL21}=1.5$ ,  $\text{IL21}=0.4$ ,  $\text{TGF}\beta=0.6$ , d)  $\beta=5$ ,  $\alpha\text{IL21}=1.5$ ,  $\text{IL21}=0.4$ ,  $\text{TGF}\beta=0.6$ . Las diferentes curvas corresponden a ROR $\gamma$ t (rojo), TGF $\beta$  (morado), IL21 (verde), IL10 (negro) e IL17 (rosa).

## SUBTIPO TREG

Finalmente, y de igual forma, se estudió la variación con el tiempo de la expresión de FOXP3, secretado por Treg y su dependencia con la concentración externa de sus principales citocinas inductoras (TGF $\beta$  e IL2), además de analizar su dinámica frente a cambios en sus tasas de decaimiento y saturación, y bajo la influencia de una citocina opuesta, en este caso IL21.

Como muestra la gráfica 36a, se consideró  $\beta=20$ , y una concentración externa relativamente baja de IL2 y TGF $\beta$  (0.4 en ambos casos). Se observa que el nivel de expresión de FOXP3 toma un valor que oscila entre 0.8 y 0.6, aumentando y luego decayendo hasta hacerse cada vez más constante, comenzando su expresión en la segunda unidad de tiempo. La expresión de IL2 endógena es similar a la de FOXP3, sin embargo, comienza su expresión más rápido. Por otro lado, la dinámica de TGF $\beta$  endógena es constante una vez que alcanza su máxima expresión. En la gráfica 36b, el valor de  $\beta$  se disminuyó a 10, se observa que el nivel máximo en la expresión de FOXP3 se ve un poco reducido en comparación al caso anterior, y el tiempo en que comenzó su expresión se redujo ligeramente al disminuir la tasa de saturación. De igual forma, las oscilaciones en la expresión de FOXP3 del caso 36a se ven atenuadas con la reducción de  $\beta$ , al igual que en la expresión de IL2. El comportamiento de TGF $\beta$  parece no presentar un cambio respecto al experimento inicial. Cuando se usaron concentraciones menores que las usadas en estos casos (iguales a 0.3), no hubo expresión cuando  $\beta$  fue igual a 20, y la hubo en un nivel más bajo que en el caso 36b. Cuando se intentó inducir Treg con sólo una de estas citocinas inductoras, no hubo expresión. Al aumentar las concentraciones iniciales con respecto a los casos anteriores y mantener la tasa inicial de saturación, es posible ver que el máximo nivel de expresión de FOXP3 se alcanza más rápidamente, caso expuesto por la gráfica 36c, además de que su comportamiento se atenuó y la expresión de FOXP3, IL2 y TGF $\beta$  fué más regular y alta. Cuando la tasa  $\beta$  se redujo a la mitad, como pasa en 36c, el nivel de expresión de FOXP3 disminuyó ligeramente, al igual que el de IL2. Por otro lado, TGF $\beta$  endógeno se mantuvo igual. Los tiempos de expresión de las citocinas implicadas no

fueron significativamente modificados con la disminución en la tasa de saturación como muestra la comparación de los casos, no así con los niveles de expresión. Al comparar estas gráficas con las dos anteriores, se observa un aumento en el nivel de expresión relacionada con el aumento en las concentraciones iniciales.

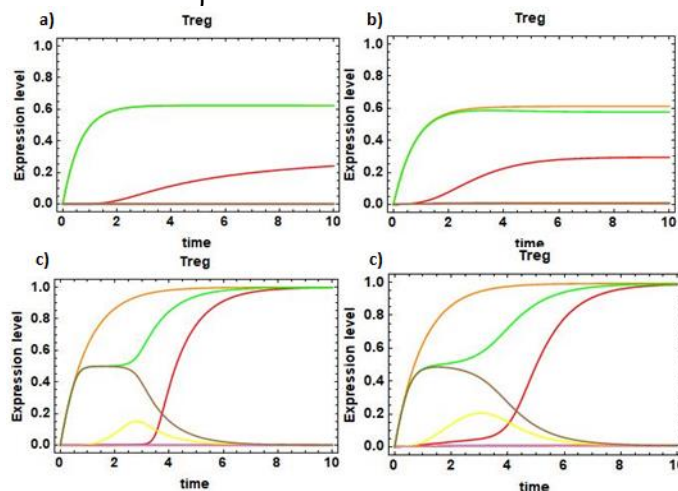


**FIGURA 36.** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Treg, para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente: a)  $\beta=20, IL2=0.4, TGF\beta=0.4$ , b)  $\beta=10, IL2=0.4, TGF\beta=0.4$ , c)  $\beta=20, IL2=0.6, TGF\beta=0.6$ , d)  $\beta=10, IL2=0.6, TGF\beta=0.6$ . Las diferentes curvas corresponden a FOXP3 (rojo), IL2 (verde), TGFβ (naranja).

En la gráfica 37a, se estudió el efecto de un incremento simultaneo de las tasas alfa de dos citocinas inductoras de Th17 (TGFβ e IL2), manteniendo las concentraciones de citocinas externas del caso 36c pero no el valor de sus alfas. Se observa como en comparación, el nivel de expresión de FOXP3, al igual que las otras dos citocinas involucradas disminuye hasta un máximo de 0.2. Cuando la tasa  $\beta$  se disminuyó a 10, se observa que en comparación con el caso 36d, también el nivel de expresión de FOXP3 y las demás citocinas se ve reducido. Al comparar los casos 37a y 37b, se observa que con el valor menor de  $\beta$ , la expresión de FOXP3 aumentó ligeramente, lo que sugiere que, al contrario de las dos gráficas anteriores, el aumento en el valor de  $\beta$  promueve el decremento en el nivel de expresión en FOXP3 cuando las tasas de decaimiento de TGFβ e IL2 se han aumentado, lo que no pasa en el caso en que las tasas de decaimiento de éstas citocinas disminuyen a 0.5 y el resto de los parámetros de control se mantienen igual, pues al cambiar los valores en las tasas de saturación no hay ningún cambio en el nivel de expresión de FOXP3 como muestra la figura 39a y b del anexo. Por otro lado, FOXP3 se expresó un poco más rápido en este caso, por lo que los valores bajos de  $\beta$  podrían aumentar su velocidad de expresión.

Por otro lado, en la gráfica 37c, se estudió la presencia de un factor proinflamatorio (IL21) y se consideró una  $\beta=20$ . Las concentraciones usadas fueron las suficientes para considerar una expresión activa de IL2, TGFβ y IL21 (igual a 1 para las tres citocinas). Se observa que el comienzo en la expresión de FOXP3 tuvo un retraso con respecto a los casos anteriores. IL2 e IL21 endógena se comienzan a expresar casi de inmediato para luego permanecer constantes durante un corto tiempo con una concentración de 0.4 y luego bifurcarse, IL2 aumentando e IL21 decayendo. TGFβ mantiene una expresión creciente y llega al nivel máximo en poco tiempo. Por otro lado, hay expresión de RORγt incluso antes que FOXP3,

pero sucede en un intervalo corto de tiempo y en baja concentración, lo que refleja la estrecha relación en la inducción de los fenotipos Th17 y Treg. Si comparamos esta gráfica con el caso 36c, donde se usó de igual forma una concentración alta de citocinas inductoras externas, pero sin la presencia de IL21, podemos ver que la velocidad de expresión de FOXP3 disminuyó al haber citocina proinflamatoria, además de que, como era previsto, sin la presencia de IL21 no hubo expresión endógena de RORY $\gamma$  ni IL21. Cuando  $\beta$  se redujo a 10 en 37d, se puede observar que el comportamiento en la expresión endógena de las citocinas involucradas fue muy similar al del caso 37c, incluyendo las características de expresión de FOXP3, sin embargo, hubo una pequeña disminución en el nivel de expresión de IL21 y un aumento en el nivel de RORY $\gamma$ , además de que la expresión de FOXP3 y RORY $\gamma$  fue ligeramente antes que en el caso anterior. Por otro lado, la comparación del caso 37d con el caso 36d, es similar a la comparación del caso 37c con el 36c. Vemos que el máximo nivel de expresión de FOXP3 en el caso 37c y d no es menor que en los casos 36a y b, cuando se usaron concentraciones menores de citocinas inductoras de FOXP3 aunque sin presencia de IL21, ni tampoco fue menor que cuando se usaron concentraciones menores de citocinas inductoras y además se aumentó la tasa de decaimiento de dos de ellas, pero sin presencia de IL21, como pasó en los casos 37a y b. Para estudiar el efecto en las concentraciones iniciales y la presencia de IL21, es importante mencionar que cuando se usó una concentración igual a 1 de IL2 y TGF $\beta$ , pero sin IL21, con una  $\alpha$  considerablemente alta de TGF $\beta$ , como ocurrió en la figura 39c y d del anexo 1, vemos que el nivel de expresión de FOXP3 aumenta significativamente en comparación de los casos 37a y 37b. Adicionalmente, vemos que la presencia de la citocina proinflamatoria en los casos 37c y d, disminuyó la velocidad de expresión de FOXP3, al compararlas con los casos antes mencionados, además de que promueve la expresión endógena de IL21 y RORY $\gamma$ . Algo importante de notar, es que cuando las concentraciones externas de IL2 y TGF $\beta$  son menores que en los casos 37c y d y se conserva la misma concentración de IL21 externa, FOXP3 no se expresa, y por otro lado, en el caso 39c y d del anexo 1, cuando hay una concentración alta de citocinas iniciales aunque sin IL21, FOXP3 se expresa casi totalmente a pesar de tener un decaimiento alto en TGF $\beta$ , lo que sugiere que al aumentar las concentraciones externas en la citocinas inductoras de TGF $\beta$ , se puede evitar el retraso e inhibición de la diferenciación de Treg por parte de IL21 y de un aumento de  $\alpha$  en TGF $\beta$ .



**FIGURA 37.** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Treg para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente: a)  $\beta=20$ ,  $\alpha_{IL2}=1.6$ ,  $\alpha_{TGF\beta}=1.6$  IL2=0.6

TGF $\beta$ =0.6 b)  $\beta$ =10,  $\alpha$ IL2=1.6,  $\alpha$ TBF $\beta$ =1.6, IL2=0.6 TGF $\beta$ =0.6, c)  $\beta$ =20, IL2=1, TGF $\beta$ =1, IL21=1 d)  $\beta$ =10, IL2=1  
TGF $\beta$ =1 IL21=1. Las diferentes curvas corresponden a FOXP3 (rojo), IL2 (verde), TGF $\beta$  (naranja) ROR $\gamma$ t (amarillo) e  
IL21 (café).

# DISCUSION

## SUBTIPO TH1

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 32, podemos inferir que las condiciones de concentración mínimas para que el fenotipo característico de Th1, INF $\gamma$  se exprese es un 0.3 externo del mismo, o bien, 0.3 de IL12 e IL2. La presencia de IL2 o IL12 por separado no es suficiente para inducir la expresión de Th1, lo que supone una acción sinérgica de ambas citocinas, mientras que la presencia de INF $\gamma$  externo es suficiente para inducir a Th1. La figura 32c sugiere que la reducción de la tasa  $\alpha$  de alguna citocina inductora de Th1 (en este caso INF $\gamma$ ) reduce el tiempo en que comienza la expresión de su factor de transcripción característico en los casos cuyos valores de  $\beta$  sean grandes pues con valores de  $\beta$  menores a 20, esta reducción de  $\alpha$  no mostró influencia en dicha expresión, comparándolas con las dos gráficas anteriores.

Por otro lado, en la figura 32e vemos que la presencia en pequeñas concentraciones de una citocina antiinflamatoria no sugiere afectar el tiempo ni nivel en el que se expresa INF $\gamma$  cuando el valor de  $\beta$  es pequeño, pues los valores altos de  $\beta$  parecen aumentar la sensibilidad de la función ante la presencia de IL10. En los casos de diferentes valores de  $\beta$ , no se mostró un efecto sinérgico entre IL2, IL12 e INF $\gamma$  cuando se tienen en pequeñas concentraciones para la expresión de INF $\gamma$ .

Consistentemente, los valores de  $\beta$  bajos sensibilizan la expresión de Th1, pues reducen el tiempo en el que se comienza a expresar el factor de transcripción característico, además de que aumentan la robustez de la expresión en INF $\gamma$  en presencia de una citocina antiinflamatoria en las condiciones externas o una disminución en la tasa de decaimiento de INF $\gamma$ , mientras que los valores altos de  $\beta$  aumentan el valor mínimo en la concentración de citocinas inductoras de Th1.

## SUBTIPO TH2

Los resultados obtenidos sugieren que las condiciones mínimas para que Th2 se exprese es una concentración de 0.4 de al menos 2 citocinas inductoras y un valor bajo en la tasa de saturación, también se puede observar en la figura 33, que existe un efecto sinérgico entre IL2 e IL4 para la diferenciación a Th2. Las concentraciones en pequeñas concentraciones de interleucinas inductoras de GATA3 no son suficientes para la expresión efectiva de Th2. El tiempo de expresión de GATA3 se ve afectado negativamente con la presencia de una citocina proinflamatoria (en este caso IL21). Adicionalmente, los resultados sugieren que la tasa de decaimiento  $\alpha$  de alguna interleucina externa inductora afecta de una forma directa los tiempos de expresión del factor de transcripción característico de las células Th2.

Los valores de  $\beta$  mayores a 10 requieren concentraciones más altas de citocinas para inducir el fenotipo Th2 por lo que los valores bajos de  $\beta$  parecen sensibilizar a la función frente la presencia de citocinas cuando no hay modificación de las tasas de decaimiento o presencia de alguna citocina antagónica. En casos como los presentados en la figura 33, en donde además de haber un aumento en las tasas de decaimiento de las citocinas participantes en la diferenciación de Th2, hay una adición de IL21, parece que la relación inversa entre el valor de  $\beta$  y la velocidad de expresión no se cumple, pues los valores altos de  $\beta$  aumentan la velocidad de expresión de GATA3, en contraste con la relación inversamente proporcional

que se establece en los casos en los que no hay presencia de algún factor negativo para la expresión de GATA3, como los antes mencionados.

### SUBTIPO TH17

Con respecto a los resultados observados en la figura 34a, b, c y d del fenotipo Th17, se infiere que la presencia de una citocina antiinflamatoria en una expresión proinflamatoria afecta negativamente el nivel de expresión del factor de transcripción característico de Th17, RORY $\gamma$ t. Asimismo, para afectar negativamente la expresión de RORY $\gamma$ t, parece necesario disminuir alguna de sus citocinas inductoras en más que un 0.2 a partir de que se logra expresar con un mínimo de concentraciones iniciales de citocinas externas.

De acuerdo con la figura 35a y b, el incremento en la tasa de decaimiento  $\alpha$  de alguna citocina inductora (en este caso TGF $\beta$ ) de RORY $\gamma$ t, disminuye su nivel de expresión. La disminución de la tasa de decaimiento  $\alpha$  de alguna citocina inductora de RORY $\gamma$ t afecta positivamente al nivel de su expresión, aunque no hay un aumento notorio en su velocidad de expresión. De acuerdo con las figuras 34c y d y 35a y b, parece que lo único que afecta más que el aumento de  $\alpha$  de TGF $\beta$  en la expresión de RORY $\gamma$ t, es la adición de IL10. Como se puede deducir de la figura 35 c y d, el aumento del valor de  $\alpha$  de IL21 afecta negativamente el tiempo de expresión de RORY $\gamma$ t cuando el valor de  $\beta$  es alto mientras que afecta negativamente su nivel de expresión cuando el valor de  $\beta$  es menor. Se intentaron probar las mismas condiciones en los parámetros de orden, pero en vez de disminuir la tasa de decaimiento de TGF $\beta$ , fue la de IL21, lo que mostró que el aumento del valor de  $\alpha$  de TGF $\beta$  es más desfavorable para el nivel de expresión de RORY $\gamma$ t que el aumento en el valor de  $\alpha$  de IL21 a pesar de que ambas son citocinas inductoras de ese fenotipo, probablemente con valores de  $\beta$  altos. El aumento del valor de  $\beta$  parece favorecer el nivel máximo de concentración de RORY $\gamma$ t cuando hay citocinas antagonista o modificación negativa de las tasas de decaimiento, pero también altera su tiempo de expresión, pues después de un tiempo parece comenzar a decaer. Un valor de  $\beta$  pequeño favorece la expresión constante de RORY $\gamma$ t y la expresión exponencial TGF $\beta$  cuando valor de  $\alpha$  es igual a 1. En adición, las tasas altas de decaimiento  $\alpha$  de citocinas inductoras de Th17 afectan de mayor forma al nivel de expresión de RORY $\gamma$ t cuando los valores de  $\beta$  son bajas. El aumento en concentraciones externas iniciales de citocinas inductoras de RORY $\gamma$ t no mejora el tiempo ni el nivel de expresión cuando alguna tasa  $\alpha$  se aumenta. Conjuntamente, se puede considerar que en la mayoría de experimentos para inducir el fenotipo Th17, la tasa de saturación  $\beta$  es directamente proporcional con el nivel y tiempo de expresión del factor de transcripción.

### SUBTIPO TREG

Como podemos ver en los resultados mostrados en la figura 36, las citocinas inductoras de FOXP3 tienen un efecto sinérgico y complementario, pues la presencia de un solo tipo de citocina no es suficiente para inducir Treg. Además, en concentraciones menores a 0.5 de citocinas inductoras, el comportamiento en la expresión del factor de transcripción es irregular, y aumentar esta concentración lo homogeniza. Asimismo, el aumento en la concentración de citocinas inductoras aumenta el nivel y la velocidad de expresión de FOXP3, como se logra observar en las figuras 36c y d. Reducir el valor de  $\beta$ , parece homogeneizar el comportamiento en la expresión de Treg, el cual es oscilante cuando  $\beta$  toma valores grandes. Los valores pequeños en la tasa de saturación parecen reducir la concentración mínima necesaria de citocinas inductoras para promover el subtipo Treg,

además, aumenta la velocidad en la que se expresa FOXP3. De igual forma, los valores de  $\beta$  grandes promueven el aumento en el máximo nivel de expresión de FOXP3 cuando las alfas no han sido modificadas (aumentadas).

La figura 37a y b sugiere que el aumento en las tasas de decaimiento de las citocinas inductoras de FOXP3, como se espera, reduce su nivel de expresión. Además, parece que las tasas mayores a 1 de  $\alpha$  en dos de las citocinas involucradas en la expresión de Treg, invierten el efecto positivo en el aumento del nivel de expresión de FOXP3 de las tasas de saturación altas. Como se puede ver en la figura 37c y d, la presencia de una citocina proinflamatoria, como lo es IL21, perjudica la velocidad de expresión de FOXP3, aunque no parece afectar su nivel máximo de expresión, de igual forma afecta la velocidad de IL2 e IL21, pero no la de TGF $\beta$ . Las concentraciones externas altas de citocinas inductoras de FOXP3, contrarrestan la acción negativa en el nivel de expresión de FOXP3 de valores altos de  $\alpha$  en las citocinas inductoras. La presencia de IL21 en combinación de TGF $\beta$ , promueven la diferenciación de ROR $\gamma$ t. También se vió, que las bajas concentraciones de citocinas inductoras de FOXP3 (en este caso IL2) no son suficientes para promover eficientemente la diferenciación de Treg a pesar de la presencia de otra citocina inductora en alta concentración (en este caso TGF $\beta$ ), pues, aunque si hay expresión de FOXP3, es baja y lenta. Es preferible usar las mínimas concentraciones, pero en misma proporción de citocinas inductoras de FOXP3 para expresarla eficientemente, que una concentración grande de una y la otra pequeña. Los resultados obtenidos para Treg, proponen que los valores bajos de  $\beta$  aumentan la sensibilidad de la función para reconocer concentraciones de citocinas inductoras que actúan sinérgicamente, y aumentan la velocidad de expresión de FOXP3.

Como bien se indica en Enciso 2019, las proposiciones difusas nos ayudan a describir una expresión intermedia de algún fenotipo, que es de gran importancia en los fenómenos biológicos. Además, las funciones continuas que contienen a las proposiciones de lógica difusa, describen las transiciones entre distintos estados estables que pueden ser influenciados por las condiciones microambientales y las tasas  $\alpha$  y  $\beta$ , que a su vez actúan en la diferenciación y plasticidad celular, lo que se relaciona con las respuestas inmunes en la progresión de diversas enfermedades. Es importante resaltar las potenciales aplicaciones del modelado matemático en biología, como podemos ver en el reciente trabajo de Corral-Jara y colaboradores, donde se muestra como una herramienta promisoriosa en el estudio del sistema inmune y el cáncer, mejorando la comprensión de la diferenciación de las células T CD4+ en Treg y Th17, y su relación con el comportamineto de las células cancerosas. Desarrollando de esta forma aplicaciones inmunoterapéuticas contra el cáncer basadas en estrategias de modelado matemático e integración de datos ómicos.



## CONCLUSION

Para comprender los eventos moleculares y procesos de regulación genética involucrada en la diferenciación celular, en este caso del sistema inmune adaptativo, e integrar la acción de diversos componentes moleculares y determinar su dinámica, resulta de utilidad proponer modelos matemáticos y enfoques computacionales que conducen al establecimiento de fenotipos celulares estables observados en los experimentos. Para ello, es importante establecer funciones booleanas que nos ayuden a entender la lógica de regulación transcripcional de la RRG, cuyos componentes regulatorios mantienen sus interacciones no lineales. La proposición de una red genética regulatoria también nos permite conocer mecanismos útiles para proponer nuevas interacciones o regulaciones faltantes, además de establecer jerarquías en los elementos de funcionalización y facilitar la propuesta de terapias asociadas en fallas en la señalización.

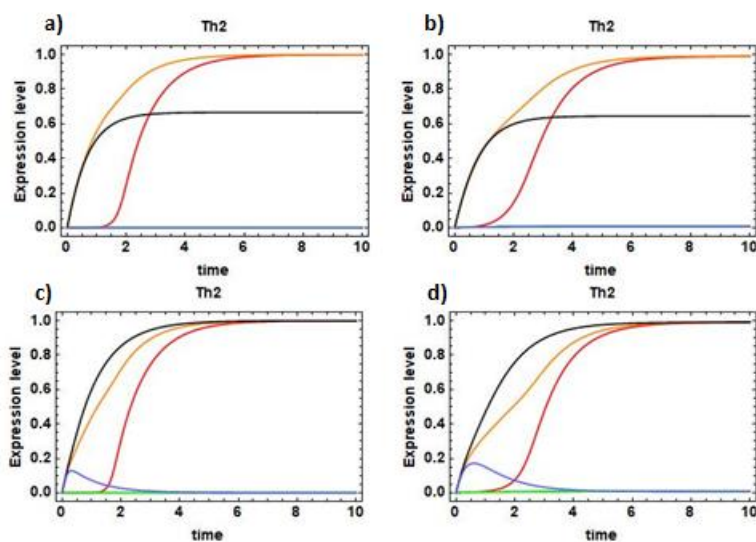
La dinámica continua determinada por la lógica difusa, además de ser más realista biológicamente, nos ayuda a profundizar en la composición de los patrones microambientales que influyen en la diversidad de linfocitos, pues la dinámica de expresión génica no solo está regulada por la topología de las interacciones de la red reguladora, sino también por los tiempos de expresión relativa de sus componentes y el ritmo de transición de un estado no expresado a uno expresado o el rango de sensibilidad de las células a diversas citocinas, lo que nos permite estudiar la evolución temporal del sistema, así como la exploración del paisaje epigenético a través de la variación de los parámetros continuos. Una gran tasa de decaimiento que equivaldría a un tiempo de expresión corto, sería equivalente a una mutación efectiva asociada a una falta de funcionalidad, lo contrario a una sobreexpresión de gen con una tasa baja. Asimismo, el sistema también puede adquirir comportamientos muy diferentes dependiendo del valor de la tasa de saturación. De esta forma, la diferenciación entre diferentes fases ordenadas pueden ser inducidas por modificaciones de los parámetros de control, como son las concentraciones iniciales, las tasas de decaimiento y saturación.

Se infiere a partir de los diferentes experimentos, que modificar los valores en los parámetros de  $\alpha$  y  $\beta$  afecta directamente al nivel y al tiempo de expresión de los factores transcripcionales. Generalmente el tiempo en que comienza la expresión aumenta cuando las tasas de decaimiento de algún factor involucrado se aumentan y viceversa. Existe una influencia notable del valor de la tasa de saturación en la gradualidad y nivel de expresión, pues el comportamiento en la dinámica fué variado con valores bajos y altos. De esta forma, es posible, cambiando los valores en dichos parámetros, inducir un estado, eficientizar una respuesta aumentando su tiempo y nivel de expresión o acelerar la expresión de un elemento de la red, ya sea un factor de transcripción, una enzima, una molécula reguladora, etc. De igual forma, la existencia de elementos antagónicos permite la inhibición de respuesta, como la presencia de interleucinas antiinflamatorias en reacciones proinflamatorias y viceversa. Por otro lado, los efectos negativos de dichas tasas podrían ser contrarrestados con el aumento en la concentración inicial de citocinas promotoras del fenotipo. Concluyendo, el empleo de redes reguladoras continuas basadas en la lógica difusa podrían ser de mucha e importante utilidad en el estudio y comprensión de los complejos mecanismos moleculares involucrados en los procesos de homeostasis, proliferación y diferenciación celular implicados en diversas enfermedades humanas.

## ANEXO

En la gráfica 38a se estudió el efecto de la presencia de una interleucina proinflamatoria (IL21), observándose que no existe alguna diferencia significativa en este caso sin IL21 y el caso que si tiene IL21 (resultados) pero el resto de condiciones se conserva. Al reducir la tasa de saturación a la mitad, en el caso 38b, se observa como la función aumenta su gradualidad.

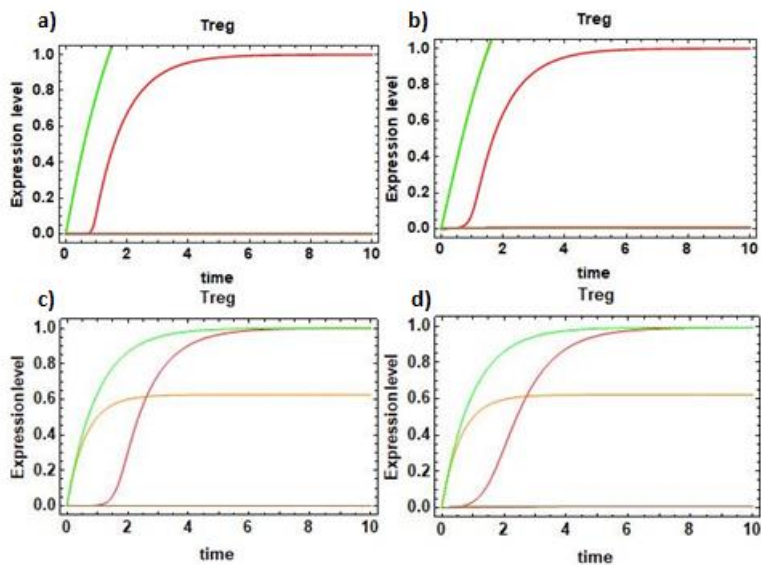
En el caso 38c, se usó una concentración regular (0.6) de citocinas inductoras de Th2 (IL2 e IL4) y una citocina proinflamatoria (IL21), para poder comparar el efecto del aumento en la tasa de decaimiento. Observándose que apenas y hubo un retraso leve en la expresión de RORYT con la modificación en el valor de  $\alpha$  IL4. Al disminuir la tasa de saturación en el caso 38d el comportamiento es análogo al anterior.



**FIGURA 38.** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Th2 para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente: a)  $\beta=20$ , IL2=0.6, IL4=0.6,  $\alpha$  IL2=1.5. b)  $\beta=10$ , IL2=0.6, IL4=0.6,  $\alpha$  IL2=1.5. c)  $\beta=20$ , IL2=0.6, IL4=0.6, IL21=0.6. d)  $\beta=10$ , IL2=0.6, IL4=0.6, IL21=0.6.

En las gráficas 39 a y b, se analizó la relación del nivel de expresión con el valor en las tasas de decaimiento, viéndose que no hay una diferencia notable entre estos casos con  $\beta=20$  y 10 respectivamente, lo contrario que sucedió en los casos 36 a y b.

En las graficas 39 c y d se estudió el efecto de las concentraciones iniciales de citocinas inductoras, observándose que existe una total expresión del factor transcripcional, a pesar de que la tasa de decaimiento de TGF $\beta$  es muy alta. Por otro lado, no es muy visible la diferencia entre 39 c y d.



**FIGURA 39.** Dinámica de expresión asociada al fenotipo Treg para diferentes valores de los parámetros de saturación y decaimiento, y de las concentraciones relativas de citocinas del microambiente, a)  $\beta=20$ ,  $IL2=0.6$ ,  $TGF\beta=0.6$ ,  $\alpha IL2=0.5$ ,  $\alpha TGF\beta=0.5$ . b)  $\beta=10$ ,  $IL2=0.6$ ,  $TGF\beta=0.6$ ,  $\alpha IL2=0.5$ ,  $\alpha TGF\beta=0.5$ . c)  $\beta=20$ ,  $IL2=1$ ,  $TGF\beta=1$ ,  $\alpha TGF\beta=1.6$ . d)  $\beta=10$ ,  $IL2=1$ ,  $TGF\beta=1$ ,  $\alpha TGF\beta=1.6$ .

## Reglas Booleanas para células T CD4+

TBET	((IFNG   (IL12e & !IL21 & !IL4 & !IL10) )   TBET) & !IL4 & !GATA3 & !IL21 & !BCL6
IFNG	(IFNGe   ((IFNG   TBET) & !GATA3 & !TGFB)) & !IL21 & !IL4 & !IL10 & !BCL6 & !IL9
GATA3	((IL2 & IL4)   IL4   GATA3) & !TBET & !TGFB & !IL21 & !IFNG & !BCL6
IL2	(IL2e   (IL2 & !FOXP3)) & !IFNG & !IL21 & (FOXP3   !IL10)
IL4	(IL4e   (GATA3 & (IL2   IL4) & !TBET)) & !IFNG & !IL21
RORGT	IL21 & TGFB & !TBET & !FOXP3 & !GATA3 & !BCL6
IL21	(IL6e   IL21e   IL21   RORGT   BCL6) & !IFNG & !IL4 & !IL10 & !IL2 & !IL9
FOXP3	IL2 & (TGFB   FOXP3) & !IL21 & !RORGT & !IL4
TGFB	(TGFB   ((TGFB   FOXP3) & !IL21 ))
IL10	(IL10e   (IL10 & (IFNG   IL21   TGFB   GATA3   IL27e)))
IL9	IL4 & ((IL10 & IL2)   TGFB) & !IFNG & !IL21 & !FOXP3
BCL6	(IL21   IFNG) & !TBET & !IL2 & !TGFB
IL12e	IL12e
IFNGe	IFNGe
IL2e	IL2e
IL4e	IL4e
IL6e	IL6e
IL21e	IL21e
TGFB	TGFB
IL10e	IL10e
IL27e	IL27e

## BIBLIOGRAFIA

- Alvarez-Buylla, E.R., Chaos A., Aldana M., Benítez M., Cortes-Poza Y., Espinosa-Soto C., Hartasánchez D.A., Lotto R.B., Malkin D., Escalera Santos Q.J., Padilla-Longoria P. (2008). Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PLoS ONE*. 2008;38(1):e3626. doi: 10.1371/journal.pone.0003626.
- Alvarez-Buylla, E. R., Azpeitia, E., Barrio, R., Benítez, M., Padilla-Longoria, P. (2010). From ABC genes to regulatory networks, epigenetic landscapes and flower morphogenesis: making biological sense of theoretical approaches. *Semin Cell Dev Biol* 21(1):108–117. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.11.010.
- Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B., and Rao, A. (2006). Regulation of TH2: Differentiation and *il4* locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 607–656. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704
- Azpeitia, E., Davila-Velderrain, J., Villarreal, C., and Alvarez-Buylla, E. R. (2014). Gene regulatory network models for floral organ determination, in *Methods in Molecular Biology*, eds J. L. Riechmann and F. Wellmer (New York, NY: Springer).
- Barberis, M., Helikar, T., and Verbruggen, P. (2018). Simulation of stimulation: cytokine dosage and cell cycle crosstalk driving timing-dependent T Cell differentiation. *Front. Physiol.* 9:879. doi: 10.3389/fphys.2018.00879
- Brundu, S., Palma, L., Picceri, G.G., Ligi, D., Orlandi, C., Galluzzi, L., et al. (2016). Glutathione depletion is linked with Th2 polarization in mice with a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, murine AIDS: role of proglutathione molecules as immunotherapeutics. *J Virol.* 90:7118–30. doi: 10.1128/JVI.00603-16
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., et al. (2003). Conversion of Peripheral CD4 + CD25- Naive T Cells to CD4 + CD25 + regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886. doi: 10.1084/jem.20030152
- Corral-Jara KF, Rosas da Silva G, Fierro NA and Soumelis V (2021) Modeling the Th17 and Tregs Paradigm: Implications for Cancer Immunotherapy. *Front. Cell Dev Biol.* 9:675099. doi: 10.3389/fcell.2021.675099
- Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., et al. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3880–3885. doi: 10.1073/pnas.0400339101
- Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J., and Shevach, E. M. (2007). Cutting edge: IL-2 is essential for TGF $\beta$  mediated induction of Foxp3 + T regulatory cells. *J. Immunol.* 178, 4022–4026. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4022
- Davila-Velderrain, J., Villarreal, C., and Alvarez-Buylla, E. R. (2015). Reshaping the epigenetic landscape during early flower development: induction of attractor transitions by relative differences in gene decay rates. *BMC Syst. Biol.* 9:20. doi: 10.1186/s12918-015-0166-y
- DuPage, M., and Bluestone, J. A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 149–163. doi: 10.1038/nri.2015.18
- Eizenberg-Magar, I., Rimer, J., Zaretsky, I., Lara-Astiaso, D., Reich-Zeliger, S., and Friedman, N. (2017). Diverse continuum of CD4 + T-cell states is determined by

hierarchical additive integration of cytokine signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E6447–E6456. doi: 10.1073/pnas.16155 90114

Enciso, J., Pelayo, R., Villarreal, Carlos. (2019). From discrete to continuous modeling of lymphocyte development and plasticity in chronic diseases. *Frontiers in immunology*. 10:1927. doi: 10.3389/fimmu.2019.01927

Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P., Alvarez-Buylla, E, R. (2004). A gene regulatory network model for cell-fate determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell* 16:2923–2939. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.104.021725>

Germinal Cocho Gil. (2017). *Ciencia, Humanismo, Sociedad: de los sistemas complejos a la imaginación heterodoxa*. Cd. Mexico: C3.

Glass, Kaplan. (1995). *Understanding Nonlinear Dynamics*. New York: Springer-Verlag.

Golubovskaya V, Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* (2016) 8(3): E36. doi:10.3390/cancers8030036

Gol-Ara, M., Jadidi-Niaragh, F., Sadria, R., Azizi, G., and Mirshafiey, A. (2012). The role of different subsets of regulatory t cells in immunopathogenesis of rheumatoid. *Arthritis* 2012:805875. doi: 10.1155/2012/805875

Haken, H. (1977). *Synergetics. An introduction. Nonequilibrium phase transitions and self-organization in Physics, Chemistry and Biology*. Nueva York: Springer-Verlag.

Herrero, M.A. (2006). *Matemáticas y Biología: un comentario de Textos*. Encuentros Multidisciplinarios: Universidad Complutense

Herzenberg, L.A. et al. (1997). Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Medical Sciences*.

Hegazy, A. N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Frohlich, A., Bergthaler, A., et al. (2010). Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3+T-bet+ cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32,116–128. doi: 10.1016/j.immuni.2009.12.004

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061. doi: 10.1126/science.1079490

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O’Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4 + T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547–549. doi: 10.1126/science.8097338

Jing Zhao, Lin T., Hong Y., Jian-Hua L., Cao Z., Yixue L. (2007). Bow tie topological features of metabolic networks and the functional significance. *Chin Sci Bull.*, 52:1036–45.

Kaneko, K., (2011) Characterization of stem cells and cancer cells on the basis of gene expression profile stability, plasticity, and robustness. *Bioessays* 33:403–413. doi: 10.1002/bies.201000153.

Kauffman, S. (1969). Homeostasis and differentiation in random genetic control networks. *Nature*

Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., Campbell, D. J., et al. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* 10, 595–602. doi: 10.1038/ni.1731

Klysz, D. et al. Glutamine-dependent  $\alpha$ -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Sci. Signal.* 8, ra97 (2015).

- Le Gros, G., Ben-Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D., Paul, W. E., Le Gros, G., et al. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.* 172, 921–929. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Magombedze, G., Reddy, P. B. J., Eda, S., and Ganusov, V. V. (2013). Cellular and population plasticity of helper CD4+ T cell responses. *Front. Physiol.* 4:206. doi: 10.3389/fphys.2013.00206
- Martínez-Sosa, P., and Mendoza, L. (2013). The regulatory network that controls the differentiation of T lymphocytes. *BioSystems* 113, 96–103. doi: 10.1016/j.biosystems.2013.05.007
- Martinez-Sanchez, M. E., Mendoza, L., Villarreal, C., and Alvarez-Buylla, E. R. (2015). A minimal regulatory network of extrinsic and intrinsic factors recovers observed patterns of CD4 + T cell differentiation and plasticity. *PLoS Comput. Biol.* 11:e1004324. doi: 10.1371/journal.pcbi.100432
- Martinez-Sanchez, M. E., Huerta, L., Alvarez-Buylla, E. R., and Villarreal Lujan, C. (2018). Role of cytokine combinations on CD4+ T cell differentiation, partial polarization, and plasticity: continuous network modeling approach. *Front. Physiol.* 9:877. doi: 10.3389/fphys.2018.00877
- Mendoza, L & Xenarios, I. (2006). A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *BioMed Central*. doi: 10.1186/1742-4682-3-I3.
- Mendoza, L., Méndez, A. (2015). A dynamical model of the regulatory network controlling lymphopoiesis. *BioSystems* 137, 26-33. doi: 10.1016/j.biosystems.2015.09.004.
- Mitchell, M. (2006). *Complex Systems: network thinking*. Portland State USA. Elsevier Science. doi:10.1016/j.artint.2006.10.002
- Murphy, K. M., and Stockinger, B. (2010). Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat. Immunol.* 76, 211–220. doi: 10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid
- Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K., Waltenbaugh, C. (1998) Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2response patterns. *Proc Nat Acad Sci U S A*1998;95:3071-3076
- Perez, V. L., Lederer, J. A., Lichtman, A. H., and Abbas, A. K. (1995). Stability of Th1 and Th2 populations. *Int. Immunol.* 7, 869–875. doi: 10.1093/intimm/7.5.869
- Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C. H. & Jones, R. G. (2013). Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science.* 342 doi:10.1126/science.1242454
- Ponce-Cruz, P., & Ramirez-Figueroa, F. D. (2010). Fuzzy Logic. En *Intelligent Control Systems with LabVIEW™* (pp. 9–46). Londres: Springer London. [http://doi.org/10.1007/978-1-84882-684-7\\_2](http://doi.org/10.1007/978-1-84882-684-7_2)
- Puniya, B. L., Todd, R. G., Mohammed, A., Brown, D. M., Barberis, M., and Helikar, T. (2018). A mechanistic computational model reveals that plasticity of CD4+ T cell differentiation is a function of cytokine composition and dosage. *Front. Physiol.* 9:462. doi: 10.3389/fphys.2018.00878
- Ramírez, Santiago (coord.). 1999. *Perspectivas en las teorías de sistemas*. Siglo xxi Editores-ceiich, unam, México.
- Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145, 3796–3806.

- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., and Glimcher, L. H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21,713–758. doi: 10.1146/annurev.immunol.21
- Wang, J., Xu, L., Wang, E., Huang, S. (2010). The potential landscape of genetic circuits imposes the arrow of time in stem cell differentiation. *Biophys J* 99: 29–39.
- Wohlfert, E. A., Grainger, J. R., Bouladoux, N., Konkel, J. E., Oldenhove, G., Ribeiro, C. H., et al. (2011). GATA3 controls Foxp3 + regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4503–4515. doi: 10.1172/JCI57456
- Van der Windt, G. J & Pearce, E.L. (2012). Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol. Rev.*, 249. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01150.x.
- Villarreal, C., Padilla-Longoria, P., and Alvarez-Buylla, E. R. (2012). General theory of genotype to phenotype mapping : derivation of epigenetic landscapes from N-node complex gene regulatory networks. *Phys. Rev. Lett.* 109:118102. doi: 10.1103/PhysRevLett.109.118102
- Zadeh, L. A. (1965). Fuzzy sets. *Information and Control* 8:338–353
- Zheng, W. F., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80240-8
- Zheng, Y., Josefowicz, S. Z., Kas, A., Chu, T.-T., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940. doi: 10.1038/nature05563
- Zhou, J. X., Bruschi, L. & Huang, S. (2011). Predicting pancreas cell fate decisions and reprogramming with a hierarchical multi-attractor model. *PLoS One* 6(3):e14752. doi: 10.1371/journal.pone.0014752