



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Sobreexpresión de NeST promueve la producción de  
IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**PRESENTA:  
ADRIÁN ALBARRÁN GODÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS  
Dr. José Carlos Crispín Acuña**

**Facultad de Medicina**



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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.

## **Agradecimientos**

*A mis tutores, Dr. Crispín, Dra. Rosetti y Dra. Madera, por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio, por el conocimiento que me han brindado, los consejos, su paciencia, por su apoyo y motivación en perseguir el camino de la ciencia y la inmunología. Muchas gracias.*

*A mis padres, Emilia Godínez y Antonio Albarrán por su amor incondicional, por ser el hombro donde me puedo apoyar. Por creer en mí desde el primer momento. Por motivarme a perseguir mis sueños y cumplir mis metas.*

*A mi tía Leticia Godínez, por toda su confianza, amor y apoyo incondicional sin importar la distancia.*

*A la Dra. Rosa, Gerardo, Abi, Diana, Diego, Marco, por su amistad, por las risas, por los buenos consejos, por su ayuda en los experimentos y su compañía en los momentos de desesperación.*

*A Laura, Ale, Roy, Aza y Rodrigo, por su amistad incondicional, por todas las risas, por los momentos que compartimos juntos, por las videollamadas y no permitirme caer en la locura durante la pandemia.*

*A Elizabeth, por su compañía e impulso constante durante el desarrollo de este proyecto.*

*A Alejandro, por permitirme continuar con su trabajo de maestría y pertenecer al equipo NeST.*

*Al Dr. Iván Valdés, por enseñarme a realizar las cirugías de punción y ligación cecal. .*

*A Damáris Romero y Jessica Rodriguez, por su ayuda en el sorting de estos experimentos, su amabilidad hizo esto posible.*

*A Mariela Contreras, por su apoyo en el bioterio.*

*A los tutores de mis primeros años de la carrera Dr. Dreyfus, Dra. Bobadilla, Dra. Soldevila por compartir sus enseñanzas conmigo. A todas las personas que conocí y me apoyaron durante mi licenciatura con su conocimiento y amistad. A Javier, Tere, Mariela, Andy, Mike, Toño, Rosi, Selina, Sandra, Saúl y Ximena. Muchas gracias.*

*Gracias a la UNAM, por concederme el orgullo de estudiar en sus aulas.  
Gracias a la LIBB por enseñarme tanto y abrir mis ojos al mundo de la investigación.*



## Índice

<b>I.</b>	<b>Resumen/ Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>3</b>
	2.1 <i>El sistema inmunológico .....</i>	3
	2.1.1 <i>Sistema inmune innato .....</i>	3
	2.1.2 <i>Sistema inmune adaptativo .....</i>	5
	2.1.3 <i>Inmunidad humoral y celular.....</i>	6
	2.1.4 <i>Memoria celular .....</i>	7
	2.2 <i>Mecanismos efectores de Linfocitos CD4 y CD8.....</i>	8
	2.3 <i>IFN-<math>\gamma</math> y linfocitos CD8.....</i>	9
	2.3.1 <i>LncRNA NeST .....</i>	11
	2.4 <i>Sepsis.....</i>	12
	2.4.1 <i>Sepsis y linfocitos CD8.....</i>	15
<b>III.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>IV.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>V.</b>	<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>21</b>
	5.1 <i>Ratones.....</i>	21
	5.2 <i>Construcción de vectores retrovirales .....</i>	22
	5.3 <i>Transformación de bacterias .....</i>	25
	5.4 <i>Producción de virus .....</i>	26
	5.5 <i>Infección de linfocitos T CD8 con virus .....</i>	27
	5.6 <i>Citometría de flujo .....</i>	29
	5.7 <i>Extracción de RNA.....</i>	29
	5.8 <i>Medición de l<math>\alpha</math>ng por qPCR.....</i>	30
	5.9 <i>Modelo de Sepsis .....</i>	30
	5.10 <i>Ensayos in vivo.....</i>	31
	5.11 <i>Análisis estadísticos .....</i>	31
<b>VI.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
	6.1 <i>Clonación de NeST a vectores virales .....</i>	32
	6.2 <i>Vectores virales e infección de linfocitos T CD8+ muridos .....</i>	35
	6.3 <i>Infección de linfocitos T CD8+ con retrovirus in vitro.....</i>	38
	6.4 <i>Sobreexpresión de NeST y su efecto en células provenientes de sepsis .....</i>	40
<b>VII.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>42</b>
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>46</b>
<b>IX.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>47</b>
<b>X.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>48</b>

## I. Resumen

Durante la sepsis, el sistema inmunológico desarrolla un estado patológico en respuesta a una infección. Hiperinflamación, hipercoagulabilidad e inmunosupresión causan daño a diferentes órganos vitales y, frecuentemente, la muerte. En algunos pacientes, el trastorno inmune se perpetúa y se genera un estado patológico crónico que se ha denominado *PICS*, por síndrome de inflamación/inmunosupresión y catabolismo persistente.

Los linfocitos T CD8 juegan un papel indispensable en la respuesta contra patógenos intracelulares. Una de las características más conspicuas del PICS es la susceptibilidad a infecciones y reinfecciones virales, lo que sugiere que las células T CD8 funcionan en forma inadecuada en este síndrome. En trabajos previos, hemos demostrado que la sepsis crónica tiene efectos discretos en la función de las células T CD8. En particular, afecta su capacidad de producir la citocina interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), una molécula clave para la función protectora de estas células. Nuestros datos indican que el defecto en la producción de IFN- $\gamma$  se establece a nivel epigenético y se asocia con una falla en la expresión del RNA largo no codificante (lncRNA) NeST.

El objetivo de este trabajo fue inducir la expresión forzada de NeST en células T CD8 expuestas a inflamación crónica secundaria a sepsis, con el fin de demostrar si la presencia de NeST corrige el defecto en la producción de IFN- $\gamma$ . Con ese fin, cloné NeST en dos sistemas de expresión retrovirales y estandaricé un método para lograr la infección de células T CD8 activadas. Finalmente, analicé, en un sistema *in vitro* y en un modelo *in vivo* de infección por *Listeria monocytogenes* los efectos que la expresión forzada de NeST tiene sobre la producción de IFN- $\gamma$ .

## **Abstract**

Sepsis represents a pathological response to infection. Severe inflammation, thrombophilia, and paradoxical immunosuppression damage vital organs and frequently cause death. In patients that survive sepsis, the immune disturbances extend develop into a chronic pathological condition named persistent inflammation/immunosuppression and catabolism syndrome (PICS).

CD8 T lymphocytes play an essential role in the response against intracellular pathogens. A hallmark feature of PICS is susceptibility to viral infections and reactivations, suggesting that CD8 effector functions are particularly compromised. In previous work, we demonstrated that sepsis affects in a cell-intrinsic manner the behavior of CD8 T cells. In particular, sepsis had a severe impact in the capacity of CD8 T cells to produce interferon (IFN)- $\gamma$ , a molecule key for CD8 responses. Our data, indicated that the defect in the production of IFN-  $\gamma$ , was established at the epigenetic level and was associated with a failure in the expression of the long non-coding RNA (lncRNA) NeST.

The aim of this work was to induce forced expression of NeST in CD8 T cells exposed to chronic sepsis, in order to determine whether the presence of NeST was able to restore the capacity to produce IFN- $\gamma$ . To this end, I subcloned NeST into two different retroviral expression vectors and standardized a method to infect activated CD8 T cells. Finally, using an in vitro and in vivo system of infection with *Listeria monocytogenes*, I analyzed the effects of NeST forced expression.



## **II. Introducción**

### **2.1 El sistema inmunológico**

Nuestro sistema inmunológico ha evolucionado para protegernos, en particular de enfermedades infecciosas. Para lograr eso, involucra una serie de órganos, células y moléculas que actúan en conjunto para generar lo que conocemos como respuesta inmune. El sistema inmunológico interactúa con otros sistemas reguladores, en particular el endócrino y nervioso para preservar la homeostasis en el organismo.<sup>1</sup>

El sistema inmunológico está conformado por dos ramas: la respuesta inmune innata, evolutivamente más antigua, provee protección temprana en forma estereotipada; la respuesta inmune adaptativa reconoce patógenos en forma específica y genera mecanismos de memoria que protegen durante reencuentros.<sup>1, 2</sup>

#### **2.1.1 El sistema inmune innato**

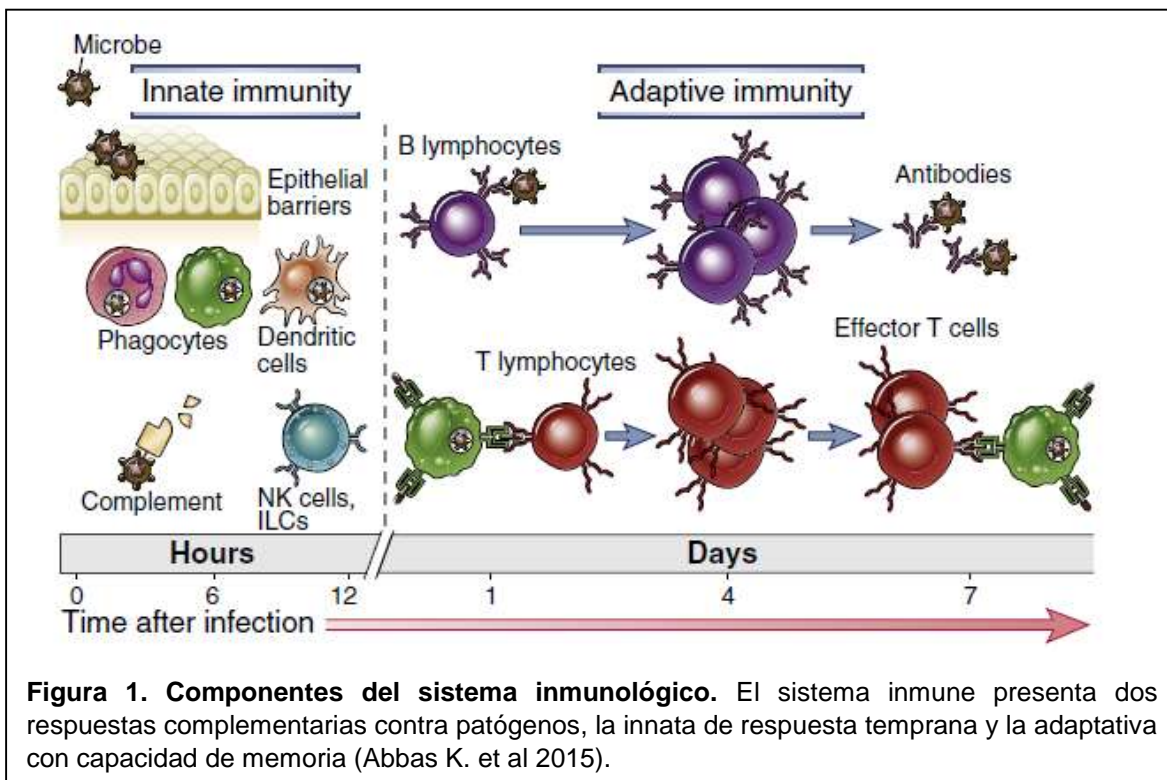
Los organismos complejos han generado diferentes mecanismos para protegernos de la invasión y colonización por patógenos. Esto ha conducido a una carrera armamentística entre huéspedes y microorganismos, que ha promovido la formación de nuevos mecanismos de defensa e infección, respectivamente. La inmunidad innata (también conocida como natural) provee la primera línea de defensa contra patógenos. Consiste en mecanismos de defensa celulares y bioquímicos, concentrados en epitelios, preparados para montar una respuesta rápida. La manera en que se activan estos mecanismos es el reconocimiento de patrones estructurales de microbios y células dañadas.<sup>1, 3</sup>

El sistema inmune innato se compone de diferentes niveles que evitan la invasión de patógenos: (1) *barreras físicas y químicas*, como epitelios, moco, o químicos como los péptidos antimicrobianos producidos por los epitelios o ambientes con pH ácido. Estas barreras detienen la entrada o avance de microorganismos al torrente sanguíneo y órganos del cuerpo; (2) *proteínas séricas solubles*, como el complemento y otros mediadores de la inflamación. El complemento funciona creando poros en membranas celulares, principalmente en bacterias, creando un desequilibrio osmótico irreversible para el patógeno; (3) *células fagocíticas*, como los neutrófilos y macrófagos que engullen microbios y restos de células apoptóticas para controlar infecciones y modular la respuesta inflamatoria (**Figura 1**).<sup>2,3</sup>

Las células del sistema inmune innato responden al reconocimiento de patrones moleculares presentes en patógenos (PAMPs, por el inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns) y a señales liberadas por células propias cuando éstas son dañadas o sufren estrés (DAMPs, por el inglés Danger-Associated Molecular Patterns). La identificación de estos patrones la hace un grupo de receptores invariantes conocidos como PRRs (por el inglés Pattern Recognition Receptors). Las secuencias que reconocen incluyen carbohidratos como manosa, proteínas como flagelina, o nucleótidos como DNA, RNA y dsRNA. La activación de PRRs activa vías de señalización que promueven la respuesta antiviral y/o la inflamatoria.<sup>3,4</sup>

## 2.1.2 El sistema inmune adaptativo

Una de las consecuencias de la activación del sistema inmune innato es la activación del sistema inmune adaptativo. Los dos componentes de la respuesta adaptativa son los linfocitos B y T (**Figura 1**). Las células B son las encargadas de la producción de anticuerpos (IgG, IgA, IgE, IgM), que realizan procesos cruciales como la opsonización, neutralización de patógenos y activación del complemento. Además, las células B son presentadoras de antígeno (APCs), en particular durante respuestas inmunes secundarias. Por otro lado, las células T son activadas tras el reconocimiento de un antígeno cargado en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las funciones de los linfocitos T pueden variar dependiendo de las señales que reciben y el tipo de antígeno que reconocen. Esto determina su papel dentro del sistema inmunológico como linfocitos CD4 ayudadores (activados vía MHC-II) o como linfocitos CD8 (activados vía MHC-I) con capacidades citotóxicas. <sup>1,5.</sup>



**Figura 1. Componentes del sistema inmunológico.** El sistema inmune presenta dos respuestas complementarias contra patógenos, la innata de respuesta temprana y la adaptativa con capacidad de memoria (Abbas K. et al 2015).

Probablemente la característica más importante que describe el mecanismo de acción de los dos tipos de linfocitos es la especificidad, conferida directamente por los receptores de antígenos *BCR* (*B cell receptor*) y *TCR* (*T cell receptor*). Ambos tipos de receptores son generados por un proceso conocido como recombinación somática que produce un vasto repertorio de receptores capaces de reconocer a innumerables antígenos de manera específica.<sup>5,6.</sup>

### **2.1.3 Inmunidad humoral y celular**

Los linfocitos B y los anticuerpos que producen conforman la inmunidad humoral. Los anticuerpos se componen por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, que a su vez contienen una región variable y una región constante. Los anticuerpos o inmunoglobulinas tienen una estructura similar a una “Y”. La parte superior contiene un dominio constante y uno variable que forman el sitio de unión al antígeno, también conocido como Fab (fragment, antigen-binding). La base, o región Fc (fragment, crystallizable), está compuesta por dominios constantes de las dos cadenas pesadas. La región Fc es el mediador de las propiedades efectoras de los anticuerpos por medio de la unión con receptores específicos o proteínas del complemento.<sup>7.</sup>

Cada tipo de anticuerpo tiene una localización predominante y funciones determinadas. Los anticuerpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) son los más abundantes en la circulación y tienen muchas funciones, como la activación del complemento, opsonización, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y neutralización. Los anticuerpos IgA se secretan en mucosas, donde neutralizan patógenos y regulan la microbiota. Los IgE, asociados con hipersensibilidad y reacciones alérgicas, juega un papel importante en la inmunidad contra

helmintos. Finalmente, los anticuerpos IgM son los primeros en producirse durante la respuesta inmune y son potentes activadores del complemento.<sup>1,7.</sup>

La inmunidad celular es mediada por los linfocitos T. Los linfocitos CD4 ayudadores pueden dividirse en diferentes subtipos funcionales (i.e. Th1, Th2, Th17, Treg). Juegan un papel fundamental en la regulación de las repuestas inmunológicas a través de efectos en células del sistema inmune y en células no inmunes. Su acción es mediada por la liberación de mediadores solubles conocidos como citocinas. Su contraparte, los linfocitos CD8, tienen acciones más directas sobre el control de patógenos y células infectadas. Sus mecanismos regulatorios se concentran en la secreción de citocinas y productos citotóxicos e inducción de muerte celular por contacto. Durante una infección la acción en conjunto de ambos tipos de células es central para una respuesta inmune exitosa.<sup>1,2.</sup>

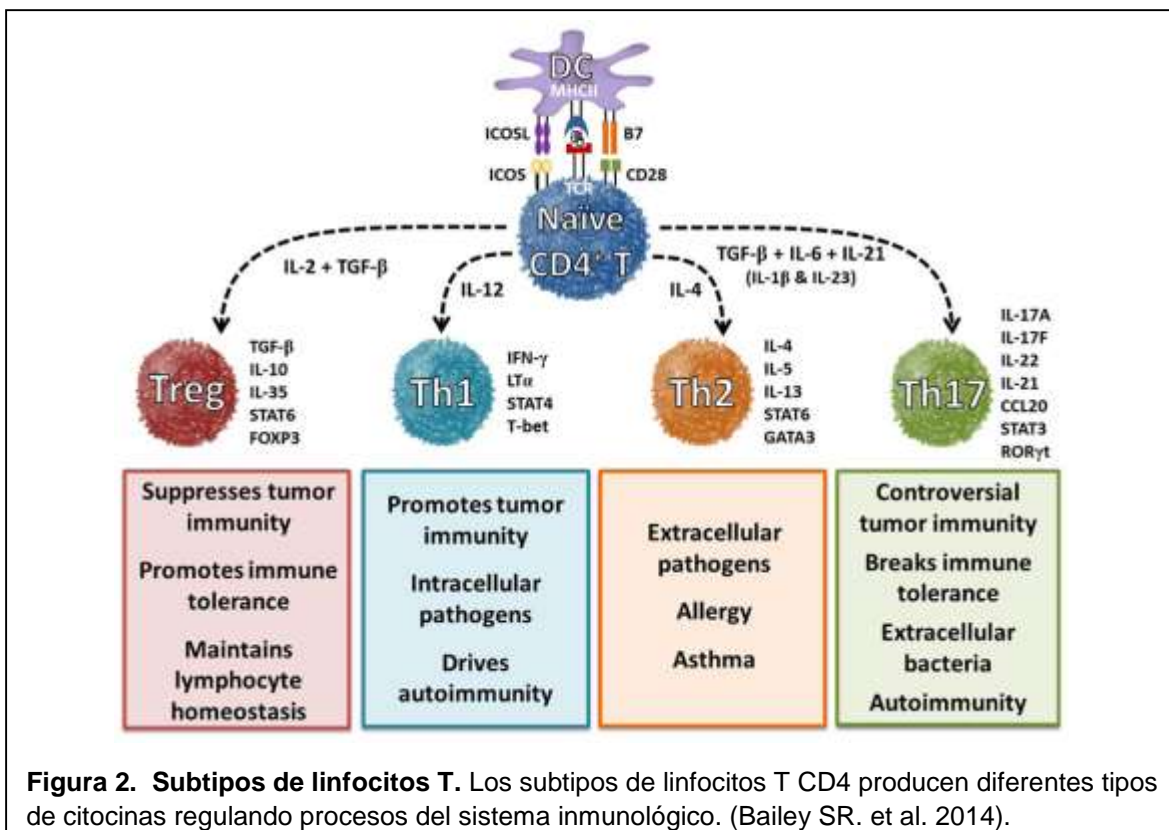
#### ***2.1.4 Memoria inmunológica***

Durante su activación en respuesta a antígenos, los linfocitos B y T sufren una diferenciación que implica grandes cambios en su metabolismo y expresión de genes. Los cambios metabólicos representan el sustento que les permite proliferar vigorosamente; los cambios en la expresión de genes les permiten adquirir funciones efectoras. Las células T recientemente activadas se diferencian en células con capacidad de autorenovación y con capacidad de generar grandes cantidades de células efectoras con diferenciación terminal. Estas últimas serán la población numéricamente predominante durante la respuesta inmune aguda. Sin embargo, morirán por apoptosis unos días más tarde, limitando así su capacidad inflamatoria. Las células autorenovables sobrevivirán por periodos prolongados en órganos linfoides secundarios como células de memoria central y en tejidos como células de memoria residentes de tejidos.<sup>8,9.</sup>

## 2.2 Mecanismos efectores de los linfocitos CD4 y CD8

Como mencioné antes, tras su activación, las células CD4 y CD8 vírgenes sufren un proceso de diferenciación que les confiere capacidades funcionales. Durante un evento infeccioso o por inmunización las células se diferencian en poblaciones heterogéneas de células efectoras que pueden eliminar a los patógenos.<sup>10</sup>

Después de su activación por MHC-II, los linfocitos CD4 vírgenes se dividen en diferentes subtipos denominados “ayudadores”, clasificados en base a su expresión de factores de transcripción, producción de citocinas y expresión de receptores de quimiocinas. Estos incluyen las células Th1 (T ayudadoras tipo 1) que producen IFN- $\gamma$  y TNF y juegan un papel central en la respuesta contra patógenos intracelulares y contra tumores. Las Th2, que producen IL-4, IL-13, e IL-5 y que representan las coordinadoras de la inmunidad contra



parásitos. Las Th17 producen IL-17 y orquestan la inmunidad en contra de bacterias y hongos extracelulares. Adicionalmente, los linfocitos T reguladores o Treg tienen funciones imprescindibles como reguladores negativos de la respuesta inmunológica y el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Este grupo de células expresa marcadores como CTLA-4 y PD-1 y produce TGF $\beta$  e IL-10, citocinas antiinflamatorias.<sup>10, 11,12.</sup>

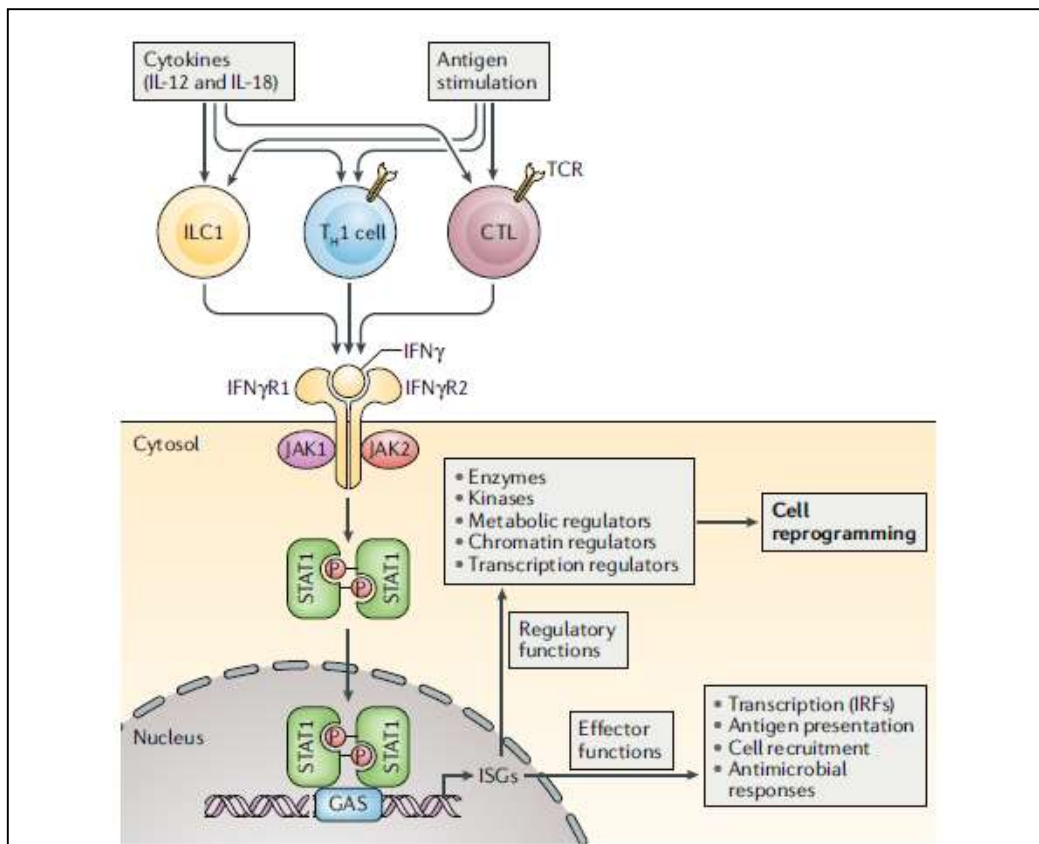
Por otro lado, los linfocitos T CD8 reconocen y responden a péptidos presentados por moléculas del MHC-I. Los linfocitos CD8 activados expresan una vasta cantidad de moléculas de secreción y llevan a cabo acciones antimicrobianas, en particular la lisis de células infectadas. Los linfocitos CD8 son importantes en la defensa contra patógenos intracelulares como virus, bacterias y protozoos. Para alcanzar la máxima expansión, los linfocitos T CD8 necesitan integrar múltiples señales, incluyendo la que se genera a través del TCR, señales coestimuladoras y citocinas inflamatorias como la IL-12 y los interferones (IFNs). Múltiples miembros de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR) emiten señales coestimuladoras y de supervivencia para los linfocitos CD8. Además, se ha demostrado que moléculas adaptadoras de la señalización por TLRs como Myd88 tienen un papel intrínseco en la expansión y viabilidad, así como en la formación de memoria en linfocitos CD8 citotóxicos (**Figura 2**).<sup>12, 13,14.</sup>

### **2.3 IFN- $\gamma$ y linfocitos CD8**

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es una citocina crucial en la inmunidad contra patógenos intracelulares y cáncer. Es producido por una amplia variedad de células del sistema inmunológico, incluyendo células innatas como las NK y células de la inmunidad adaptativa como las Th1 y linfocitos CD8 citotóxicos (CTLs). En células del sistema inmune innato, la producción de IFN- $\gamma$  puede inducirse por citocinas (ej. IL-12 e IL-18) o por la activación de

PRRs. Por otro lado, en células T, la capacidad de producir IFN- $\gamma$  se adquiere durante la diferenciación a subtipos efectoros (i.e. Th1 en células T CD4), cuando éstas son activadas a través del TCR en presencia de coestimulación y ciertas citocinas <sup>15, 16</sup>.

El IFN- $\gamma$  ejerce efectos pleiotrópicos. En células dendríticas promueve la expresión del MHC-I y de proteínas involucradas en esta vía de presentación antigénica. Además, se ha reportado que la producción de IFN- $\gamma$  puede tener efectos sobre la modificación proteosoma y sus subunidades, generando el inmunoproteosoma (**Figura 3**)<sup>17, 18</sup>.



**Figura 3. Producción y señalización de IFN- $\gamma$ .** Múltiples células del sistema inmunológico secretan IFN- $\gamma$  al activarse como linfocitos Th1 y linfocitos T citotóxicos. La unión de IFN- $\gamma$  con su receptor induce la señalización por JAK-STAT, donde STAT1 es el factor activador de las funciones de interferón incrementando las funciones reguladoras y efectoras de la incrementando las funciones reguladoras y efectoras de la citocina (Lionel B. Ivashkiv 2018).



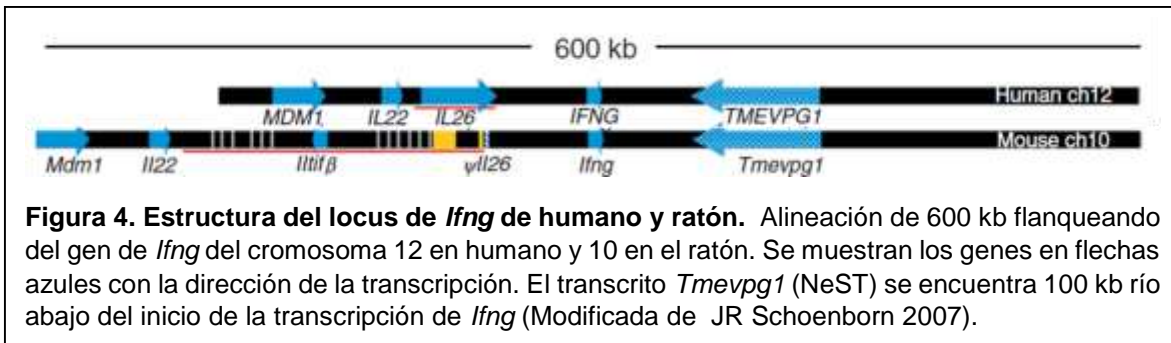
La diferenciación de los linfocitos CD8 les permite adquirir capacidad citolítica y producir citocinas (ej. IFN- $\gamma$  y TNF). Ambas capacidades son relevantes para la eliminación de patógenos. El IFN- $\gamma$  promueve la diferenciación de células CD4 a Th1 y la proliferación y supervivencia de linfocitos CD8. Además, facilita la expresión de factores de transcripción como T-bet y Eomes que contribuyen a la expresión de genes de función esencial <sup>19, 20</sup>.

### **2.3.1 LncRNA NeST**

Numerosos estudios en los últimos años han identificado la transcripción de secuencias largas (>500 bases) de RNA que no codifican para proteínas. Se ha postulado que estas secuencias, llamadas lncRNA (RNA largos no codificantes), representan elementos reguladores esenciales en procesos fisiológicos y que alteraciones en su expresión podrían causar enfermedades o contribuir a su desarrollo <sup>21</sup>.

La remodelación de la cromatina contribuye a la identidad y funciones celulares a través de modificar la accesibilidad de regiones discretas de DNA a los efectos de factores de transcripción. Estas remodelaciones dependen del reclutamiento local de complejos que remodelan la cromatina, es decir, que hacen modificaciones post-traduccionales (ej. acetilación, metilación) en las histonas. Una de las funciones demostradas para los lncRNA es facilitar el reclutamiento local de la maquinaria molecular que realiza la remodelación de la cromatina <sup>22</sup>.

El lncRNA NeST, también conocido como *Tmvepg1* o *Ifng-as1*, controla la transcripción de *Ifng* en diferentes subtipos linfoides. A pesar que no se ha dilucidado por completo su mecanismo de acción, se ha propuesto que NeST actúa en *cis* sobre la secuencia de *Ifng*, reclutando complejos que promueven la transcripción de *Ifng* a través de modificar el paisaje epigenético local.

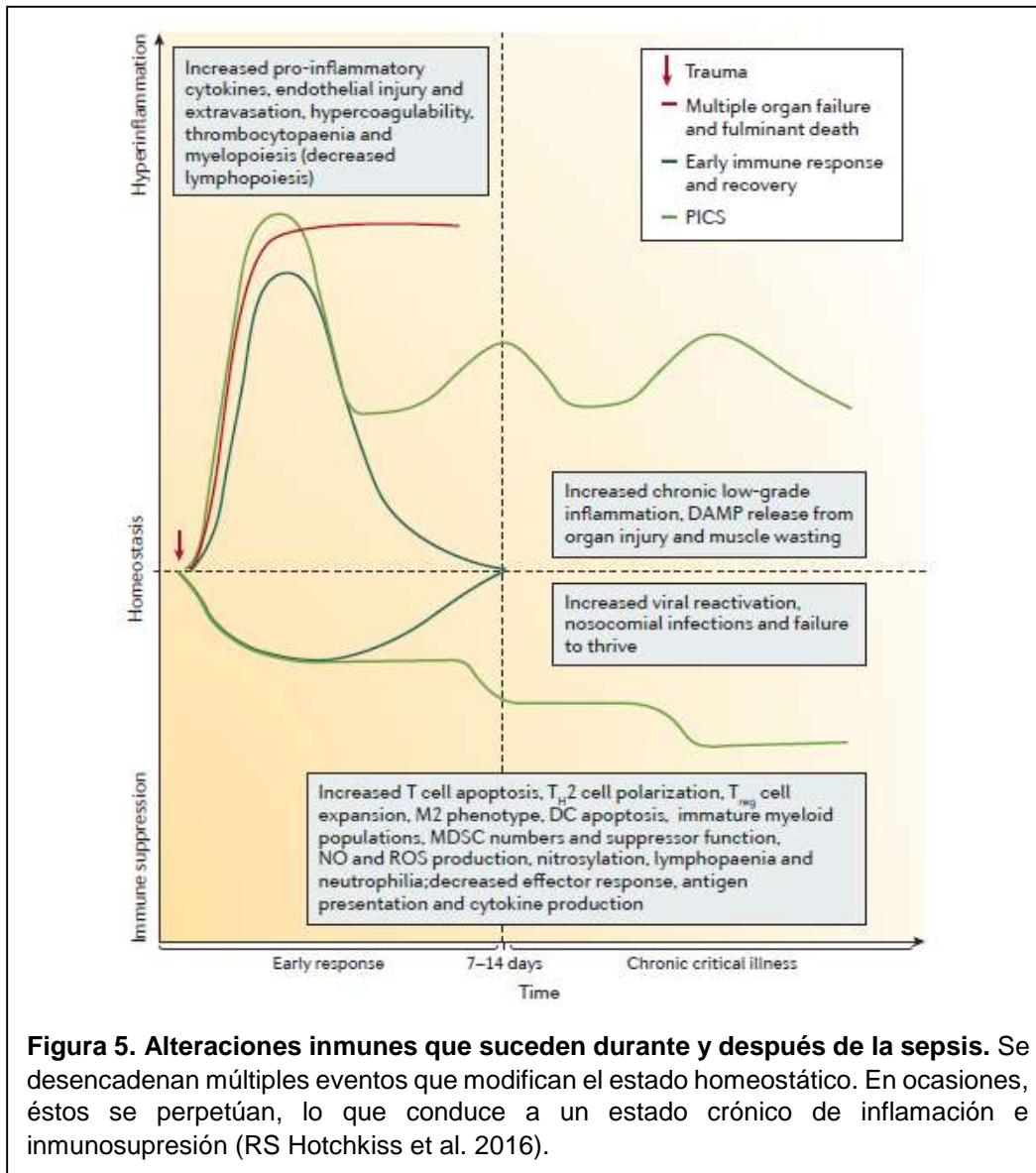


**Figura 4. Estructura del locus de *Ifng* de humano y ratón.** Alineación de 600 kb flanqueando del gen de *Ifng* del cromosoma 12 en humano y 10 en el ratón. Se muestran los genes en flechas azules con la dirección de la transcripción. El transcrito *Tmevpg1* (NeST) se encuentra 100 kb río abajo del inicio de la transcripción de *Ifng* (Modificada de JR Schoenborn 2007).

Como se ilustra en la **Figura 4**, NeST está codificado en el locus de *Ifng* (en el cromosoma 10 del ratón y en el cromosoma 12 del humano). Su secuencia se localiza en la cadena de DNA opuesta a la que codifica *Ifng*. En el ratón, NeST contiene seis exones dispersos en una región de 45 kb. La variante más abundante conocida contiene 914 nucleótidos y se ha detectado en linfocitos CD4+, CD8+ y células NK <sup>23, 24, 25</sup>.

## 2.4 Sepsis

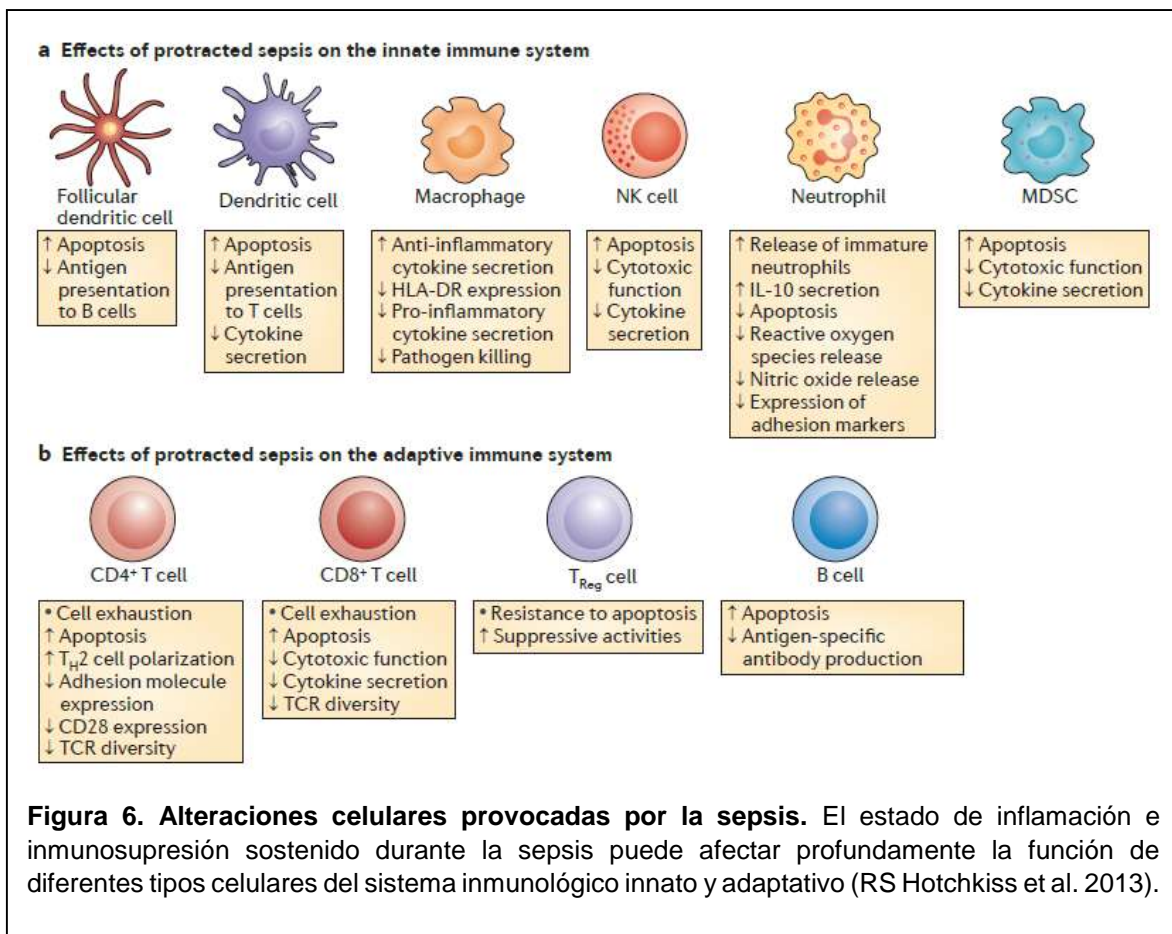
La sepsis es la presencia de disfunción de órganos vitales, provocada por una respuesta inmune descontrolada, dirigida en contra de una infección que está lejos de los órganos afectados. Esta definición enfatiza la idea de una respuesta exagerada no-homeostática, claramente patológica. En los Estados Unidos se ha reportado que el 2% de los pacientes admitidos en un hospital tienen sepsis. De estos pacientes la mitad son atendidos en unidades de cuidados intensivos (UCI), lo que representa el 10% de todas las admisiones en las UCI <sup>26, 27</sup>.



A pesar que la inflamación descontrolada se considera la principal alteración fisiopatológica en sepsis, se ha documentado que, en forma simultánea, los pacientes con sepsis desarrollan inmunosupresión. Además, en pacientes que sobreviven eventos de sepsis, las alteraciones inmunes (inflamación e inmunosupresión) pueden persistir por periodos prolongados. A este fenómeno se le conoce como Síndrome de inflamación, inmunosupresión y catabolismo o *PICS*, por sus siglas en inglés. La inflamación asociada a *PICS* está caracterizada por un aumento en la proteína C reactiva (una proteína de fase

aguda), neutrofilia y liberación de células mieloides inmaduras. A diferencia de la respuesta inflamatoria inmediata producida por PAMPs y DAMPs, la etiología de la inflamación persistente en sepsis es desconocida. Sin embargo, se ha propuesto que la inflamación persistente en *PICS* es promovida por la presencia de DAMPs y alarminas (i.e. DNA mitocondrial, histonas, HMGBI) liberadas por tejidos dañados (**Figura 5**)<sup>27</sup>.

La inmunidad adaptativa se afecta en forma grave en pacientes con sepsis. Por ejemplo, disminuye el número de linfocitos (linfopenia), la producción de citocinas pro-inflamatorias y la presentación de antígenos. Las células mieloides circulantes demuestran un fenotipo alterado y función anti-microbiana defectuosa. Además, secretan citocinas antiinflamatorias (ej. IL-10 y TGF- $\beta$ ) que suprimen la respuesta de otras células inmunes. Por otro lado, las células presentadoras de antígenos (APCs) demuestran una pobre capacidad de presentar

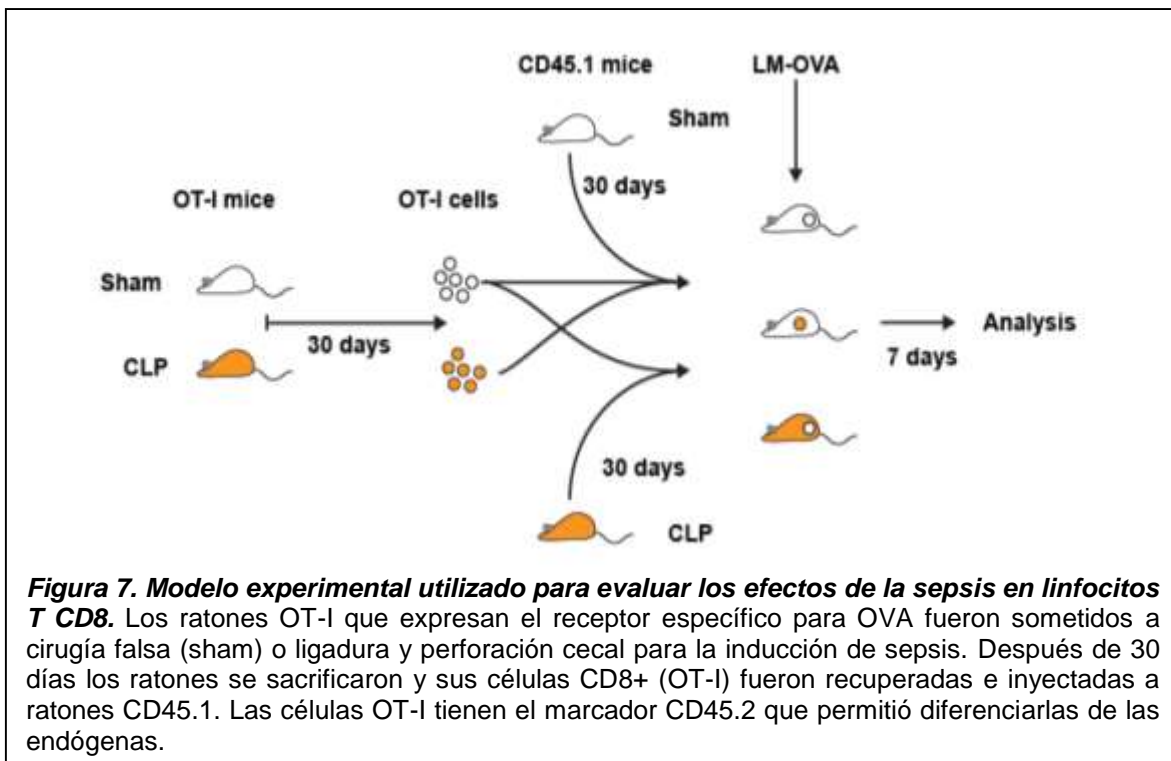


antígenos y una expresión anormalmente alta de moléculas inhibitorias como PD-L1. El aumento en la expresión de moléculas inhibitorias, la disminución en los niveles de MCH-II y la producción de citocinas antiinflamatorias favorece la conversión de los linfocitos T hacia fenotipos Th2 y reguladores (**Figura 6**)<sup>28,29</sup>.

Los cambios antes mencionados conllevan a un estado de inmunosupresión que se manifiesta por un incremento en la presencia de infecciones oportunistas y reactivaciones de virus latentes. Por ejemplo, ha sido posible identificar DNA viral en circulación en el 42% de estos pacientes<sup>29,30</sup>.

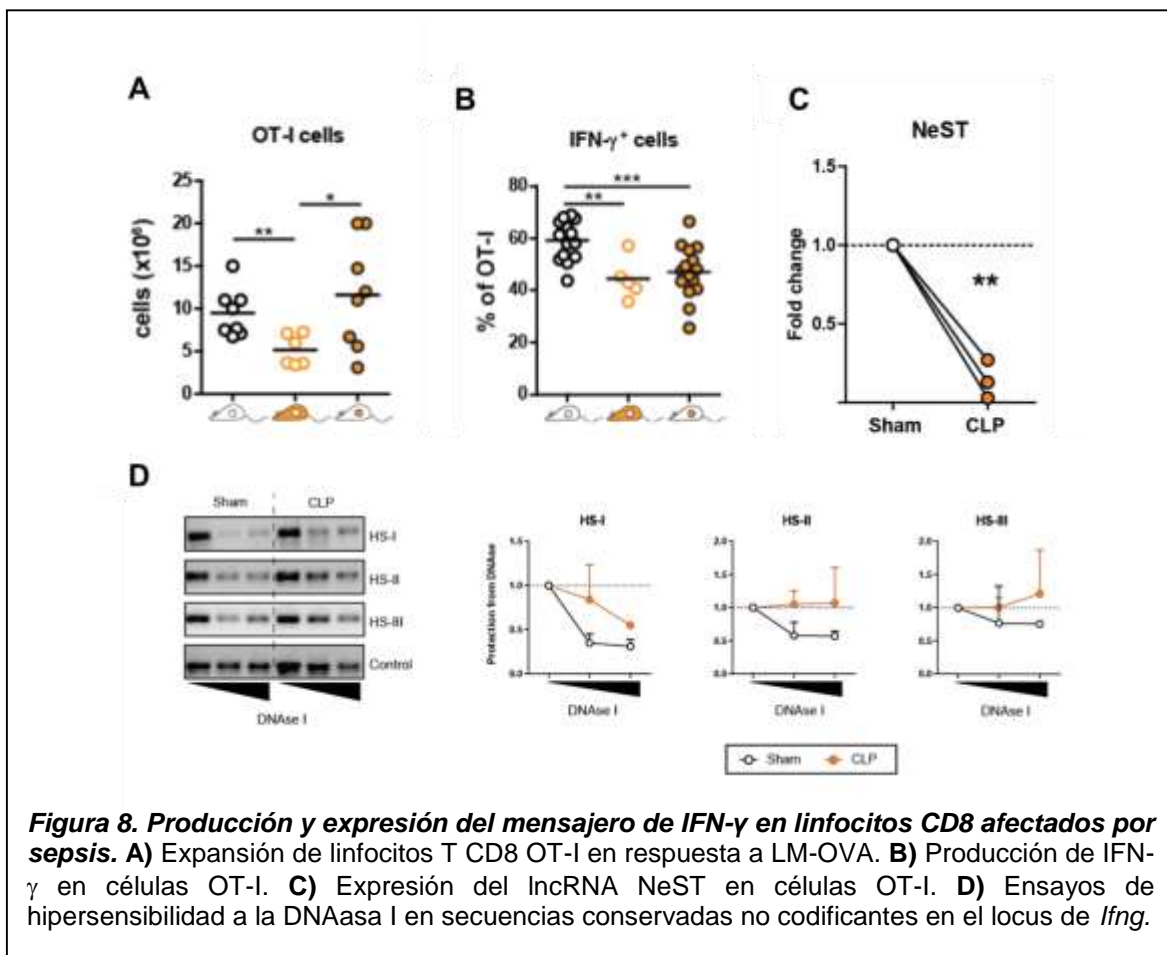
#### 2.4.1 Sepsis y los linfocitos CD8

En un trabajo previo del laboratorio del Dr. Crispín, se exploraron los efectos que la sepsis y la inflamación crónica subsecuente, tienen en células T CD8. Con este fin, se utilizó un modelo de sepsis conocido como cirugía de ligadura y perforación cecal (CLP). Se indujo



**Figura 7. Modelo experimental utilizado para evaluar los efectos de la sepsis en linfocitos T CD8.** Los ratones OT-I que expresan el receptor específico para OVA fueron sometidos a cirugía falsa (sham) o ligadura y perforación cecal para la inducción de sepsis. Después de 30 días los ratones se sacrificaron y sus células CD8+ (OT-I) fueron recuperadas e inyectadas a ratones CD45.1. Las células OT-I tienen el marcador CD45.2 que permitió diferenciarlas de las endógenas.

sepsis o se realizaron cirugías control –sham- (se anestesia al ratón y se expone la cavidad abdominal sin ligar ni perforar el colon) en ratones OT-I, que expresan un TCR específico para ovoalbúmina (OVA) y en ratones CD45.1 (normales a excepción de la expresión del alelo 1 de *Ptprc*, que codifica CD45)<sup>31, 32</sup>. Treinta días después de la cirugía, se aislaron las células CD8 (OT-I) y se transfirieron a ratones CD45.1 sometidos a ambos tipos de cirugía. De esa manera, se separó el efecto de la sepsis en las células T CD8 del efecto de la sepsis en el resto del ratón (y de su sistema inmune). Es decir, se obtuvieron las siguientes condiciones: (1) ratones control en donde ni el ratón receptor y ni las células habían sido expuestas a sepsis; (2) ratones en los que sólo las CD8 habían estado en un ambiente de sepsis; (3) ratones en donde el receptor había estado expuesto a sepsis, pero las CD8 no (Figura 7). Es importante mencionar que, dado que las células T CD8 eran específicas para



un antígeno no presente en el ratón ni en las bacterias, éstas no se activaron a través de su receptor de antígenos durante la sepsis. Finalmente, se evaluó la funcionalidad de las células CD8 al infectar a los ratones con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa OVA (LM-OVA)<sup>33, 34</sup>.

Este experimento reveló que la inflamación crónica afecta la función de las células CD8 a través de diferentes mecanismos. En primer lugar, la transferencia de células CD8 control a ratones que han sufrido sepsis, afecta su activación y expansión en respuesta a *Listeria*. Eso sugiere que alteraciones inducidas por sepsis, probablemente en células presentadoras de antígenos,<sup>34,35</sup> merman la activación de las células CD8, lo que se refleja en una menor proliferación (**Figure 8A**). La transferencia de células CD8 expuestas a sepsis a ratones control confirmó lo anterior, ya que la expansión clonal no se alteró cuando la sepsis sólo había afectado a las células CD8. En cambio, cuando analizamos la producción de IFN- $\gamma$ , encontramos que ésta era significativamente menor en células CD8 control activadas en un ambiente expuesto a sepsis y también en células CD8 expuestas a sepsis y activadas en un ambiente control (**Figura 8B**). La falla en la producción de IFN- $\gamma$  por las células control transferidas a ratones con sepsis podría ser secundaria a su activación deficiente. Sin embargo, también observamos una falla equivalente en magnitud en las células CD8 expuestas a sepsis, pero activadas en un animal control. Lo anterior sugiere un defecto intrínseco a la célula CD8, adquirido por su exposición a la inflamación asociada a sepsis. Es importante mencionar que al ser OT-I, las células CD8 no se activaban a través de su receptor de células T durante la sepsis, lo cual sugiere que mecanismos asociados a disfunción de células T CD8, en particular agotamiento, no estaban involucrados. Experimentos adicionales demostraron que la disminución en la capacidad de producir IFN- $\gamma$  se establecía a nivel transcripcional y coexistía con baja accesibilidad a la cromatina en

el locus de *Ifng* (**Figura 8 B, D**). Finalmente, demostramos que la falla en la producción de IFN- $\gamma$  se asociaba a un defecto en la transcripción del lncRNA NeST (**Figura 8C**)<sup>31, 36, 37</sup>.

En resumen, esta serie de experimentos demostró que la inflamación crónica asociada a sepsis induce efectos complejos en el sistema inmune<sup>38,39</sup>, uno de los cuales es un bloqueo en la transcripción de *Ifng* asociado a un defecto en la expresión de NeST en células T CD8.

En base a lo anterior, nos preguntamos si el defecto en la expresión de NeST representa la causa de la baja transcripción de *Ifng* en células T CD8 expuestas a sepsis y si la expresión forzada de este lncRNA podría restaurar la producción de IFN- $\gamma$  por células CD8<sup>31</sup>.



### **III. Hipótesis**

La expresión forzada de NeST restaurará, en células CD8 expuestas a sepsis, la producción de IFN- $\gamma$ .

## **IV. Objetivos**

### **General**

Desarrollar un sistema de expresión de NeST en células T CD8 de ratón y determinar si dicho sistema es capaz de restaurar la producción de IFN- $\gamma$  en células expuestas a sepsis.

### **Particulares**

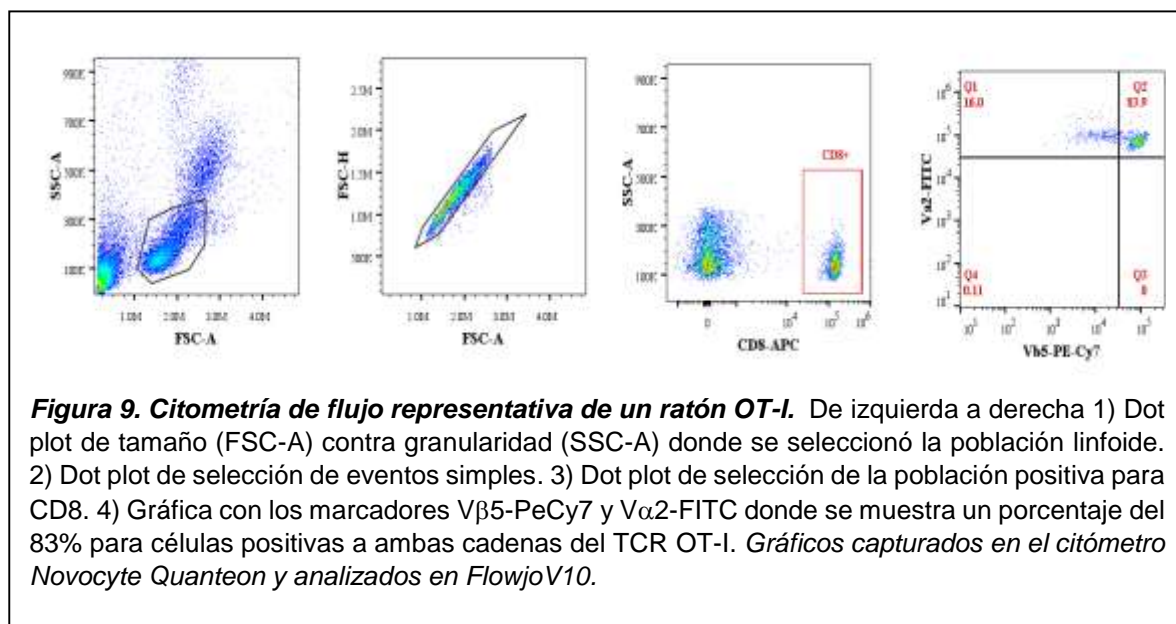
1. Clonar NeST a vectores de expresión retroviral
2. Evaluar la eficiencia de sistemas basados en lentivirus y en retrovirus para lograr la transducción de células T CD8 de ratón.
3. Analizar si la expresión forzada de NeST modifica la producción de IFN- $\gamma$  en células T CD8.
4. Determinar si la expresión forzada de NeST restaura la producción de IFN- $\gamma$  en células T CD8 expuestas a sepsis.

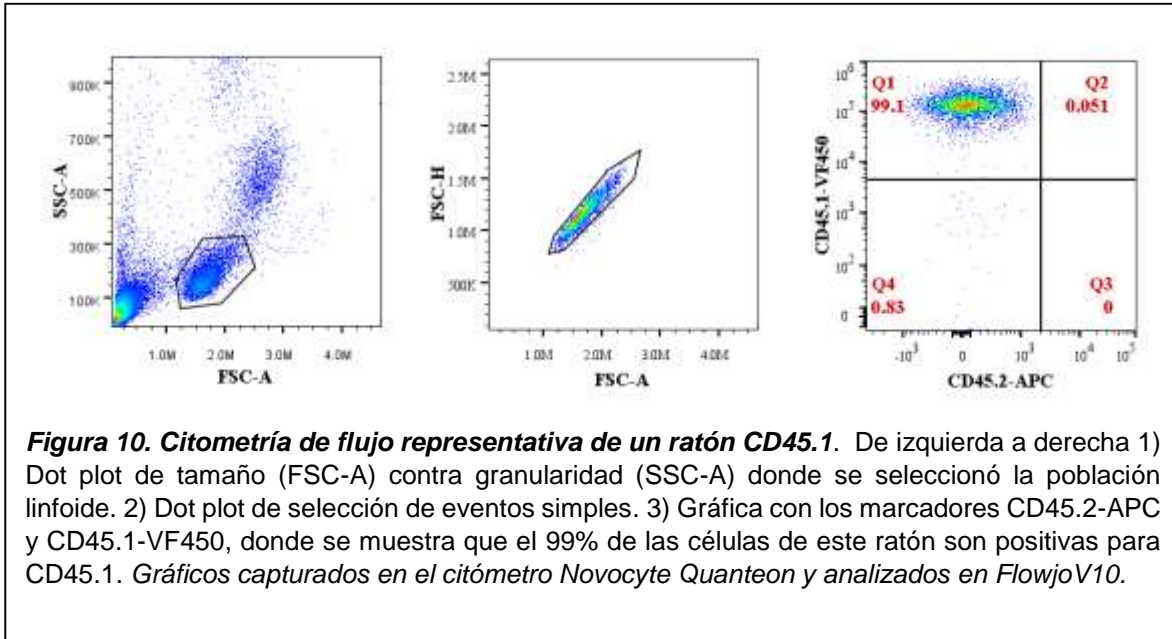
## V. Materiales y Métodos

### 5.1 Ratones

A partir de ratones CD45.1 (*B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyJ*), que expresan el alelo 1 de CD45 y de ratones OT-I (*C57BL/6-Tg (Tcr $\alpha$ Tcr $\beta$ ) 1100Mjb/J*) que expresan un receptor de células T específico para ovoalbúmina (OVA), generamos ratones CD45.1 OT-I. Comprobamos la presencia homocigota del alelo 1 de CD45 y la presencia del receptor OT-I por medio de citometría de flujo (**Figuras 9 ,10**), utilizando los marcadores enlistados en la **Tabla 1**.

Los animales utilizados se mantuvieron en condiciones estándar (21°C; ciclos de luz/oscuridad de 12 h; acceso libre a comida y agua), en un bioterio de barrera, libres de patógenos específicos, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Este proyecto y todos los procedimientos que incluye fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del INCMNSZ (IRE-1933). Todos los ratones que se usaron tenían entre 7 y 12 semanas de edad. Los animales fueron revisados todos los días para asegurar su bienestar, de acuerdo con lo establecido por el CICUAL del INCMNSZ.





**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para fenotipar a los ratones.**

Ratones CD45.1 OT-I

Marcadores	Fluorocromos
CD45.1	VF-450
CD45.2	APC
TCR-V $\alpha$ 2	FITC
TCR-V $\beta$ 5	PE-Cy7
CD8	APC

## 5.2 Construcción de vectores virales

### Vector lentiviral

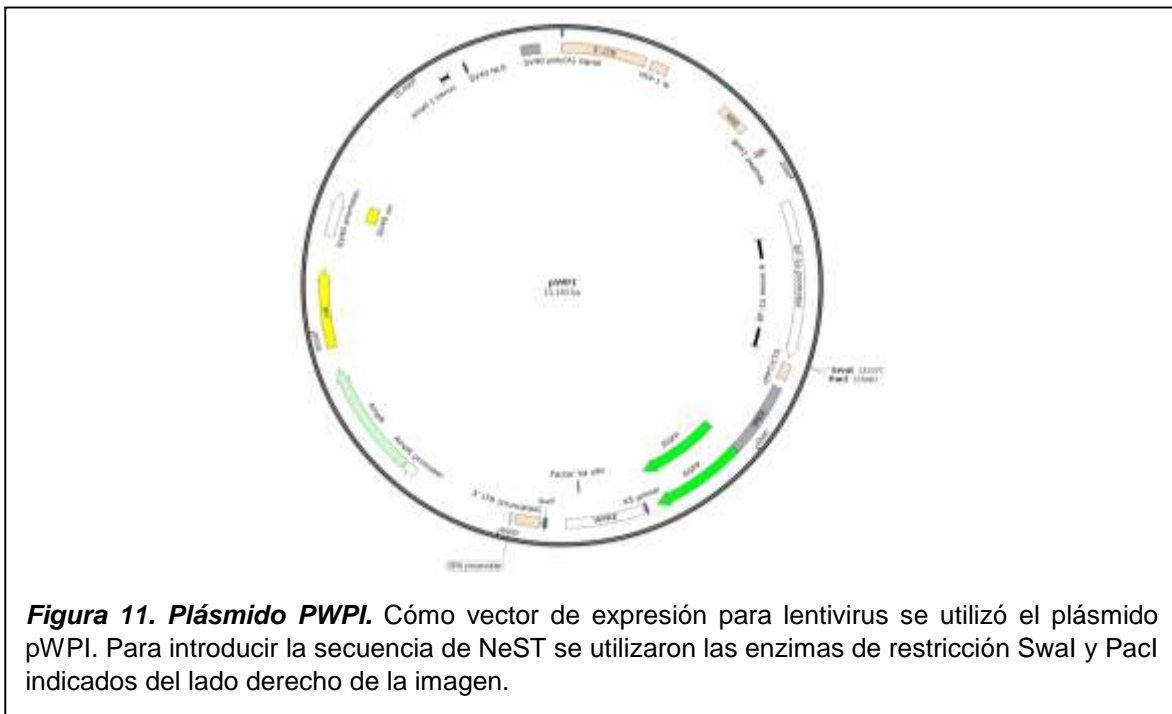
Obtuvimos un plásmido que expresa NeST del laboratorio de la Dra. Karla Kirkegaard, Stanford University (Kikegaard et al. 2013<sup>23</sup>). Diseñamos oligonucleótidos (Tabla 2) para amplificarlo en su totalidad e introducir los sitios de restricción para Swal y Pacl.

Usamos el vector de expresión pWPI, (donado por Didier Trono a través de Addgene # 12254). Usamos las enzimas de restricción Pacl y Swal para linearizar el plásmido y para integrar el inserto de NeST. Defosforilamos los extremos del plásmido por acción de la fosfatasa alcalina y lo corrimos en un gel de agarosa (1%) para verificar el corte del vector. En un transiluminador de luz UV cortamos la banda correspondiente al vector linearizado y purificamos el DNA con el sistema *Zymoclean/ Gel DNA Recovery Kit de Zymo Research*. Posteriormente, introdujimos el lncRNA al vector mediante una reacción de ligación con la ligasa del bacteriófago T4 (16°C toda la noche) (**Figura 11**).

**Tabla 2. Oligonucleótidos usados en PCR**

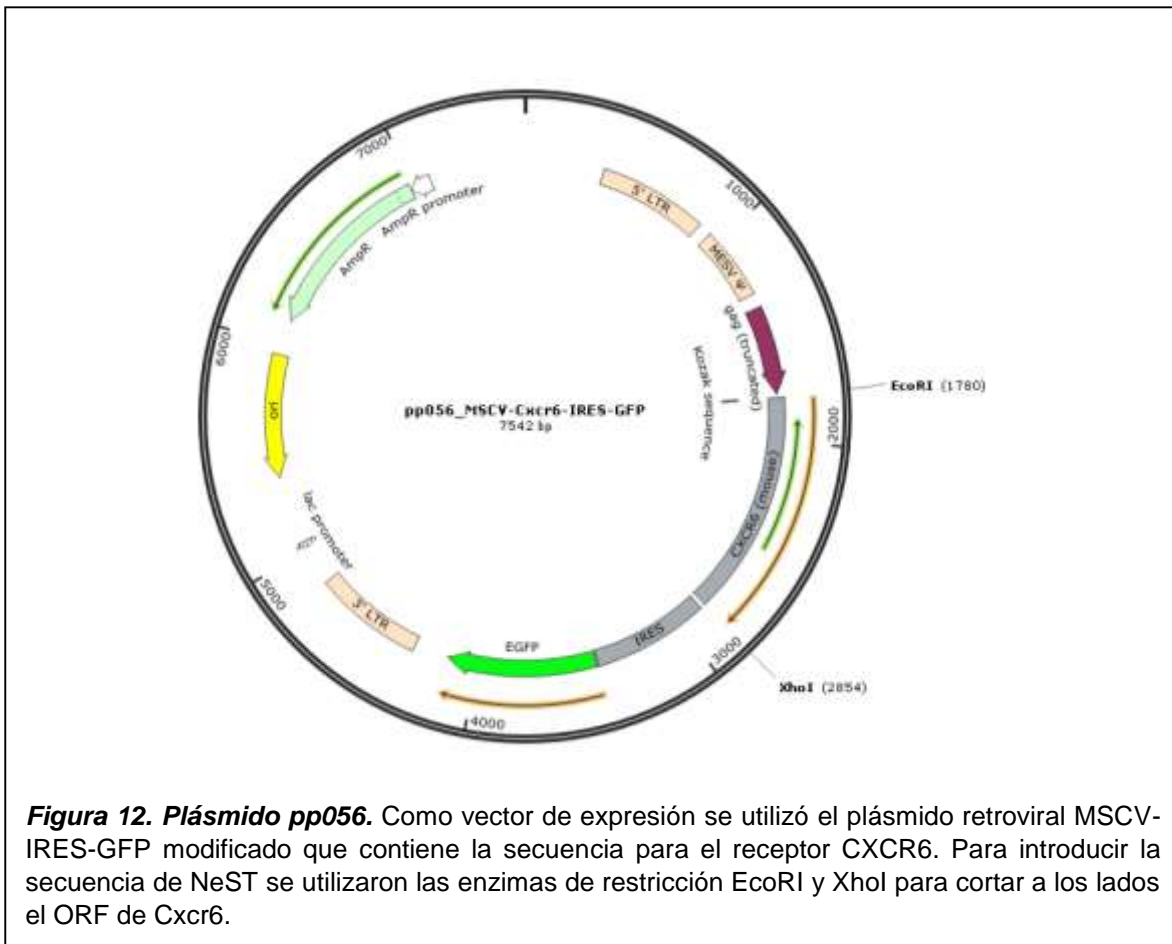
*Oligonucleótidos*

<i>Forward</i>	GCGCGATTTAAATACCAACCAAAAAGTATAGTCATCCG
<i>Reverse</i>	CGCGCGTTAATTAAGTCTTAAAATTCAATTTATTATAAAG



## Vector retroviral

Como vector de expresión, utilizamos el plásmido retroviral MSCV-IRES-GFP donado por Tannishtha Reya (Addgene plasmid # 20672; <http://n2t.net/addgene:20672>; RRID: Addgene\_20672) modificado para expresar el receptor CXCR6 (pp056, donado por Youjin Lee, Marson Lab, UCSF <sup>41</sup>). Usamos las enzimas de restricción EcoRI y XhoI para cortar el plásmido a los lados del ORF de *Cxcr6*. Utilizamos fosfatasa alcalina para desfosforilarlo y lo corrimos en un gel de agarosa (1%) para separar el vector vacío del inserto de *Cxcr6*. En un transiluminador de luz UV cortamos la banda correspondiente a MSCV-IRES-GFP (6.5 kb) y purificamos el DNA con el sistema *Zymoclean/ Gel DNA Recovery Kit* de *Zymo Research*.



**Figura 12. Plásmido pp056.** Como vector de expresión se utilizó el plásmido retroviral MSCV-IRES-GFP modificado que contiene la secuencia para el receptor CXCR6. Para introducir la secuencia de NeST se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI y XhoI para cortar a los lados el ORF de *Cxcr6*.

Diseñamos oligonucleótidos (**Tabla 3**) para amplificar NeST y para introducir sitios de restricción para EcoRI y XhoI y lo clonamos al plásmido pTZ57R/T. Comprobamos, mediante secuenciación Sanger que el lncRNA estuviera presente en su totalidad y sin mutaciones. Usamos una estrategia análoga a la descrita anteriormente para obtener el ORF de NeST, flanqueado por los sitios de restricción compatibles con el plásmido MSCV-IRES-GFP. Finalmente, introdujimos el lncRNA al vector mediante una reacción de ligación con la ligasa del bacteriófago T4 (16°C toda la noche) (**Figura 12**).

**Tabla 3. Oligonucleótidos usados en PCR**

<i>Oligonucleótidos</i>	
<i>Forward</i>	TCCGAATTCATACCAACCAAAAAGTATAGTCATCCG
<i>Reverse</i>	GGGCTCGAGGTCTTAAAATTCAATTTATTATAAAG

### **5.3 Transformación en bacterias**

Transformamos bacterias Stabl3 (*Mehmet et al. 2017*) con la reacción de ligación previamente descrita. Para esto, usamos alícuotas previamente preparadas de bacterias competentes (Stabl3; 50 uL). Se colocaron en hielo hasta quedar parcialmente descongeladas, para después agregarles 3 uL del producto de ligación. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 min y se sometieron a un choque térmico (42°C, 45 segundos). A continuación, se incubaron 2 min en hielo para luego agregarles 250 uL de medio SOC y colocarlas en la incubadora a 37°C, 250 rpm (1 hr). Al término de la incubación se sembraron las bacterias en cajas de Petri con Agar LB, en presencia de Ampicilina (100 ug/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se eligieron colonias de bacterias para crecerlas en medio LB líquido (con ampicilina) a 37°C, 250 rpm, durante 15 horas. Se aisló el DNA plasmídico con el kit Zyppy

Plasmid Miniprep (Wittkop et al. 2020) y se comprobó la presencia del inserto mediante restricción.

#### **5.4 Producción de virus**

Para la producción de las partículas virales se utilizó el siguiente protocolo:

Se empezó sembrando  $6 \times 10^6$  células HEK293T en DMEM completo (10% SFB, Abs) en una caja petri de 60 mm, que se colocó en la incubadora a 37°C. Al siguiente día se revisó la confluencia de las células en el microscopio y se verificó que fuera de un 80% para continuar con el protocolo. Se substituyó el DMEM por OptiMEM y se incubó 37°C. Se preparó el mix de transfección de las células de la siguiente manera:

Ejemplo para transfección con lipofectamina 2000 en células HEK293T en una caja petri de 60 mm.

<b>Mix de Lipofectamina</b>	<b>Volumen</b>
<b>OptiMEM</b>	<b>100 ul</b>
<b>Lipofectamina 2000</b>	<b>8 ul</b>

<b>Mix DNA</b>	<b>Volumen</b>
<b>OptiMEM</b>	<b>100 ul</b>
<b>Vector DNA</b>	<b>1.5 ug</b>
<b>Vector Empaquetamiento</b>	<b>1ug</b>



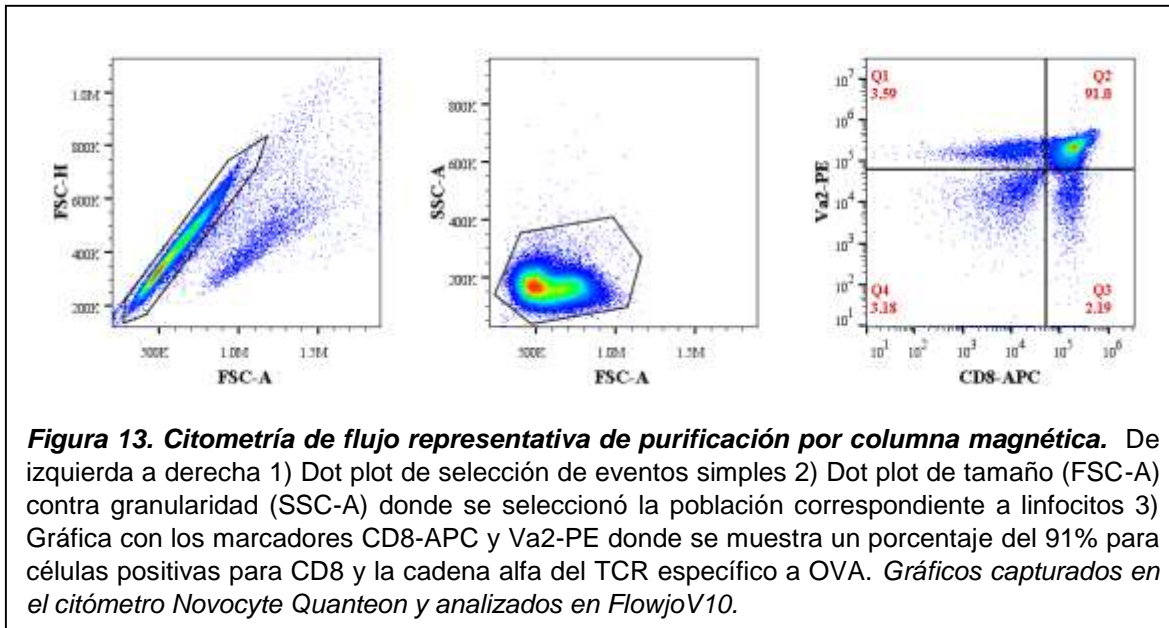
Se mezclaron los 100 ul de la mezcla de lipofectamina con los 100 ul de Mix DNA y se incubó a temperatura ambiente por 10-30 minutos. Después se adicionaron los 200 ul a cada pozo gota a gota tratando de abarcar toda el área del pozo y se incubó a 37°C toda la noche.

El siguiente día se retiró el OptiMEM y se reemplazó por DMEM completo, que fue incubado toda la noche a 37°C. La mañana siguiente se colectó el medio que contenía el retrovirus con cuidado de no llevar las células, posteriormente se adicionó DMEM completo y se regresó la placa a la incubadora a 37°C toda la noche. El medio con el retrovirus se guardó a 4°C.

Al día siguiente se colectó el medio con el virus con la alícuota del día previo, se centrifugó y colectó el sobrenadante. A continuación el tubo con virus se centrifugó a 3000 rpm durante 1hr a 4°C y posteriormente se retiró el sobrenadante con cuidado. Se hicieron alícuotas de 1ml y se guardaron a -80°C.

### ***5.5 Infección de linfocitos CD8 con virus***

Obtuvimos el bazo y ganglios linfáticos inguinales y axilares de un ratón OT-I CD45.1. Los órganos se pasaron a través de una malla de 20 µm para conseguir una suspensión celular y se lisaron los eritrocitos con ACK. Las células T CD8+ se aislaron con un sistema de purificación basado en perlas magnéticas (MidiMACS separation Kit/ Miltenyi Biotec) (**Figura 13**).



#### *In vitro*

Las células T CD8+ aisladas se activaron en una placa de 48 pozos recubierta con anticuerpos  $\alpha$ CD3/  $\alpha$ CD28 (2  $\mu$ g/mL). Un día más tarde, se agregó a las células polibreno (4 $\mu$ g/ml) y las partículas retrovirales (virus que codificaba NeST y virus control). Para incrementar la eficiencia de la infección, se centrifugaron las células durante 2hrs a 2500 rpm.

Las células se dejaron en la incubadora durante 48 hrs para después reemplazar el medio de cultivo triplicando el volumen original y agregándole IL-2 100 U/mL. Cada 48 se agregó medio e IL-2 fresca para permitir a las células seguir proliferando.

#### *In vivo*

Para la infección con retrovirus in vivo utilizamos el protocolo publicado por *John Wherry et al. 2017*<sup>42</sup>. Se aislaron las células con el sistema de purificación basado en perlas magnéticas (MidiMACS separation Kit/ Miltenyi Biotec). Posteriormente se colocaron en activación durante 16 hrs con anticuerpos  $\alpha$ CD3 (1  $\mu$ g/ml) /  $\alpha$ CD28 (0.5  $\mu$ g/mL) soluble en

conjunto con IL-2 100 U/ml. Al día siguiente se purificaron las células activadas por Percoll en centrifugación por 20 min a 800 g's. Las células recuperadas se colocaron en una placa de 24 pozos sin tratar y se infectaron con una alícuota de 1ml de virus en centrifugación a 2000 rpm's durante 90 min, sin freno. Al finalizar la placa se mantuvo en incubación durante 3 hrs a 37°C antes de resuspender en PBS, contar e inyectar las células a los ratones correspondientes.

### **5.6 Citometría de flujo**

Para la tinción de antígenos superficiales se empleó una dilución 1:100 de los anticuerpos en PBS con 2% de suero bovino fetal (SFB). Se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, posteriormente se realizaron lavados con PBS +SFB y finalmente se resuspendieron en un volumen de 300 ul para su análisis. Para la tinción intracelular de interferón gamma se utilizó el kit: Fixation/Permeabilization Kit BD Biosciences siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

Se empleó el citómetro Novocyte Quanteon (Agilent) para la adquisición de la muestras y se analizaron en el software NovoExpress y Flowjo V10.

### **5.7 Extracción de RNA**

El RNA utilizado para los experimentos en tiempo real se extrajo y purificó con TRIzol (Thermofisher). La transcripción inversa se realizó con 1ug de RNA utilizando SCRIPT reverse transcriptase, usando oligo-dT para la amplificación a cDNA.

## 5.8 Medición de IFN- $\gamma$ y NeST por qPCR

Los análisis de PCR en tiempo real se hicieron utilizando SYBR Green de Thermofisher con primers específicos (**Tabla 4**). Para determinar la expresión de los transcritos se utilizó el  $\Delta C_t$  como medida de expresión, para calcularlo se ocupó como gen de referencia el de actina (*Actb*).

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para qPCR**

	Forward	Reverse
<i>Ifng</i>	GAGGTCAACAACCCACAGGT	GGGACAATCTCTTCCCCACC
<i>Nest</i>	CTATTTGGTCGAGTCTGACAGAG	CTATTTGGTCGAGTCTGACAGAG

## 5.9 Modelo de sepsis

Se utilizó un protocolo adaptado (Dejager, Pinheiro, Dejonckheere, & Libert, 2011; Rittirsch et al., 2009). Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 30mg /kg vía intraperitoneal. Se realizó una incisión de 1 cm en la línea abdominal, 5 mm por debajo del esternón. Se expuso el ciego y en su porción distal se realizó una ligación con seda de 4-0. Posteriormente se realizó una perforación en el polo del ciego con una aguja de calibre 22F y mediante presión discreta se extrajo un botón de materia fecal. Se cerró la cavidad abdominal por capas usando material quirúrgico no absorbible. Al concluir la cirugía, se administró 1ml de solución salina isotónica vía intraperitoneal y una dosis de inepem (25mg/kg) por vía subcutánea.

### **5.10 Ensayos in vivo**

En ratones OT-I CD45.1 se realizó la cirugía CLP (cecal ligation and puncture), que consiste en exponer el ciego, perforarlo obteniendo un botón de materia fecal y reintroducirlo en la cavidad abdominal. Este procedimiento tiene como consecuencia la inducción de sepsis producida por la microbiota intestinal del animal. Se les dio seguimiento a estos grupos durante 30 días donde se sacrificaron para obtener sus órganos linfoides secundarios y después se purificaron sus linfocitos CD8+ que fueron infectados con el retrovirus de NeST y el virus control. Posteriormente se transfirieron 200,000 linfocitos sometidos al protocolo de infección a ratones WT CD45.2 que fueron infectados con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa un péptido derivado de OVA. Se siguieron a estos animales durante 7 días que al finalizarlos se sacrificaron. Se recuperaron sus células CD8+ y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  por citometría de flujo y qPCR.

### **5.11 Análisis estadístico**

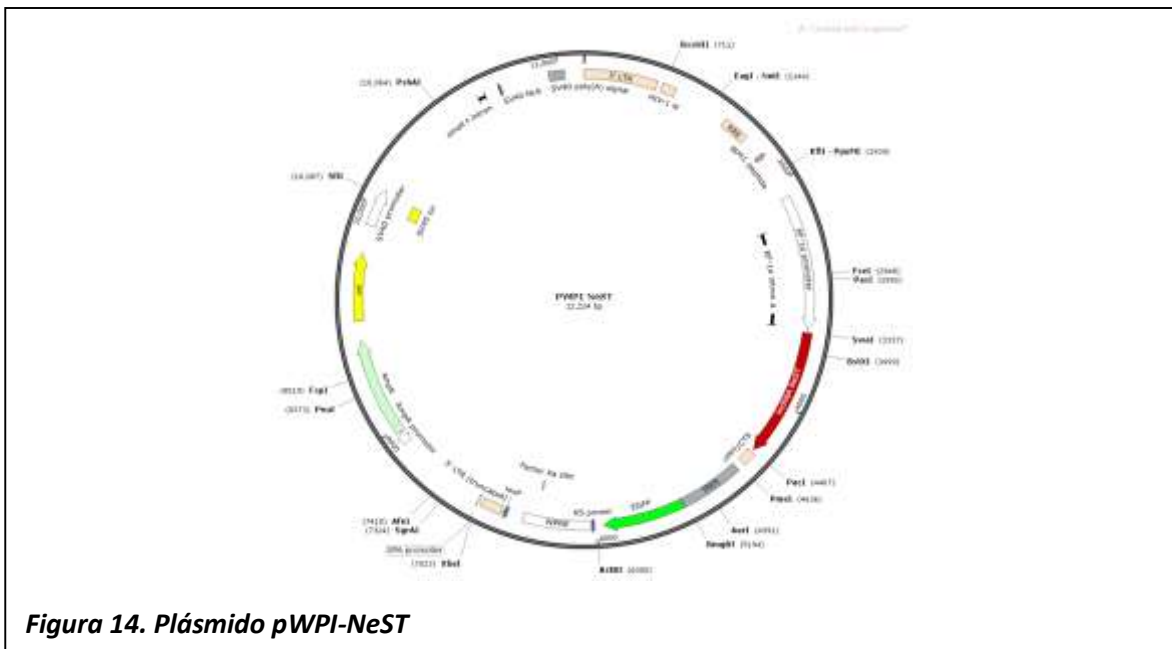
Las pruebas estadísticas fueron calculadas usando Microsoft Excel y para el análisis estadístico utilizamos el programa Graphpad Prism V.5 se consideró valores de P menores 0.05 como un valor estadísticamente significativo. Para los ensayos in vitro se utilizó t de Student de dos colas, en los experimentos de citometría de flujo y qPCR. En los ensayos in vivo con datos agrupados, se utilizó ANOVA con corrección de Bonferroni para los experimentos de citometría de flujo y qPCR. El número de experimentos está indicado en cada figura, y los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.

## VI. Resultados

### 6.1 Clonación de NeST a vectores virales

#### *Vector lentiviral*

Del plásmido obtenido del laboratorio de la Dra. Karla A. Kirkegaard, Stanford University (*Kirkegaard et al. 2013*<sup>23</sup>) amplificamos con una DNA polimerasa de alta fidelidad la secuencia del lncRNA NeST, integrando sitios de corte de SwaI y PacI. A continuación, digerimos el producto de PCR y el pWPI con las enzimas mencionadas. Purificamos el plásmido linearizado y el producto de PCR y los ligamos. La presencia del inserto en el vector se comprobó por ensayo de restricción (**Figura 14**).

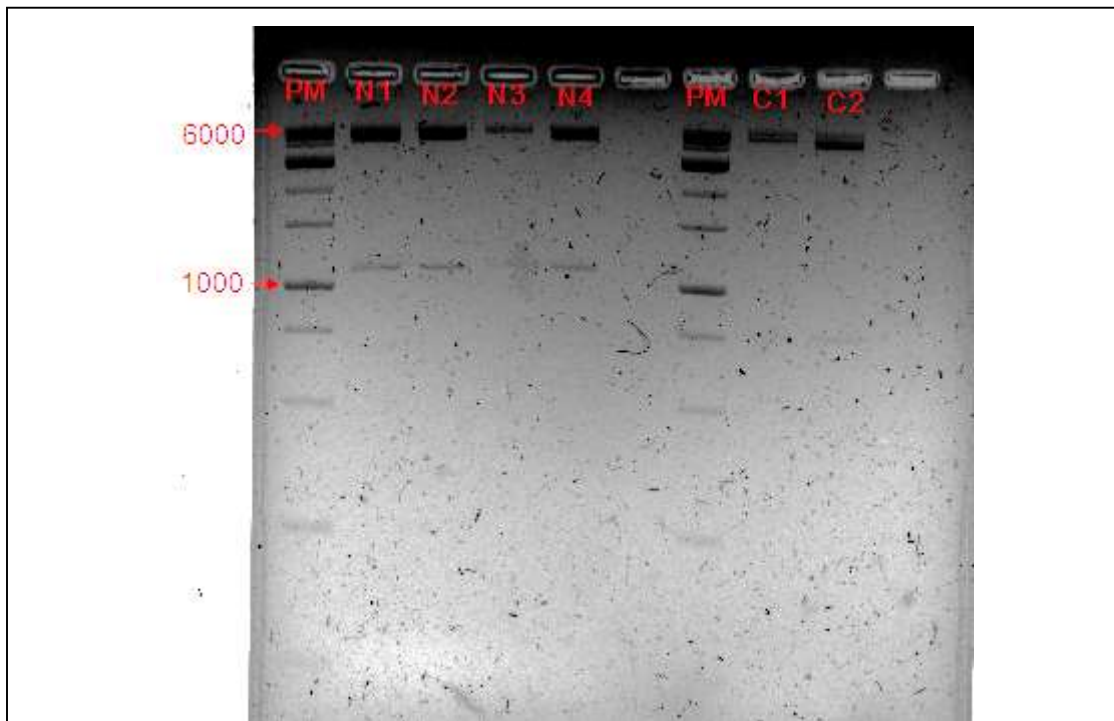


#### *Vector retroviral*

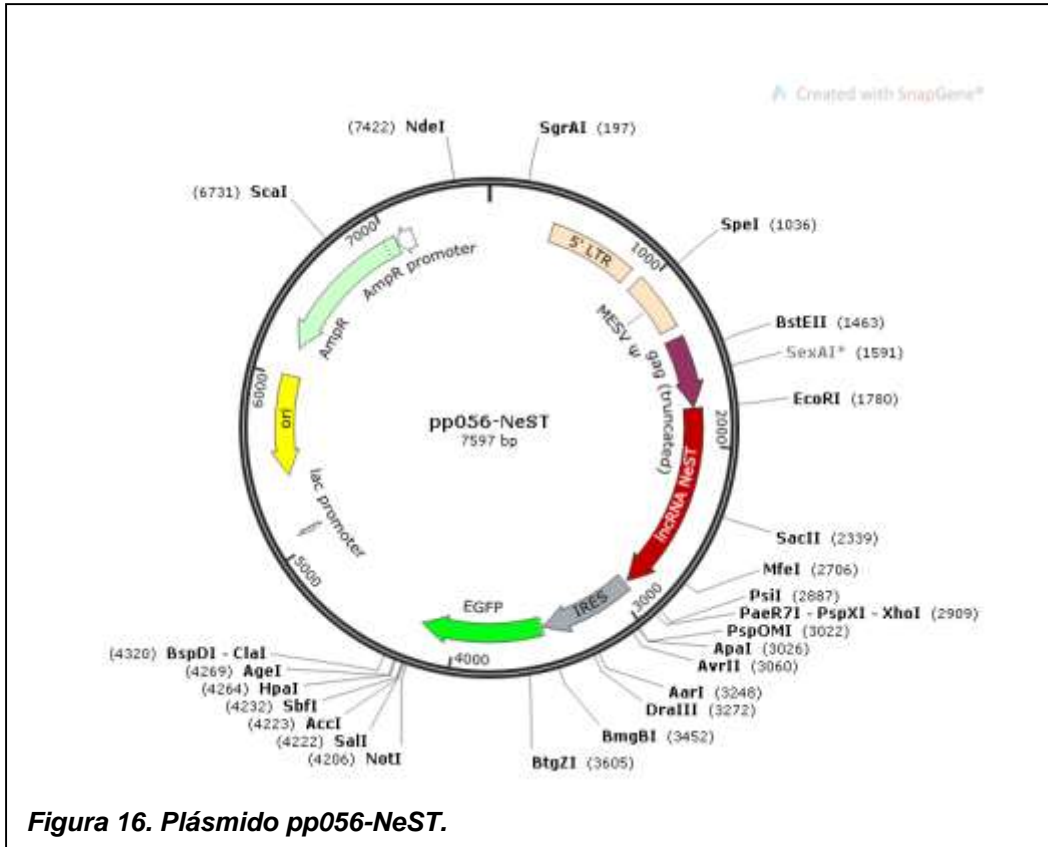
A partir del plásmido pWPI-NeST, amplificamos la secuencia de NeST con oligonucleótidos que integraban los sitios de restricción EcoRI y XhoI. Posteriormente el amplificado se colocó en una reacción de ligación con el plásmido pTZ57R/T. Utilizando las enzimas

previamente mencionadas se cortó el inserto de NeST y recuperó el fragmento correspondiente.

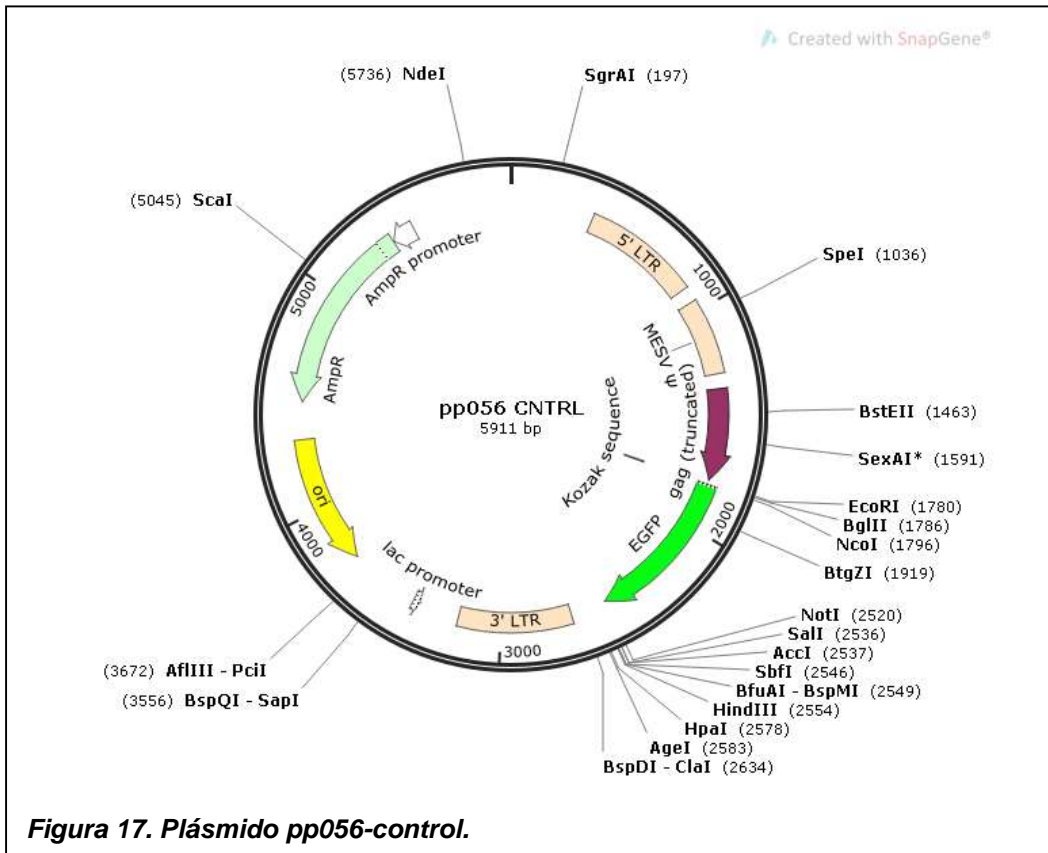
Para la construcción del vector retroviral se utilizó como templado el plásmido MSCV-IRES-GFP, que contenía la secuencia de *Cxcr6* (pp056, donado por Youjin Lee, Marson Lab, UCSF). Por medio de enzimas de restricción se retiró ese gen y se llevó a cabo una reacción de ligación con el inserto obtenido de pTZ57R/T-NeST. La presencia del inserto en el vector de expresión se comprobó por un ensayo de restricción (**Figura 15, 16**).



**Figura 15. Gel de agarosa con la construcción pp056-NeST y el plásmido control.** Se muestra el producto de la ligación entre el plásmido pp056 y el inserto de NeST, obtenido del plásmido pTZ57R/T por medio del corte de las enzimas EcoRI y XhoI. En el primer carril se cargó la escalera de peso molecular seguido de cuatro colonias que se transformaron con el producto de la ligación (N1, N2, N3, N4). Cada carril con pp056-NeST fue incubada con las enzimas de restricción SwaI y HindIII y se observaron las bandas esperadas correspondientes a la digestión enzimática (una banda de ~6000pb y otra de ~1000pb respectivamente). A continuación se cargó una escalera de pesos moleculares adicional y el plásmido pp056 cortado por la enzima NcoI para eliminar la secuencia del receptor CXCR6. En el segundo carril marcado como C2 se observaron los resultados esperados, indicados por la presencia de una banda de ~5,500 bp y una adicional indicada por ~500 bp. Para la producción de partículas retrovirales se utilizaron el producto de la ligación N4 "NesT 4" y el C2 "Control 2".



**Figura 16. Plásmido pp056-NeST.**



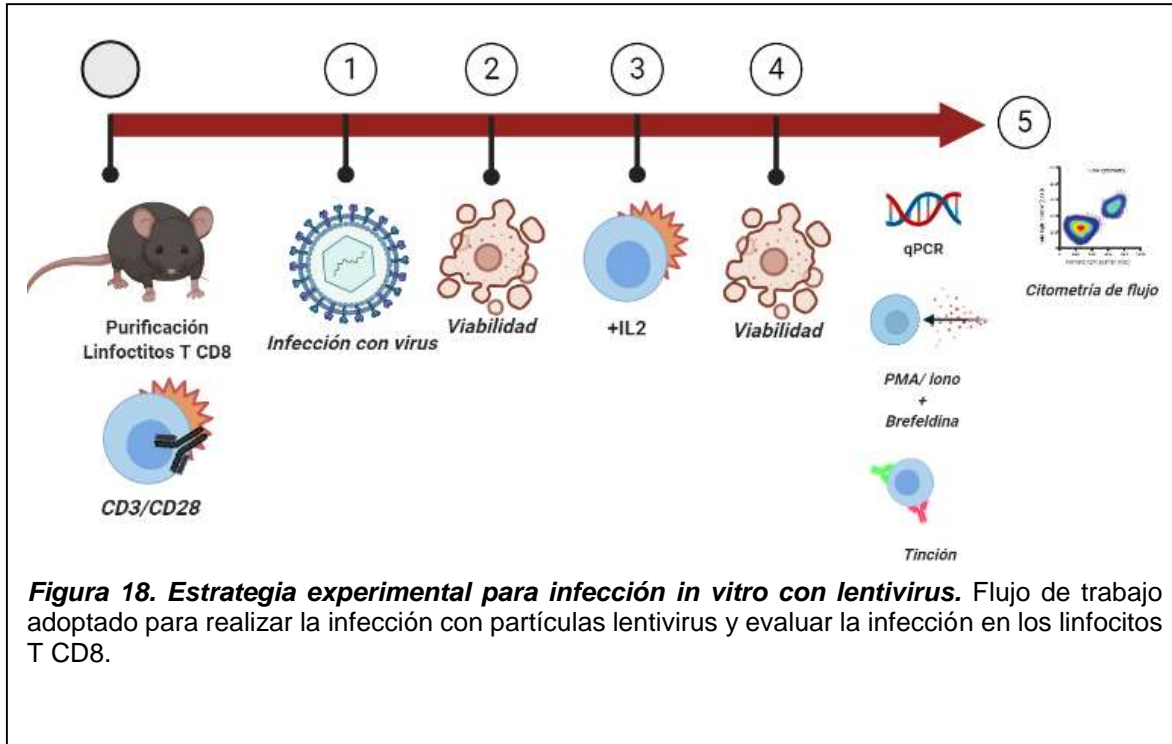
**Figura 17. Plásmido pp056-control.**



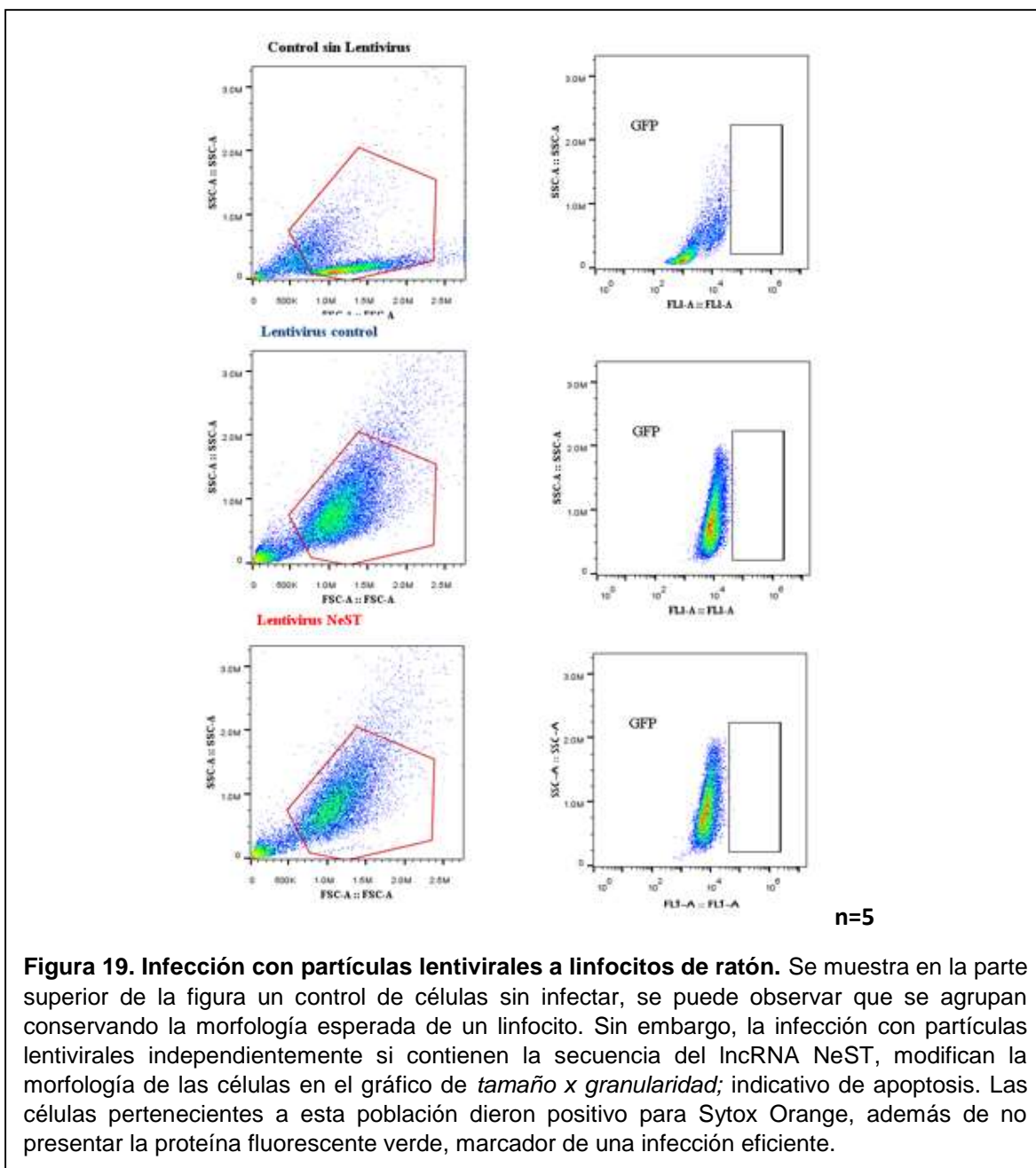
Adicionalmente, para generar un vector vacío como control, se utilizó la enzima NcoI para eliminar las secuencias de *Cxcr6* y del IRES. Después se colocó en una reacción de ligación toda la noche para volver a unir los extremos del plásmido. Con esto se conservó la secuencia de la proteína fluorescente verde (**Figura 17**).

## 6.2 Vectores virales e infección de linfocitos T CD8+ múridos

Para comparar los dos sistemas de transducción (lentivirus vs. retrovirus), purificamos células CD8 y las activamos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Al día siguiente, las infectamos con lentivirus o retrovirus (cada uno control y NeST) en presencia de polibreno (4 µg/ml). Las células se mantuvieron en cultivo durante 5 días. Durante este periodo se agregó medio de cultivo fresco e IL-2 (100 U/mL) cada 48 horas (**Figura 18**).



Para evaluar la eficiencia de la infección utilizamos como marcador la intensidad de la proteína fluorescente verde (GFP), integrada en la construcción pWPI-NeST y el control pWPI, por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Durante los días siguientes a la infección con los lentivirus se observó que la población con morfología linfoide desaparecía. Además, cuando analizamos la expresión de la proteína GFP, se observó que

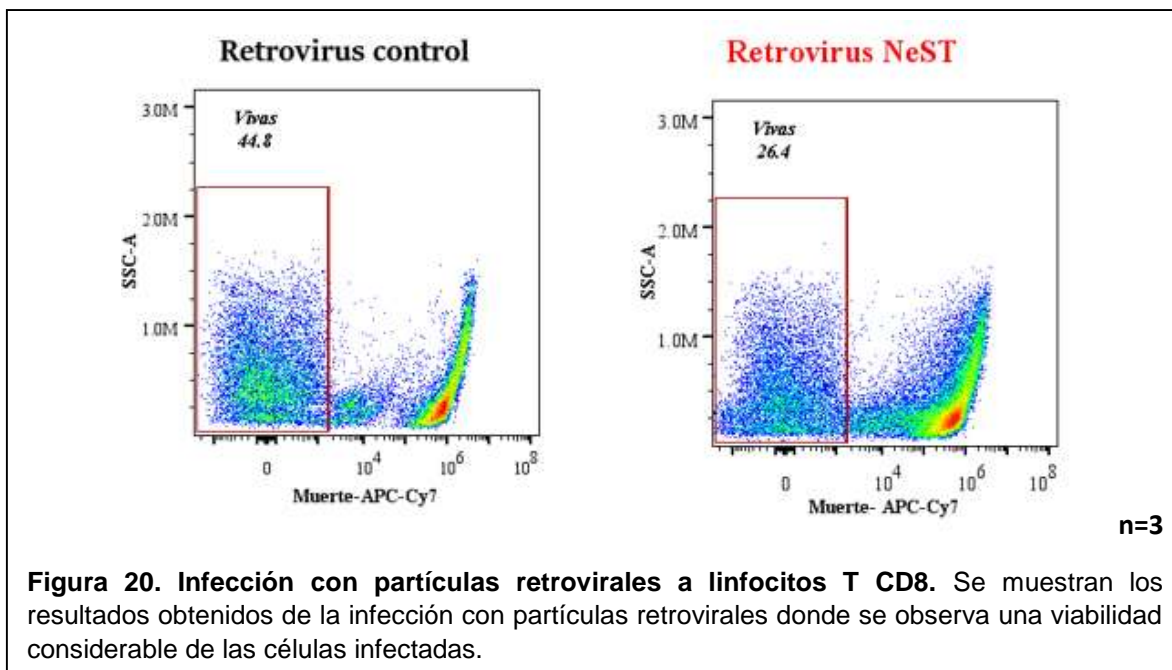


**Figura 19. Infección con partículas lentivirales a linfocitos de ratón.** Se muestra en la parte superior de la figura un control de células sin infectar, se puede observar que se agrupan conservando la morfología esperada de un linfocito. Sin embargo, la infección con partículas lentivirales independientemente si contienen la secuencia del lncRNA NeST, modifican la morfología de las células en el gráfico de *tamaño x granularidad*; indicativo de apoptosis. Las células pertenecientes a esta población dieron positivo para Sytox Orange, además de no presentar la proteína fluorescente verde, marcador de una infección eficiente.

no había células positivas para el marcador, ni en células infectadas con el lentivirus control, ni en las que recibieron NeST (**Figura 19**). Confirmamos la muerte de los linfocitos usando una tinción de viabilidad (Sytox Orange).

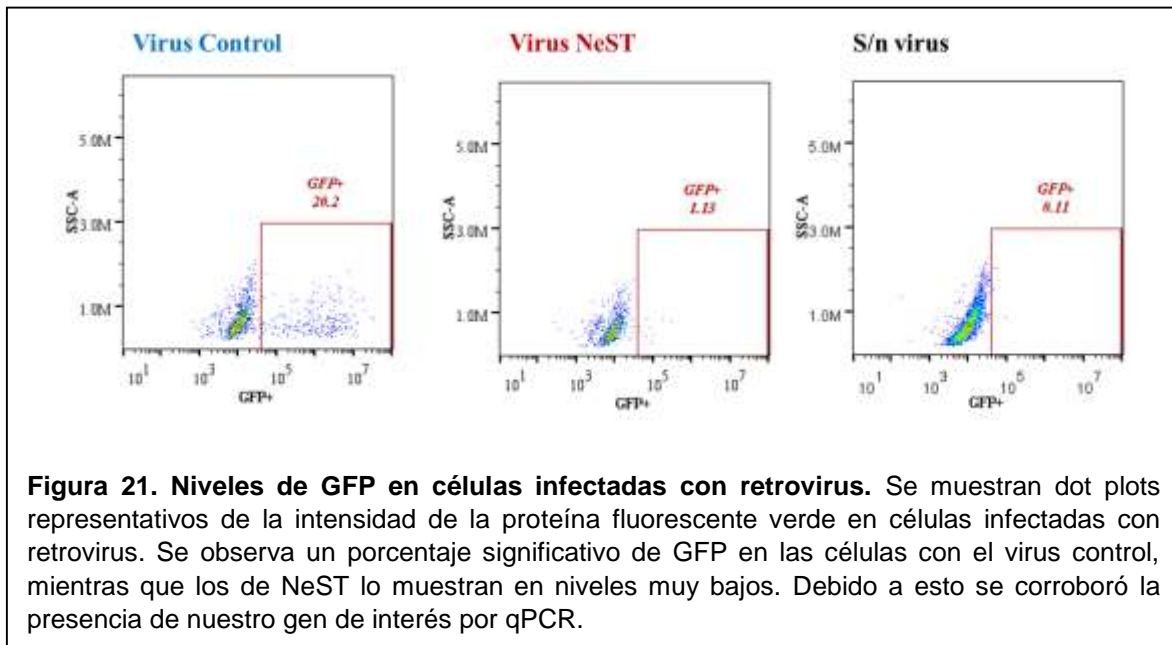
Hicimos cambios en el protocolo de infección con lentivirus, con el fin de mejorar la supervivencia de las células. Cambiamos la forma de concentrar los virus (polietilenglicol, columnas concentradoras, sin concentrar), sin embargo esto no mejoró la infección. Cambiamos la concentración de polibreno y polietilenglicol (tienen efectos citotóxicos conocidos), sin obtener resultados eficientes. También se probamos métodos para activar a las células y mejorar su supervivencia por citocinas como la IL-7. Sin embargo, ninguna de estas modificaciones tuvo efectos significativos en la tasa de infección o la viabilidad celular.

Cuando probamos la transducción con gamma-retrovirus, observamos una mejoría en la supervivencia de las células (**Figura 20**). Una proporción considerable de las células infectadas con el virus control expresaban la proteína GFP. Sin embargo, observamos muy poca expresión de dicha proteína en las células OT-I purificadas infectadas con el retrovirus



**Figura 20. Infección con partículas retrovirales a linfocitos T CD8.** Se muestran los resultados obtenidos de la infección con partículas retrovirales donde se observa una viabilidad considerable de las células infectadas.

que codificaba para NeST (**Figura 21**). En el laboratorio hemos notado este fenómeno con otros plásmidos. Cuando en plásmidos bicistronicos se coloca un gen entre el promotor y la secuencia que codifica para la proteína reportera, baja la expresión de esta última. Dado que la infección funcionaba de manera adecuada con el virus control, decidimos proseguir.

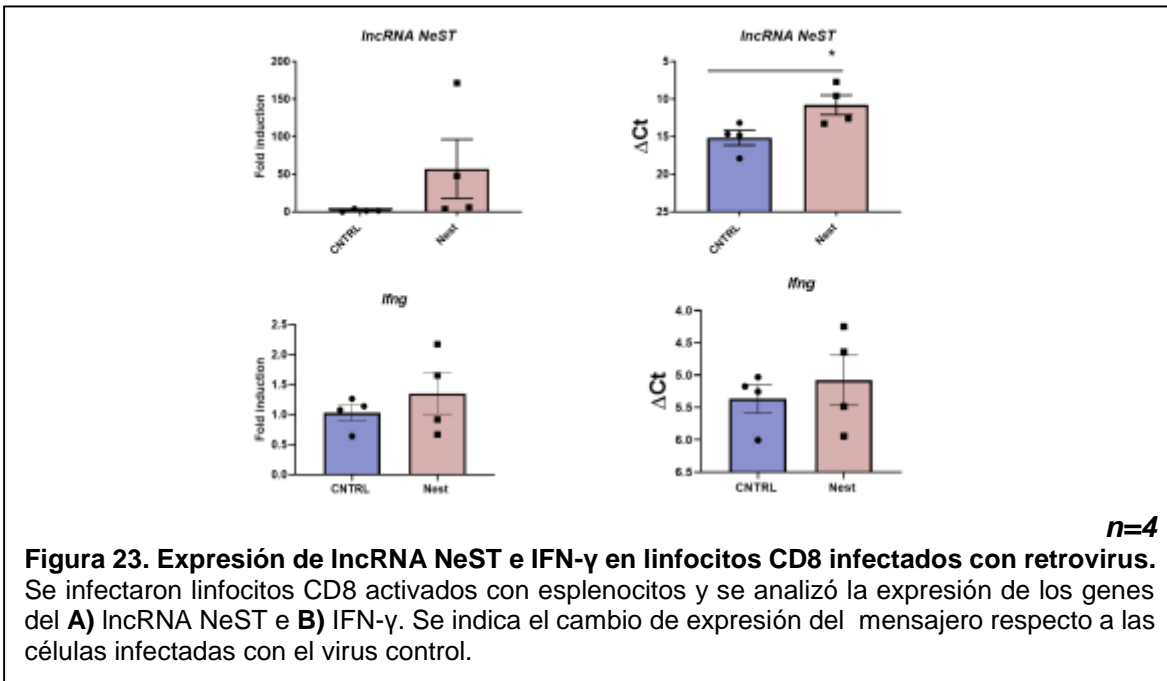
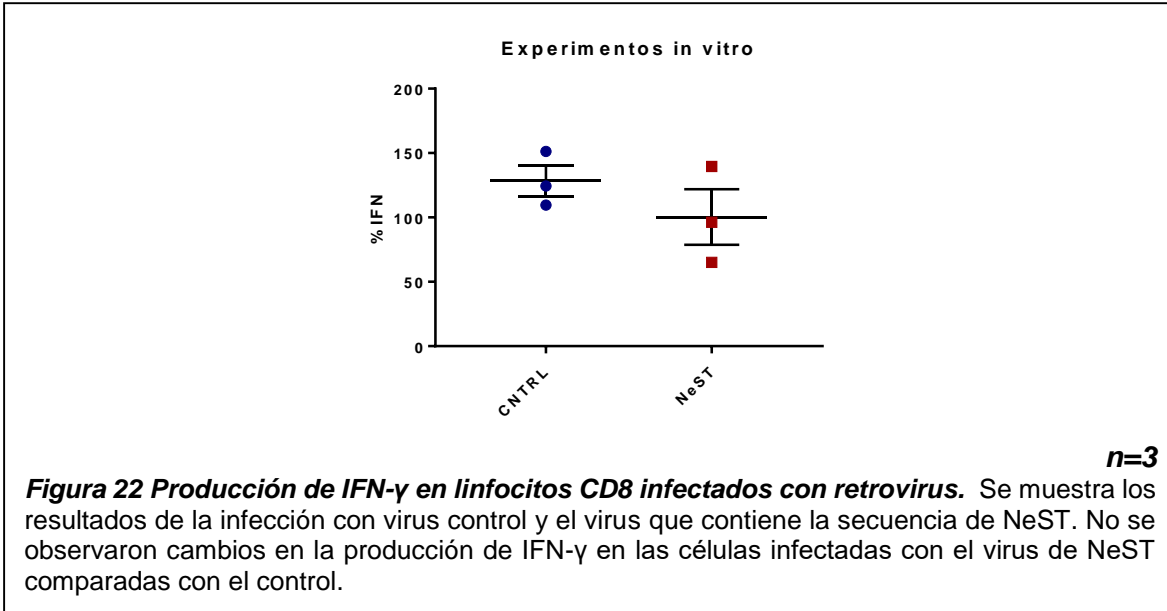


### 6.3 Infección de linfocitos T CD8+ con retrovirus in vitro

Linfocitos CD8+ CD45.1 purificados se activaron con  $\alpha$ CD3/  $\alpha$ CD28 (2 ug/mL) y se infectaron 16 hrs después con el virus control o el que contenía la secuencia de NeST y se evaluaron al día 5 posterior a una ronda de estimulación con IL-2 y activación utilizando PMA/ionomicina para observar los efectos de la infección.

El análisis por citometría de flujo demostró que un porcentaje de células CD8+ CD45.1 conservaban una buena viabilidad. No obstante, no se observaron cambios significativos en la producción de IFN- $\gamma$  en aquellas que se infectaron con el virus de NeST en comparación con células infectadas con el virus control (**Figura 22**). Es importante

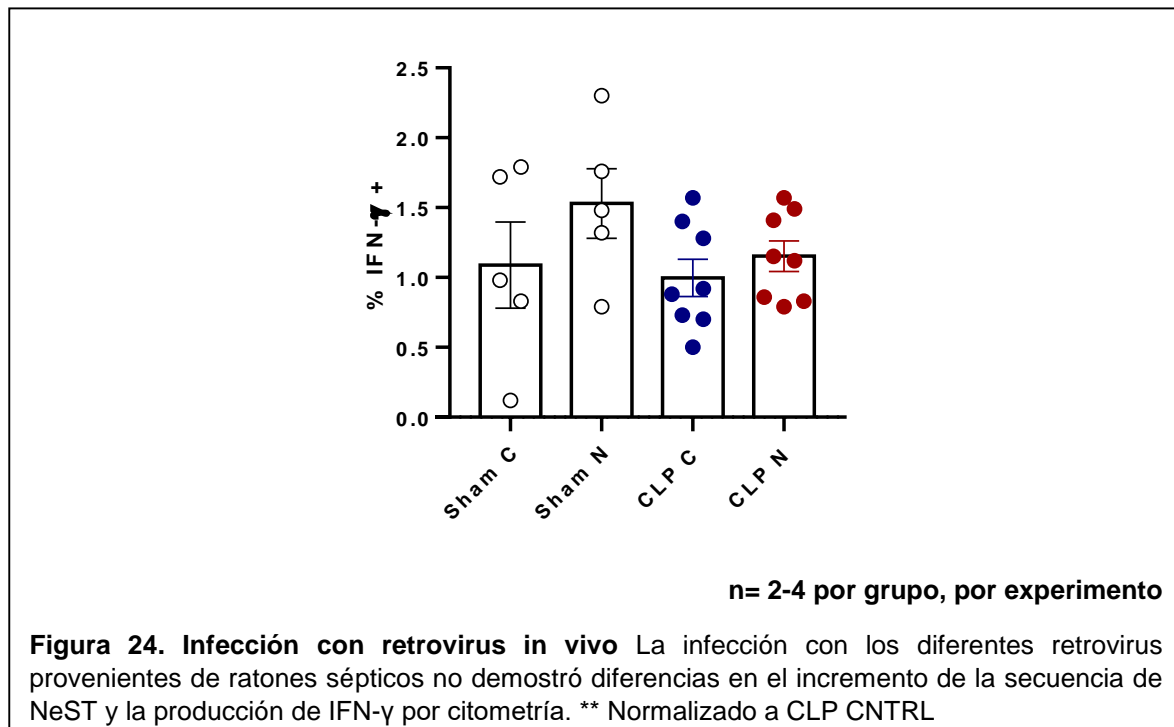
mencionar que, dado que no podíamos observar el reportero de infección (GFP), no podíamos enfocar en análisis en las células con infección eficiente. Por esa razón, la expresión de IFN- $\gamma$  fue evaluada en todas las células del cultivo, sin importar su estado de infección.



Cuantificamos por qPCR la transcripción de NeST y de IFN- $\gamma$  en las células infectadas con los virus control y NeST. Observamos una tendencia a que ambos transcritos estuvieran aumentados en las células infectadas con el retrovirus que codifica NeST (**Figura 23**). Sin embargo, a juzgar por el incremento en la transcripción del lncRNA, existía una variabilidad grande entre experimentos, probablemente relacionada a cambios en la eficiencia de la infección.

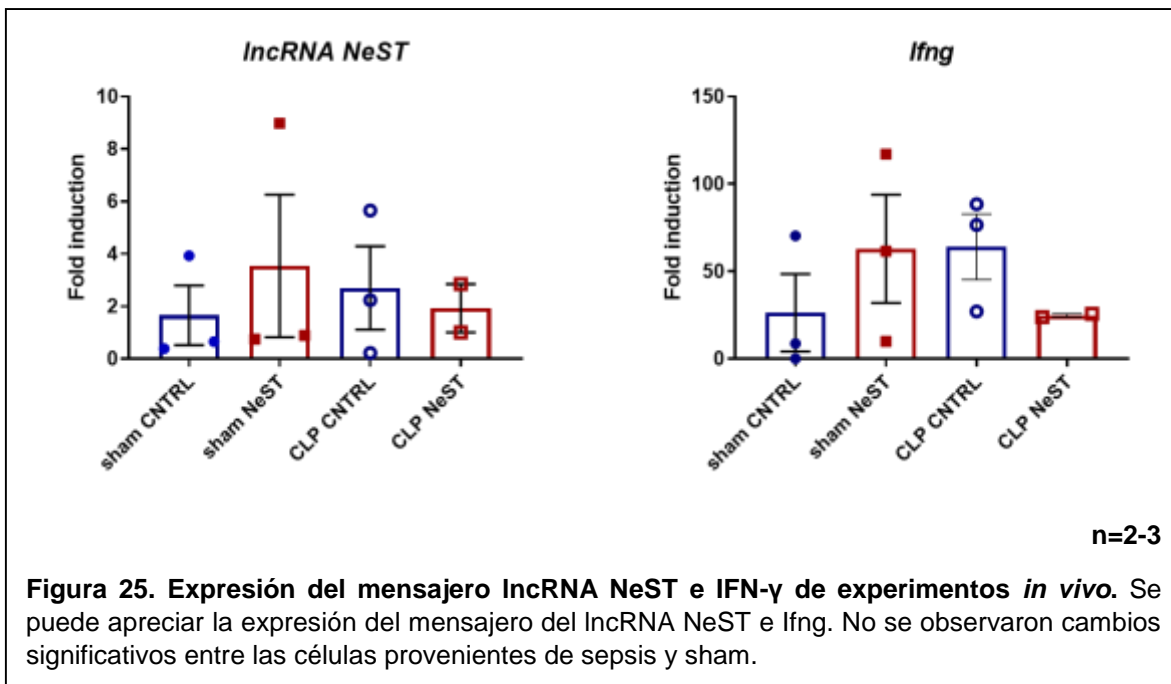
#### 6.4 Retrovirus de NeST y su efecto en células provenientes de sepsis

Con el fin de determinar si los efectos de NeST sobre la producción de IFN- $\gamma$  eran relevantes, utilizamos el modelo de sepsis previamente descrito. Realicé CLP o cirugía control a ratones OT-I CD45.1. Treinta días después, los ratones se sacrificaron y se purificaron células CD8 de órganos linfoides secundarios. Los linfocitos se activaron con anti-CD3/CD28 y 24 horas después se infectaron con el retrovirus control o el que codifica NeST. Se transfirieron 200,000 linfocitos provenientes del protocolo de infección a animales CD45.2 a los que el día previo se había infectado con *Listeria monocytogenes* que expresa



OVA. Cinco días más tarde, los ratones se sacrificaron y analizamos la expansión clonal y la capacidad de producir IFN- $\gamma$  de las células transferidas.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 24**, donde se indica el porcentaje de IFN- $\gamma$  en células infectadas. No observamos diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  por citometría de flujo entre células infectadas con el virus control y el que codifica NeST. Aislamos por citometría de flujo (cell sorting) las células transferidas y analizamos el nivel de mensajero en las células infectadas. No se observaron diferencias en el transcrito de NeST entre los ratones sham y los ratones con sepsis. Tampoco se observaron cambios significativos en la producción de IFN- $\gamma$  en células donde se sobreexpresó NeST proveniente de sepsis (**Figura 25**).



## VII. Discusión

*Partículas retrovirales y su eficiencia en la transducción de linfocitos murinos.*

La infección con partículas lentivirales, ampliamente utilizada para la modificación de linfocitos humanos, ha probado ser eficiente e incluso ha sido usada en forma terapéutica (ej. células CAR)<sup>43, 44, 45</sup>. El poco éxito de reproducir este fenómeno en linfocitos de ratón ha llevado a los investigadores a desarrollar diferentes métodos para poder replicar lo observado en humanos. Entre los diferentes protocolos se ha optado por modificar la envoltura de la partícula viral<sup>46</sup> e inclusive adicionar reactivos como *Lentiboost/Sirion Biontec*<sup>47, 48</sup> que aumentan la eficiencia de la transducción. No obstante, la eficiencia de la transducción obtenida por los cambios en estas metodologías no logra resolver este problema por completo<sup>49, 50</sup>.

Las diferencias obtenidas en el método de transducción entre lentivirus y retrovirus reflejan varias piezas clave en los componentes de los linfocitos de ratón. En algunos artículos publicados, se menciona que, por lo menos en parte, la poca capacidad de infección obtenida con lentivirus se debe a la ausencia de algunos componentes celulares en los linfocitos de ratón para su integración en el genoma<sup>47, 48</sup>. Evidencia de esto proviene de pruebas realizada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (perteneciente a la familia de los lentivirus) en células de ratón, obteniendo baja eficiencia de transcripción reversa y translocación al núcleo<sup>48, 51</sup>. Al modificar genéticamente a los ratones para expresar los factores y receptores presentes en las células humanas incrementó la capacidad de infección<sup>52</sup>. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la baja transducción con lentivirus no se entienden en su totalidad, siendo necesario ahondar más en su investigación para utilizarlos como posibles vectores en la infección de células de ratón.



Por su parte, la familia de los gamma-retrovirus se encuentra ampliamente asociada con diferentes especies de animales entre los que se encuentran los ratones <sup>53</sup>. El más común presente en roedores se conoce como “*virus de la leucemia murina*” (MuLV, por sus siglas en inglés), causante de sarcomas en los roedores <sup>54</sup>. Estudios han demostrado que las gamma-retrovirus son variados en su capacidad de infección, que se modifica dependiendo de su tipo de envoltura y sus componentes abarcando un amplio rango de huéspedes <sup>55</sup>. En consecuencia, estos vectores virales contienen todos los elementos requeridos para concretar la infección en los linfocitos, siendo la opción predilecta en metodologías *in vitro* e *in vivo*.

En nuestros experimentos dichas características de las partículas virales se vieron reflejadas en la eficiencia de infección. Mientras que los linfocitos de ratón infectados con lentivirus disminuyeron significativamente su viabilidad, células CD8 infectadas con retrovirus sobrevivían al protocolo de infección y aumentaban la expresión de nuestro gen de interés en comparación de células que recibieron el virus control. Los cambios establecidos entre las metodologías *in vitro* e *in vivo* de este trabajo mostraban un incremento en la supervivencia e infección de las células y permitieron identificarlas posteriormente en los experimentos *in vivo*, demostrando ser un protocolo eficaz para introducir genes de interés en linfocitos T CD8 de ratón.

#### *LncRNA NeST, función como regulador de IFN- $\gamma$*

Investigaciones previas apuntan a que elementos no codificantes pueden tener una función como reguladores de funciones biológicas. Particularmente NeST se ha demostrado que puede tener una acción en *cis* sobre el locus de IFN- $\gamma$  provocando el reclutamiento de

complejos de metilación donde pertenece WDR5, modificando la accesibilidad de la cromatina, induciendo el aumento en la producción de dicha citocina <sup>23, 24</sup>.

La estrategia utilizada en este trabajo consistía en probar si la reintroducción de NeST a linfocitos por un vector retroviral era capaz de incrementar la producción de IFN- $\gamma$ . Adicionalmente, se quería probar si en células provenientes de ratón con sepsis pueden recuperar su producción de IFN- $\gamma$  al sobreexpresarlo con el vector retroviral <sup>31</sup>. Esto impactaría de forma directa sus funciones efectoras, potenciando su proliferación y capacidad de respuesta ante una infección como *Listeria monocytogenes*.

Los resultados *in vitro* demostraron la eficiencia de la infección con los retrovirus, mostrando un aumento en la proteína fluorescente verde en el virus control y la expresión del mensajero de NeST en las células infectadas con dichas partículas virales. No obstante, la sobreexpresión de NeST no causó cambios en la producción de IFN- $\gamma$  por citometría y únicamente mostró una ligera tendencia en el incremento del mensajero en las células infectadas con el virus cargado con el RNA largo no codificante. Esto dio lugar a montar el protocolo de infección en un sistema *in vivo* y comprobar su eficacia durante una infección. En los resultados de los experimentos *in vivo* similar a los *in vitro* se observó que independientemente de la infección con el virus control o cargado con la secuencia de NeST, no había cambios en la producción de IFN- $\gamma$ . Dicho resultado fue consistente entre los grupos de células provenientes de un animal sham o con sepsis (CLP). La principal debilidad de este estudio radica en nuestra imposibilidad de diferenciar las células adecuadamente transducidas (que por lo tanto expresan NeST) de aquellas en las que la infección no fue eficiente. Lo anterior, porque el vector que codificaba NeST no producía GFP a un nivel adecuado. Por esa razón, solo pudimos analizar la función y el fenotipo de *todas* las células transferidas, de las cuales consideramos que aproximadamente el 25%

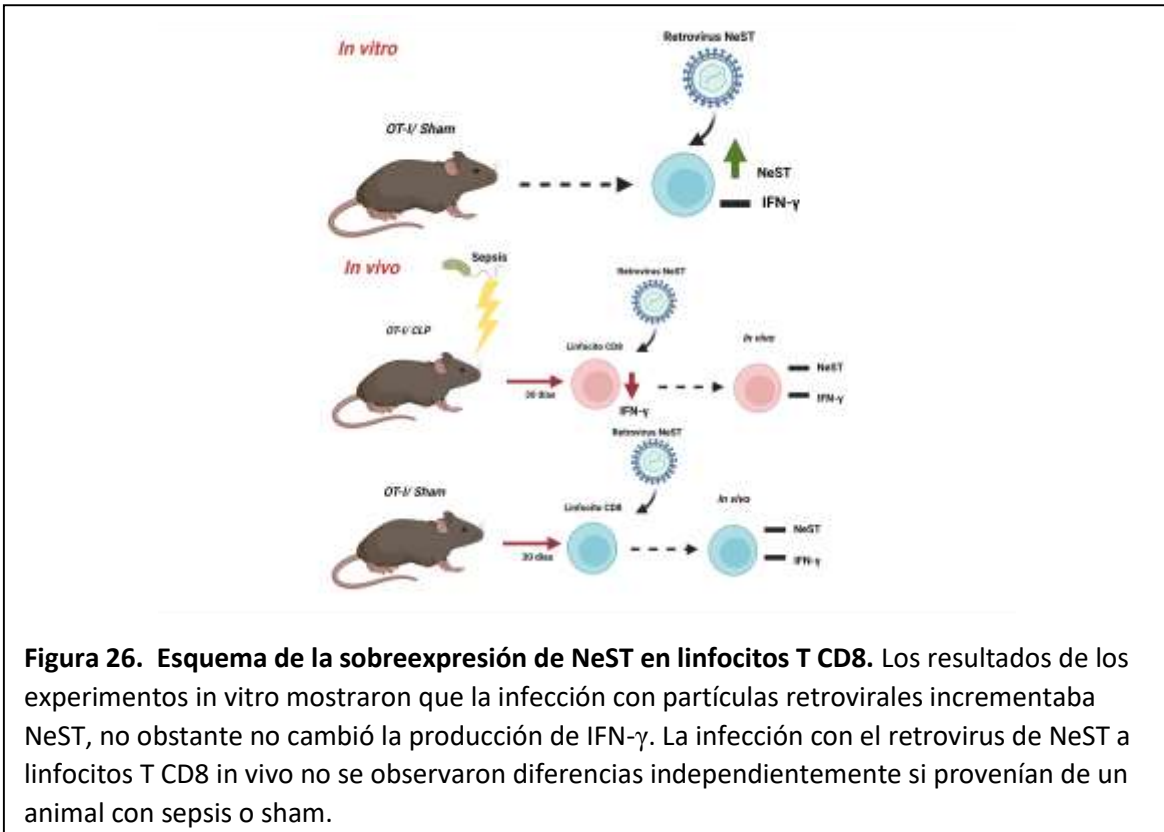
sobre-expresaba NeST. Por esa razón, nuestro análisis podría subestimar el efecto de la restauración de la expresión de NeST.

Para la parte experimental podrían probarse otras metodologías para mejorar la introducción del lncRNA a las células. Por ejemplo podría probarse protocolos como la electroporación o lipofección en diferentes vectores y observar la eficiencia de transfección. Igualmente, podrían utilizarse otro tipo de recursos como líneas celulares CD8 de ratón modificadas de manera específica por el sistema CRISPR-Cas9 sobre el locus de *Ifng* para sobreexpresar NeST en conjunto con algún marcador como una proteína fluorescente.

Entre las posibles hipótesis teóricas que explican la ausencia de cambio en la producción de la citocina recaen en el mecanismo de integración viral. La integración del vector viral en el genoma celular ocurre de forma no dirigida<sup>56, 57, 58</sup>. Es decir, a diferencia de sistemas como CRISPR-Cas9, la introducción de la secuencia de NeST por el virus no sucede directamente sobre el locus de *Ifng*. Por lo tanto, si la acción de NeST ocurre en *cis* sobre el genoma, ésta no sucede debido a la distancia de inserción del vector viral y la secuencia de *ifng*. Igualmente, el cambio en la accesibilidad de la cromatina inducida por la sepsis también podría interferir con el correcto funcionamiento de NeST<sup>59</sup>. Debido a que NeST puede reclutar complejos que modifican el paisaje epigenético, su regulación a la baja en células provenientes de sepsis podría cerrar por completo su sitio de acción<sup>60, 61</sup>. En consecuencia, a pesar de su incremento en el sistema, el lncRNA podría no alinearse correctamente con su secuencia, conservando la alteración provocada por la enfermedad y manteniendo a la baja la producción de IFN- $\gamma$ .

## VIII. Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron *in vitro* que la sobreexpresión del lncRNA NeST por medio de un vector retroviral incrementó la expresión del RNA largo no codificante, no obstante la producción de IFN- $\gamma$  no mostró cambios significativos en las células infectadas con el virus control y nuestra secuencia de interés. Así mismo, los experimentos *in vivo* no demostraron que la reintroducción de NeST al linfocito tuviera efectos significativos en la presencia de la citocina, independientemente si las células provenían de un ambiente de sepsis. Esto podría explicarse también a una baja eficiencia de transducción del inserto de NeST en los experimentos *in vivo* por lo que otros enfoques metodológicos podrían resolver esta problemática. Por lo tanto, la presencia de NeST por sí sola no puede contrarrestar los efectos del estado de poca funcionalidad inducido por sepsis, siendo necesario investigar qué otras moléculas podrían jugar un papel importante para recuperar las funciones efectoras de las células y modificar su paisaje epigenético.



## IX. Perspectivas

- Es necesario continuar la investigación sobre el mecanismo de acción de NeST en el locus de *I*fng y la producción de esta citocina.
- Los retrovirus son una estrategia eficaz para infectar linfocitos CD8 murino *in vitro* en comparación a otros tipos de partícula viral como los lentivirus.
- La transducción *in vivo* de linfocitos CD8 de ratón con partículas retrovirales es un buen acercamiento a la sobreexpresión de genes de interés, aunque se necesita trabajar estas metodologías para mejorar su eficiencia.
- Para comprobar los efectos de la sobreexpresión de NeST en linfocitos CD8 de ratón protocolos como la electroporación y lipofección pueden ser de utilidad.

## XI. Referencias

1. Abbas, Abul K., et al. *Cellular and Molecular Immunology*. Ninth edition, Elsevier, 2018.
2. Murphy, Kenneth, et al. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed, Garland Science, 2012.
3. Kapila K. (2004). Kuby Immunology, 4<sup>th</sup> Edition year 2000. *Medical Journal, Armed Forces India*, 60(1), 91. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(04\)80176-X](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(04)80176-X)
4. Kufer, T. A., Creagh, E. M., & Bryant, C. E. (2019). Guardians of the Cell: Effector-Triggered Immunity Steers Mammalian Immune Defense. *Trends in Immunology*. doi:10.1016/j.it.2019.08.001
5. Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L., & Mogensen, T. H. (2020). Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*. doi:10.1038/s41577-020-0391-5
6. Smith, N. C., Rise, M. L., & Christian, S. L. (2019). A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.02292
7. Semmes, Eleanor C., et al. "Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health." *Frontiers in Immunology*, vol. 11, Jan. 2021, p. 595297. DOI.org, doi:10.3389/fimmu.2020.595297.
8. Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-S52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046
9. Omilusik, K. D., & Goldrath, A. W. (2017). The origins of memory T cells. *Nature*, 552(7685), 337–339. doi:10.1038/d41586-017-08280-8
10. Martin, M. D., & Badovinac, V. P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02692
11. Laidlaw, B. J., Craft, J. E., & Kaech, S. M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 102–111. doi:10.1038/nri.2015.10
12. Seder, R. A., & Ahmed, R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature Immunology*, 4(9), 835–842. doi:10.1038/ni969
13. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med*. 2020 Dec 3;383(23):2255-2273. doi: 10.1056/NEJMra2026131. PMID: 33264547; PMCID: PMC7727315.
14. Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol*. 2009 Oct;1(1):20-36. doi: 10.1093/jmcb/mjp001. Epub 2009 May 28. PMID: 19482777; PMCID: PMC2841031.
15. Kotzin JJ, Spencer SP, McCright SJ, Kumar DBU, Collet MA, Mowel WK, Elliott EN, Uyar A, Makiya MA, Dunagin MC, Harman CCD, Virtue AT, Zhu S, Bailis W, Stein J, Hughes C, Raj A, Wherry EJ, Goff LA, Klion AD, Rinn JL, Williams A, Flavell RA, Henao-Mejia J. The long non-coding RNA *Morrbid* regulates Bim and short-lived myeloid cell lifespan.

Nature. 2016 Sep 8;537(7619):239-243. doi: 10.1038/nature19346. Epub 2016 Aug 15. PMID: 27525555; PMCID: PMC5161578.

16. Jason K. Whitmire, Joyce T. Tan, J. Lindsay Whitton; Interferon- $\gamma$  acts directly on CD8<sup>+</sup> T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med* 4 April 2005; 201 (7): 1053–1059. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20041463>

17. Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., & Frazer, I. H. (2017). Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell death & disease*, 8(6), e2836. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.67>

18. de Araújo-Souza PS, Hanschke SC, Viola JP. Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells. *J Immunol Res*. 2015;2015:849573. doi: 10.1155/2015/849573. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25973438; PMCID: PMC4418004.

19. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101. doi: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2. PMID: 17981204.

20. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*. 2020 Sep 29;8:49. doi: 10.1186/s40364-020-00228-x. PMID: 33005420; PMCID: PMC7526126.

21. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 2016 Aug;17(8):487-500. doi: 10.1038/nrg.2016.59. Epub 2016 Jun 27. PMID: 27346641.

22. Allis, C. David, et al., editors. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007.

23. Gomez, J. A., Wapinski, O. L., Yang, Y. W., Bureau, J.-F., Gopinath, S., Monack, D. M., ... Kirkegaard, K. (2013). The NeST Long ncRNA Controls Microbial Susceptibility and Epigenetic Activation of the Interferon- $\gamma$  Locus. *Cell*, 152(4), 743–754. doi:10.1016/j.cell.2013.01.015

24. Petermann F, Pękowska A, Johnson CA, Jankovic D, Shih HY, Jiang K, Hudson WH, Brooks SR, Sun HW, Villarino AV, Yao C, Singleton K, Akondy RS, Kanno Y, Sher A, Casellas R, Ahmed R, O'Shea JJ. The Magnitude of IFN- $\gamma$  Responses Is Fine-Tuned by DNA Architecture and the Non-coding Transcript of *Ifng-as1*. *Mol Cell*. 2019 Sep 19;75(6):1229-1242.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.025. Epub 2019 Jul 31. PMID: 31377117; PMCID: PMC6754279.

25. Peng H, Liu Y, Tian J, Ma J, Tang X, Rui K, Tian X, Mao C, Lu L, Xu H, Jiang P, Wang S. The Long Noncoding RNA IFNG-AS1 Promotes T Helper Type 1 Cells Response in Patients with Hashimoto's Thyroiditis. *Sci Rep*. 2015 Dec 4;5:17702. doi: 10.1038/srep17702. PMID: 26634912; PMCID: PMC4669486.

26. Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

---

27. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862-74. doi: 10.1038/nri3552. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24232462; PMCID: PMC4077177.
28. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013 Aug 29;369(9):840-51. doi: 10.1056/NEJMra1208623. Erratum in: *N Engl J Med*. 2013 Nov 21;369(21):2069. PMID: 23984731.
29. Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J. L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>
30. Amézquita José, Molina Alejandro (2018) La sepsis como causas de egreso hospitalario en México; una revisión retrospectiva 2008-2015.
31. Cisneros Segura, José Alejandro. (2021). Efectos de la inflamación crónica en la función del sistema inmune / tesis que para optar por el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas; tutor principal de tesis José Carlos Crispín Acuña.
32. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Oct;4(10):854-65. doi: 10.1038/nrd1854. PMID: 16224456.
33. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005 Dec;24 Suppl 1:52-7. doi: 10.1097/01.shk.0000191414.94461.7e. PMID: 16374373.
34. Pope C, Kim SK, Marzo A, Masopust D, Williams K, Jiang J, Shen H, Lefrançois L. Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2001 Mar 1;166(5):3402-9. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3402. Erratum in: *J Immunol* 2001 May 1;166(9):5840. PMID: 11207297.
35. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011 Dec 21;306(23):2594-605. doi: 10.1001/jama.2011.1829. PMID: 22187279; PMCID: PMC3361243.
36. Lee DU, Avni O, Chen L, Rao A. A Distal Enhancer in the Interferon- $\gamma$  (IFN - $\gamma$ ) Locus Revealed by Genome Sequence Comparison. *J. Biol. Chem*. 2004;279(6):4802–4810.
37. Schoenborn JR et al. Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon- $\gamma$ . *Nat. Immunol*. 2007;8(7):732–742.
40. Hatton RD et al. A Distal Conserved Sequence Element Controls *Ifng* Gene Expression by T Cells and NK Cells. *Immunity* 2006;25(5):717–729.
41. Cortez JT, Montauti E, Shifrut E, Gatchalian J, Zhang Y, Shaked O, Xu Y, Roth TL, Simeonov DR, Zhang Y, Chen S, Li Z, Woo JM, Ho J, Vogel IA, Prator GY, Zhang B, Lee Y, Sun Z, Ifergan I, Van Gool F, Hargreaves DC, Bluestone JA, Marson A, Fang D. CRISPR screen in regulatory T cells reveals modulators of Foxp3. *Nature*. 2020 Jun;582(7812):416-



420. doi: 10.1038/s41586-020-2246-4. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32499641; PMCID: PMC7305989.
42. Kurachi M, Kurachi J, Chen Z, Johnson J, Khan O, Bengsch B, Stelekati E, Attanasio J, McLane LM, Tomura M, Ueha S, Wherry EJ. Optimized retroviral transduction of mouse T cells for in vivo assessment of gene function. *Nat Protoc.* 2017 Sep;12(9):1980-1998. doi: 10.1038/nprot.2017.083. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28858287; PMCID: PMC6020692.
43. Lo Presti V, Cornel AM, Plantinga M, Dünnebach E, Kuball J, Boelens JJ, Nierkens S, van Til NP. Efficient lentiviral transduction method to gene modify cord blood CD8<sup>+</sup> T cells for cancer therapy applications. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021 Mar 23;21:357-368. doi: 10.1016/j.omtm.2021.03.015. PMID: 33898633; PMCID: PMC8056177.
44. Pampusch MS, Haran KP, Hart GT, Rakasz EG, Rendahl AK, Berger EA, Connick E, Skinner PJ. Rapid Transduction and Expansion of Transduced T Cells with Maintenance of Central Memory Populations. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019 Sep 30;16:1-10. doi: 10.1016/j.omtm.2019.09.007. PMID: 31673565; PMCID: PMC6816036.
45. Verhoeven E, Costa C, Cosset FL. Lentiviral vector gene transfer into human T cells. *Methods Mol Biol.* 2009;506:97-114. doi: 10.1007/978-1-59745-409-4\_8. PMID: 19110622.
46. Chicaybam L, Sodre AL, Curzio BA, Bonamino MH. An efficient low cost method for gene transfer to T lymphocytes. *PLoS One.* 2013;8(3):e60298. doi: 10.1371/journal.pone.0060298. Epub 2013 Mar 26. PMID: 23555950; PMCID: PMC3608570.
47. Delville M, Soheili T, Bellier F, Durand A, Denis A, Lagresle-Peyrou C, Cavazzana M, Andre-Schmutz I, Six E. A Nontoxic Transduction Enhancer Enables Highly Efficient Lentiviral Transduction of Primary Murine T Cells and Hematopoietic Stem Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018 Aug 8;10:341-347. doi: 10.1016/j.omtm.2018.08.002. PMID: 30191160; PMCID: PMC6125771.
48. Kerkar, S. P., Sanchez-Perez, L., Yang, S., Borman, Z. A., Muranski, P., Ji, Y., Chinnasamy, D., Kaiser, A. D., Hinrichs, C. S., Klebanoff, C. A., Scott, C. D., Gattinoni, L., Morgan, R. A., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2011). Genetic engineering of murine CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells for preclinical adoptive immunotherapy studies. *Journal of immunotherapy* (Hagerstown, Md. : 1997), 34(4), 343–352. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3182187600>
49. 448. Optimization of Lentiviral Transduction of Primary Murine Splenocytes for Adoptive Immunotherapy. (2003). *Molecular Therapy*, 7(5), S177. doi:10.1016/s1525-0016(16)40890-7
50. Simmons A, Alberola-Ila J. Retroviral Transduction of T Cells and T Cell Precursors. *Methods Mol Biol.* 2016;1323:99-108. doi: 10.1007/978-1-4939-2809-5\_8. PMID: 26294401; PMCID: PMC5562401.
51. Baumann JG, Unutmaz D, Miller MD, Breun SK, Grill SM, Mirro J, Littman DR, Rein A, KewalRamani VN. Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* 2004 Nov;78(22):12537-47. doi: 10.1128/JVI.78.22.12537-12547.2004. PMID: 15507641; PMCID: PMC525105.
-

52. Browning, J., Horner, J. W., Pettoello-Mantovani, M., Raker, C., Yurasov, S., DePinho, R. A., & Goldstein, H. (1997). Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14637–14641. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14637>
53. Fan, H. (2009). Retroviruses. *Encyclopedia of Microbiology*, 519–534. doi:10.1016/b978-012373944-5.00315-1
54. Hunter, J. E., Ramos, L., & Wolfe, J. H. (2017). Viral Vectors in the CNS ☆. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. doi:10.1016/b978-0-12-809324-5.02446-9
55. STRAUSS, J. H., & STRAUSS, E. G. (2008). Viruses Whose Life Cycle Uses Reverse Transcriptase. *Viruses and Human Disease*, 211–259. doi:10.1016/b978-0-12-373741-0.50009-x
56. Poletti V, Mavilio F. Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017 Oct 5;8:31-41. doi: 10.1016/j.omtm.2017.10.001. PMID: 29159201; PMCID: PMC5684498.
57. Yoder, K. E., Rabe, A. J., Fishel, R., & Larue, R. C. (2021). Strategies for Targeting Retroviral Integration for Safer Gene Therapy: Advances and Challenges. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 662331. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.662331>
58. Flint, S. Jane, et al. *Principles of Virology*. 4th edition, ASM Press, 2015.
59. Binnie A, Tsang JLY, Hu P, Carrasqueiro G, Castelo-Branco P, Dos Santos CC. Epigenetics of Sepsis. *Crit Care Med*. 2020 May;48(5):745-756. doi: 10.1097/CCM.0000000000004247. PMID: 32167492.
60. Falcão-Holanda, R. B., Brunialti, M., Jasiulionis, M. G., & Salomão, R. (2021). Epigenetic Regulation in Sepsis, Role in Pathophysiology and Therapeutic Perspective. *Frontiers in medicine*, 8, 685333. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.685333>
61. Cross D, Drury R, Hill J, Pollard AJ. Epigenetics in Sepsis: Understanding Its Role in Endothelial Dysfunction, Immunosuppression, and Potential Therapeutics. *Front Immunol*. 2019 Jun 18;10:1363. doi: 10.3389/fimmu.2019.01363. PMID: 31275313; PMCID: PMC6591469.
-