



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

***PAPEL DE LA SIALOMUCINA CD43 EN LA EXPRESIÓN DE GLUT-1***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Luis Eduardo Chipres Naranjo

TUTOR PRINCIPAL

[Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay](#)  
(Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dr. Otoniel Rodríguez Jorge](#)  
(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

[Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva](#)  
(Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México)

Ciudad de México. Febrero, 2025



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.

## **JURADO DE EXAMEN**

Dra. Nora Alma Fierro Gonzales  
(Presidenta)

Dr. Paul Santiago Rosas  
(Secretario)

Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy  
(Vocal)

Dra. Ana María Salazar Martínez  
(Vocal)

Dr. Jorge Gaona Bernal  
(Vocal)

### ***Expresiones de gratitud***

El presente proyecto de investigación se realizó en el departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos (DMMB) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay y fue financiado parcialmente por los donativos de CONAHCYT A1-S-15601 y PAPIIT/DGAPA/UNAM IN222523, México.

Para el desarrollo de este proyecto a Luis Eduardo Chipres Naranjo se le otorgó una beca de CONHACYT (CVU 1184165), apoyo para actividades académica nacionales e internacionales de corta duración por parte de PAEP 2023 y fue beneficiado con la beca de manutención del IBT 2024.

El proyecto recibió apoyo técnico por parte del Dr. Ángel Francisco Flores Alcantar y la M. en C. Erika Isabel Melchy Pérez.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ABREVIATURAS</b> .....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....	XI
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Sistema inmune .....	2
1.1.1 Sistema inmune innato .....	3
1.1.2 Sistema inmune adaptativo .....	4
1.2 Linfocitos T y respuesta celular .....	5
1.2.1 Origen y maduración .....	6
1.2.2 Receptor de células T: complejo TCR-CD3.....	8
1.2.3 Activación de linfocitos T: El modelo de las tres señales.....	9
1.3 Metabolismo de linfocitos T como cuarta señal de activación.....	17
1.3.1 Plasticidad metabólica en linfocitos T .....	21
1.3.2 Papel de las señales proporcionadas por las moléculas co-estimuladoras en la reprogramación metabólica .....	23
1.3.3 Mecanismos que sustentan a la glucólisis aeróbica como un programa metabólico esencial en la función de linfocitos T .....	25
1.4 Sialomucina CD43.....	28
1.4.1 Expresión y estructura .....	28
1.4.2 Regulación de la expresión y localización de CD43 .....	30
1.4.3 Ligandos y funciones .....	32
1.4.4 Señalización de CD43: una molécula accesoria.....	35
1.4.5 CD43 y su participación en patologías .....	37
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	39
2.1 HIPÓTESIS .....	40
2.2 OBJETIVOS .....	40
2.2.1 OBJETIVO GENERAL.....	40
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
3.1 Cultivo celular.....	42
3.2 Purificación de linfocitos T CD4+ .....	42
3.3 Estimulación.....	43
3.4 Citometría de flujo .....	44
3.5 Inmunofluorescencia .....	45
3.6 Evaluación del metabolismo Glucolítico y Glutaminolítico.....	46
3.7 RT-qPCR.....	46
3.8 Análisis de base de datos GEPIA2 .....	47
3.9 Análisis estadístico.....	48
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	49
4.1 Las señales coestimuladoras de CD43 en conjunto con las del TCR promueven el aumento de Glut-1 en la membrana de linfocitos T CD4+ .....	50
4.2 Las señales solas de CD43 y CD28 promueven el aumento de Glut-1 total y en membrana en células Jurkat .....	53
4.3 Las señales dependientes de CD43 y CD28 promueven una disminución en la liberación de lactato. ....	58
4.4 Los estímulos CD28 y CD43 podrían estar participando en la glutaminólisis .....	60
4.5 La sialomucina CD43 se sobre expresa en líneas tumorales no hematopoyéticas y se correlaciona con el aumento de Glut-1 en Leucemias mieloides agudas .....	62
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	65
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>VII. PERSPECTIVAS</b> .....	75
<b>VIII. REFERENCIAS</b> .....	78
<b>IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Inmunidad innata y adaptativa.....	2
<b>Figura 2.</b> Origen y maduración de linfocitos T .....	7
<b>Figura 3.</b> Receptor de células T (TCR) y recombinación V (D) J.....	9
<b>Figura 4.</b> Transducción de señales mediada por el TCR.....	12
<b>Figura 5.</b> Subpoblaciones de linfocitos T cooperadores CD4 <sup>+</sup> .....	16
<b>Figura 6.</b> Subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos CD8 <sup>+</sup> .....	17
<b>Figura 7.</b> Metabolismo y nutrientes como cuarta señal de activación.....	20
<b>Figura 8.</b> Adaptaciones metabólicas durante los procesos de activación de linfocitos T .....	22
<b>Figura 9.</b> Programas metabólicos de las subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	25
<b>Figura 10.</b> Metabolismo central de la glucosa. ....	27
<b>Figura 11.</b> Estructura y ligandos de CD43.....	30
<b>Figura 12.</b> Señalización mediada por CD43. ....	36
<b>Figura 13.</b> Las señales coestimuladoras de CD43 en conjunto con las del TCR promueven el aumento de Glut-1 en membrana de Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> . ....	52
<b>Figura 14.</b> Las señales solas de CD43 y CD28 promueven el aumento de Glut-1 total y en membrana en células Jurkat.....	55
<b>Figura 15.</b> Las señales solas de CD43 y CD28 promueven el aumento del mRNA de Glut-1 en células Jurkat.....	56
<b>Figura 16.</b> En células Jurkat la localización de Glut-1 parece depender del estímulo.....	57
<b>Figura 17.</b> Las señales dependientes de CD43 y CD28 promueven una disminución en la liberación de lactato.....	59
<b>Figura 18.</b> Las señales dependientes de CD43 y CD28 podrían estar participando en la glutaminólisis .....	61
<b>Figura 19.</b> La sialomucina CD43 se sobre-expresa en 8 tipos de tumores y se correlaciona con un aumento de Glut-1 en leucemia mieloide aguda .....	64

## ABREVIATURAS

**2-DG** - *2-Deoxyglucose* (2-Desoxiglucosa)

**4EBP** - *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein* (Proteína de unión al factor de inicio de traducción 4E)

**Acetil-CoA** - *Acetyl coenzyme A* (Acetil coenzima A)

**AKT** - *Protein kinase B* (Proteína Cinasa B)

**APC** - *Antigen Presenting Cell* (Célula Presentadora de Antígeno)

**AP-1** - *Activator Protein 1* (Proteína Activadora 1)

**ATP** - *Adenosine Triphosphate* (Trifosfato de Adenosina)

**B2M** - Beta-2-Microglobulina

**BCR** - *B Cell Receptor* (Receptor de Células B)

**CBM** - CARD11-BCL10-MALT1 (Complejo de señalización)

**Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>** - Ion de Calcio

**c-Myc** - Proto-oncogén Myc

**CDR** - *Complementarity-Determining Regions* (Regiones Determinantes de Complementariedad)

**CTL** - *Cytotoxic T Lymphocyte* (Linfocito T Citotóxico)

**DAG** - Diacilglicerol

**DC** - *Dendritic Cell* (Célula Dendrítica)

**DLBCL** - *Diffuse Large B-cell Lymphoma* (Linfoma Difuso de Células B Grandes)

**DAMP** - *Damage-Associated Molecular Patterns* (Patrones Moleculares Asociados a Daño)

**DN** - *T Lymphocyte Double Negative* (Linfocito T Doble Negativo)

**eIF4F** - *Eukaryotic translation initiation factor 4F* (Factor de inicio de traducción eucariota 4F)

**ENO1** - Enolase 1 (Enolasa 1)

**ERM** - Ezrin-Radixin-Moesin (Familia de proteínas adaptadoras)

**FADH<sub>2</sub>** - *Flavin Adenine Dinucleotide* (Dinucleótido de Flavina y Adenina reducido)

**FAO** - *Fatty Acid Oxidation* (Oxidación de Ácidos Grasos)

**FOXP3** - *Forkhead box P3* (Caja Forkhead P3)

**GALT** - *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (Tejido Linfoide Asociado al Intestino)

**GAPDH** - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)

**GLUT-1** - *Glucose Transporter Type 1* (Transportador de Glucosa Tipo 1)

**GLUT-6** - *Glucose Transporter Type 6* (Transportador de Glucosa Tipo 6)

**GLUT-8** - *Glucose Transporter Type 8* (Transportador de Glucosa Tipo 8)

**GRB2** - *Growth factor receptor-bound protein 2* (proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento)

**GADS** - *GRB2-related adaptor protein* (Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento)

**GSL1** - *Glutaminase 1* (Glutaminasa 1)

**GSL2** - *Glutaminase 2* (Glutaminasa 2)

**HIF-1 $\alpha$**  - *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (Factor Inducible por Hipoxia 1-alfa)

**H3K9Ac** - *Histone H3 Lysine 9 acetylation* (Acetilación de la lisina 9 de la histona H3)

**HPB-ALL** - *Human Peripheral Blood Acute Lymphoblastic Leukemia* (Leucemia Linfoblástica Aguda de Sangre Periférica Humana)

**IFN $\gamma$**  - Interferón gamma

***ifng*** - *Gene for Interferon gamma* (Gen del Interferón gamma)

**IL** - Interleucina

**IP3** - Inositol 1,4,5-Trifosfato

**IS** - *Immunological Synapse* (Sinapsis Inmunológica)

**ITAM** - *Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif* (Motivo de Activación Basado en Tirosina del Receptor Inmunitario)

**ITK** - *IL-2-inducible T cell kinase*

**IKK** - *I $\kappa$ B kinase*

**I $\kappa$ B** - *Inhibitor of NF- $\kappa$ B*

**JUN** - *Proto-Oncogene Jun*

**JNK** - *c-Jun N-terminal Kinase*

**LAT** - *Linker for Activation of T cells*

**LDHA** - *Lactate dehydrogenase A* (Lactato deshidrogenasa A)

**LFA-1** - *Lymphocyte Function-associated Antigen 2* (Antígeno Asociado a la Función linfocítica 1)

**LLC** - *Chronic Lymphocytic Leukemia* (Leucemia Linfocítica Crónica)

**LTs** – Linfocitos T

**LTs CD4<sup>+</sup>** - Linfocitos T cooperadores (Helper) CD4<sup>+</sup>

**LTs CD8<sup>+</sup>** - Linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>

**MALT** - *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue* (Tejido Linfoide Asociado a Mucosas)

**MAPK** - *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MHC** - *Major Histocompatibility Complex* (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)

**MEK** - *MAPK/ERK Kinase*

**mTOR** - *Mechanistic Target of Rapamycin* (Objetivo Mecanístico de Rapamicina)

**mTORC1** - *Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1* (Objetivo Mecanístico de Rapamicina Complejo 1)

**mTORC2** - *Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2* (Objetivo Mecanístico de Rapamicina Complejo 2)

**NADH** - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

**NAD<sup>+</sup>** - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (oxidado)

**NADPH** - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato)

**NFAT** - *Nuclear Factor of Activated T Cells*

**NFκB** - *Nuclear Factor kappa*

**NK** - *Natural Killer* (Células Asesinas Naturales)

**NLS** - *Nuclear Localization Signal* (Señal de Localización Nuclear)

**OXPHOS** - *Oxidative Phosphorylation*

**PAMP** - *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos)

**PDK1** - *Phosphoinositide-dependent kinase 1* (Cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1)

**PI3K** - *Phosphatidylinositol-3-Kinase*

**PKCθ** - *Protein Kinase C Theta*

**PLC-γ1** - *Phospholipase C gamma 1*

**PIP2** - *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

**PIP3** - *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato)

**PPP** - *Pentose Phosphate Pathway* (Vía de las Pentosas Fosfato)

**PRR** - *Pattern Recognition Receptors*

**PTEN** - *Phosphatase and Tensin Homolog*

**qPCR** - *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

**RASGRP1** - *RAS Guanyl Nucleotide-Releasing Protein 1*

**S6K** - *Ribosomal protein S6 kinase* (Cinasa de la proteína ribosomal S6)

**SFB** - *Suero Fetal Bovino*

**SLC3A2** - *Solute Carrier Family 3 Member 2*

**SLC5A1** - *Solute Carrier Family 5 Member 1*

**SLC7A1** - *Solute Carrier Family 7 Member 1*

**SLP76** - *Src Homology 2 domain-containing leukocyte protein 76*

**SOS** - *Son of Sevenless*

**SPN** - *Sialophorin (CD43)*

## RESUMEN

El metabolismo celular es esencial para la activación y función de los linfocitos T (LTs), así como para el desarrollo y mantenimiento de las células tumorales. En ambos contextos, la glucólisis aeróbica desempeña un papel crucial al satisfacer las elevadas demandas energéticas y biosintéticas asociadas a los procesos de proliferación. Se ha descrito que las moléculas coestimuladoras, como CD28, regulan la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 durante los procesos de activación, favoreciendo así la adopción de la glucólisis aeróbica. Sin embargo, el papel de otras moléculas coestimuladoras, como CD43, en la regulación de la expresión GLUT-1 permanece inexplorado.

CD43 es una sialomucina transmembranal de tipo I que se expresa abundantemente en la membrana de los LTs, así como en tumores de origen hematopoyético y no hematopoyético. En LTs normales, CD43 participa en la selección de timocitos, la maduración, la migración, la adhesión y la activación; por otro lado, su expresión en células tumorales se asocia con un mal pronóstico. Nuestra hipótesis es que por su abundancia y por su estructura larga y rígida, CD43 es una de las moléculas iniciales que transmite señales ambientales necesarias para la supervivencia y proliferación celular. En este trabajo evaluamos si CD43 participa en las adaptaciones metabólicas que experimentan las células T normales y tumorales en respuesta a condiciones de activación en las que la glucólisis soporta las demandas bioenergéticas de la proliferación.

Linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados de sangre periférica humana y células Jurkat se activaron por entrecruzamiento del TCR y/o CD28 o CD43 con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD43. La expresión de GLUT-1 se evaluó mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia y RT-qPCR. Además, se analizaron parámetros metabólicos como el consumo de glucosa y glutamina, y la liberación de lactato y glutamato. Los resultados mostraron que la coestimulación a través de CD43 junto con el TCR (TCR/CD43) incrementó significativamente la expresión de GLUT-1 en la membrana de LTs CD4<sup>+</sup>, superando el efecto observado al estimular con TCR/CD28. En células Jurkat, las señales individuales de CD43 y CD28 fueron

suficientes para aumentar la expresión total y en membrana de GLUT-1, aunque este incremento no se reflejó en un mayor consumo de glucosa. Sorprendentemente, las señales dependientes de CD43 y CD28 disminuyeron la liberación de lactato, observándose una tendencia al aumento en la glutaminólisis. Adicionalmente, el análisis de bases de datos públicas reveló que CD43 está sobreexpresada en varios tipos de tumores y se correlaciona con un aumento de GLUT-1 en leucemias mieloides agudas.

En conclusión, este estudio demuestra que durante la activación de LTs, CD43 participa en la regulación de GLUT-1 y posiblemente en la remodelación metabólica que experimentan durante los procesos de activación. Por otro lado, el aumento considerable en la expresión de GLUT-1 que se observa en respuesta al entrecruzamiento de CD43 en células Jurkat, una leucemia aguda linfoblástica humana, sugiere que CD43 podría estar participando además en las adaptaciones metabólicas que sufren las células tumorales, remodelando su capacidad metabólica al interactuar con sus ligandos en un contexto tumoral. En conjunto, estos resultados amplían el entendimiento de las funciones de CD43 y la posicionan como un potencial blanco terapéutico en enfermedades relacionadas con la activación aberrante de LTs y en ciertos tipos de cáncer.

**Palabras clave:** Linfocitos T, CD43, GLUT-1, reprogramación metabólica, coestimulación, glucólisis aeróbica, células Jurkat, cáncer.

## ABSTRACT

Cellular metabolism is fundamental for T-cell activation and function and for the development and maintenance of tumor cells. Particularly, aerobic glycolysis is important in meeting the high energy and biosynthetic demands associated with proliferation processes. Although the role of co-stimulatory molecules, especially CD28, to promoting the expression of the glucose transporter GLUT-1 during activation, the role of other molecules, such as CD43, in this process is less clear.

CD43 is a type I transmembrane sialomucin abundantly expressed on the membrane of T cells and hematopoietic and non-hematopoietic tumor cells. In normal T lymphocytes (TLs), CD43 induces signals involved in thymocyte selection, maturation, migration, adhesion, and activation, and its expression in tumor cells is associated with a poor prognosis. We hypothesized that, resulting of its abundance and long and rigid structure, CD43 is one of the initial molecules that transmit environmental signals necessary for cell survival and proliferation. Specifically, we investigated whether the signals mediated by CD43 participate in the metabolic adaptations that T cells undergo in response to activation conditions where glycolysis supports the bioenergetic demands of proliferation.

Purified human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes and Jurkat cells were stimulated by crosslinking the TCR alone or in combination with CD43 or CD28 using anti-CD3, anti-CD28, and anti-CD43 antibodies. The expression of GLUT-1 was evaluated by flow cytometry, immunofluorescence, and RT-qPCR. Additionally, metabolic parameters such as glucose and glutamine consumption and lactate and glutamate release were analyzed.

The results showed that co-stimulation through CD43 and the TCR (TCR/CD43) significantly increased the expression of GLUT-1 on the membrane of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, surpassing the effect observed with TCR/CD28. In Jurkat cells, the individual signals from CD43 and CD28 were sufficient to increase both total and membrane expression of GLUT-1, although this increase was not reflected in increased glucose uptake. Interestingly, CD43- and CD28-dependent signals reduced lactate release, suggesting a possible increase in glutaminolysis.

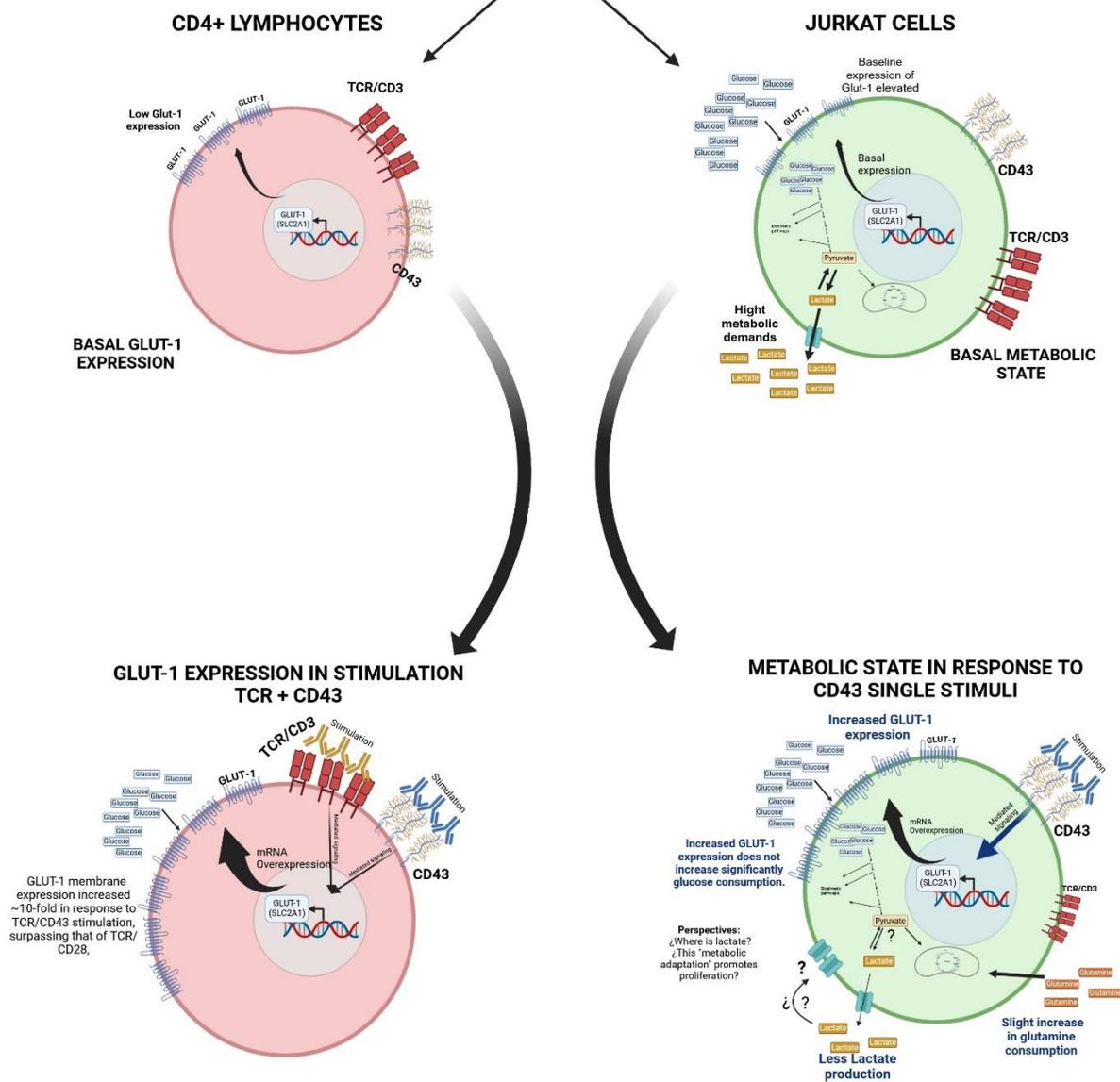
Additionally, the analysis of public databases revealed that CD43 is overexpressed in several types of tumors, correlating with an increase of GLUT-1 in acute myeloid leukemias.

In conclusion, this study demonstrates that CD43 participates in regulating GLUT-1 expression during T cell activation and in the metabolic remodeling cells undergo during activation processes. Furthermore, CD43 may also be involved in the metabolic adaptations tumor cells experience, remodeling their metabolic capacity by interacting with their ligands in a tumor context. These findings expand the understanding of CD43 functions and position it as a potential therapeutic target in diseases related to aberrant T lymphocyte activation and certain cancer types.

**Keywords:** T lymphocytes, CD43, GLUT-1, metabolic reprogramming, co-stimulation, aerobic glycolysis, Jurkat cells, cancer.

# GRAPHICAL ABSTRACT

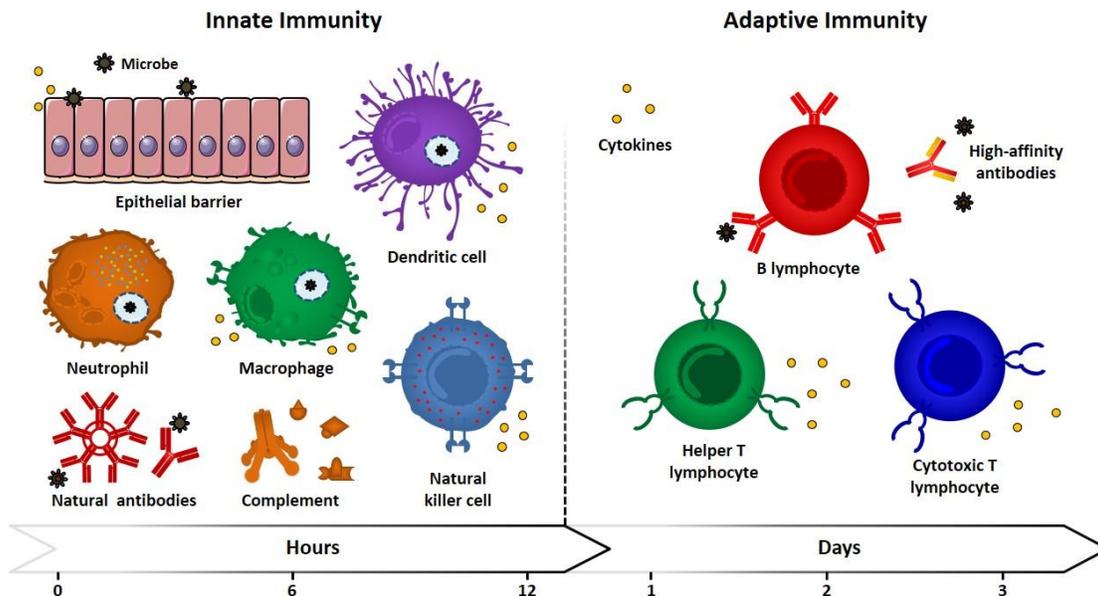
## STUDIED MODELS



# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema inmune

El sistema inmunitario está constituido por células y moléculas que se encargan de reconocer productos o componentes de bacterias, virus, hongos, parásitos o cualquier sustancia reconocida como “extraña”, “peligrosa” o no propia, para así brindar protección. Inclusive, se pueden generar respuestas contra componentes propios en situaciones fisiológicas particulares (Abbas et al., 2014). Para mejorar el entendimiento del montaje de las respuestas inmunitarias tras el reconocimiento de un agente extraño, también llamado “antígeno”, se emplea una categorización simplificada basada en el aspecto temporal de la respuesta (Fig. 1): por un lado, las reacciones rápidas, pero relativamente inespecíficas de la inmunidad innata y por otro lado, las respuestas tardías y específicas de la inmunidad adaptativa (Sá-Nunes, 2021).



**Figura 1.** Inmunidad innata y adaptativa, extraída de (“*Innate, Adaptive, Passive-Active Immunities*”, s/f)

### 1.1.1 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa contra agentes infecciosos y sus mecanismos se encienden inmediatamente o pocas horas después de una infección. La inmunidad innata se conforma de por lo menos cuatro barreras defensivas: anatómicas, fisiológicas, celulares e inflamatorias (Marshall et al., 2018).

Las principales barreras anatómicas son la piel y las mucosas, las cuales actúan como una barrera física que impide el ingreso de los microorganismos. Las barreras fisiológicas comprenden factores como el pH ácido del estómago, sustancias químicas secretadas con actividad antimicrobiana, como la lisozima o defensinas presentes en secreciones como la sudoración o el lagrimeo y el aumento de la temperatura en el cuerpo (Riera Romo et al., 2016). Estas barreras son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis corporal, pero cuando fallan e ingresa un agente externo (patógeno o no), entran en acción las barreras celulares de la inmunidad innata, conformadas por diversos tipos de células entre las que podemos destacar a los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células asesinas naturales (NK), las células linfoides innatas y los linfocitos T intraepiteliales. Todas estas células son capaces de reconocer a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés, *pattern recognition receptors*) patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y moléculas endógenas reconocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*) (Yin et al., 2015; Zindel & Kubes, 2020). El resultado de este reconocimiento es la fagocitosis del microorganismo invasor y la rápida producción de mediadores solubles tales como proteínas de fase aguda, citocinas proinflamatorias, agentes quimiotácticos, mediadores lipídicos de la inflamación, especies reactivas con radicales libres y aminas vasoactivas. En conjunto, todos estos elementos promueven la activación de procesos inflamatorios que se caracterizan, entre otras cosas, por un cambio en la permeabilización vascular, lo que permite la difusión de las moléculas

señalizadoras a la vez que la migración de más células al sitio del insulto (Sá-Nunes, 2021).

A pesar de contar con diversas estrategias y mecanismos efectores, con frecuencia la inmunidad innata es ineficiente para eliminar microorganismos que evolucionaron desarrollando estrategias que les permiten evadir estas respuestas. Cuando esto sucede el sistema inmune adaptativo se hace cargo.

### **1.1.2 Sistema inmune adaptativo**

El sistema inmune adaptativo se caracteriza principalmente por su capacidad de distinguir y reconocer una gran variedad de antígenos de manera específica (diversidad y especificidad) y por su capacidad de montar respuestas vigorosas, rápidas y específicas a exposiciones repetidas del mismo agente patógeno / insulto (especialización y generación de memoria inmunológica) (Abbas et al., 2014).

Este sistema está compuesto principalmente por dos subpoblaciones celulares: los linfocitos B y los linfocitos T. Ambas expresan en la membrana receptores que reconocen específicamente al antígeno: el receptor de células B (BCR) y el receptor de células T (TCR) respectivamente, los cuales, en conjunto con las señales proporcionadas por las moléculas co-estimuladoras permiten que los linfocitos reconozcan a su antígeno, se activen, proliferen y se diferencien para llevar a cabo sus funciones efectoras (Cooper, 2015; Miller, 2004). Estos receptores están distribuidos clonalmente y son antígeno-específicos, esto significa que todos los receptores de un linfocito (que dará lugar a una futura clona) reconocen el mismo antígeno. La suma de los millones de linfocitos con especificidades diferentes constituye el repertorio inmunitario (X. Liu & Wu, 2018).

Los linfocitos que reconocieron su antígeno a través de su receptor, a la vez que recibieron las señales proporcionadas por las moléculas co-estimuladoras y se activaron son capaces de entrar en un proceso llamado expansión clonal, donde proliferan y además se especializan para combatir de mejor manera la infección. Un linfocito activado puede tardar entre 8 y 18 horas en dividirse, por lo que el proceso

de expansión clonal toma entre 5 y 12 días, hasta que hay células suficientes para combatir la infección (Sá-Nunes, 2021). De tal forma que la inmunidad adaptativa es altamente específica pero relativamente lenta. Además, se caracteriza por generar memoria inmunológica, es decir, parte de los linfocitos que se activaron se convertirán en células de memoria y sobrevivirán durante meses o años, inclusive después de la eliminación del microorganismo (Mueller et al., 2013; Weisel & Shlomchik, 2017). Así el siguiente encuentro con el mismo antígeno llevará a una respuesta más rápida y posiblemente mejor.

Posterior a la activación las funciones efectoras de la inmunidad adaptativa son la respuesta humoral que es mediada por los linfocitos B, a través de la producción y secreción de anticuerpos que son los encargados de reconocer, neutralizar y promover la eliminación de microorganismos y por otro lado la respuesta celular mediada por los linfocitos T (Bonilla & Oettgen, 2010).

Si bien la inmunidad innata y adaptativa comúnmente son descritas por separado, existe una sinergia entre ambas. Por un lado, se necesitan los componentes de la inmunidad innata para activar a la inmunidad adaptativa y, a su vez, las funciones efectoras de la inmunidad adaptativa son capaces de potenciar los efectos de la primera. Así, la participación y sinergia entre ambas es esencial para una respuesta inmunitaria intacta y eficaz (Chaplin, 2010).

## **1.2 Linfocitos T y respuesta celular**

Los linfocitos T (LTs) median las respuestas celulares de la inmunidad adaptativa. Se clasifican en dos subpoblaciones principales: los linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> (LTs CD4<sup>+</sup>), cuya función principal es direccionar y amplificar la respuesta inmunitaria al activar y reclutar otras células inmunes (Luckheeram et al., 2012), y los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (LTs CD8<sup>+</sup>) que identifican y eliminan células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares (Koh et al., 2023). En el cuerpo humano se estima que el número total de linfocitos es de  $5 \times 10^{11}$ , distribuidos de la siguiente manera: ~65% en órganos linfáticos, principalmente bazo y ganglios

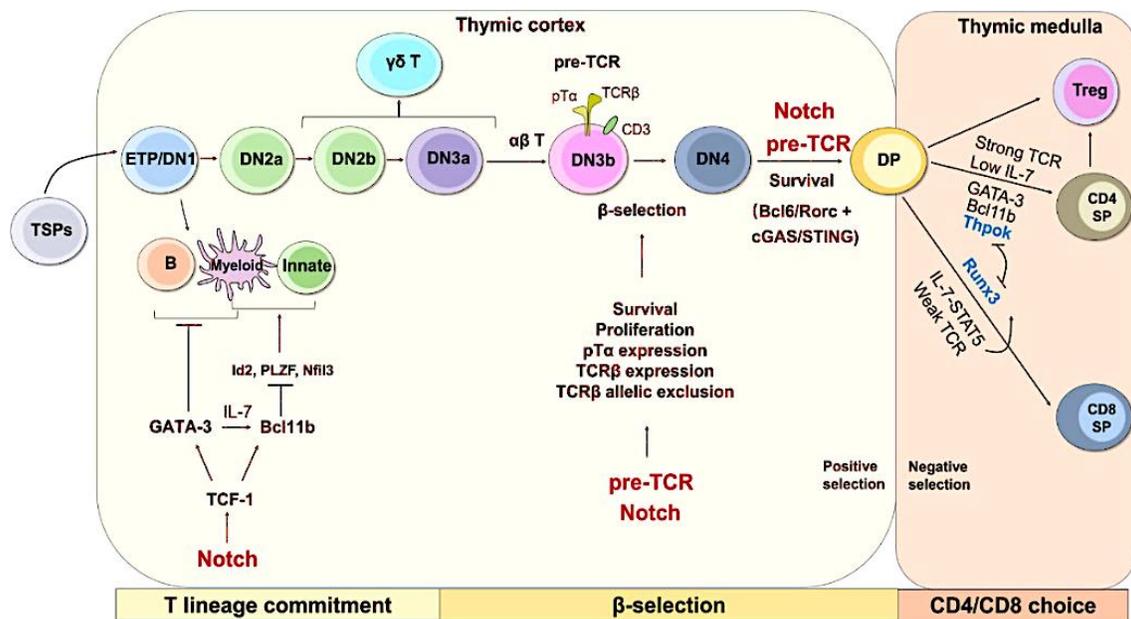
linfáticos, ~15% en tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) e intestino (GALT), ~10% en médula ósea, ~4% en la piel y tan solo ~2% en sangre en donde los LTs CD4<sup>+</sup> son el 65% y los LTs CD8<sup>+</sup> el 35% (Abbas et al., 2014). Estos porcentajes son aproximados y pueden variar dependiendo del estado de salud y otras condiciones del individuo.

### 1.2.1 Origen y maduración

El desarrollo y maduración de los LTs (Fig. 2), comienza en la médula ósea, donde progenitores de siembra tímica migran hacia el timo en donde pasan por varias etapas de desarrollo y selección antes de adquirir su identidad de células T maduras y funcionales (Sun et al., 2023). Las primeras fases de maduración se dan en el córtex del timo, donde las células dobles negativas (DN, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) recién llegadas al timo (timocitos) pasan por cuatro etapas de maduración (DN<sub>1</sub> a DN<sub>4</sub>), y donde podemos destacar: 1) la adquisición del compromiso de linaje hacia células T; 2) la selección beta, donde se reordena el gen de la cadena β del receptor de células T y se expresa un pre-TCR funcional que consta de CD3, TCRβ (reordenado) y un pre-TCRα invariante; 3) la adquisición del fenotipo de células dobles positivas (DP, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), que coincide con el momento donde aquellas que expresan la cadena TCRβ inician el reordenamiento del pre-TCRα invariante para formar un TCRαβ maduro y funcional en la superficie (Cano & Lopera, 2013; Hosokawa & Rothenberg, 2021; Kumar et al., 2018). Este reordenamiento es el acontecimiento clave y responsable de la generación del gran repertorio de reconocimiento con el que cuenta el cuerpo humano (Abbas et al., 2014).

Al generar un complejo TCRαβ maduro (descrito con más detalle en la siguiente sección), los timocitos DP pasan por un punto de control llamado *selección positiva*, donde se seleccionan células con TCR funcionales capaces de reconocer con una afinidad “moderada” auto-péptidos presentados en contextos de MHC-I o MHC-II. Esto los rescata de procesos apoptóticos y además define si serán LTs CD8<sup>+</sup> (reconocieron péptidos presentados por MHC-I) o LTs CD4<sup>+</sup> (reconocieron péptidos presentados por MHC-II), lo que da lugar a la selección de linaje y la generación de

células “single” positivas (SP, CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> o CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>). Estas células migran a la médula del timo en donde se lleva cabo a un segundo control llamado *selección negativa*, en la cual se les presentan antígenos propios a los timocitos mediante el MHC (clase I o clase II) de las células epiteliales de la medula del timo, aquellos linfocitos que reconocen con alta afinidad antígenos propios sufren apoptosis o se vuelven anérgicos (incapaces de activarse). De esta forma se eliminan la gran mayoría de las células T autorreactivas, asegurando así la tolerancia central y previniendo respuestas autoinmunes (Klein et al., 2014; Taniuchi, 2018).



**Figura 2.** Origen y maduración de linfocitos T, extraída de (Sun et al., 2023)

Las células que pasan estos filtros se convierten en linfocitos T vírgenes (también llamados *naïve*) y salen del timo, circulando continuamente por los órganos linfoides secundarios, buscando cada uno su antígeno para activarse, proliferar y convertirse en células efectoras con actividad funcional.

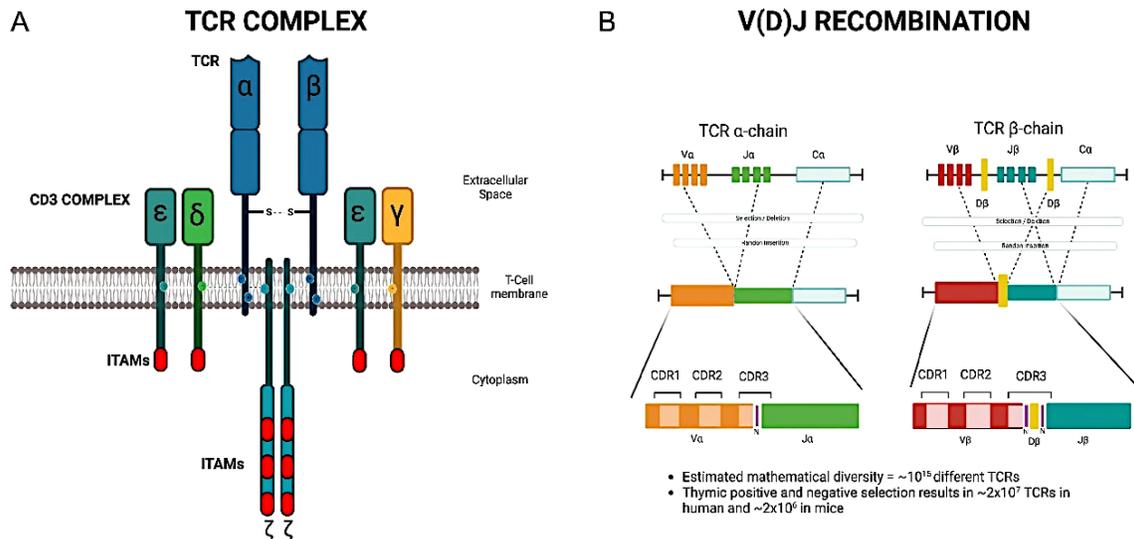
### 1.2.2 Receptor de células T: complejo TCR-CD3

El receptor de células T (Fig. 3) es un heterodímero formado por cadenas altamente variables [TCR $\alpha$ /TCR $\beta$ , >95%) o TCR $\gamma$ /TCR $\delta$  0.5-5%], responsables del reconocimiento del antígeno. Las cadenas del TCR se asocian además a tres dímeros de proteínas accesorias invariantes encargadas de iniciar y propagar la señalización: CD3 $\gamma\epsilon$ , CD3 $\delta\epsilon$  y CD3 $\zeta\zeta$  (Figura 3) (Birnbaum et al., 2014; Kuhns & Badgandi, 2012; Wucherpfennig et al., 2010).

Las cadenas  $\alpha\beta$  son altamente polimórficas. Cada una tiene un dominio variable (V) que contiene segmentos donde se concentra la mayor variabilidad, CDR-1, -2 y -3, conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDRs, del inglés *complementarity-determining regions*), un dominio constante (C) y un segmento de unión (J). Adicionalmente, la cadena  $\beta$  consta de un segmento de diversidad (D) (Cano & Lopera, 2013). En humanos, el locus que codifica para la cadena  $\beta$  contiene 42 segmentos (V), 2 (D), 12 (J) y 2 (C). Por su parte, el locus de la cadena  $\alpha$  contiene 43 (V) y 58 (J) (Turner et al., 2006). Durante la maduración en el timo, estos segmentos se someten a un proceso de recombinación somática llamado recombinación V(D)J (Figura 3) mediante el cual, los segmentos V-D-J de la cadena  $\beta$  y los segmentos V-J de la cadena  $\alpha$  se seleccionan, se reorganizan y se ensamblan aleatoriamente entre sí para generar nuevas secuencias codificantes (Chi et al., 2024). Este proceso da como resultado la gran diversidad de receptores TCR maduros y funcionales con la que cuenta el cuerpo humano, la cual se estima en alrededor de  $\sim 2 \times 10^7$  (Mora & Walczak, 2016; Turner et al., 2006).

Las cadenas  $\alpha\beta$  del TCR no poseen dominios de señalización intracelular (su dominio intracelular es corto, con solo 5 a 12 aminoácidos), pero se encuentran asociadas de forma no covalente, a través de residuos conservados en la región transmembranal, con un aparato de señalización conformado por los heterodímeros CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\epsilon\delta$  y el homodímero CD3 $\zeta\zeta$  (Birnbaum et al., 2014). El complejo CD3 es el encargado de transmitir las señales iniciadas por las cadenas  $\alpha\beta$  a través de los ITAMs (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) que son regiones altamente conservadas del dominio citoplásmico, ricas en tirosinas.

(YXXL/I). Las cadenas CD3  $\gamma/\delta/\epsilon$  contienen cada una un ITAM, mientras que las cadenas CD3 $\zeta$  contienen tres ITAMs (Hwang et al., 2020). El estado de fosforilación de las tirosinas de los ITAMs regula la interacción de estas cadenas con distintas moléculas que participan en la transducción de señales y activación de los linfocitos T.



**Figura 3. A) Receptor de células T (TCR), extraída y modificada de (Yun et al., 2023) y B) recombinación V (D) J, extraída y modificada de (Turner et al., 2006)**

### 1.2.3 Activación de linfocitos T: El modelo de las tres señales

Una vez que los LTs abandonan el timo, circulan constantemente a través de órganos linfoides secundarios, hasta encontrar su antígeno específico. Este encuentro se dará principalmente en los ganglios linfáticos, donde los LTs vírgenes establecen contacto temporal con un gran número de células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cell*) que son células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *Antigen presenting cell*). En ausencia de antígenos, los LTs permanecen en promedio 24 horas en un ganglio linfático y posteriormente lo abandonan. En presencia de una DC madura que está presentando un antígeno afín, la interacción

se vuelve estable y se prolonga durante al menos 3-4 días, con la finalidad de que el LT pueda integrar las señales necesarias para su completa activación y diferenciación (Bouso, 2008).

Actualmente, se han descrito al menos tres señales necesarias para la activación de LTs. La señal detonante e indispensable es el reconocimiento mediante el TCR de péptidos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las DC. Sin embargo, esta señal por sí sola es insuficiente; se requieren también las señales proporcionadas por las denominadas moléculas co-estimuladoras o co-receptoras pues sin las señales de las moléculas co-estimuladoras, los linfocitos mueren por apoptosis o entran en un estado de anergia. La tercera señal es proporcionada por un microambiente rico en citocinas, las cuales definirán en gran parte el tipo de respuesta (Kapsenberg, 2003).

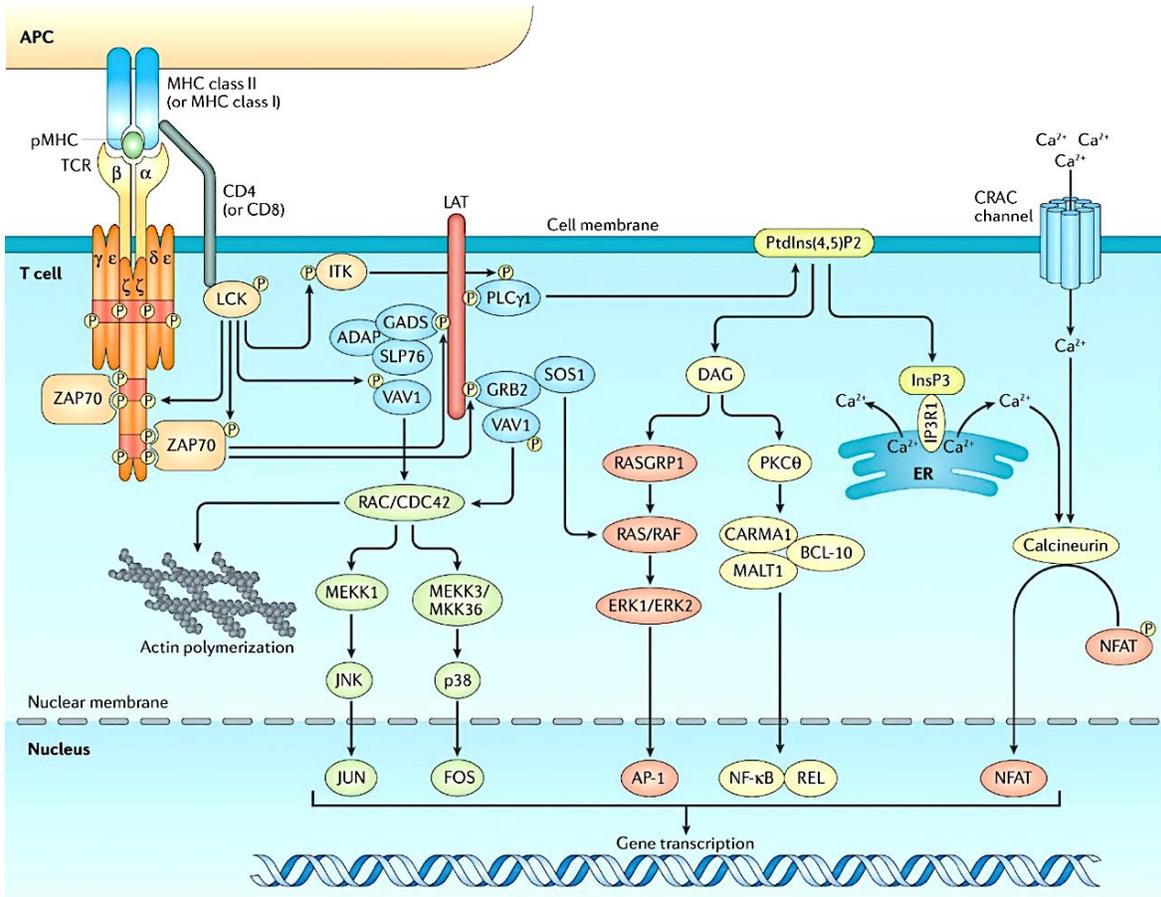
### **1.2.3.1 Primera señal: reconocimiento del antígeno y señalización del TCR**

La transducción de señales a través del TCR (Fig. 4) comienza con el reconocimiento de complejos de moléculas peptídicas presentadas mediante el MHC (pMHC), lo que lleva a la reorganización y reclutamiento de moléculas de membrana y proteínas de señalización hacia la zona de contacto con las DC, formando la denominada sinapsis inmunológica (IS, del inglés *immunological synapse*) (Hashimoto-Tane & Saito, 2016). Aunque existen distintas teorías y un gran debate respecto a cómo la unión TCR-pMHC inicia la señalización y son revisadas a detalle en (Chakraborty & Weiss, 2014; Courtney et al., 2018; Gaud et al., 2018), se propone que el reconocimiento provoca un cambio conformacional en las cadenas CD3 que expone sitios ITAMs no disponibles previamente, para que puedan ser fosforilados por tirosin-kinasas de la familia SRC, como FYN quien se encuentra asociadas a las cadenas CD3 (Salmond et al., 2009), o por LCK, que tras la activación, es reclutada a la sinapsis inmunológica, asociada a los correceptores CD4 o CD8 (Brownlie & Zamoyska, 2013). Cuando LCK fosforila los ITAMs ahora

disponibles de las cadenas CD3 ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ), se generan sitios de unión para los dominios SH2 de la cinasa ZAP-70 (del inglés, *Zeta-chain-associated protein kinase 70*), que al unirse sufre un cambio conformacional que se estabiliza por una fosforilación mediada por LCK. A su vez, ZAP-70 fosforilada fosforila cuatro tirosinas ( $Y^{132,171,191,226}$ ) en la proteína adaptadora LAT (del inglés, *linker of activation of T cells*), generando así el andamiaje para reclutar a otras moléculas como PLC- $\gamma$ 1 (del inglés, *phospholipase C gamma 1*), las proteínas adaptadoras GRB2 (del inglés, *growth factor receptor-bound protein 2*), GADS (del inglés, *GRB2-related adaptor proteins*), SOS (del inglés, *son of sevenless*) y SLP76 (del inglés, *Src homology 2 domain containing leukocyte protein 76*), la cinasa ITK (del inglés, *IL-2-inducible T cell kinase*) y el intercambiador de nucleótidos de guanina VAV, lo que da lugar a la generación de un LAT-señalosome (Acuto et al., 2008; Shah et al., 2021), propagando la señalización iniciada por el TCR a través de tres vías principales: la vía mediada por  $Ca^{2+}$  ( $IP_3$ - $Ca^{2+}$ -NFAT), la vía de las MAPK (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) (DAG-RAS-MAPK-ERK-FOS / VAV-RAC-JNK-JUN) y la activación de la vía mediada por la PKC $\theta$  (del inglés, *protein kinase C-Theta*) (PKC $\theta$ -IKK-NFkB).

Un participante central en la diversificación del proceso de señalización es PLC- $\gamma$ 1, que produce segundos mensajeros mediante la conversión de PIP $_2$  (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) en IP $_3$  (inositol-3,4,5-tri-fosfato) y DAG (diacilglicerol). Cuando el IP $_3$ , que difunde hacia el citoplasma se une a receptores del retículo endoplásmico induce la liberación de  $Ca^{2+}$  hacia el citosol. El aumento de calcio intracelular estimula la enzima serina/treonina cinasa calmodulina, que fosforila y activa a la fosfatasa calcineurina, catalizando la desfosforilación y exposición de un motivo de localización nuclear del factor de transcripción NF-AT (del inglés, *Nuclear factor of activated T cells*), permitiendo su translocación nuclear. La vía de PKC $\theta$  se inicia mediante el reconocimiento de DAG, que, a diferencia de IP $_3$ , se mantiene unido a la membrana plasmática y recluta a la proteína efectora PKC $\theta$ . Su reclutamiento desencadena la formación de un complejo de proteínas adaptadoras llamado complejo CBM, que promueve la activación de la cinasa IKK que fosforila a I $\kappa$ B, el inhibidor de NFkB, permitiendo la liberación y translocación al núcleo de este factor

de transcripción. Por su parte, la vía de las MAPK se puede iniciar a través del DAG, que recluta a la proteína RASGRP1 (del inglés, *RAS guanyl nucleotide-releasing protein*), promoviendo la activación de la GTPasa Ras y desencadenando una cascada de tres MAPK, RAF-MEK-ERK, resultando en la transcripción de c-Fos.



**Figura 4.** Transducción de señales mediada por el TCR, extraída de (Gaud et al., 2018)

Paralelamente a la activación de Ras, las proteínas adaptadoras Grb-2 y SOS reclutan y activan otras MAPK mediante el reclutamiento del factor intercambiador de nucleótidos de guanina VAV, y la activación de RAC-JNK, que fosforilan a c-jun. La dimerización de c-Jun con c-Fos forma el factor de transcripción AP-1 (Hwang et al., 2020; M. O. Li & Rudensky, 2016). En su conjunto los factores de transcripción

NF-AT, NFκB y AP-1 son suficientes para inducir la transcripción de genes esenciales para la proliferación y supervivencia de los LTs.

### 1.2.3.2 Segunda señal: coestimulación

Las señales proporcionadas por las moléculas co-estimuladoras o accesorias se derivan de la interacción entre estas moléculas, presentes en la superficie de los linfocitos T, y sus ligandos en las APC. Esta interacción promueve vías de señalización que disminuyen el umbral de activación y complementan la señalización proporcionada por el reconocimiento del antígeno mediante el TCR. De tal manera que aún en condiciones donde se generan señales “débiles” (dosis bajas de antígeno o uniones de baja afinidad con pMHC), la presencia de moléculas co-estimuladoras promoverá la activación (Abbas et al., 2014; Acuto et al., 2008). Existe un gran número de moléculas co-estimuladoras como CD28, ICOS, CD2, SLAM, HVEM, CD40L y CD43 (L. Chen & Flies, 2013; Sperling et al., 1995), siendo el prototipo de molécula coestimuladora CD28 (Lenschow et al., 1996).

CD28 se expresa constitutivamente en la mayoría de los linfocitos T. Sus ligandos, miembros de la familia de proteínas B7, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), se expresan de manera regulada en las APC cuando están expuestas a microambientes proinflamatorios (reconocimiento de antígenos mediante los PRR´s o detección de citocinas). En ausencia de estos estímulos, su expresión es baja o prácticamente nula (Abbas et al., 2014).” *Lo “extraño” (señal 1) debe combinarse con el “peligro” (señal 2), para poder activar de manera exitosa un linfocito T*” (Abbas et al., 2014).

CD28 activa vías de señalización mediante el reclutamiento de proteínas intracelulares (revisado en (Boomer & Green, 2010; Ogawa & Abe, 2019). El evento clave que acopla la coestimulación mediada por CD28 a varias vías de señalización comienza con el reclutamiento de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K, del inglés, *phosphatidylinositol-3-kinase*) al motivo Y<sup>170</sup>MNM fosforilado del dominio intracelular de CD28. PI3K fosforila a PIP<sub>2</sub> en la membrana plasmática, generando PIP<sub>3</sub>, el cual funciona en este caso como ancla para el reclutamiento de proteínas

que contienen dominios de homología a pleckstrina (PH) como las serina/treonina cinasas PDK1 (del inglés, Phosphoinositide-dependent kinase-1) y AKT/PKB (del inglés *Protein Kinase B*) así como la tirosina cinasa ITK y el intercambiador de nucleótidos de guanina VAV. El reclutamiento de ITK y VAV promueven la activación de PLCY1 y de Rac-GTPasa respectivamente, y AKT, activada mediante fosforilación por PDK1, tiene la capacidad de fosforilar a una gran variedad de sustratos, incluidos TSC1/2 (del inglés *Tuberous Sclerosis Complex 1 y 2*), el inhibidor de la proteína NF-κB (IκB), GSK3 (del inglés *Glycogen synthase kinase-3*), BAD (del inglés *Bcl-2-associated death promoter*) y FOXO (del inglés *Forkhead box O*) (Boomer & Green, 2010; Ogawa & Abe, 2019; Shah et al., 2021). En conjunto, la fosforilación de TSC1/2, que promueve la liberación del complejo mTORC1 (Inoki et al., 2002) y la fosforilación de IκB (Bai et al., 2009) resultan en cambios metabólicos y en un aumento de la actividad transcripcional de NF-κB, respectivamente. Por su parte, la fosforilación de Bad/Foxo da como resultado la inhibición de vías apoptóticas (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000), por último, la fosforilación e inactivación de GSK3, una quinasa responsable de la exportación nuclear de NFAT, favorece un aumento en la actividad transcripcional de NFAT. (Diehn et al., 2002).

Las vías de señalización derivadas de la coestimulación se bifurcan y entrelazan con las del TCR, proporcionando señales adicionales esenciales para la supervivencia y proliferación celular. Estas vías son indispensables para potenciar la producción de IL-2 y de proteínas anti-apoptóticas como BCL-X<sub>L</sub>, además participan en la remodelación del metabolismo, tema que se profundiza más adelante.

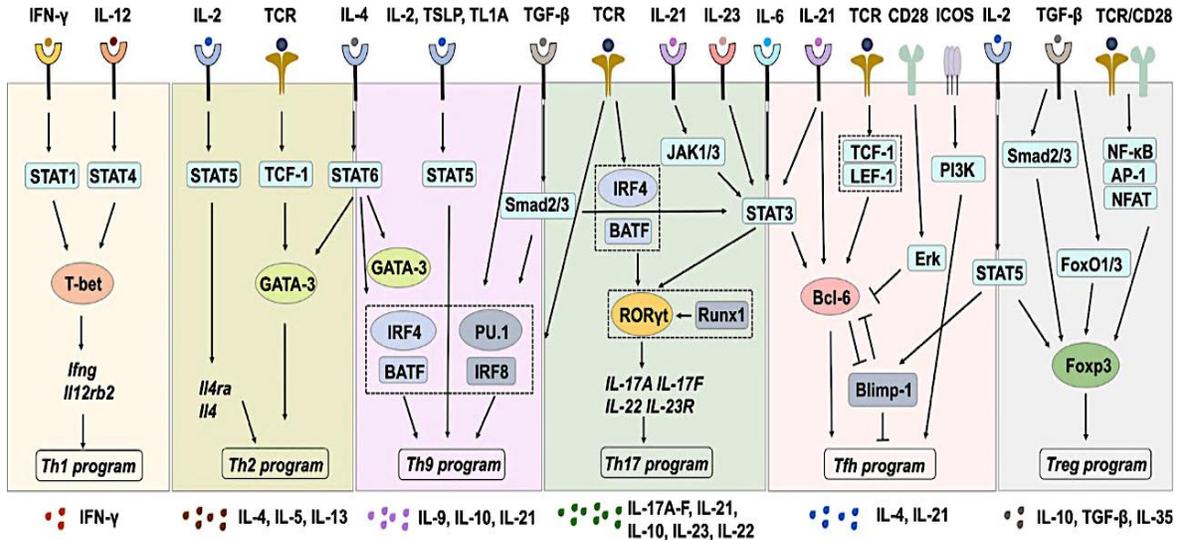
### **1.2.3.3 Tercera señal: microambiente, citocinas y fenotipos**

Además de las señales proporcionadas por el TCR y las moléculas coestimuladoras, la adquisición de un fenotipo efector especializado depende del microambiente en el que se produce la activación de los linfocitos, especialmente

influenciado por el patrón de citocinas liberadas por las APC o por otras células en respuesta al insulto (Corthay, 2006). Estas citocinas dirigen la diferenciación de los linfocitos T hacia distintos subtipos de células efectoras, que se caracterizan por su perfil de secreción de citocinas y por la activación de programas transcripcionales que están íntimamente asociados a sus funciones efectoras (Bonilla & Oettgen, 2010).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se diferencian en linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés *T helper*) que participan prácticamente en todos los aspectos de la inmunidad. Funcionalmente se han descrito distintos tipos de subpoblaciones (Fig. 5). Los linfocitos **Th1**, diferenciados en presencia de IFN- $\gamma$ , IL-12 y la activación del factor de transcripción T-bet, participan en la defensa contra patógenos intracelulares liberando IFN- $\gamma$ . Los linfocitos **Th2**, diferenciados en presencia de IL-2, IL-4 y la activación del factor de transcripción GATA-3, participan en respuestas contra helmintos, facilitan la reparación de tejido y pueden contribuir a la inflamación crónica liberando IL-4, IL-5 e IL-13. Los linfocitos **Th17**, diferenciados a través de IL-6, TGF- $\beta$ , IL-21 e IL-23 junto con la activación del factor de transcripción ROR $\gamma$ t, participan en la respuesta a infecciones por microorganismos extracelulares, especialmente en tejido mucoso, produciendo IL-17, IL-21, IL-10, IL-23 e IL-22. Los linfocitos T reguladores inducidos (**iTreg**), diferenciados en presencia de TGF- $\beta$ , IL-2 y la activación del factor de transcripción Foxp3, suprimen las respuestas inmunes para mantener la tolerancia. Se caracterizan por una alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ , CD25) y por la producción de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35. Los linfocitos **Th9**, requieren IL-4, TGF- $\beta$  y la activación de IRF4 y PU.1 para su diferenciación y se han asociado con alergia, cáncer y enfermedades autoinmunes mediante la producción de IL-9, IL-10 e IL-21. Las células T foliculares (**TFH**), reguladas principalmente por la activación del factor de transcripción Bcl-6, están involucradas en la proliferación y maduración de los linfocitos B en los centros germinales y en la producción de anticuerpos de alta afinidad, liberan IL-4 e IL-2 (Luckheeram et al., 2012; Sun et al., 2023). Posterior a su activación, los LTs CD4<sup>+</sup> efectoras persistirán y se diferenciarán en LTs de memoria que se pueden subdividir en T<sub>CM</sub> (linfocitos de memoria central) caracterizados por la expresión de CD62L y

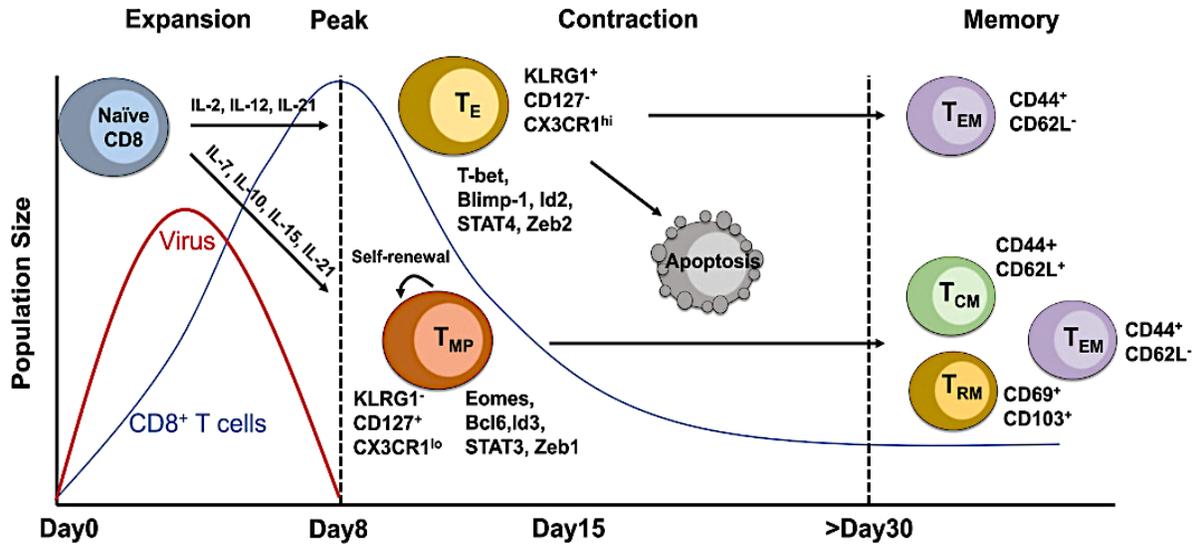
CCR7 y T<sub>EM</sub> (linfocitos de memoria efectora) caracterizados por ser CD62L- y CCR7- (Künzli & Masopust, 2023).



**Figura 5.** Subpoblaciones de linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup>, extraída de (Sun et al., 2023)

Por su parte, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés *cytotoxic T lymphocyte*), los cuales inducen directamente la muerte de las células diana infectadas. Esta subpoblación es bastante heterogénea y se ha identificado una dinámica temporal en su diferenciación. Posterior a la infección y activación de los CTL (Fig. 6), cuando las células alcanzan su pico de proliferación (~ día 8), se pueden identificar dos subpoblaciones: **TE** (CTL efectoras de vida corta) y **TMP** (CTL precursores de memoria). La mayoría de las TE sufrirán apoptosis en la fase de contracción de la respuesta, una vez que se elimina el patógeno (días 8-15), y solo unas cuantas se diferenciarán en **TEM** (CTL de memoria efectora). Por su parte, las TMP continuarán proliferando, dando lugar a células **TCM** (CTL de memoria central), **TRM** (CTL de memoria residentes de tejido) y **TM** (CTL de memoria de larga vida). En términos generales, las CTL con funciones efectoras se diferencian en presencia de IL-2, IL-12, IFN tipo I, IFN- $\gamma$ , IL-21 e IL-27, y la activación de T-bet, Blimp-1, Id2, STAT4 y Zeb2, mientras que las

CTL con funciones de memoria, se diferencian en presencia de IL-7, IL-10, IL-15 e IL-21, y la activación de Eomes, Bcl-6, Id3, STAT3 y Zeb1 (Sun et al., 2023).



**Figura 6.** Subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, extraída de (Sun et al., 2023)

### 1.3 Metabolismo de linfocitos T como cuarta señal de activación

El metabolismo celular permite la extracción de energía de los nutrientes e impulsa la reconstrucción continua de las estructuras celulares. La capacidad de adaptarse para satisfacer distintas demandas energéticas y biosintéticas, así como la de utilizar una diversidad de nutrientes, es fundamental en la biología de los LTs. El estudio de esta capacidad de adaptarse ha ganado relevancia en los últimos tiempos, y ha permitido comprender cómo los LTs reprograman su metabolismo para asegurar la tasa de proliferación y la adquisición de un fenotipo efector, en respuesta a las señales intracelulares generadas a partir del complejo TCR-CD3 y las moléculas co-estimuladoras.

La captación y transporte de glucosa a través de la membrana plasmática constituyen un punto de control metabólico y suelen ser el primer paso limitante en la adopción de un metabolismo altamente glucolítico. Para resolver esta limitación,

las células de mamíferos cuentan con dos familias de transportadores responsables de la entrada de glucosa a la célula. Por un lado, están los cotransportadores de sodio/glucosa (SGLT), que son transportadores activos dependientes de sodio para impulsar la absorción de glucosa y galactosa. Por otro lado, se encuentran los GLUT's, transportadores pasivos que utilizan gradientes de concentración para transportar principalmente hexosas. El genoma humano codifica para 14 GLUT's, los cuales son expresados por la familia de genes *SLC2A* (del inglés *solute linked carrier family 2, subfamily A gene family*) y se dividen en tres clases basadas en su similitud de secuencia y estructura (Long & Cheeseman, 2015; Thorens & Mueckler, 2010).

Los LTs son capaces de captar glucosa a través de diversos transportadores de la familia Glut cuya expresión varía según el estado de activación o la subpoblación efectora (Fu et al., 2023; Macintyre et al., 2014). Durante los procesos de activación, para cumplir con sus demandas energéticas, dependen principalmente de GLUT-1 (*SLC2A1*) (Macintyre et al., 2014), una proteína transmembranal capaz de transportar glucosa, galactosa, manosa y glucosamina (Pragallapati & Manyam, 2019). GLUT-1 consta de 492 aminoácidos, tiene un peso molecular de 54 kDa y su conformación incluye 12 dominios transmembranales (DMT)  $\alpha$ -hélices con sus colas N- y C- terminales orientadas hacia el citoplasma. GLUT-1 cuenta con un sitio de glicosilación en el primer bucle extracelular (localizado entre DMT1 y DMT2) y un gran bucle citosólico (localizado entre los dominios DMT6 y DMT7) el cual contribuye a su estabilidad en membrana, regulando su actividad, tráfico y degradación (Kvainickas et al., 2017; E. E. Lee et al., 2015; Qualls-Histed et al., 2023; Roy et al., 2017; Shinde & Maddika, 2017; Siska & Rathmell, 2015; Steinberg et al., 2013; Wu et al., 2013). Presenta una Km de  $\sim 2$  mM, apenas por debajo de la concentración de azúcar en sangre ( $\sim 4-5$  mM) (Holman, 2020; Long & Cheeseman, 2015; Qualls-Histed et al., 2023).

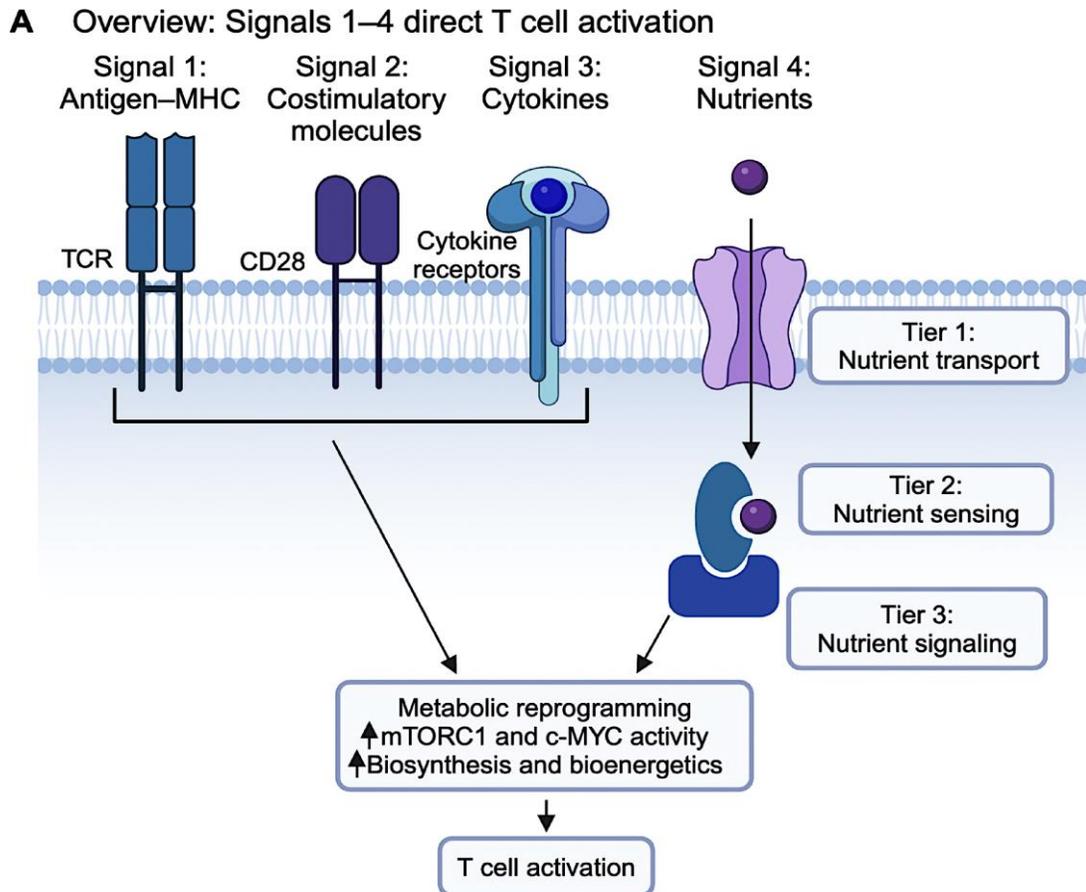
Una vez dentro de la célula, la glucosa se metaboliza a través de la glucólisis, y la energía liberada en este proceso se utiliza para producir compuestos de alta energía como el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) y la producción

neta de dos moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). El último metabolito generado en la glucólisis es el piruvato, que puede ser metabolizado a través de distintas vías.

En los LTs vírgenes que circulan en un estado de quiescencia y se caracterizan por presentar bajas tasas glucolíticas (Geltink et al., 2018; Zhang et al., 2018), el piruvato entra en la mitocondria, donde es completamente oxidado en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA, del inglés *Tricarboxylic Acid Cycle*) para generar más NADH y dinucleótido de adenina y flavina reducido (FADH<sub>2</sub>), los cuales alimentan la fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *Oxidative Phosphorylation*) para generar 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Por otro lado, en LTs activados, que se caracterizan por tener altas tasas glucolíticas (Chapman et al., 2020; Geltink et al., 2018), el piruvato sigue una vía alternativa en la que es reducido a lactato con la finalidad de regenerar dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD<sup>+</sup>), un cofactor necesario para que la glucólisis continúe. Este mecanismo se presenta generalmente en condiciones anaeróbicas, donde el oxígeno no puede funcionar como último aceptor de electrones en la OXPHOS; sin embargo, esta vía también puede ser aprovechada por células con altas demandas proliferativas, incluso en condiciones de oxígeno, lo que se conoce como glucólisis aeróbica o efecto Warburg (DeBerardinis & Chandel, 2020). Este programa metabólico, descrito inicialmente por Otto Warburg en carcinoma de rata (Warburg, 1925), puede ser utilizado por células que requieren afrontar procesos de proliferación como los LTs durante la activación (Lunt & Heiden, 2011). Es importante mencionar que, a pesar de usar la glucólisis aeróbica como principal programa metabólico, la OXPHOS sigue funcionando al ser alimentada por vías alternativas como el  $\alpha$ -cetoglutarato proveniente de la glutamina (Sena et al., 2013).

De esta manera, los LTs son capaces de reprogramar dinámicamente su metabolismo para salir del estado de quiescencia, principalmente incrementando sus tasas glucolíticas para afrontar las demandas energéticas y biosintéticas que conlleva el proceso de expansión clonal y proliferación (Palmer et al., 2015; Salmond, 2018). Esto a su vez se traduce en un aumento en la absorción de

nutrientes, particularmente en el consumo de glucosa pero también de aminoácidos y otros nutrientes esenciales, que funcionan como componentes para la biosíntesis de macromoléculas y la producción de energía, regulando e impactando la activación, proliferación, diferenciación y función de los LTs (S. Ma et al., 2024; Yang et al., 2016).



**Figura 7.** Metabolismo y nutrientes como cuarta señal de activación, extraída de (Raynor & Chi, 2024)

Este creciente entendimiento ha llevado a proponer un cambio de paradigma en el que los nutrientes y la adopción de programas metabólicos específicos se consideran como la cuarta señal de activación de los LTs (Fig. 7). En particular se propone en (Raynor & Chi, 2024) que la señal 4, dada por los nutrientes es un proceso en el que se pueden distinguir tres niveles: 1) la regulación al alza de los

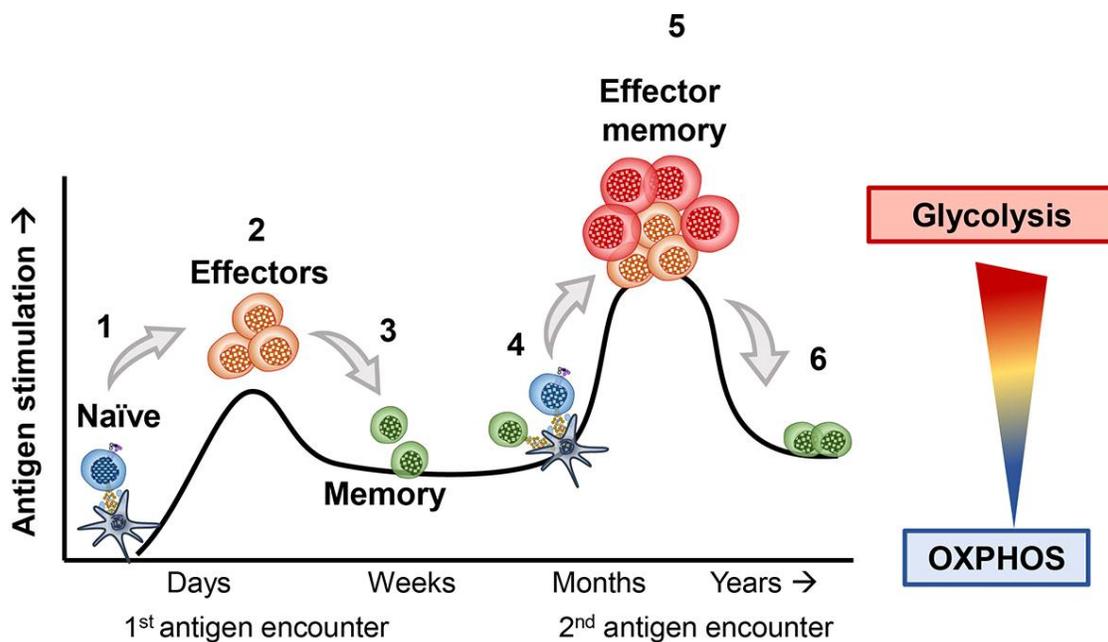
transportadores de nutrientes, 2) la detección intracelular de los nutrientes y 3) la generación de señales que soporten los cambios metabólicos o que resulten de estos mismos. Por otro lado (Shyer et al., 2020), proponen un modelo dual compuesto por señalización "*top-down*" en la que las señales generadas río abajo del TCR, la coestimulación y las citocinas regulan vías de señalización y factores transcripcionales clave en la reprogramación metabólica y la señalización "*bottom-up*" que se refiere a la generación de efectores de la reprogramación metabólica, como los transportadores y metabolitos que regularán a su vez más cascadas de señalización.

### **1.3.1 Plasticidad metabólica en linfocitos T**

La principal adaptación metabólica de los LTs durante los procesos de activación está relacionada con la regulación de las tasas glucolíticas y el aprovechamiento de sus metabolitos intermediarios a través de distintas vías metabólicas (Fig. 8), este fenómeno se ha vinculado con el proceso de diferenciación y las funciones efectoras de diversas subpoblaciones [revisado en (Chapman et al., 2020; Geltink et al., 2018; Lunt & Heiden, 2011; S. Ma et al., 2024; Palmer et al., 2015; Rangel Rivera et al., 2021; Raynor & Chi, 2024; Salmond, 2018; Shyer et al., 2020; Yang et al., 2016)]. En particular la adopción de un metabolismo altamente glucolítico se encuentra mediado por la sobreexpresión del transportador GLUT-1 en la membrana plasmática de los LTs (Macintyre et al., 2014; Michalek et al., 2011).

Específicamente, en LTs CD4<sup>+</sup> se ha demostrado que las subpoblaciones efectoras Th1, Th2 y Th17 presentan mayores tasas glucolíticas, en concordancia con una mayor expresión de GLUT-1 en la membrana plasmática (Macintyre et al., 2014; Michalek et al., 2011). La importancia de GLUT-1 en los procesos de activación de estas subpoblaciones se ha evidenciado mediante la delección del gen codificante *Slc2a1*, lo cual produce una reducción en el número de timocitos y una inhibición significativa de la proliferación y función de las subpoblaciones Th1 y Th17 (Macintyre et al., 2014). Además, la inhibición de la vía glucolítica a través de inhibidores de la captación de glucosa como 2-desoxiglucosa (2-DG), CG-5 o

rapamicina, resulta en una inhibición de la diferenciación de las subpoblaciones Th1 y Th17. No solo eso, sino que la reducción del metabolismo glucolítico promueve la diferenciación de iTreg (W. Li et al., 2019; Shi et al., 2011), lo cual se explica por el hecho de que esta subpoblación cumple sus demandas energéticas principalmente a través de la oxidación de ácidos grasos libres (FAO, del inglés *fatty acid oxidation*), se ha demostrado que inclusive los iTreg suprimen la expresión de GLUT-1 (Berod et al., 2014; Michalek et al., 2011).



**Figura 8.** Adaptaciones metabólicas durante los procesos de activación de linfocitos T, extraída de (Rangel Rivera et al., 2021)

De manera similar las subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8<sup>+</sup> muestran un metabolismo altamente glucolítico que respalda su diferenciación y función (S. Ma et al., 2024). Sin embargo, existen diferencias significativas entre LTs CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los CTL requieren una demanda glucolítica superior debido a su mayor tasa de proliferación (De Boer et al., 2003). Además, no muestran una dependencia estricta de GLUT-1 para proliferar o cumplir con sus funciones efectoras, ya que esta subpoblación respalda su programa metabólico en conjunto

con la expresión del transportador de glucosa de alta afinidad GLUT-2 (H. Fu et al., 2023).

### **1.3.2 Papel de las señales proporcionadas por las moléculas co-estimuladoras en la reprogramación metabólica**

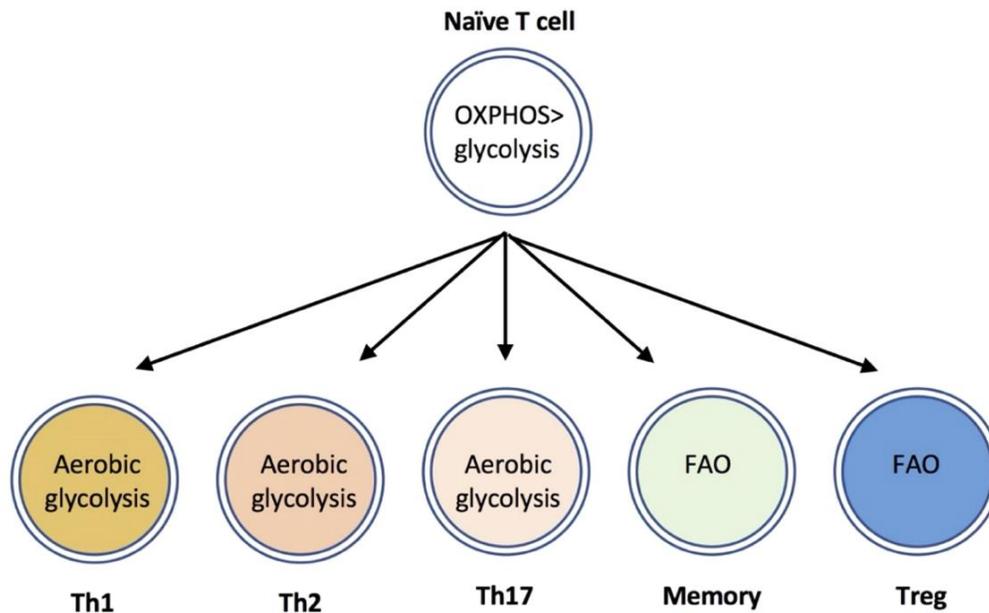
Aunque la señalización a través del TCR es necesaria y, por sí sola, puede promover un aumento en el consumo de glucosa, en ausencia de coestimulación, el consumo de glucosa disminuye notablemente. Actualmente se considera a la coestimulación, ejemplificada en este caso por CD28, como el principal regulador de la expresión de GLUT-1 en la membrana y del aumento subsecuente en el consumo de glucosa (Frauwirth et al., 2002), y se ha identificado al eje PI3K-AKT-mTOR (principalmente mTORC1) y a la activación de los factores de transcripción c-Myc y HIF-1 $\alpha$  como los principales reguladores asociados a la reprogramación metabólica (S. Ma et al., 2024).

La quinasa mTOR (del inglés *mammalian Target Of Rapamycin*) es una serina/treonina quinasa que puede formar dos complejos de señalización que varían en su composición y en la unión con distintas proteínas (Foster & Fingar, 2010). Por un lado, el complejo mTORC2, caracterizado por su unión a la proteína de andamiaje RICTOR, que es activado a través de PDK1 y AKT. Este complejo se ha relacionado con las respuestas a factores de crecimiento y citocinas, y es necesario para la activación de su contraparte, mTORC1. Este último se caracteriza por su unión a la proteína de andamiaje RAPTOR y es activado principalmente en respuesta al eje PI3K-AKT, por las señales co-estimuladoras de CD28. Si bien mTORC1 cuenta con diversas funciones, principalmente se relaciona con la reprogramación metabólica y la proliferación celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, sus efectores clave incluyen reguladores de la traducción como la proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (4EBP, del inglés *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein*), la cual al ser fosforilada por mTORC1 provoca que se disocie del complejo de iniciación de la traducción eIF4F, lo cual promueve la traducción proteica. Por otro lado, la

fosforilación de la quinasa S6K (del inglés *ribosomal protein S6 Kinase*) aumenta la capacidad de síntesis proteica de la célula (Palmer et al., 2015; Salmond, 2018).

Existe una sólida evidencia que posiciona a los complejos mTOR como reguladores centrales en la remodelación metabólica y la adopción de funciones efectoras en linfocitos a través de la reprogramación metabólica al promover la glucólisis aeróbica (Fig. 9). En particular, la inhibición de las vías mediadas por mTORC1 mediante el uso de rapamicina reduce significativamente la regulación de los transportadores y enzimas relacionadas con la vía glucolítica, evitando la diferenciación de los fenotipos Th1 y Th17 principalmente (Fig. 9), favoreciendo además la formación de Treg (Delgoffe et al., 2011; Shi et al., 2011). En consistencia con lo anterior, la delección de mTOR en LTs provoca una falta de diferenciación en subpoblaciones Th1, Th2 y Th17 (Delgoffe et al., 2009). En estudios adicionales, se observó que la delección de RHEB (una GTPasa necesaria para la activación de mTORC1) impide la diferenciación de LTs en las subpoblaciones Th1 y Th17, mientras que la diferenciación de Th2 permaneció normal y posteriormente se asoció con la función de mTORC2 (Delgoffe et al., 2011; Lee et al., 2010). Además, la deficiencia de RAPTOR demostró ser necesaria para la diferenciación de Th17, pero no para Th1 (Kurebayashi et al., 2012). Se ha demostrado, además, que mTOR estimula la actividad del factor de transcripción c-Myc, el cual desempeña un papel clave en la reprogramación metabólica en respuesta a la activación (Wang et al., 2011). Este factor induce la expresión de todas las enzimas glucolíticas, así como de GLUT-1, promueve el metabolismo de la glutamina mediante la inducción de los transportadores de glutamina: SLC3A2, SLC5A1 y SLC7A1, además de aumentar la expresión de las enzimas clave de la glutaminólisis las glutaminasas (GLS), GLS1 y GLS2 [revisado en (Yang et al., 2016)]. Se ha demostrado que la inhibición de c-Myc en LTs disminuye significativamente las vías glucolíticas y glutaminolíticas, limitando la proliferación celular (Wang et al., 2011; Yang et al., 2016). Además, mTOR puede promover la actividad de HIF-1 $\alpha$ , un factor transcripcional relacionado con la adaptación metabólica que se activa en respuesta a entornos hipóxicos, como el MALT y tejidos con inflamación crónica. El aumento en los niveles de HIF-1 $\alpha$  induce la expresión

de ciertos genes en las vías glucolíticas, incluido GLUT-1, y se ha descrito como un factor de transcripción esencial en la diferenciación Th17 (Shi et al., 2011).



**Figura 9.** Programas metabólicos de las subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, extraída de (Salmond, 2018)

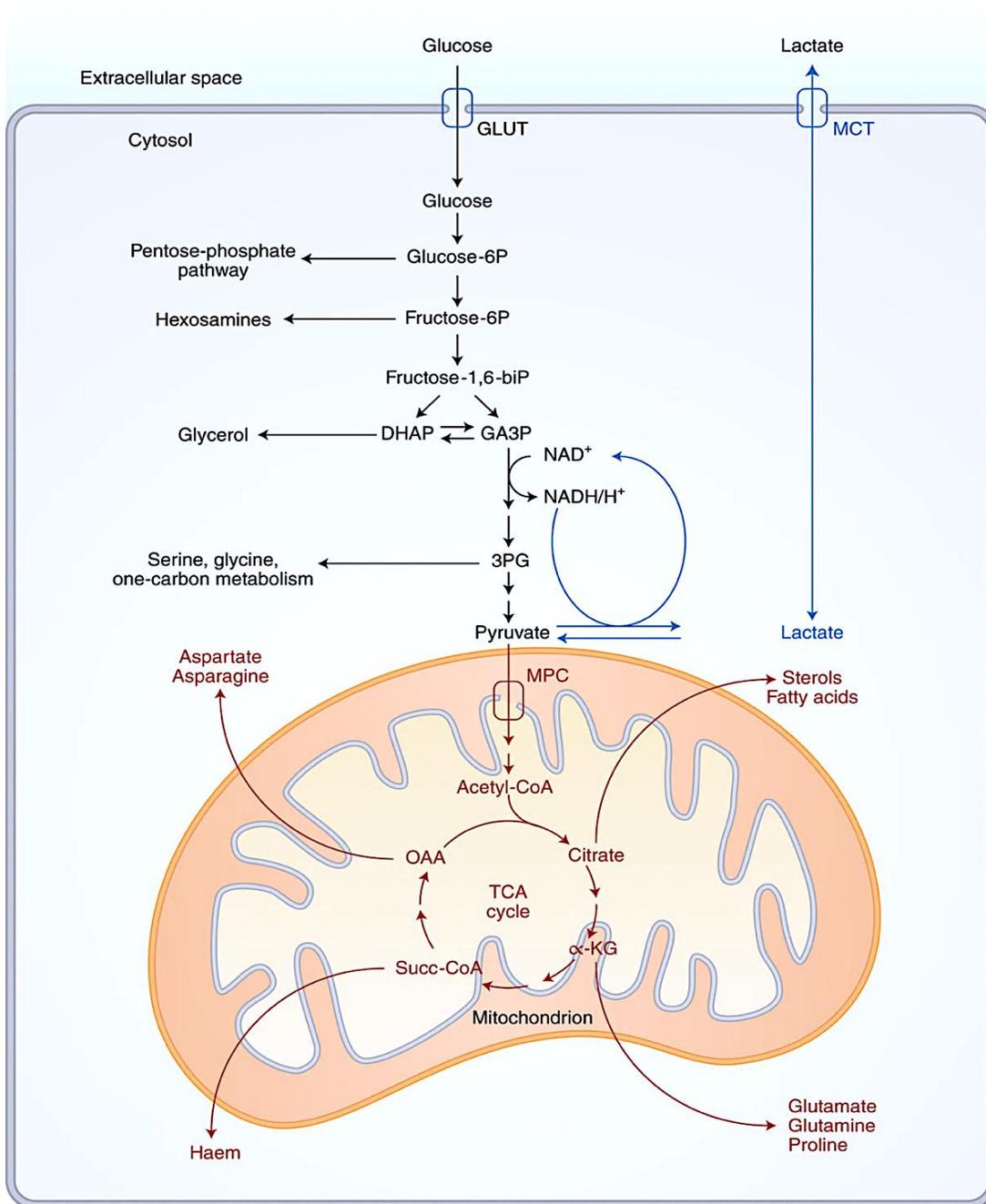
Dado que mTOR, particularmente el complejo mTORC1, está relacionado con las reprogramaciones metabólicas, actúa como un sensor de nutrientes que se regula en respuesta a la disponibilidad de estos. En especial, el metabolismo de aminoácidos como glutamina, leucina, arginina y metionina actúa como potente activador de la actividad de mTORC1 mediante diferentes mecanismos [revisado en (Ma et al., 2024; Raynor & Chi, 2024)].

### 1.3.3 Mecanismos que sustentan a la glucólisis aeróbica como un programa metabólico esencial en la función de linfocitos T

Puede parecer contradictorio que los LTs activados, al ser células con alta demanda de energía, utilicen un proceso relativamente ineficaz para la producción de ATP. Sin embargo, existen dos mecanismos principales que explican esta dependencia.

Por un lado, el aumento en el flujo glucolítico favorece la acumulación y el desvío de intermediarios de la glucólisis hacia vías no mitocondriales que contribuyen a la biosíntesis macromolecular (Figura 10). Entre estas vías se incluyen: la vía de las pentosas fosfato (PPP, del inglés *Pentose Phosphate Pathway*), que produce ribosa para los nucleótidos y el cofactor NADPH, esencial para la síntesis de lípidos y el reciclaje de glutatión; la vía de las hexosaminas, que genera UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), necesario para la glicosilación de proteínas; el metabolismo de la serina-glicina, fundamental para generar compuestos de un carbono que alimentan la síntesis de glutatión, nucleótidos y reacciones de metilación; y la producción de glicerol, que es crucial para la síntesis de lípidos (DeBerardinis & Chandel, 2020; Lunt & Heiden, 2011).

Por otro lado, las enzimas involucradas en la vía glucolítica son capaces de regular las funciones efectoras de los LTs. La enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) puede inhibir la traducción de IFN $\gamma$  al unirse a la región 3' no traducida (UTR) del mRNA del gen *Irfg*. De esta manera, la glucólisis aeróbica mantiene a la enzima GAPDH activa en esta vía, evitando así su función alternativa (Chang et al., 2013). De manera similar, la enzima enolasa 1 (Eno1) puede interferir con la expresión de FOXP3 cuando no participa en la glucólisis, inhibiendo la generación de Treg (De Rosa et al., 2015). Por otro lado, existen enzimas que son capaces de inducir modificaciones epigenéticas que promueven la función; en LTs Th1 la expresión de lactato deshidrogenasa A (LDHA) induce el mantenimiento de los niveles de Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA), la cual es necesaria para la acetilación H3K9 (H3K9Ac) del promotor del gen *Irfg*, la cual promueve la expresión de este gen (Peng et al., 2016).



**Figura 10.** Metabolismo central de la glucosa, extraída de (DeBerardinis & Chandel, 2020).

En resumen, la glucólisis aeróbica es esencial en el mantenimiento, activación y diferenciación de las subpoblaciones de LTs. Dado que la captación de glucosa es el primer paso limitante en este proceso, es necesaria la expresión elevada de

transportadores de glucosa en membrana celular, particularmente GLUT-1. Se ha demostrado que la transición metabólica es promovida principalmente a través de la señalización derivada de moléculas coestimuladoras. Bajo este contexto, si bien CD28 es la molécula de coestimulación prototípica, existen otras que pueden cumplir funciones similares e inclusive suplirla bajo algunos contextos. Entre ellas, la sialomucina CD43 que destaca por sus características, funciones y vías de señalización, sugiriendo un papel potencial en la reprogramación de los LTs.

## **1.4 Sialomucina CD43**

La sialomucina CD43, también llamada sialoforina o leucosialina, es una glucoproteína transmembranal de tipo I que se expresa abundantemente en la membrana de todos los leucocitos, con excepción de los eritrocitos maduros y los linfocitos B en reposo (Eileen et al., 1987; Lee et al., 2005; Wikén et al., 1988). Aunque inicialmente se consideraba una molécula exclusiva de este linaje, avances en el campo evidencian que CD43 puede estar participando en tejidos no linfoides, especialmente en tumores de distintos orígenes (Baeckström, 1997; Batdorf et al., 2017; Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Fu et al., 2013; Santamaría et al., 1996; Sorigue et al., 2018). CD43 es considerada una sialomucina por contener arreglos secuenciales de serina y treonina altamente glicosilados (O-Glicosilación), a los que se unen moléculas de ácido siálico que confieren una carga negativa a esta molécula. Dadas las características y diversidad de funciones con las que cuenta CD43 [revisado en (Torres-Huerta et al., 2018)] y que se resumen a continuación, esta molécula podría estar participando en la promoción de la proliferación y supervivencia a través de reprogramaciones metabólicas.

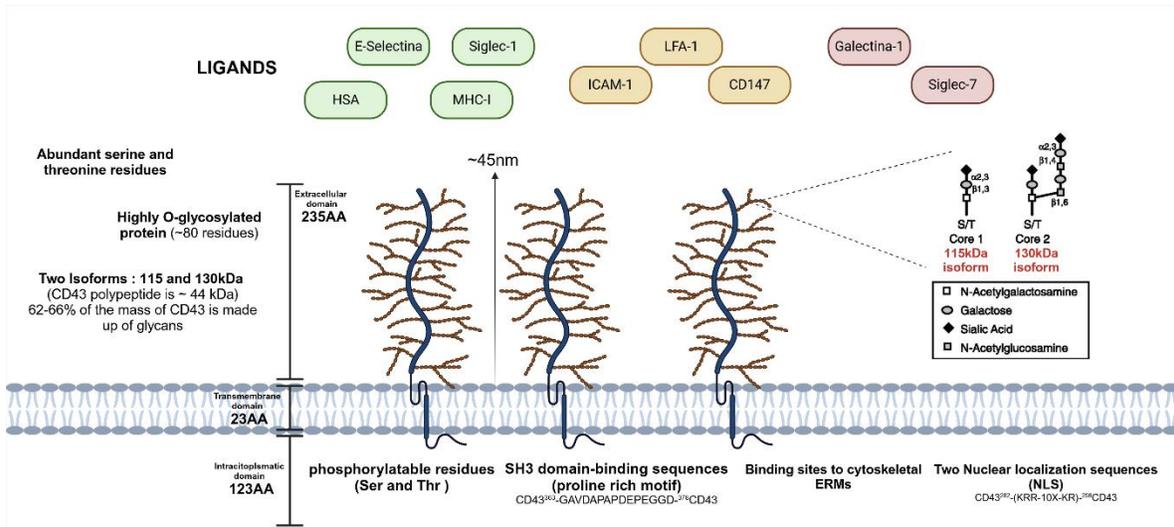
### **1.4.1 Expresión y estructura**

El gen *SPN* que codifica para CD43, se localiza en el cromosoma 16 en humanos (Pallant et al., 1989). Está compuesto por dos exones y un solo intrón, no sufre eventos de splicing alternativo y la proteína se codifica completamente a partir del

segundo exón. Derivado de señales alternativas de poliadenilación se pueden encontrar dos mRNA de 1.9 y 4.3 Kb respectivamente que difieren en la longitud de sus regiones 3'-UTR (Kudo & Fukuda, 1991; Shelley et al., 1989).

CD43 consta de tres dominios estructurales: un dominio extracelular altamente glicosilado y rígido de 235 aminoácidos que se proyecta hasta ~45 nm de la superficie celular, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 123 aminoácidos con distintos motivos de señalización (Fig. 11) (Cyster et al., 1991). Además de ser largo y rígido, el dominio extracelular de CD43 contiene cinco secuencias repetidas de 18 aminoácidos en tándem (Ile<sup>116</sup>-Ser<sup>205</sup>). En esta región rica en residuos de prolina, serina y treonina, se encuentran numerosas moléculas de galactosa y N-acetilgalactosamina (O-GalNAc), aunque también se encuentran en menores cantidades N-acetilglucosamina, fucosa y manosa. Las cadenas de azúcares, alrededor de 80, presentan uniones O-glicosídicas, pero también se puede encontrar una unión N-glicosídica. Como resultado, los O-glicanos constituyen aproximadamente el 60 % de la masa total de la molécula (Cyster et al., 1991; Shelley et al., 1989).

Los LTs expresan dos isoformas principales de CD43 que difieren en sus patrones de glicosilación y en su expresión a lo largo del desarrollo: una isoforma de 115 kDa decorada principalmente con el tetrasacárido NeuAc( $\alpha$ 2-3)-Gal( $\beta$ 1-3)[(NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc, conocido como Core1, que se expresa predominante en timocitos doble negativos (DN), *single* positivos (SP) y LTs CD4<sup>+</sup> vírgenes, y otra de 130 kDa que contiene el más complejo hexasacárido ramificado NeuAc( $\alpha$ 2-3)-Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc, conocido como Core2, que se encuentra predominantemente en LTs CD8<sup>+</sup> y LTs CD4<sup>+</sup> activados, macrófagos, neutrófilos, y otras células del sistema inmunológico. Estas variaciones en la glicosilación que ocurren tras la activación celular se deben a un aumento en la expresión de la enzima core 2 GlcNAc transferasa (C2GnT), la cual inicia las ramificaciones en los O-glicanos (Clark & Baum, 2012; Fukuda, 2002; Piller et al., 1988).



**Figura 11.** Estructura y ligandos de CD43, creada en BioRender.com. Esquema de estructura de core de glucanos extraída de (Hernandez et al., 2006).

El dominio intracelular de CD43 está conformado por 123 aminoácidos, con una secuencia altamente conservada entre especies (Torres-Huerta et al., 2018). En la secuencia se encuentran once serinas y seis treoninas potencialmente fosforilables (Shelley et al., 1989; Sperling et al., 1995). Asimismo, se han identificado una secuencia rica en prolinas que actúa como andamiaje para proteínas con dominios SH3 (Pedraza-Alva et al., 1996), así como dos sitios de unión a las proteínas adaptadoras de citoesqueleto ezrina, radixin y moesina (ERMs) (Yonemura et al., 1998), que empalman con dos secuencias de localización nuclear (NLS del inglés, *nuclear localization signals*) que consisten en dos grupos de aminoácidos cargados positivamente separados por 10 aminoácidos (KRR-10X-KR), situados en las posiciones 282-296 (Andersson et al., 2004; Torres-Huerta et al., 2018).

#### 1.4.2 Regulación de la expresión y localización de CD43

La regulación en los niveles de expresión de CD43 y su localización en la superficie celular se controla a través de varios mecanismos, como son la regulación de la expresión a través de metilación del promotor del gen (Kudo & Fukuda, 1995), la proteólisis (Bazil & Strominger, 1993; Remold-O'Donnell & Parent, 1995) y su

exclusión o segregación de los sitios de contacto entre células (Allenspach et al., 2001).

La expresión de CD43 en diferentes tejidos, tipos celulares y etapas de diferenciación está regulada principalmente por la metilación de su región promotora, ubicada aproximadamente a 40 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Esta región contiene la secuencia '5-GGGTGGGTGGACGG-3', la cual no presenta una caja TATA clásica, pero muestra una alta actividad transcripcional dependiente de la unión del factor de transcripción Sp1 (Kudo & Fukuda, 1991, 1994). Dicha secuencia permanece no metilada en células que expresan CD43, mientras que está metilada en aquellas que no lo expresan (Kudo & Fukuda, 1995).

El corte proteolítico es un mecanismo clave para regular la expresión de ciertas moléculas en la superficie celular. En el caso de CD43, su proteólisis y desprendimiento ha sido reportada en neutrófilos estimulados mediante TNF $\alpha$  (Campanero et al., 1991), en linfocitos T humanos estimulados con anticuerpos anti-CD43, al imitar su interacción con sus ligandos naturales (Bazil & Strominger, 1993) y en líneas celulares de carcinoma de colon (COLO 205), de leucemia promielocítica crónica (K562) y de leucemia aguda de células T (Jurkat), donde se demostró que el corte del dominio intracelular estaba mediado por la enzima  $\gamma$ -secretasa (Andersson et al., 2005). Aunque no se ha documentado experimentalmente, y se desconoce el mecanismo por el que ocurre, parece ser que este corte proteolítico también ocurre *in vivo* ya que se han encontrado altas concentraciones de la fracción extracelular de CD43 de manera soluble en el suero de individuos sanos (Schmid et al., 1992).

La función precisa de las porciones escindidas de CD43 no ha sido identificada. Se especula que podría regular las interacciones entre el receptor anclado a la membrana y sus ligandos o bien podría ser una forma de regular las señales mediadas por esta molécula. Por otro lado, dado que el dominio intracelular de CD43 contiene señales de localización nuclear, la proteólisis mediada por la  $\gamma$ -secretasa, promueve su traslocación al núcleo donde ejerce una función protectora

contra señales apoptóticas y también puede interactuar con  $\beta$ -Catenina provocando una regulación al alza de sus genes diana *c-MYC* y *CyclinD1* (Andersson et al., 2004; Seo & Ziltener, 2009).

Por último, la localización de CD43 en la membrana celular es regulada durante los procesos de activación. El reconocimiento mediante el TCR de un antígeno induce la exclusión de CD43 de la sinapsis inmunológica y su migración hacia el polo distal contrario de las células por un proceso dependiente de las proteínas adaptadoras de citoesqueleto ERMs (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001; Roumier et al., 2001). En esa localización, CD43, es capaz de seguir generando señales intracelulares y cumpliendo funciones en la regulación de la adhesión celular (del Pozo et al., 1995; Sanchez-Mateos et al., 1995).

### **1.4.3 Ligandos y funciones**

La sialomucina CD43 es una proteína multifuncional y promiscua. Se le han atribuido funciones antagónicas en cuanto a su papel en la regulación de la adhesión homotípica como heterotípica, considerándose como una molécula anti-adhesiva a la vez que como una molécula que favorece la adhesión. Lo que podría considerarse una paradoja puede ser explicado por las características estructurales del dominio extracelular. Por un lado, la estructura rígida y alargada, altamente glicosilada y sialilada, que le confiere una carga neta negativa, posiciona a CD43 como una barrera que dificulta las interacciones celulares. Por otro lado, los O-glicanos, particularmente aquellos del core 2 constituyen una estructura que forma ligandos para diversas moléculas, en particular selectinas (Fukuda, 2002), a través de las cuales CD43 participa en la adhesión celular.

Se han identificado una variedad de ligandos fisiológicos para CD43 (Fig. 11), ninguno de los cuales es exclusivo de esta molécula, ya que cada uno de ellos tiene a su vez sus propios ligandos. Entre los ligandos de CD43 están: ICAM-1 (Rosenstein et al., 1991), galectina-1 (Hernandez et al., 2006), el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) (Stöckl et al., 1996), albumina sérica humana (HSA)

(Nathan et al., 1993), E-Selectina (Matsumoto et al., 2005; Velázquez et al., 2016), Siglec-1 (van den Berg et al., 2001) Siglec-7 (Yoshimura et al., 2021), nucleolina (Hirano et al., 2005), LFA-1 y CD147 (Khunkaewla et al., 2008). La interacción con cada uno de sus ligandos en contextos específicos ha puesto en evidencia un papel dinámico y plástico de CD43 en la regulación de las interacciones y funciones celulares.

CD43 puede tener funciones pro-adhesivas que se han demostrado al bloquear su interacción con otras moléculas mediante anticuerpos anti-CD43 que provocan una disminución en la unión de células linfoides a ganglios linfáticos y vénulas endoteliales [revisado en (Ostberg et al., 1998)]. En adición, la E-Selectina (que se expresa principalmente en células endoteliales) interactúa con la isoforma de 130 kDa de CD43, lo que favorece el rodamiento de LTs activados sobre el endotelio vascular durante la extravasación de las células inmunitarias hacia el sitio del insulto (Matsumoto et al., 2005; Velázquez et al., 2016). Por otro lado, la interacción entre CD43 de LTs en reposo y el MHC-I en APC promueve un proceso de transactivación que mejora a su vez la unión entre CD2 y CD58, aumentando la adhesión y sugiriendo un posible papel de CD43 en las primeras etapas de activación (Stöckl et al., 1996). Siglec-1 (expresado abundantemente en macrófagos) se reconoció también como un ligando para las dos isoformas de CD43, sugiriendo un posible papel en las interacciones entre LTs y macrófagos (van den Berg et al., 2001).

En contraste con estas observaciones, se ha reportado que CD43 puede actuar como una molécula anti-adhesiva. En estudios con esplenocitos y timocitos de ratones deficientes en CD43 (CD43<sup>-/-</sup> / CD43KO) se observó una mayor adhesión homotípica y una mayor unión a moléculas como ICAM-1, lo que sugiere en inicio que CD43 podría estar regulando la interacción de ICAM-1 con sus ligandos como LFA1 (Manjunath et al., 1995). Por otro lado, se demostró que la interacción de CD43 en distintos complejos con LFA-1 y CD147 puede afectar la adhesión y agregación celular (Khunkaewla et al., 2008). Otros estudios han validado el papel dual de CD43 en la adhesión celular, demostrando que el entrecruzamiento de CD43 en la membrana celular mediante diversas clonas de anticuerpos anti-CD43

puede tanto promover la adhesión homotípica como inhibirla (Drew et al., 2005; Layseca-Espinosa et al., 2003; Nong et al., 1989; Rosenkranz et al., 1993; Sanchez-Mateos et al., 1995; Stöckl et al., 1996; Stockton et al., 1998).

En adición a la participación de CD43 en la regulación de las funciones adhesivas, la unión de CD43 con sus ligandos y la señalización intracelular que se desencadena, hacen de CD43 una molécula que participa en la regulación de funciones celulares. La interacción de la galectina-1 con la isoforma de 130KDa de CD43 dispara diversas señales dependiendo del tipo celular. En células dendríticas humanas, la interacción activa a las células, promoviendo la producción de citocinas, la regulación al alza de metaloproteasas y una mayor migración (Fulcher et al., 2009). En LTs activados, esta interacción actúa como un regulador positivo de la apoptosis, muy probablemente al generar *clusters* de galectina-1 y facilitar su reconocimiento mediante CD7 el cual es el responsable directo de inducir muerte celular por galectina-1 (Hernandez et al., 2006; Perillo et al., 1995). Por otro lado, la interacción específica con siglec-7 forma parte de un mecanismo regulador que podría estar implicado en la evasión inmune de células tumorales que expresan CD43, ya que se demostró que la interacción Siglec-7 – CD43 envía señales inhibitoras a través de Siglec-7 que suprimen la función de células NK (Yoshimura et al., 2021).

En resumen, la diversidad de ligandos asociados y la variedad de funciones que CD43 puede desempeñar sugieren un papel complejo en la adhesión y/o activación celular. Esto se debe a su capacidad para ejercer efectos que, aunque aparentan ser opuestos, son en realidad dependientes del contexto inmunológico, de la temporalidad de la respuesta, de la isoforma específica con la que se da su interacción, y muy probablemente de los ligandos con los que interactúa en un microambiente específico. La combinación de estos factores convierte a CD43 en una molécula con una red de funciones y regulación excepcionalmente compleja.

#### 1.4.4 Señalización de CD43: una molécula accesoria

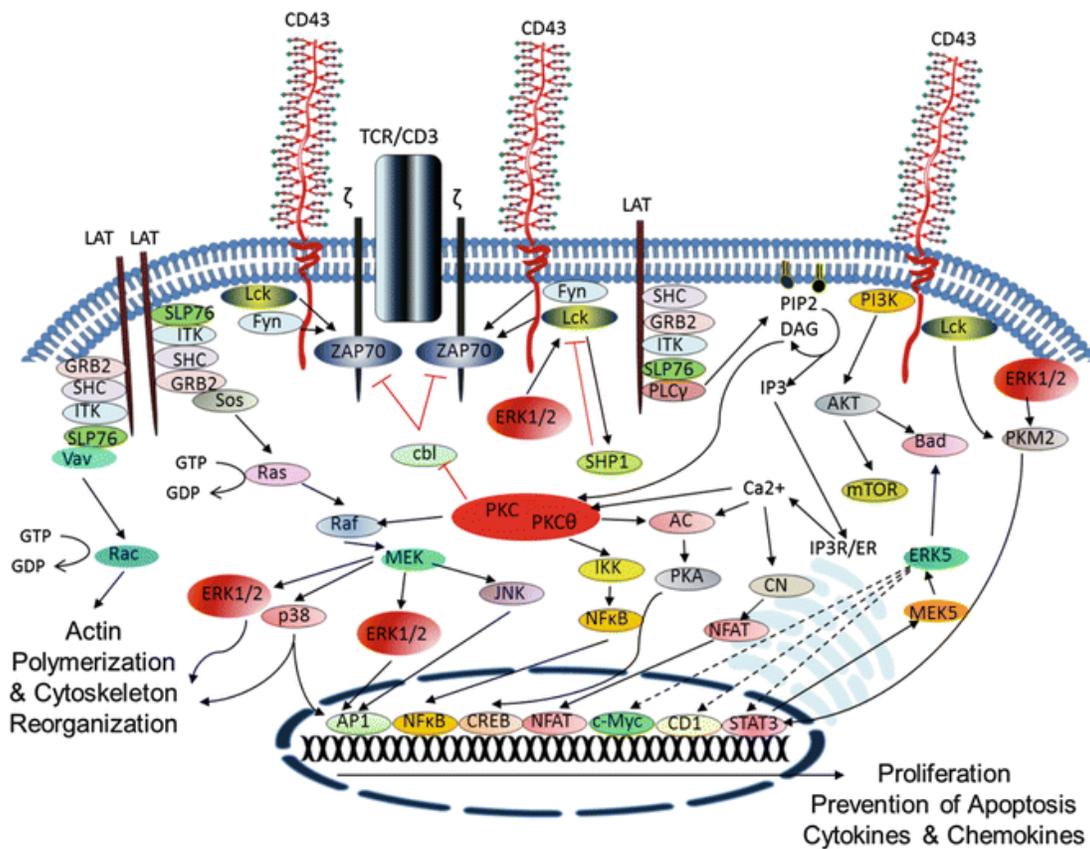
La capacidad de CD43 para transmitir señales de activación depende de su dominio intracitoplasmático y ha sido mejor caracterizada en LTs (Fig. 12), donde su función como molécula coestimuladora es aceptada y se considera independiente de CD28 (Park et al., 1991; Sperling et al., 1995).

En LTs las señales generadas a partir del ligamiento de CD43 con anticuerpos monoclonales induce la activación de las tres vías esenciales en la activación de los LTs a través de la generación de segundos mensajeros como DAG e IP<sub>3</sub>; la vía mediada por Ca<sup>2+</sup>, la vía de las MAPK y la activación de PKC $\theta$  (del Rio et al., 2004; Silverman et al., 1989). El entrecruzamiento de CD43 en células T humanas induce su asociación con las quinasas de la familia Src, Lck y Fyn, a través de la interacción de sus dominios SH3 y la región rica en prolina de CD43 (Cruz-Muñoz et al., 2003; Pedraza-Alva et al., 1996). Esto conduce a la fosforilación de la cadena  $\zeta$  del CD3 y al ensamblaje de complejos macromoleculares que incluyen proteínas adaptadoras como Shc, Grb2, SLP-76, y el factor de intercambio de guanina Vav (Pedraza-Alva et al., 1998). La formación de estos complejos de señalización promueve la activación de la vía MAPK ERK1/2, lo que lleva a la regulación del citoesqueleto de actina (Layseca-Espinosa et al., 2003) y a un bucle de retroalimentación positiva para la señalización de Lck como resultado de la fosforilación de la serina<sup>59</sup> de Lck dependiente de ERK1/2, lo que inhibe su asociación con la fosfatasa SHP-1 (Fierro et al., 2006). La interacción de CD43 también induce flujos de calcio a través de la generación de IP<sub>3</sub> y activación de PKC mediada por DAG, se ha demostrado que, la pre-estimulación de los LTs a través de CD43 antes de recibir la señalización mediada por el TCR, PKC $\theta$  se activa y fosforila a cbl, disminuyendo así la actividad de E3 ligasa de cbl, lo que favorece la activación de las células a través de una mayor fosforilación de Zap-70 y la cadena  $\zeta$ , esto a su vez lleva a una mayor activación de la vía de las MAPK (Pedraza-Alva et al., 2011).

En conjunto, la señalización mediada por CD43 da como resultado un aumento en la actividad de unión a DNA de los factores de transcripción AP-1, NF- $\kappa$ B y NF-AT, así como la expresión de IL-2, sin requerir señales adicionales de otras moléculas

receptoras (Santana et al., 2000), en su conjunto esto resulta esencial para lograr una respuesta robusta de LTs y además ayudan a disminuir el umbral de activación.

Otras vías generadas a partir de CD43 en linfocitos T se dan mediante la coestimulación de CD43 y el TCR, lo que resulta en la fosforilación en la posición Y<sup>105</sup> de la isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2), de manera dependiente de LCK, lo cual favorece su forma dimérica y su traslocación a núcleo donde induce la fosforilación de la Y<sup>705</sup> de STAT3, como resultado se activa la vía MEK5/ERK5 que activa la localización nuclear de NF-κB, Myc y la fosforilación de BAD (Bravo-Adame et al., 2017; Luo & Semenza, 2011).



**Figura 12.** Señalización mediada por CD43, extraída de (Torres-Huerta et al., 2018).

## 1.4.5 CD43 y su participación en patologías

### 1.4.5.1 CD43 y cáncer

Por mucho tiempo se consideró que CD43 era una molécula exclusiva de linaje hematopoyético. Sin embargo, cada vez ha surgido más evidencia que asocia su presencia en tipos tumorales tanto de origen hematopoyético, como no hematopoyético. Se ha demostrado que CD43 se encuentra sobre-expresado en una variedad de tumores hematopoyéticos (Sorigue et al., 2018) y su expresión se ha correlacionado con una esperanza de vida menor en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) (Li et al., 2021) y en pacientes con linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (Ma et al., 2018). Sorprendentemente, se registra un número cada vez mayor de publicaciones sobre la expresión anormal de CD43 fuera del linaje hematopoyético, en específico en tumores sólidos y líneas celulares de cáncer de mama, cuello uterino, tiroides, pulmón, páncreas y colon (Batdorf et al., 2017; Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Fu et al., 2013; Santamaría et al., 1996).

Las evidencias experimentales sugieren que la participación de CD43 en los procesos de transformación celular podría influenciar de manera positiva los procesos de proliferación, migración y supervivencia a través de la activación de c-myc y ciclina D1 (Andersson et al., 2004). En el cáncer de mama, la presencia de CD43 en el núcleo incrementa la resistencia a la muerte inducida por TNF- $\alpha$  y contribuye a una mayor masa tumoral, aunque este efecto puede ser mitigado reduciendo la expresión de CD43 (Fu et al., 2014). En un modelo *in vitro* de células K562, un modelo de leucemia mieloide crónica, se demostró que la interacción de CD43 con su ligando Siglec-7 inhibe la citotoxicidad mediada por células NK sobre esta línea tumoral, sugiriendo que al actuar como un ligando de Siglec-7, CD43 tiene un papel inhibitorio sobre la actividad citotóxica de las células NK (Fu et al., 2013; Yoshimura et al., 2021). La administración de un anticuerpo anti-CD43 humano (clona UN1 mAb) inhibe el crecimiento tumoral de ratones inoculados con células HPB-ALL un modelo de leucemia linfoblástica aguda, lo que posiciona a CD43 como un posible blanco terapéutico (Tuccillo et al., 2014). En células MLL/AF9, un modelo de leucemia de ratón, se ha demostrado que los altos niveles de ácido siálico

presentes en CD43 y su carga negativa protegen a las células de la lisis mediada por los LTs CTL CD8<sup>+</sup> (Hasegawa et al., 2016)

Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que en las líneas celulares CaSki (cérvix), A549 (pulmón) y DLD-1 (colon), aumenta la proliferación celular en respuesta a la presencia de CD43. Específicamente en células A549 post-confluencia, CD43 incrementa la expresión de AKT, una cinasa crucial en la vía PI3K/AKT/mTOR, implicada en la proliferación y supervivencia celular y la cual es considerada como un factor clave en el desarrollo del cáncer. Además, de que CD43 protege a las células A549 de la muerte inducida durante el ayuno y post-confluencia. La reducción de CD43 mediante siRNA aumenta la proporción de células muertas y los niveles de caspasa 3 activa (Camacho-Concha et al., 2013). También se demostró que la expresión de CD43 en células A549 contribuyen significativamente a la remodelación del microambiente tumoral (TME), favoreciendo la secreción de proteínas que facilitan la reorganización de la matriz extracelular, la angiogénesis y la degradación de colágeno, todos estos factores claves en la progresión del cáncer (Vega-Mendoza et al., 2021).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1 HIPÓTESIS**

Las señales dependientes de la sialomucina CD43 promueven la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 en la membrana de linfocitos T.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si las señales producidas a través de la sialomucina CD43 promueven la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 en la membrana de linfocitos T y de células Jurkat, y si esto incide a su vez en la disponibilidad/producción de metabolitos como la glucosa, el lactato, la glutamina y el glutamato.

### **2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Evaluar el efecto de la coestimulación mediada por CD43 en la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 en dos modelos distintos, linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos y células Jurkat, comparándolo con la coestimulación mediada por CD28.
- 2.-Determinar si las señales de CD43 y CD28 incrementan la expresión de GLUT-1 en células Jurkat, y evaluar si esto afecta el consumo de glucosa y la liberación de lactato.
- 3.-Investigar si las señales de CD43 y CD28 promueven la glutaminólisis en células Jurkat, evaluando el consumo de glutamina y la liberación de glutamato.
- 4.-Analizar si existe una correlación entre la expresión de CD43 y GLUT-1 en diferentes tipos de cáncer, utilizando bases de datos públicas, para sustentar el posible papel de CD43 en la remodelación metabólica de las células tumorales.

# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 Cultivo celular

Las células Jurkat se cultivaron en medio Advanced RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone, GE Healthcare Life Sciences,), L-Glutamina 2mM, penicilina (50U/mL) y estreptomina (50µg/mL) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y ~95% de humedad relativa. Se realizó el pasaje de las células cada ~2 días para permanecer a una concentración de ~1x10<sup>6</sup> células/mL. Las células se usaron entre los pases 5 y 20.

### 3.2 Purificación de linfocitos T CD4+

Se utilizaron paquetes leucocitarios de donadores varones anónimos sanos, provenientes del banco de sangre del Centro Estatal para la Trasfusión Sanguínea (Cuernavaca, Morelos, México). El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del IBt. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) se separaron mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Lymphoprep (Axis-Shield) y se suspendieron a una densidad de 2x10<sup>6</sup> células/mL en RPMI-1640 suplementado con SFB al 2%, penicilina (50 U/mL), estreptomina (50µg/mL), 2mM de glutamina, 50 µM de 2-mercaptoetanol y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en placas de poliestireno de 100 mm durante 12 horas para promover la adhesión de monocitos y el arresto celular. Las células no adheridas se recuperaron y se realizó purificación de linfocitos T totales (CD3<sup>+</sup>) mediante separación magnética por selección negativa utilizando el "*pan T cell Isolation Kit*" (Miltenyi Biotec GmbH,). Las células "no T" se marcaron con un coctel de anticuerpos monoclonales (anti-CD14, -CD15, -CD16, -CD19, -CD34, -CD36, -CD56, -CD123 y -CD235a) conjugados con biotina durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario anti-biotina acoplado a perlas magnéticas durante 30 minutos a 4°C. Las células marcadas se transfirieron a una columna LS (Miltenyi Biotec GmbH) se eluyeron y colectaron como la fracción de linfocitos T purificados.

La pureza de las células se determinó mediante citometría de flujo con un anticuerpo PE-anti-CD3 humano (1 µg/mL, clona FN50, Biolegend, San Diego CA.), siendo la pureza mayor al 90%.

La población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se purificó y aisló por selección negativa a partir de la fracción de linfocitos T CD3<sup>+</sup> marcando los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con un anticuerpo VB510-anti-CD8 humano (1.5 µL/1x10<sup>6</sup> células, clona SK1, Biolegend), para posteriormente seleccionar y aislar la población celular “no teñida” correspondiente a linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante el citómetro BD FACS Aria Fusion Sorter (BD, Biosciences) con una eficiencia de separación mayor al 95%. La pureza se validó analizando las muestras separadas y confirmando que la positividad para el anticuerpo VB510-anti-CD8 humano era menor al 1%. Después del proceso de *sorting*, las células se resuspendieron en RPMI advanced-1640 suplementado con SFB al 5%, penicilina (50 U/mL), estreptomina (50 µg/mL), 2mM de glutamina y 50 µM de 2-mercaptoetanol, durante 12 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> antes de ser estimuladas.

### **3.3 Estimulación**

Se estimularon células Jurkat previamente arrestadas durante ~18 horas en RPMI-1640 suplementado con SFB al 2%, penicilina (50 U/mL), estreptomina (50 µg/mL), 2 mM de glutamina y 50 µM de 2-mercaptoetanol o linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados como se describió en el apartado anterior. Se colocaron 200,000 células/pozo en placas de 96 pozos. Para la estimulación se utilizaron anticuerpos; anti-CD3 humano (clona OKT3, IgG2a), anti-CD28 humano (clona CD28.2, IgG1) y anti-CD43 humano (clona L10, IgG1). Los anticuerpos fueron inmovilizados en la superficie de los pocillos incubando 50 µL de una solución de anticuerpo a 10 µg/mL en PBS durante 2 horas a 37°C (el primer anticuerpo pegado fue el anti-CD3 y posteriormente el anti-CD28 o anti-CD43 según correspondía a la condición). Los pocillos se lavaron 2 veces con 100 µL de PBS para eliminar el anticuerpo no unido y a continuación se sembraron las células en RPMI advanced-1640 suplementado

con SFB al 5%, penicilina (50 U/mL), estreptomina (50 µg/mL), 2mM de glutamina y 50 µM de 2-mercaptoetanol. Las placas se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y ~95% de humedad relativa durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Como control positivo se utilizó PMA a 25 ng/mL y Ionomicina a 1 µg/mL.

### 3.4 Citometría de flujo

Las células ( $2 \times 10^5$ ) se recolectaron en tubos de 5 mL de fondo redondo y fueron fijadas con 200 µL de paraformaldehído al 2% durante 10 minutos a 37°C previo a su tinción.

Para la tipificación las células se tiñeron con alguno de los siguientes anticuerpos: PE-anti-CD3 humano (1 µL, clona OKT3, Biolegend), APC-anti-CD4 humano (2 µL, Biolegend), APC-anti-CD28 humano (2 µL, clona CD28.2, Tonbo Biosciences) y APC-anti-CD43 humano (1 µL, clona DFT-1, Santa Cruz Biotechnology), en un volumen de 50 µL de PBS suplementado con 5% de suero humano y 5% de suero de caballo durante 45 minutos a 4°C protegidos de la luz, posteriormente se lavó el exceso de anticuerpo y las células fueron resuspendidas en 200 µl de PFA hasta su análisis.

Para la medición de *GLUT-1 total*, las células fueron permeabilizadas durante 30 minutos a 4°C con 1 mL de metanol absoluto preenfriado a -20°C, fueron lavadas y se realizó una incubación con 50 µL de una solución de PBS al 5% de suero humano y 5% de suero de caballo durante 30 minutos a 4°C, para evitar uniones intracelulares inespecíficas, posteriormente las células fueron incubadas con 50 µL de una solución del anticuerpo monoclonal A647-anti-Glut1 humano (2 µg/mL, clona EPR3915, Abcam) durante 45 minutos a 4°C protegidas de la luz, seguido fueron lavadas con FACS para retirar el exceso de anticuerpo y como se describió anteriormente en esta sección fueron fijadas y almacenadas hasta su análisis.

Para la medición de *Glut-1 extracelular* las células fueron tratadas de la misma manera omitiendo el paso de permeabilización e incubadas con 50 µL de anticuerpo monoclonal A488-anti-Glut1 humano (8 µg/mL, clona 202915, R&D System). Como

marcador de activación las células se tiñeron con PE-anti-CD69 humano (0.75  $\mu$ L; clona FN50, Biolegend).

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro BD FACSCanto II (BD, Biosciences) mediante la interfaz BD FACSDiva Software y analizadas con el programa FlowJo (Version 10.8.1, FlowJo). Los niveles de expresión fueron representados como el cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI fold-change) y/o el porcentaje de células positivas.

### **3.5 Inmunofluorescencia**

La localización de Glut-1 fue determinada por inmunofluorescencia en células Jurkat estimuladas durante 48 horas como se describe en el apartado 3.3. Al término de la incubación. Las células fueron recuperadas y adheridas a porta-objetos basándonos en el protocolo de (Tsang et al., 2017), donde 100  $\mu$ L de una suspensión celular a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL se dejó sedimentando durante ~30 minutos a temperatura ambiente hasta el secado de la gota. Pasado este tiempo las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol absoluto preenfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y posteriormente incubadas con PBS al 5% de suero humano / 5% suero de caballo durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear interacciones no específicas proteína-proteína. A continuación, las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-Glut1 humano (1  $\mu$ g/mL, clona SPM498, Abcam) toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las células fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (1:1500) por una hora a T.A, protegidas de la luz. Después de remover el exceso de anticuerpo con PBS, las laminillas se incubaron con DAPI (5 ng/mL, LifeTechnologies) durante 10 minutos a T.A, protegidas de la luz. Finalmente, las células fueron lavadas y se montaron con cubreobjetos en una solución de glicerol al 60%. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX81F-3 con una amplificación de 63X e inmersión en agua.

### **3.6 Evaluación del metabolismo Glucolítico y Glutaminolítico**

Las células Jurkat se estimularon durante 24 y 48 horas, como se describe en el apartado 3.3. La concentración de glucosa, lactato, glutamina y glutamato se midió en los sobrenadantes previamente centrifugados utilizando un analizador YSI-2950 (YSI Life Sciences, Estados Unidos). La detección se basa en la descomposición de los metabolitos glucosa, lactato, glutamina y glutamato mediante las enzimas glucosa oxidasa, lactato oxidasa, glutaminasa y glutamato oxidasa, respectivamente. La reacción de descomposición produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual es oxidado en un ánodo de platino, generando un flujo de electrones que, al alcanzar el equilibrio de la reacción, es proporcional de manera lineal a la concentración de  $H_2O_2$  y, por lo tanto, a la concentración del sustrato medido.

### **3.7 RT-qPCR**

Para cada condición se realizó la extracción de RNA total a las 24 y 48 horas post-estimulación utilizando TRIzol® reagent (ThermoFisher). Se utilizó un volumen de 160  $\mu$ L de trizol por cada  $1 \times 10^6$  células y se siguieron las instrucciones del fabricante con la única modificación al protocolo en el tiempo de precipitación del RNA en isopropanol el cual pasó de 10 minutos a T.A. a 24 horas a  $-20^\circ\text{C}$ .

El RNA fue solubilizado en 20  $\mu$ L de  $H_2O$  DEPC, se cuantificó con un espectrofotómetro DeNovix DS-11 y se consideró como RNA de calidad a las muestras que presentaron valores  $260/280 > 1.8$  y  $260/230 > 1.8$ . Para remover contaminación de DNA, 1.5  $\mu$ g de RNA total fueron tratados con DNASE-I (Thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. En este punto se validó la integridad del RNA visualizando las bandas de RNA 18s y 16s utilizando el protocolo descrito por (Aranda et al., 2012) en geles al 1% de agarosa / 1% de cloro comercial. La transcripción inversa a cDNA se realizó a partir de 500 ng de RNA tratado con DNase con el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher).

La PCR en tiempo real (qPCR) se llevó a cabo utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoFisher) utilizando los siguientes cebadores:

- GLUT-1: FW: 5'-CTTTGTGGCCTTCTTTGA AGT-3';  
RV, 5'- CCACACAGTTGCTCCACAT-3'
- GLUT-6: FW, 5'- TCTCAGCGGCCATCATGTTT-3';  
RV, 5'- GGCGTAGCCCATGATGAAGA-3'
- GLUT-8: FW, 5'- TCATGGCCTTTCTCGTGAC-3';  
RV, 5'- TCCTTTAGTTTCAGGGACACAG-3';
- B2M: FW, 5'- TGTCTTTCAGCAAGGACTGGT-3';  
RV, 5'- ATGCTGCTTACATGTCTCGAT-3'.

Para todos los cebadores se utilizó una  $T_m$  de 60°C obteniendo eficiencias de amplificación de entre 90 y 110%. Para el análisis de datos se utilizó el método de Livak, que consiste en calcular el valor  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  para calcular la expresión relativa usando como gen de referencia B2M ( $\beta$ -2-Microglobulina).

### 3.8 Análisis de base de datos GEPIA2

Utilizando la base de datos en línea GEPIA2, enfocada en el análisis interactivo de perfiles de expresión génica, realizamos un análisis pancanceroso de la expresión de genes diana (*SPN* para CD43 y *SLC2A1* para Glut-1) basándonos en las bases de datos de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y *The Genotype-Tissue Expression* (GTEx). En este análisis, se comparó la expresión de CD43 en muestras tumorales de 31 tipos de cáncer de la base de datos TCGA con las muestras normales correspondientes de las bases de datos TCGA y GTEx. La relación entre la expresión de GLUT1 y CD43 se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

### 3.9 Análisis estadístico

Los valores de fold induction para las qPCR, fold-change para las mediciones de actividad glucolítica, MFI fold-change o porcentajes de células positivas para las citometrías fueron representados como la media  $\pm$  media del error estándar (SEM), analizados y graficados mediante la interfaz de Rstudio (Rstudio Team (2021). Versión 4.3.0). Para las pruebas de normalidad de datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff mediante la función *lillie.test* perteneciente a la paquetería nortest (Versión 1.0.4). Los valores fueron graficados mediante las paqueterías ggpubr (Versión 0.6.0) y ggplot2 (Versión 3.4.2). El análisis de comparación entre las medianas de tres o más grupos no relacionados para datos no normales se llevó a cabo mediante las prueba de Kruskal-Wallis, la diferencia entre las distribuciones de valores no normales para dos muestras relacionadas mediante la prueba de Wilcoxon, la diferencia entre las distribuciones de valores no normales para dos muestras no relacionadas mediante la prueba de Mann-Whitney y t de student para la diferencia entre las medias de grupos relacionados o no relacionados de valores con una distribución normal, todos mediante la función *stat\_compare\_means* perteneciente a la paquetería ggplot2 considerando resultados significativos a los resultados con un pValue<0.05.

# **IV. RESULTADOS**

#### **4.1 Las señales coestimuladoras de CD43 en conjunto con las del TCR promueven el aumento de Glut-1 en la membrana de linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Para ampliar nuestro conocimiento con respecto a la participación de CD43 en los cambios metabólicos de linfocitos T evaluamos si las señales dependientes de CD43 promueven un aumento en la expresión de Glut-1 en membrana durante el proceso de activación. Para ello estimulamos LTs CD4<sup>+</sup> de sangre periférica humana durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas a través de estímulos dobles TCR/CD28, TCR/CD43 o bien a través de los estímulos individuales TCR, CD28 y CD43; como controles se utilizaron células no estimuladas (US) y células estimuladas con PMA/Ionomicina (PMA-Iono).

Al término de la purificación, para cada uno de los experimentos se verificó la pureza de las células obtenidas mediante los marcadores CD3, CD4, CD28 y CD43 por citometría de flujo, midiendo el porcentaje de células positivas (~ 95% CD3+, ~92% CD4+ ~99% CD43+ y ~ 90% CD28+) (Fig. 13A). El porcentaje de células positivas y la distribución de la población para los tres marcadores fueron similares en los tres donadores evaluados.

A las 24 horas post-estimulación, se evaluó la expresión del marcador de activación CD69 en los LTs CD4<sup>+</sup> mediante citometría de flujo (Fig. 13B). En concordancia con lo reportado por (Sandoval-Hernández et al., 2024), el estímulo mediante TCR/CD28 indujo la expresión de CD69 en un porcentaje menor de células (76.6%) en comparación con las células estimuladas a través de TCR/CD43 (93.5%) y el estímulo control PMA/Iono (97.9%). Adicionalmente se observa que la coestimulación mediada por CD43 parece inducir la expresión de CD69 de manera más homogénea en la totalidad de la población de LTs, a diferencia del estímulo TCR/CD28 que no induce una expresión homogénea ni con los mismos niveles de expresión de CD69 en esta población. Una vez validado el estado de activación, se procedió a medir la expresión de Glut-1 en membrana.

Considerando que son células de donadores adultos de banco de sangre con buena salud, una alta proporción de LTs serán efectores y de memoria, y una fracción

menor (por lo general <30%) de esos LTs CD4<sup>+</sup> son *naïve* (Bains et al., 2009; Trepel, 1974), es de esperar que en condiciones basales o de no activación, el porcentaje de células que expresan Glut-1 en membrana sea elevado. Nuestros resultados muestran que el porcentaje de LTs positivos oscila entre el 65 y 75% del total de células (Fig. 13D), observándose un incremento de la expresión de Glut-1 en membrana celular desde las 6 y 12 horas en respuesta a los distintos estímulos (Fig. S1).

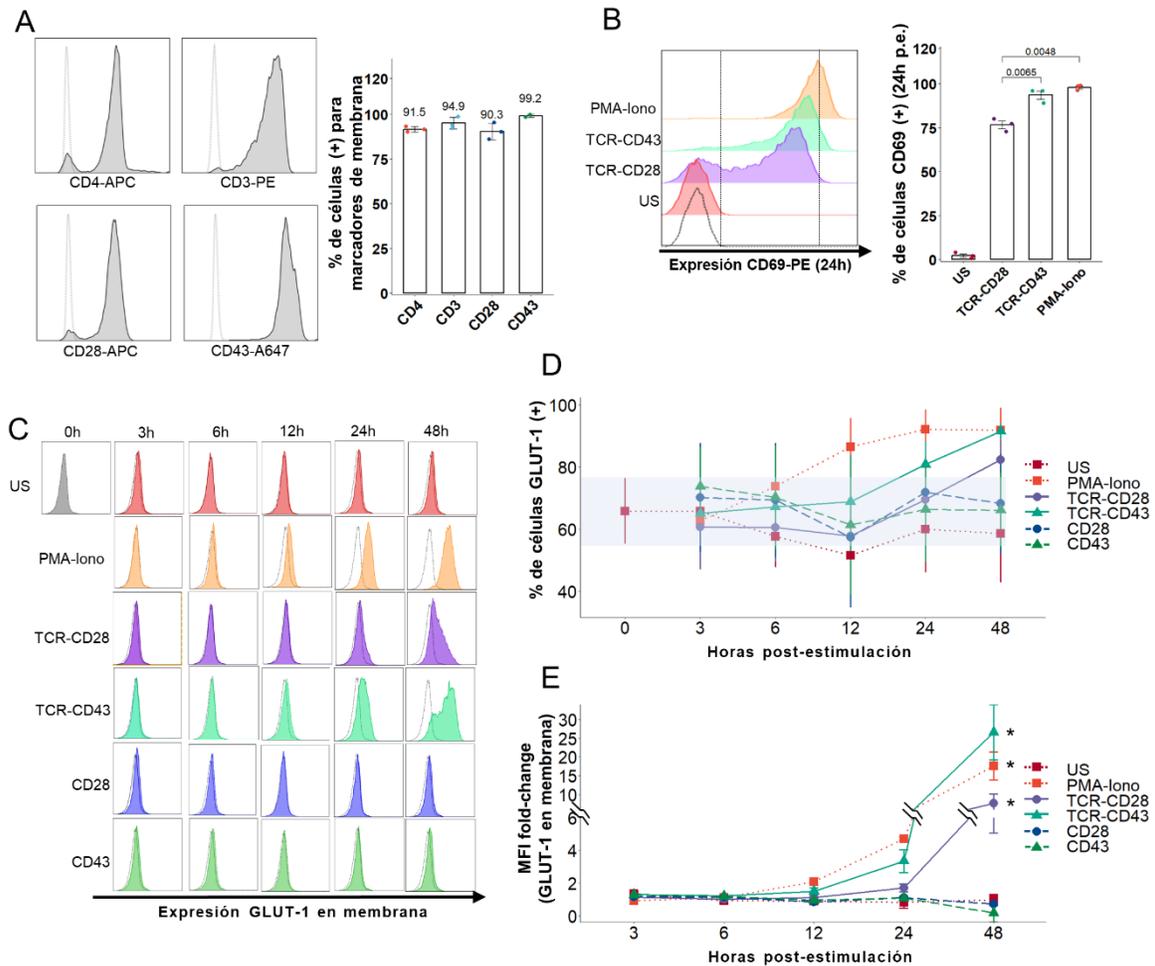
Dependiendo del estímulo, la cinética de expresión mostró diferencias (Fig. 13 C,E). Los estímulos dobles, TCR/CD28 y TCR/CD43, provocaron un aumento progresivo en la expresión de Glut-1, alcanzando niveles máximos a las 48 horas, con una cinética muy parecida a la reportada por (Macintyre et al., 2014). En particular, a las 48 horas post-estimulación, el porcentaje de células positivas para Glut-1 en respuesta al estímulo TCR/CD43 fue comparable al de las células estimuladas con PMA/Ionomicina y ligeramente superior al de aquellas estimuladas con TCR/CD28 (Fig. 13D).

La expresión de Glut-1 aumentó aproximadamente 27 veces en las células estimuladas con TCR/CD43 y aproximadamente 8 veces en las células estimuladas con TCR/CD28 en comparación con las células no estimuladas (US) (Fig. 13E). Fue el estímulo TCR/CD43 el que promovió un aumento mucho mayor en los niveles de expresión de Glut-1, alcanzando niveles ~19 veces mayores en comparación con las células tratadas con TCR/CD28 y ~9 veces mayor que las células estimuladas con PMA/Ionomicina.

A diferencia de los estímulos TCR/CD28 y TCR/CD43, los estímulos simples, CD28 y CD43, provocaron solo un modesto incremento en el nivel de expresión de Glut-1, con un fold-change máximo de 1.14 y 1.18 respectivamente a las 6 horas. Sin embargo, estos niveles no se sostienen y se empalman eventualmente con los niveles observados en las células no estimuladas (Fig. 13E).

Es importante destacar que en respuesta a la estimulación con TCR/CD43, se observa una considerable heterogeneidad en los niveles de expresión de Glut-1 a las 48 horas, lo que sugiere que distintas subpoblaciones de LTs CD4<sup>+</sup> responden

de manera diferencial a este estímulo, y/o que distintas subpoblaciones expresan diferentes niveles de GLUT-1 (Fig. 13C). La heterogeneidad en los niveles de GLUT-1 en respuesta a las señales del estímulo TCR/CD43 podría estar relacionada con variaciones en la activación metabólica y funcional de las distintas subpoblaciones de LTs.



**Figura 13.** Las señales coestimuladoras de CD43 en conjunto con las del TCR promueven el aumento de Glut-1 en membrana de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica humana de donadores sanos fueron estimulados como se describe anteriormente (sección 3.3). Posterior a los tiempos indicados las células se recuperaron para realizar diversas mediciones ( $n=3$ ). **A**) Se muestra el nivel de expresión (histograma representativo) y el porcentaje de positividad para los marcadores CD3, CD28 y CD43 en la población de LTs purificados. **B**) La expresión de CD69 se midió a las 24h post-estimulación para las condiciones dobles TCR/CD28 y TCR/CD43, se muestra un histograma representativo de la distribución y los porcentajes de células positivas para

CD69 en las células estimuladas. **C)** Histogramas representativos de Glut-1 en membrana para los distintos estímulos a lo largo del tiempo. **D)** Porcentaje de células positivas para Glut-1 en membrana para los distintos estímulos a lo largo del tiempo **E)** Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI Fold-change) para **Glut-1 en membrana** representada como: (MFI de Glut-1 en condición de estudio)/(MFI Glut-1 en condición US a tiempo cero (0h)). Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM y para el análisis estadístico se realizaron las pruebas correspondientes según la comparación necesaria: Wilcoxon (diferencias entre las distribuciones de valores para dos muestras relacionadas sin distribución normal) o U de Mann-Whitney (diferencias entre las distribuciones de valores para dos muestras no relacionadas sin distribución normal), se consideró un resultado significativo ( $p^* \leq 0.05$ ,  $p^{**} \leq 0.01$ ).

## **4.2 Las señales solas de CD43 y CD28 promueven el aumento de Glut-1 total y en membrana en células Jurkat**

Al igual que los experimentos realizados anteriormente con LTs aislados de sangre periférica de donadores sanos de banco de sangre, evaluamos si las señales dependientes de CD43 inducen un aumento en la expresión del transportador de glucosa Glut-1 en un modelo de células Jurkat, una línea celular derivada de sangre periférica de una leucemia de células T (Schneider et al., 1977). Las células se estimularon bajo las mismas condiciones que los linfocitos T normales, es decir a través de TCR/CD43, TCR/CD28, o bien a través de los estímulos individuales del TCR, CD28 y CD43 durante 3, 12, 24 o 48 horas. Como controles se utilizaron células sin estimular (US) y células estimuladas con PMA/Ionomicina (PMA-Iono).

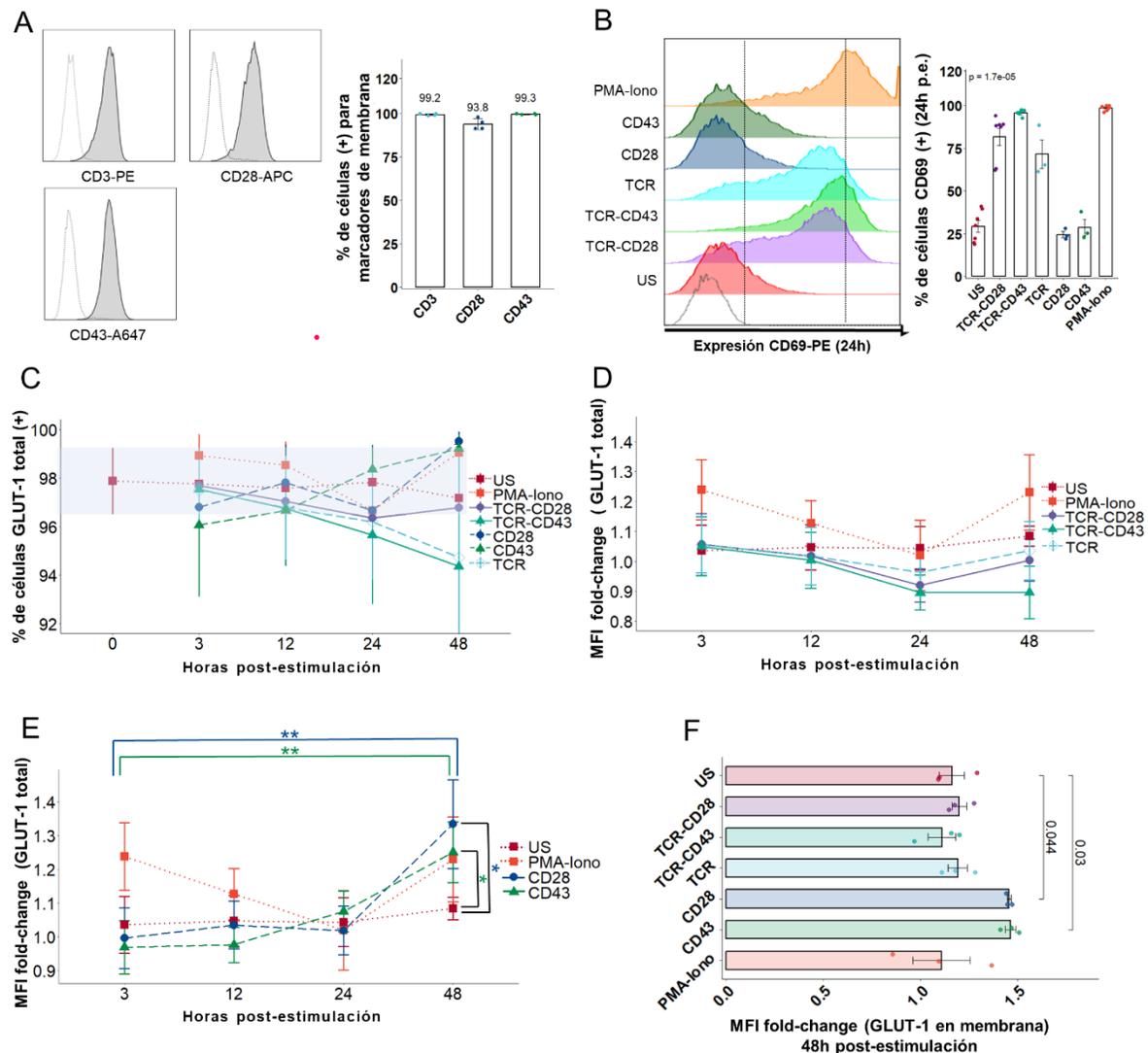
Antes de iniciar cada experimento, se midieron los niveles de expresión de los marcadores de membrana CD3, CD28 y CD43 en las células Jurkat. Los resultados mostraron que ~93% de las células expresaban estos marcadores, presentando valores consistentes a lo largo de todas las réplicas (Fig. 14A). Al igual que en los experimentos anteriores como control de una activación, se evaluaron los niveles de expresión del marcador de activación CD69 a las 24 horas post-estimulación (Fig. 14B). Los resultados obtenidos estuvieron en concordancia con los datos previos en LTs, mostrando que el estímulo PMA-Ionomicina y TCR/CD43 inducen una mayor proporción de células positivas para CD69, 98.4% y 95.5% respectivamente en comparación con el estímulo TCR/CD28 (81.7%). Además, en este modelo evaluamos la capacidad de los estímulos individuales de promover la

expresión de CD69. Únicamente el estímulo TCR indujo la expresión de CD69 en la mayoría de las células (71.6%), mientras que los estímulos CD28 y CD43 no inducen la expresión de este marcador de activación.

En el modelo de células Jurkat, en consistencia con lo reportado (M. J. Lee et al., 2020), y con la necesidad de un suministro constante de glucosa para su crecimiento, proliferación y supervivencia (Carvalho et al., 2011; Zambrano et al., 2019) en estado basal (0 horas) y en ausencia de un estímulo, todas las células (~95%) son prácticamente positivas para Glut-1 (Fig. 14C). Contrario a lo observado en LTs CD4<sup>+</sup> de sangre periférica, en células Jurkat, los estímulos dobles TCR/CD28, TCR/CD43, así como el estímulo sencillo TCR y el control PMA-Ionomomicina, no causaron un aumento en el nivel de expresión de Glut-1 total a lo largo del tiempo, mostrando una cinética similar a las células no estimuladas (Fig. 14D). En cambio, a las 48 horas post-estimulación, los estímulos sencillos CD28 y CD43 provocaron un aumento significativo (32 y 25% respectivamente) en los niveles de expresión de Glut-1 total con relación al control de células no estimuladas (US). Inclusive, el aumento fue mayor que para el estímulo PMA-Iono, el cual alcanza sus niveles máximos de Glut-1 a las 3 horas, disminuye a las 12 y 24 horas y a las 48h vuelve a niveles similares a los de las 3 horas (Fig. 14E). Para evaluar si el aumento en la expresión total de Glut-1 se reflejaba en un aumento en los niveles de Glut-1 en la membrana, medimos su expresión en membrana a las 48 horas post-estimulación (Fig. 14F), encontrando que el aumento de Glut-1 total por los estímulos sencillos CD28 y CD43 se ve reflejado también con un aumento de este transportador en membrana.

De manera coherente con estos hallazgos, al evaluar los niveles relativos de la expresión de mRNA para Glut-1 a las 24 y 48 horas post-estimulación, observamos un aumento notable en el mRNA de GLUT-1 a las 24 horas en respuesta a los estímulos CD28 y CD43, seguido de un retorno a sus niveles basales a las 48 horas (Fig. 15). En contraste, los estímulos que involucran la señalización a través del TCR al igual que el estímulo PMA-Ionomomicina no promovieron este aumento a ninguno de los tiempos analizados, observándose inclusive una ligera disminución

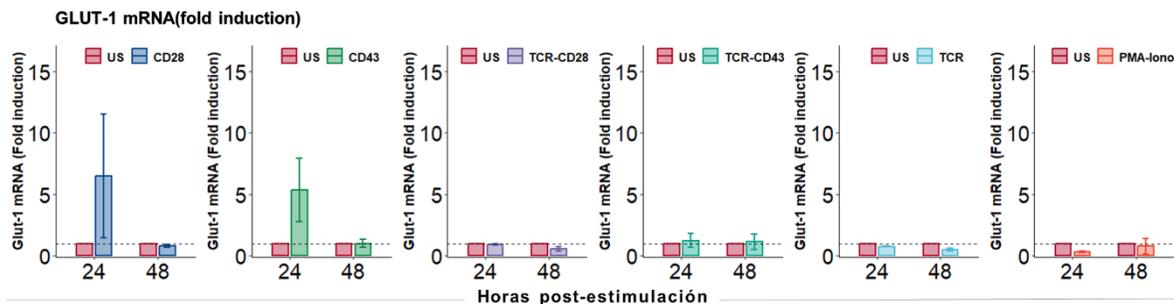
en la expresión del mRNA de Glut-1 a las 48 horas para los estímulos TCR/CD28 y TCR (Fig. 15), lo que sugiere una regulación diferencial de este transportador en respuesta a diferentes estímulos.



**Figura 14.** Las señales solas de CD43 y CD28 promueven el aumento de Glut-1 total y en membrana en células Jurkat.

Las células Jurkat fueron estimuladas como se describe anteriormente (sección 3.3). Posterior a los tiempos indicados las células se recuperaron para realizar diversas mediciones **A**) Se muestra el nivel de expresión (histograma representativo) y el porcentaje de positividad para los marcadores CD3, CD28 y CD43 en el cultivo de células Jurkat ( $n=4$ ). **B**) La expresión de CD69 se midió a las 24h post-estimulación para todas las condiciones, se muestra un histograma representativo de la distribución y los porcentajes de células positivas para CD69 ( $n = 3$ ). **C, D, F**) Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI Fold-change) para Glut-1 total o membranal representada como: (MFI de Glut-1 en

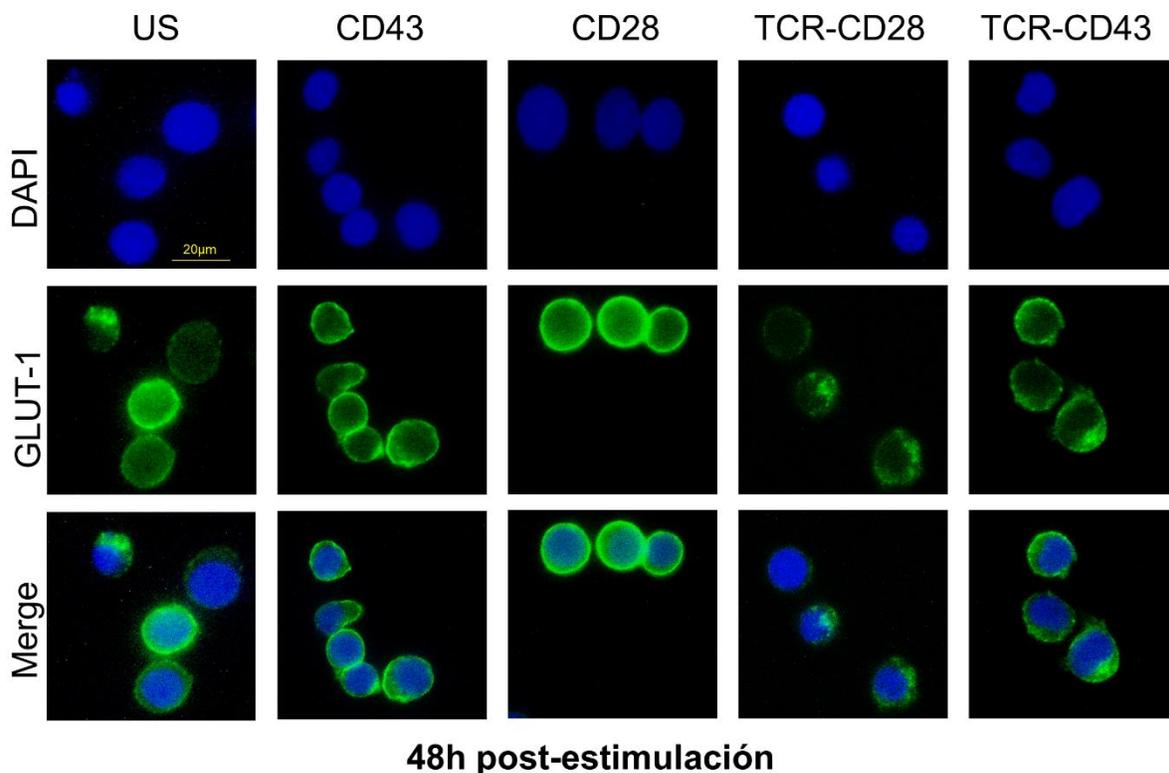
Condición de estudio) / (MFI Glut-1 en condición US a tiempo cero (0h)) **C) MFI fold-change para Glut-1 total** en los estímulos donde participa el TCR; TCR, TCR-CD28 y TCR-CD43. **D) MFI fold-change para Glut-1 total** en los estímulos individuales CD28 y CD43. **E)** Porcentaje de células positivas para Glut-1 total en los distintos estímulos a lo largo del tiempo ( $n \geq 5$ ). **F) MFI Fold-change para Glut-1 en membrana**, en todos los estímulos a las 48h post-estimulación. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM y para el análisis estadístico se realizaron las pruebas correspondientes según la comparación necesaria: Kruskal-Wallis (Diferencias en las medianas de tres o más grupos no relacionados), t de student (diferencias entre los promedios de valores para dos muestras relacionadas o no relacionadas con una distribución normal), Wilcoxon (diferencias entre las distribuciones de valores para dos muestras relacionadas sin distribución normal) o U de Mann-Whitney (diferencias entre las distribuciones de valores para dos muestras no relacionadas sin distribución normal), se consideró un resultado significativo ( $p^* \leq 0.05$ ,  $p^{**} \leq 0.01$ ).



**Figura 15.** Las señales solas de CD43 y CD28 promueven el aumento del mRNA de Glut-1 en células Jurkat.

Las células Jurkat fueron estimuladas como se describe anteriormente (sección 3.3). El pellet se recuperó a las 24 y 48 horas post-estimulación y la qPCR se realizó como se describe en la sección 3.7. Se muestra la expresión relativa de mRNA (fold-induction) representada como el valor  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  obtenido por el método de Livak, para la expresión del mRNA de Glut-1 en células Jurkat 24 y 48h post-estimulación para los distintos estímulos ( $n = 3$ ). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM y para el análisis estadístico se realizó la prueba correspondientes según la comparación necesaria: Wilcoxon (diferencias entre las distribuciones de valores para dos muestras relacionadas sin distribución normal) o U de Mann-Whitney (diferencias entre las distribuciones de valores para dos muestras no relacionadas sin distribución normal), se consideró un resultado significativo ( $p^* \leq 0.05$ ,  $p^{**} \leq 0.01$ ).

En adición, la localización de Glut-1 en la membrana de las células Jurkat a las 48 horas post-estimulación fue confirmada mediante inmunofluorescencia (Fig. 16). Observamos que la señal de Glut-1 aumentó en el contorno celular con los estímulos CD43 y CD28. Interesantemente, si bien los datos de citometría indican que el estímulo TCR/CD43 no aumenta los niveles de Glut-1 total parece ser que existe una relocalización del transportador en zonas específicas de las células, lo que sugiere una regulación dinámica en cuanto a la localización de GLUT-1 ante distintos estímulos.



**Figura 16.** En células Jurkat la localización de Glut-1 parece depender del estímulo.

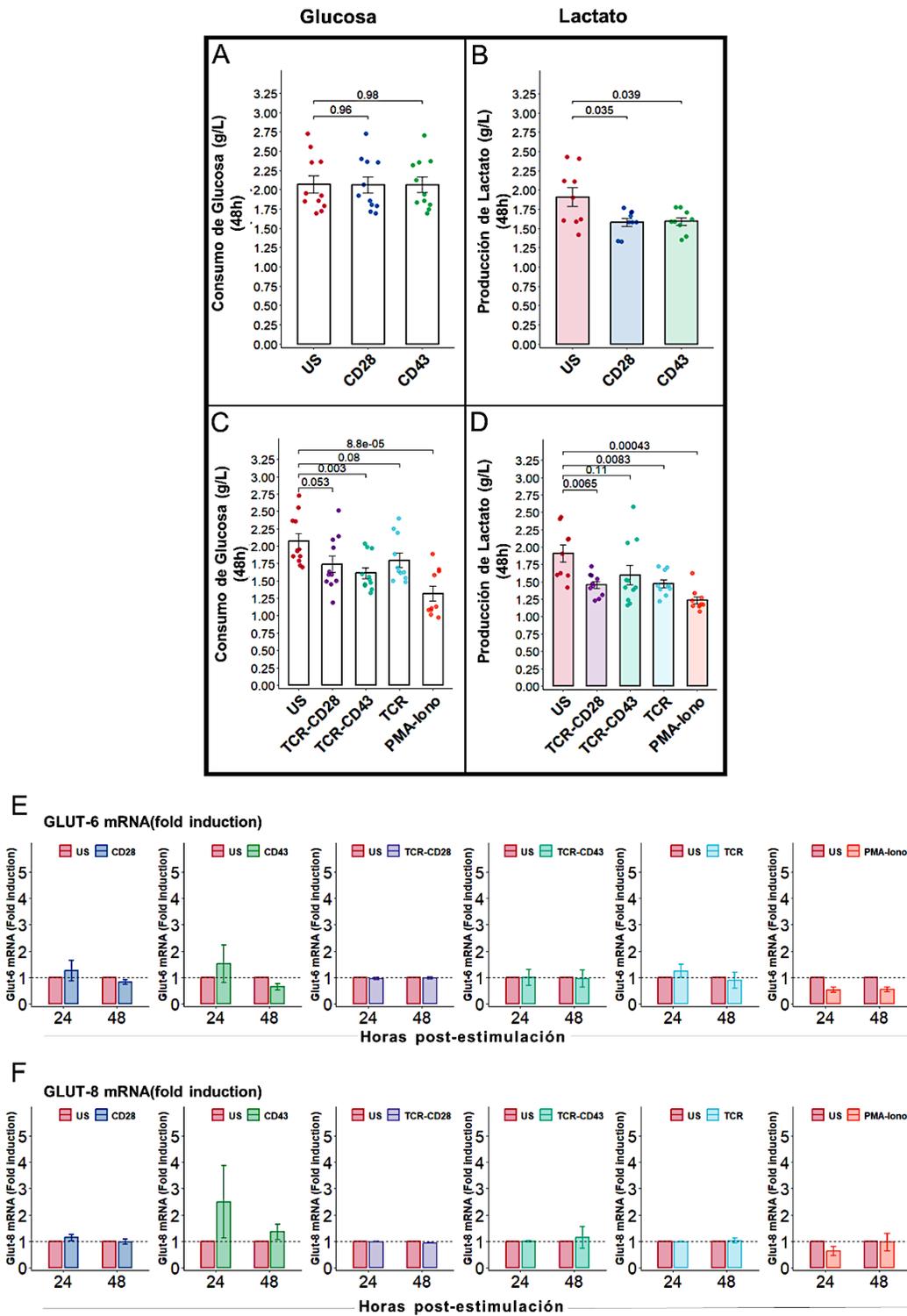
Las células Jurkat fueron activadas como se describe anteriormente (sección 3.3). A las 48 horas post-estimulación, las células fueron teñidas para Glut-1 total como se describe en la sección 3.5. Se muestra una imagen representativa.

### **4.3 Las señales dependientes de CD43 y CD28 promueven una disminución en la liberación de lactato.**

A continuación, exploramos si el incremento en la expresión de Glut-1 que se observó en respuesta a las señales de CD43 y CD28 puede potenciar el consumo de glucosa y la liberación de lactato en células Jurkat, una línea celular tumoral que intrínsecamente presenta altas demandas glucolíticas. Observamos que el aumento en la expresión de Glut-1 derivado de la estimulación con CD43 o CD28 no correlaciona con un mayor consumo de glucosa a las 48h post-estimulación (Fig. 17A), ya que los niveles de glucosa en el medio de cultivo se mantuvieron en niveles comparables a los de las células no estimuladas (US). Paradójicamente, las células estimuladas mediante CD43 o CD28 disminuyeron la liberación lactato a las 48h post-estimulación (Fig. 17B). Por otro lado, en los estímulos donde se involucra al TCR, solo o en combinación con CD28 o CD43, se observó que paralelo a la ligera disminución en la expresión de Glut-1 (Fig. 14C), se registra una disminución significativa en el consumo de glucosa para los estímulos donde se involucra al TCR (TCR/CD43, TCR/CD28 y TCR) al igual que en el control con PMA-Ionomicina (Fig. 17C). Como resultado, la liberación de lactato también disminuyó significativamente para las células estimuladas con TCR-CD28, TCR y para el control PMA-Ionomicina así como con una tendencia a la baja en la condición TCR/CD43 (Fig. 17D).

Para investigar si la ausencia de un aumento en el consumo de glucosa estaba asociada con cambios en la expresión de otros miembros de la familia de transportadores de glucosa (GLUT-), se evaluó la expresión relativa de mRNA de Glut-6 y Glut-8, dos transportadores asociados con el consumo de glucosa en procesos tumorales mediante qPCR. Los resultados mostraron que, a las 24 y 48 horas post-estimulación, no hubo cambios significativos en los niveles de expresión de GLUT-6 en las distintas condiciones evaluadas (Fig. 17C, D), lo que sugiere que la expresión de este transportador no parece modificarse en la respuesta a los estímulos aplicados en este modelo celular. En cuanto a GLUT-8, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, se identificó una ligera tendencia al aumento en su expresión a las 24 horas post-estimulación, particularmente en respuesta al estímulo CD43 (Fig. 17C).

# Metabolismo de Glucosa



**Figura 17.** Las señales dependientes de CD43 y CD28 promueven una disminución en la liberación de lactato.

Las células Jurkat fueron activadas a través de CD43, CD28 y/o el TCR; a las 48 h post-estimulación se midió la cantidad de glucosa (**A,C**,  $n=11$ ) y lactato (**B,D**,  $n=9$ ) en el sobrenadante. La expresión relativa (fold-induction) de mRNA de GLUT-6 (**E**) y GLUT-8 (**F**) ( $n=3$ ). Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM; para el análisis estadístico de A-D se realizaron pruebas t de Student (diferencias entre los promedios de valores para dos muestras relacionadas o no relacionadas con una distribución normal); y para E-F se realizó la prueba U de Mann Whitney (diferencias entre los promedios de valores para dos muestras no relacionadas sin una distribución normal); se consideró un resultado significativo ( $p^* \leq 0.05$ ,  $p^{**} \leq 0.01$ )

#### **4.4 Los estímulos CD28 y CD43 podrían estar participando en la glutaminólisis**

Los resultados obtenidos en relación con el consumo de glutamina y la producción de glutamato a las 48 horas post-estimulación revelan algunas tendencias interesantes, aunque no estadísticamente significativas (Fig. 18).

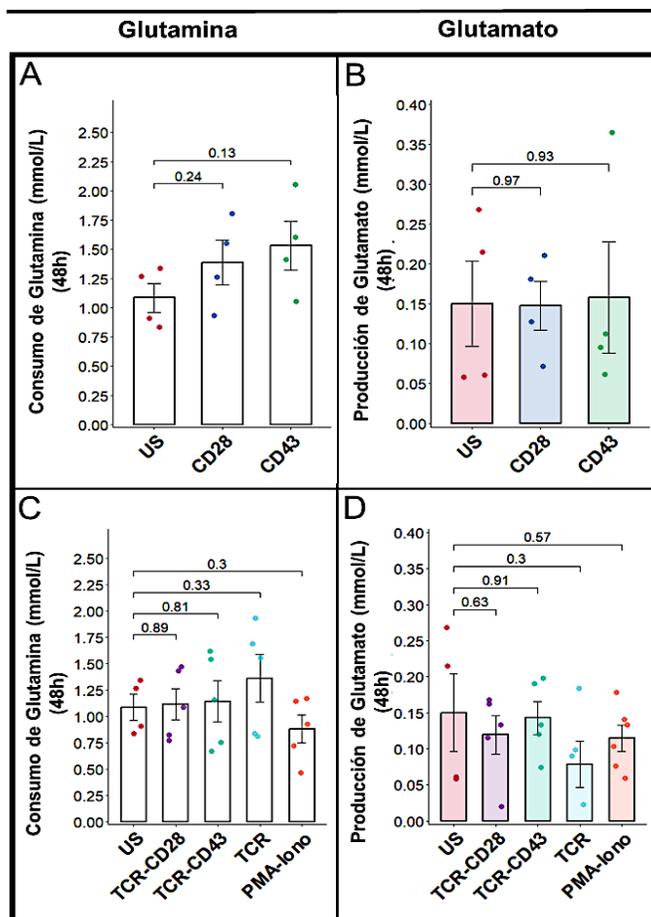
En el caso de los estímulos individuales a través de CD28 y CD43, se observó una tendencia hacia un mayor consumo de glutamina en comparación con el grupo no estimulado (US) (Fig. 18A). Aunque las diferencias no son significativas, los datos sugieren que los estímulos CD28 y CD43 promueven un incremento en el consumo de glutamina. En paralelo, no se detectó una liberación significativa de glutamato en estos estímulos (Fig. 18B), lo que sugiere que la glutamina está siendo utilizada intracelularmente y no liberada en su forma de glutamato, lo que podría indicar una mayor demanda de glutamina y su metabolismo mitocondrial bajo estas condiciones.

En cuanto a los estímulos que involucraron la señalización a través del TCR, no se observaron cambios significativos en el consumo de glutamina en comparación con el grupo control de células no estimuladas (US) (Fig. 18C), aunque se detecta un ligero aumento en el estímulo a través del TCR. Esto es consistente con el hecho de que la señalización mediada por el TCR es conocida por inducir la expresión de transportadores de glutamina y fomentar su consumo (Carr et al., 2010; Shyer et al., 2020). En concordancia, en estas condiciones tampoco se observó una liberación significativa de glutamato (Fig. 18D), siendo notable que la condición estimulada solamente mediante el TCR fue la que mostró niveles más bajos de producción de

glutamato, lo que refuerza la idea de que el TCR promueve el uso eficiente de la glutamina dentro de las células sin liberar sus productos derivados.

Este hallazgo resulta paradójico, ya que, si bien la señalización individual a través de TCR, CD28 y CD43 parece fomentar la glutaminólisis, esperaríamos que la combinación de estas señales amplificara este efecto. Sin embargo, esto no sucedió, sugiriendo que la interacción entre estos estímulos y sus vías de señalización en el modelo de células Jurkat podría tener un efecto contrario a lo esperado.

## Metabolismo de Glutamina



**Figura 18.** Las señales dependientes de CD43 y CD28 podrían estar participando en la glutaminólisis.

Las células Jurkat fueron activadas a través de CD43, CD28 y/o el TCR; a las 48 h post-estimulación se midió la cantidad de glucosa (A,C, n=11) y lactato (B,D; n=9) en el sobrenadante. Expresión relativa (fold-induction) de mRNA de GLUT-6 (E) y GLUT-8 (F)

(n = 3) Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM; para el análisis estadístico de se realizaron pruebas t de Student (diferencias entre los promedios de valores para dos muestras relacionadas o no relacionadas con una distribución normal), se consideró un resultado significativo ( $p^* \leq 0.05$ ,  $p^{**} \leq 0.01$ )

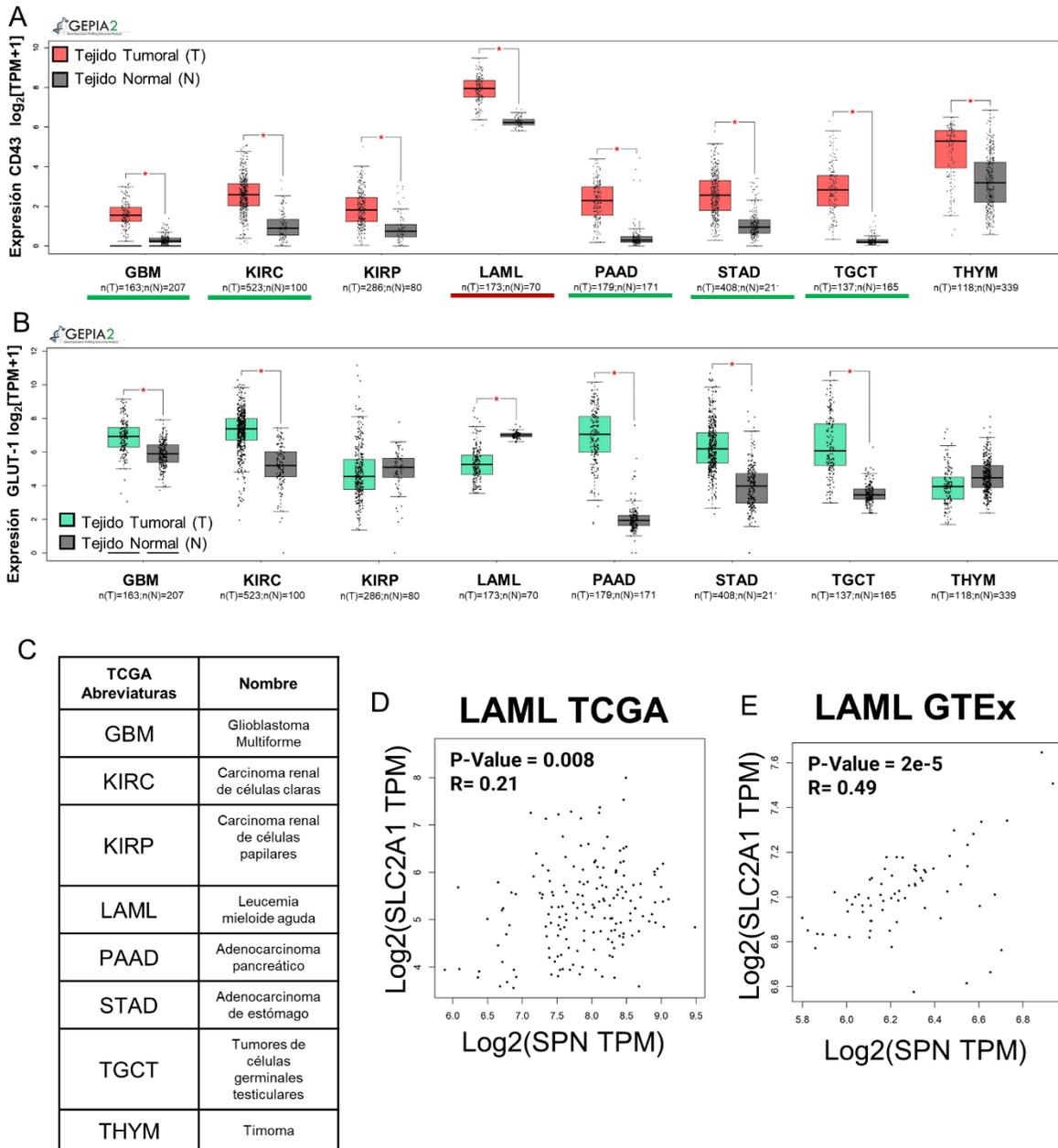
#### **4.5 La sialomucina CD43 se sobre expresa en líneas tumorales no hematopoyéticas y se correlaciona con el aumento de Glut-1 en Leucemias mieloides agudas**

Con el objetivo de ampliar nuestras observaciones acerca del papel de CD43 y GLUT-1 en la progresión tumoral, analizamos la expresión del mRNA de estas moléculas en diversos tipos de cáncer, de origen tanto hematopoyéticos como no hematopoyéticos. El análisis pan-canceroso de CD43 y Glut-1 se basó en los transcriptomas disponibles en las bases de datos TCGA y GTEx, a través de GEPIA2, que incluyen datos de expresión pareados obtenidos mediante *Bulk-RNAseq* de tejido sano y tumoral.

De los 31 tipos de cáncer evaluados (Fig. S2), identificamos ocho que presentan una elevada expresión del transcrito *SPN*, que codifica para CD43, en comparación con el tejido sano (Fig. 19A). Entre estos, identificamos principalmente tumores de origen epitelial, como el carcinoma renal de células claras (KIRC), el carcinoma renal de células papilares (KIRP), el adenocarcinoma pancreático (PAAD), el adenocarcinoma gástrico (STAD) y el timoma (THYM). Además de dos tipos tumorales con orígenes dispersos: el glioblastoma multiforme (GBM), un tumor originado a partir de la glía en cerebro, y el tumor de células germinales testiculares (TGCT). Por último, en el caso de la leucemia mieloide aguda (LAML), un tumor de origen hematopoyético, se observó la mayor expresión de CD43, probablemente debido a su origen.

Además de evaluar la expresión de CD43, se analizaron los niveles del transcrito de *Slc2a1*, que codifica para Glut-1 (Fig. S3). En los ocho tipos tumorales que sobreexpresaron CD43. Los resultados mostraron que GBM, KIRC, PAAD, STAD y TGCT presentan niveles de expresión de Glut-1 mayores en comparación con su tejido sano (Fig. 19B). Paradójicamente, aunque la LAML tiene los mayores niveles

de expresión para CD43, expresa niveles menores de Glut-1 en comparación con su tejido sano (Fig. 19B). Sin embargo, al realizar análisis de correlación entre los tumores que sobreexpresaron CD43 y sobre- o subexpresaron Glut-1 (Fig. S4), se observó que la única correlación positiva entre ambos se da en LAML (Fig. 19D, E). Esto sugiere que el metabolismo glucolítico no es necesariamente una característica distintiva de este tipo tumoral o que responde a factores que regulan la expresión de Glut-1; sin embargo, los tumores con alta expresión de CD43 tienden a sobre expresar Glut-1, lo que podría conferirles una ventaja en términos de proliferación, supervivencia y metabolismo.



**Figura 19.** La sialomucina CD43 se sobre-expresa en 8 tipos de tumores y se correlaciona con un aumento de Glut-1 en leucemia mieloide aguda

Los datos públicos de Bulk RNA-Seq de tumores y tejido sano extraídos de TCGA y GTEx se analizaron utilizando la plataforma GEPIA2. La abundancia de mRNA para CD43 se normalizó como transcritos por millón (TPM) y se representó gráficamente como  $\log_2[TPM+1]$  **A)** Tumores con una expresión de CD43 significativamente elevada en comparación con el tejido sano **B,C)** Análisis de correlación de Spearman para TPM en tejido tumoral de CD43 (Sialophorin - SPN) y Glut-1 - SLC2A1 (Solute Carrier Family 2 member 1) para datos extraídos de **(B)** leucemia mieloide aguda (LMA) extraídos de TCGA y **(C)** leucemia mieloide aguda (LMA) extraídos de GTEx.

# V. DISCUSIÓN

La adopción de un metabolismo altamente glucolítico durante los procesos de activación de LTs es esencial para cumplir con las demandas proliferativas y las funciones de estas células [revisado en (Chapman et al., 2020; Geltink et al., 2018; S. Ma et al., 2024; Shyer et al., 2020)]. Dado que la reprogramación metabólica está limitada principalmente por el transporte de glucosa al interior de la célula, los linfocitos T incrementan significativamente la expresión de Glut-1 en la membrana en respuesta a las señales proporcionadas por las moléculas coestimuladoras en conjunción con las señales del TCR, promoviendo la sobreexpresión de genes que permiten la adopción de un metabolismo altamente glucolítico (Frauwirth et al., 2002; Macintyre et al., 2014)

Bajo este contexto, CD43 es una molécula que participa durante los procesos de activación de linfocitos T. Si bien su papel en el metabolismo no ha sido estudiado directamente, se sabe que regula la activación de vías de señalización que pueden participar en la remodelación metabólica, entre las que destacan la vía de PI3K-AKT-mTOR, la activación de ERK y la fosforilación de STAT-3 (Bravo-Adame et al., 2017; Camacho-Concha et al., 2013), así como su interacción con  $\beta$ -catenina (Andersson et al., 2004). Así mismo, en LTs humanos nuestro grupo de trabajo demostró previamente que CD43 regula al alza la expresión de proteínas relacionadas con la generación de precursores metabólicos y energía a tiempos cortos (< 12h) en respuesta a las señales de CD43 o CD43+TCR (Bravo-Adame, Tesis de doctorado, 2017). En particular, en respuesta a la coestimulación de TCR+CD43, la actividad enzimática de la isoenzima M2 de la piruvato quinasa (PKM2), una enzima de la vía glucolítica que convierte el fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato, se modifica debido a la fosforilación en la tirosina Y<sup>105</sup>, dando lugar a que PKM2 dimerice y ejerza funciones fuera de la vía glucolítica, lo que lleva a la activación de proteínas como STAT3, ERK5 y CREB. En conjunto, estas señales promueven la localización nuclear de c-Myc y NFkB (p65) así como la fosforilación de Bad favoreciendo el crecimiento y la proliferación celular (Bravo-Adame et al., 2017).

Con el objetivo de profundizar más en las funciones de la sialomucina CD43 en un contexto de activación de linfocitos T, en este trabajo investigamos si CD43 participa en la regulación del transportador de glucosa GLUT-1 en dos modelos celulares: linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados de donadores sanos de banco de sangre y células Jurkat, una línea celular derivada de una leucemia linfoblástica aguda de células T humanas. Nuestros hallazgos muestran que la señalización a través de CD43 es capaz de inducir la expresión de GLUT-1 en membrana celular, tanto en combinación con las señales del TCR como de manera independiente.

En linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica humana, las señales coestimuladoras de CD43 en conjunto con las del TCR, promovieron la inducción de la expresión de GLUT-1 en la membrana, superando incluso las señales de CD28. Dado que CD28 es el prototipo más estudiado de molécula coestimuladora relacionada con la reprogramación metabólica, estos resultados sugieren que CD43 podría desempeñar un papel aún más potente en la reprogramación metabólica de lo reportado para CD28. En línea con estas observaciones, encontramos que la coestimulación mediada por CD43 produce una mayor expresión del marcador de activación CD69 en la membrana de los linfocitos T a las 24 horas post-estimulación, consistente con lo reportado en (Sandoval-Hernández et al., 2024). Este hallazgo es particularmente relevante porque CD69 es un marcador clásico de activación temprana en linfocitos T, cuya expresión generalmente se detecta en membrana desde las ~2 horas posteriores a la activación y tiende a disminuir progresivamente desde de las 24 post-activación (Antas et al., 2002; Simms & Ellis, 1996). Además, recientemente, CD69 se ha vinculado con la reprogramación metabólica al promover la activación de la vía mTOR y regular la captación de aminoácidos a través del complejo LAT1-CD98 [revisado en (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017)]. La aumentada presencia de CD69 en la membrana celular derivada de las señales coestimuladoras de CD43 podría por tanto contribuir a regular las demandas metabólicas durante la activación linfocitaria, participando en la captación de aminoácidos y favoreciendo un aumento en la captación de glucosa, esencial para sostener la proliferación y la adopción de funciones efectoras, especialmente en las subpoblaciones Th1 y Th17. Consistente con esta hipótesis, se ha demostrado que

las señales de CD43 solas o combinadas con el TCR promueven una respuesta Th1 con una elevada producción de IFN- $\gamma$  (Ramírez-Pliego et al., 2007; Sandoval-Hernández et al., 2024; Zhou et al., 2013), mientras que deficiencia de CD43 desemboca en una diferenciación hacia un fenotipo Th2 (Cannon et al., 2008).

Las células Jurkat que se derivan de una leucemia linfoblástica aguda de células T humanas (T-ALL, del inglés *T-Cell acute lymphoblastic leukemia*), han sido utilizadas como modelo de estudio de linfocitos T desde su establecimiento a mediados de 1980 (Abraham & Weiss, 2004), y han proporcionado buena parte del conocimiento sobre la señalización dependiente del complejo TCR-CD3 y la cascada de señalización río abajo en la que participan proteínas del LAT-Señalosome [revisado en (Abraham & Weiss, 2004)]. Si bien las células Jurkat ofrecen un modelo aceptado para estudiar *in vitro* aspectos específicos de la activación de los linfocitos T, sin la complejidad de las células de sangre periférica que, aunque provienen de donadores “sanos” de banco de sangre, recapitulan la experiencia inmunológica del donador, esta línea celular conserva características particulares derivadas de su origen tumoral que impactan en el metabolismo glucolítico promoviéndolo, como el hecho de que la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR se encuentra constitutivamente activa debido a la ausencia de PTEN, una fosfatasa esencial para regular la actividad de AKT (Gioia et al., 2018; Shan et al., 2000).

A diferencia de los linfocitos T primarios, que en estado *naïve* o no activado presentaron niveles bajos o nulos de expresión de Glut-1, las células Jurkat mostraron una expresión elevada y constitutiva de este transportador de glucosa, lo cual tiene sentido debido a las características mencionadas anteriormente y concuerda con lo reportado en la literatura para distintos tumores y diversas líneas celulares tumorales (Bukkuri et al., 2022).

Por otro lado, también en contraste con lo observado en linfocitos T primarios, en el modelo de células Jurkat, los estímulos individuales de CD28 y CD43, pero no los estímulos combinados con el TCR, provocaron un incremento adicional en la expresión de Glut-1, incluso cuando el modelo celular ya presenta, en condiciones

basales, una alta demanda glucolítica y una expresión elevada de Glut-1 tanto a nivel de mRNA, como de proteína total y en la membrana. Estos resultados sugieren que la señalización derivada del entrecruzamiento de estas moléculas podría favorecer la reprogramación metabólica en células tumorales, en especial CD43, una molécula co-receptora que ha sido relacionada con la malignidad de distintos tipos tumorales (Sorigue, 2021). Adicionalmente nuestros datos sugieren que CD43 también podría estar participando en el aumento de los niveles del mRNA de Glut-8, otro transportador de glucosa que ha sido relacionado con la progresión y malignidad de distintas neoplasias como el cáncer de endometrio y en algunos mielomas (Barron et al., 2016; Goldman et al., 2006).

A pesar de que este aumento de Glut-1 en membrana dependiente de CD43 y CD28 no conduce a un mayor consumo de glucosa en comparación con células no estimuladas, las señales de CD43 indujeron una disminución en la liberación de lactato y a su vez un ligero aumento en el consumo de glutamina. Estos resultados llevan a pensar que la estimulación mediada por CD43 u otras moléculas coestimuladoras como CD28, podrían promover una reprogramación metabólica que favorece el uso de la glutamina a través de la vía mitocondrial y minimiza la pérdida de carbono a través de la disminución en la producción y/o secreción de lactato. Este tipo de adaptaciones metabólicas ya han sido descritas en contextos tumorales donde se observan adaptaciones metabólicas complejas entre las que se incluyen: 1. El aumento en el consumo de la glutamina en microambientes tumorales (Wang et al., 2024) y 2. La adopción de metabolismos “no warburgianos” los cuales son característicos de células que consumen más glucosa del lactato que liberan (Chen et al., 2019; DeBerardinis & Chandel, 2020), lo cual es lógico dado que si se generan más precursores biosintéticos el flujo glucolítico disminuye y por consiguiente la biosíntesis de lactato también, y que el no secretar lactato tiene la finalidad de aprovechar de manera más eficiente el carbono disponible (¡secretar lactato es perder carbono!).

Aunque se observó una disminución en la liberación de lactato, bajo nuestras condiciones experimentales no está claro si el lactato es producido y retenido dentro

de las células para su aprovechamiento por otras vías como la lactilación de proteínas como p53 y su consecuente inhibición, resultando en una ventaja adaptativa para las células tumorales que no liberan lactato (Zong et al., 2024); si es liberado y re-ingerido a través de su transportador MCT-1 (Liu et al., 2023; Payen et al., 2019); si simplemente no se genera, por una falta de producción de piruvato, lo que sería resultado del desvío de intermediarios glucolíticos hacia vías biosintéticas; o finalmente, si el piruvato se está metabolizando en la mitocondria, y la glucólisis aeróbica y la glucólisis “convencional” pueden estar funcionando al mismo tiempo dentro de una célula. En cualquiera de los casos, todos los escenarios proporcionarían una ventaja adaptativa mediada por CD43, favoreciendo una mayor eficiencia en el uso de los recursos celulares para sostener la proliferación y la biosíntesis. En particular, la correlación positiva observada entre la expresión de CD43 y GLUT-1 en células leucémicas y su sobreexpresión en tumores de distintos orígenes, junto con nuestros resultados experimentales sugieren una reprogramación metabólica dependiente de CD43 que confiere una ventaja proliferativa y de supervivencia a las células tumorales, facilitando su adaptación metabólica y promoviendo un uso más eficiente de los recursos energéticos.

Finalmente, también en contraste con lo observado en linfocitos T purificados de donadores sanos, los estímulos que involucraron al TCR, ya sea solo o en combinación con CD28 y CD43, no generaron un aumento en la expresión de GLUT-1, a pesar de que un alto porcentaje de células presentaban expresión de CD69. Contrario a lo esperado, la ligera disminución en los niveles de Glut-1 a nivel de mRNA y proteína fue capaz de inducir una reducción significativa en el consumo de glucosa y como consecuencia, a una menor producción de lactato. Este efecto negativo observado en el metabolismo y en la expresión de Glut-1 derivado de las señales del TCR solas o en combinación podría estar relacionado con la inducción de la apoptosis en modelos de células leucémicas T-ALL [revisado en (dos Santos et al., 2019)], donde la administración de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clona OKT3, misma que se usó en nuestro estudio) provocó la muerte de las células tumorales al inducir una estimulación intensa mediada por el TCR (Trinquand et al.,

2016). Dado que las células Jurkat son hiper-responsivas a la estimulación mediante el TCR (Shan et al., 2000), podríamos sugerir que bajo nuestras condiciones de activación las células Jurkat podrían estar experimentando una estimulación excesiva que compromete el metabolismo celular y como consecuencia la viabilidad (o viceversa; la disminución de la viabilidad, afecta en el consumo metabólico). Los datos obtenidos con la condición PMA-Ionomicina resultaron al igual que los estímulos TCR-CD28 y TCR-CD43 en una disminución exacerbada del metabolismo.

# **VI. CONCLUSIONES**

En este estudio, hemos demostrado que la sialomucina CD43 desempeña un papel crucial en la regulación del transportador de glucosa GLUT-1 durante la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de células Jurkat. Nuestros resultados indican que la coestimulación a través de CD43 y el TCR, promueve un aumento significativo en la expresión de GLUT-1 en la membrana de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, superando incluso los efectos de la coestimulación mediada por CD28. Este hallazgo sugiere que CD43 podría tener una influencia más potente en la reprogramación metabólica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que las moléculas coestimuladoras tradicionalmente estudiadas. Además, observamos que la estimulación con TCR/CD43 mantiene elevados los niveles del marcador de activación CD69 a las 24 horas post-estimulación, lo que indica una activación prolongada y podría estar relacionado con una mayor capacidad metabólica y funcional de las células T. Los efectos sobre la regulación del metabolismo podrían influir en la diferenciación hacia subpoblaciones efectoras como Th1 y Th17, que dependen de una alta actividad glucolítica.

En el modelo de células Jurkat, las señales individuales de CD43 y CD28 fueron suficientes para aumentar tanto la expresión total como la membranal de GLUT-1, a pesar de que estas células ya presentan una alta demanda glucolítica y una elevada expresión de Glut-1 en condiciones basales. Sin embargo, este incremento en GLUT-1 no se tradujo en un mayor consumo de glucosa, pero si se observó una disminución en la liberación de lactato y una tendencia al aumento en el consumo de glutamina. Estos hallazgos sugieren que CD43 y CD28 podrían estar promoviendo una reprogramación metabólica que favorece la glutaminólisis y la utilización más eficiente de los recursos energéticos, minimizando la pérdida de carbono y potenciando la biosíntesis celular.

La correlación positiva entre la expresión de CD43 y GLUT-1 en ciertos tipos de cáncer, especialmente en la leucemia mieloide aguda, indica que CD43 podría contribuir a la ventaja proliferativa y de supervivencia de las células tumorales al facilitar su adaptación metabólica. Esto sugiere que CD43 no solo es relevante en la activación normal de linfocitos T sino también en la fisiopatología de ciertos tumores, posicionándose como un posible blanco terapéutico.

En conjunto, nuestros resultados aportan nuevas perspectivas sobre el papel de CD43 en la reprogramación metabólica durante la activación de linfocitos T y en contextos tumorales. Estos hallazgos abren la puerta a futuras investigaciones que exploren la modulación de CD43 como estrategia para influir en la función inmunitaria y desarrollar terapias antitumorales más eficaces.

# **VII. PERSPECTIVAS**

## Linfocitos T

- Determinar la expresión de Glut-1 en las distintas subpoblaciones de LTs CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, principalmente *Naïve* y de memoria efectora.

Para ambos modelos, LTs CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, en respuesta a los distintos estímulos:

- Evaluar la capacidad metabólica mediante SCENITH (single-cell energetic metabolism by profiling translation inhibition)
- Realizar mediciones de consumo de glucosa y liberación de lactato.
- Evaluar la expresión de los principales transportadores de glucosa implicados en la activación (Glut-1, Glut-2, Glut-3, Glut-6, Glut-8 y Glut-10) mediante qPCR.
- Identificar mediante Bulk RNA-Seq sobre expresión de vías relacionadas con la remodelación del metabolismo, en este caso principalmente en respuesta a los estímulos TCR/CD28 y TCR/CD43.

Utilizando como modelo ratones OT-I y OT-II C57BL/6 KO para CD43 (CD43<sup>-/-</sup>)

- Evaluar si la ausencia de CD43 afecta las capacidades metabólicas durante los procesos de activación antígeno específica.
- Evaluar la participación de CD43 en la adopción de fenotipos efectores Th1, Th2, Th17 y iTreg.

## Células Jurkat

- Evaluar la capacidad metabólica mediante SCENITH.
- Identificar vías metabólicas enriquecidas en respuesta los estímulos mediante el rastreo isotópico de marcajes de <sup>13</sup>C-Glucosa, <sup>13</sup>C-Lactato y <sup>13</sup>C-Glutamina
- Evaluar la expresión de los principales transportadores de glucosa implicados en procesos tumorales (Glut-3 y Glut-10) mediante qPCR.
- Identificar mediante Bulk RNA-Seq sobre expresión de vías relacionadas con la remodelación del metabolismo, en este caso principalmente en respuesta a los estímulos CD28 y CD43.

- Identificar las vías de señalización dependientes de CD43 que participan en el metabolismo de las células tumorales.
- Evaluar si la pérdida de CD43 en células tumorales promueve una disminución en las capacidades metabólicas

# **VIII. REFERENCIAS**

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology E-Book: Cellular and Molecular Immunology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Abraham, R. T., & Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology*, 4(4), 301–308. <https://doi.org/10.1038/nri1330>
- Acuto, O., Bartolo, V. D., & Michel, F. (2008). Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 699–712. <https://doi.org/10.1038/nri2397>
- Allenspach, E. J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A. G., Cannon, J. L., Takahashi, S. M., Morgan, R., Burkhardt, J. K., & Sperling, A. I. (2001). ERM-Dependent Movement of CD43 Defines a Novel Protein Complex Distal to the Immunological Synapse. *Immunity*, 15(5), 739–750. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00224-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00224-2)
- Andersson, C. X., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Baeckström, D., Haass, C., & Hansson, G. C. (2005). Shedding and  $\gamma$ -secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochemical Journal*, 387(Pt 2), 377–384. <https://doi.org/10.1042/BJ20041387>
- Andersson, C. X., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Sikut, R., Sikut, A., Baeckström, D., & Hansson, G. C. (2004). CD43 has a functional NLS, interacts with  $\beta$ -catenin, and affects gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.011>
- Antas, P. R. Z., Oliveira, E. B., Milagres, A. S., Franken, K. C., Ottenhoff, T. H. M., Klatser, P., Sarno, E. N., & Sampaio, E. P. (2002). Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(8), 1097–1099. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000800005>
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Baeckström, D. (1997). Post-translational Fate of a Mucin-like Leukocyte Sialoglycoprotein (CD43) Aberrantly Expressed in a Colon Carcinoma Cell Line \*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11503–11509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)40667-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)40667-9)
- Bai, D., Ueno, L., & Vogt, P. K. (2009). Akt-mediated regulation of NF $\kappa$ B and the essentialness of NF $\kappa$ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 125(12), 2863–2870. <https://doi.org/10.1002/ijc.24748>
- Bains, I., Antia, R., Callard, R., & Yates, A. J. (2009). Quantifying the development of the peripheral naive CD4+ T-cell pool in humans. *Blood*, 113(22), 5480–5487. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-184184>
- Barron, C. C., Bilan, P. J., Tsakiridis, T., & Tsiani, E. (2016). Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 65(2), 124–139. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.007>

Batdorf, B. H., Kroft, S. H., Hosking, P. R., Harrington, A. M., Mackinnon, A. C., & Olteanu, H. (2017). Evaluation of CD43 expression in non-hematopoietic malignancies. *Annals of Diagnostic Pathology*, 29, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2017.04.010>

Bazil, V., & Strominger, J. L. (1993). CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 3792–3796.

Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., Sandouk, A., Hesse, C., Castro, C. N., Bähre, H., Tschirner, S. K., Gorinski, N., Gohmert, M., Mayer, C. T., Huehn, J., Ponimaskin, E., Abraham, W.-R., Müller, R., Lochner, M., & Sparwasser, T. (2014). De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nature Medicine*, 20(11), 1327–1333. <https://doi.org/10.1038/nm.3704>

Birnbaum, M. E., Berry, R., Hsiao, Y.-S., Chen, Z., Shingu-Vazquez, M. A., Yu, X., Waghray, D., Fischer, S., McCluskey, J., Rossjohn, J., Walz, T., & Garcia, K. C. (2014). Molecular architecture of the  $\alpha\beta$  T cell receptor–CD3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49), 17576–17581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420936111>

Bravo-Adame, M. (2017). *Las señales de CD43 promueven la activación de vías que favorecen la sobrevida de los linfocitos T*. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México.

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>

Boomer, J. S., & Green, J. M. (2010). An Enigmatic Tail of CD28 Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a002436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002436>

Bouso, P. (2008). T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: Lessons from the movies. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 675–684. <https://doi.org/10.1038/nri2379>

Bravo-Adame, M. E., Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Martínez-Campos, C., Flores-Alcantar, A., Ocelotl-Oviedo, J. P., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2017). An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes. *Immunology*, 150(1), 87–99. <https://doi.org/10.1111/imm.12670>

Brownlie, R. J., & Zamoyska, R. (2013). T cell receptor signalling networks: Branched, diversified and bounded. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 257–269. <https://doi.org/10.1038/nri3403>

Bukkuri, A., Gatenby, R. A., & Brown, J. S. (2022). GLUT1 production in cancer cells: A tragedy of the commons. *Npj Systems Biology and Applications*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41540-022-00229-6>

Camacho-Concha, N., Olivos-Ortiz, A., Nuñez-Rivera, A., Pedroza-Saavedra, A., Gutierrez-Xicotencatl, L., Rosenstein, Y., & Pedraza-Alva, G. (2013). CD43 Promotes Cells Transformation by Preventing Merlin-Mediated Contact Inhibition of Growth. *PLOS ONE*, 8(11), e80806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080806>

Campanero, M. R., Pulido, R., Alonso, J. L., Pivel, J. P., Pimentel-Muiños, F. X., Fresno, M., & Sánchez-Madrid, F. (1991). Down-regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  of neutrophil cell surface

- expression of the sialoprotein CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism. *European Journal of Immunology*, 21(12), 3045–3048. <https://doi.org/10.1002/eji.1830211222>
- Cannon, J. L., Collins, A., Mody, P. D., Balachandran, D., Henriksen, K. J., Smith, C. E., Tong, J., Clay, B. S., Miller, S. D., & Sperling, A. I. (2008). CD43 Regulates Th2 Differentiation and Inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(11), 7385. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7385>
- Cano, R. L. E., & Lopera, H. D. E. (2013). Introduction to T and B lymphocytes. En *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]*. El Rosario University Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>
- Carr, E. L., Kelman, A., Wu, G. S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A. M., & Frauwirth, K. A. (2010). Glutamine Uptake and Metabolism Are Coordinately Regulated by ERK/MAPK During T Lymphocyte Activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(2), 1037–1044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903586>
- Carvalho, K. C., Cunha, I. W., Rocha, R. M., Ayala, F. R., Cajaíba, M. M., Begnami, M. D., Vilela, R. S., Paiva, G. R., Andrade, R. G., & Soares, F. A. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*, 66(6), 965–972. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000600008>
- Chakraborty, A. K., & Weiss, A. (2014). Insights into the initiation of TCR signaling. *Nature immunology*, 15(9), 798–807. <https://doi.org/10.1038/ni.2940>
- Chang, C.-H., Curtis, J. D., Maggi, L. B., Faubert, B., Villarino, A. V., O’Sullivan, D., Huang, S. C.-C., van der Windt, G. J. W., Blagih, J., Qiu, J., Weber, J. D., Pearce, E. J., Jones, R. G., & Pearce, E. L. (2013). Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell*, 153(6), 1239–1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.016>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chapman, N. M., Boothby, M. R., & Chi, H. (2020). Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 55–70. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chen, P.-H., Cai, L., Huffman, K., Yang, C., Kim, J., Faubert, B., Boroughs, L., Ko, B., Sudderth, J., McMillan, E. A., Girard, L., Chen, D., Peyton, M., Shields, M. D., Yao, B., Shames, D. S., Kim, H. S., Timmons, B., Sekine, I., ... DeBerardinis, R. J. (2019). Metabolic Diversity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Cell*, 76(5), 838-851.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.028>
- Chi, H., Pepper, M., & Thomas, P. G. (2024). Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell*, 187(9), 2052–2078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.037>
- Cibrián, D., & Sánchez-Madrid, F. (2017). CD69: From activation marker to metabolic gatekeeper. *European journal of immunology*, 47(6), 946–953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>

- Clark, M. C., & Baum, L. G. (2012). T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253, 58–67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06304.x>
- Cooper, M. D. (2015). The early history of B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 191–197. <https://doi.org/10.1038/nri3801>
- Corthay, A. (2006). A Three-cell Model for Activation of Naïve T Helper Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(2), 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01782.x>
- Courtney, A. H., Lo, W.-L., & Weiss, A. (2018). TCR SIGNALING: MECHANISMS OF INITIATION AND PROPAGATION. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(2), 108. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.008>
- Cruz-Muñoz, M. E., Salas-Vidal, E., Salaiza-Suazo, N., Becker, I., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2003). The CD43 Coreceptor Molecule Recruits the  $\zeta$ -Chain as Part of Its Signaling Pathway1. *The Journal of Immunology*, 171(4), 1901–1908. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1901>
- Cyster, J. G., Shotton, D. M., & Williams, A. F. (1991). The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *The EMBO Journal*, 10(4), 893–902.
- De Boer, R. J., Homann, D., & Perelson, A. S. (2003). Different Dynamics of CD4+ and CD8+ T Cell Responses During and After Acute Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection 1. *The Journal of Immunology*, 171(8), 3928–3935. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.3928>
- De Rosa, V., Galgani, M., Porcellini, A., Colamatteo, A., Santopaolo, M., Zuchegna, C., Romano, A., De Simone, S., Procaccini, C., La Rocca, C., Carrieri, P. B., Maniscalco, G. T., Salvetti, M., Buscarinu, M. C., Franzese, A., Mozzillo, E., La Cava, A., & Matarese, G. (2015). Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nature Immunology*, 16(11), 1174–1184. <https://doi.org/10.1038/ni.3269>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2020). We need to talk about the Warburg effect. *Nature Metabolism*, 2(2), 127–129. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- del Pozo, M. A., Sánchez-Mateos, P., Nieto, M., & Sánchez-Madrid, F. (1995). Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *The Journal of Cell Biology*, 131(2), 495–508. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.495>
- del Rio, R., Rincón, M., Layseca-Espinosa, E., Fierro, N. A., Rosenstein, Y., & Pedraza-Alva, G. (2004). PKC $\theta$  is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(1), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.006>
- Delgoffe, G. M., Kole, T. P., Zheng, Y., Zarek, P. E., Matthews, K. L., Xiao, B., Worley, P. F., Kozma, S. C., & Powell, J. D. (2009). The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment. *Immunity*, 30(6), 832–844. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.014>

- Delgoffe, G. M., Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Heikamp, E., Meyers, D. J., Horton, M. R., Xiao, B., Worley, P. F., & Powell, J. D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nature Immunology*, *12*(4), 295–303. <https://doi.org/10.1038/ni.2005>
- Delon, J., Kaibuchi, K., & Germain, R. N. (2001). Exclusion of CD43 from the Immunological Synapse Is Mediated by Phosphorylation-Regulated Relocation of the Cytoskeletal Adaptor Moesin. *Immunity*, *15*(5), 691–701. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00231-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00231-X)
- Diehn, M., Alizadeh, A. A., Rando, O. J., Liu, C. L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G. R., & Brown, P. O. (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(18), 11796–11801. <https://doi.org/10.1073/pnas.092284399>
- dos Santos, N. R., Ghysdael, J., & Tran Quang, C. (2019). The TCR/CD3 complex in leukemogenesis and as a therapeutic target in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Advances in Biological Regulation*, *74*, 100638. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100638>
- Drew, E., Merzaban, J. S., Seo, W., Ziltener, H. J., & McNagny, K. M. (2005). CD34 and CD43 Inhibit Mast Cell Adhesion and Are Required for Optimal Mast Cell Reconstitution. *Immunity*, *22*(1), 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.014>
- Eileen, R.-O., Christopher, Z., Dianne, K., & Fred S., R. (1987). Expression on Blood Cells of Sialoporphin, the Surface Glycoprotein That Is Defective in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Blood*, *70*(1), 104–109. <https://doi.org/10.1182/blood.V70.1.104.104>
- Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C. X., Laos, S., Baeckström, D., Sikut, A., Sikut, R., & Hansson, G. C. (2002). The Leukocyte Antigen CD43 Is Expressed in Different Cell Lines of Nonhematopoietic Origin. *Tumor Biology*, *23*(4), 193–201. <https://doi.org/10.1159/000067252>
- Fierro, N. A., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2006). TCR-Dependent Cell Response Is Modulated by the Timing of CD43 Engagement<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*, *176*(12), 7346–7353. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7346>
- Foster, K. G., & Fingar, D. C. (2010). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony\*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(19), 14071–14077. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.094003>
- Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., Plas, D. R., Elstrom, R. L., June, C. H., & Thompson, C. B. (2002). The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity*, *16*(6), 769–777. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00323-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00323-0)
- Fu, H., Vuononvirta, J., Fanti, S., Bonacina, F., D’Amati, A., Wang, G., Poobalasingam, T., Fankhaenel, M., Lucchesi, D., Coleby, R., Tarussio, D., Thorens, B., Hearnden, R. J., Longhi, M. P., Grevitt, P., Sheikh, M. H., Solito, E., Godinho, S. A., Bombardieri, M., ... Marelli-Berg, F. M. (2023). The glucose transporter 2 regulates CD8<sup>+</sup> T cell function via environment sensing. *Nature Metabolism*, *5*(11), 1969–1985. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00913-9>

Fu, Q., Cash, S. E., Andersen, J. J., Kennedy, C. R., Madadi, A. R., Raghavendra, M., Dietrich, L. L., Agger, W. A., & Shelley, C. S. (2014). Intracellular patterns of sialophorin expression define a new molecular classification of breast cancer and represent new targets for therapy. *British Journal of Cancer*, *110*(1), 146–155. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.526>

Fu, Q., Cash, S. E., Andersen, J. J., Kennedy, C. R., Oldenburg, D. G., Zander, V. B., Foley, G. R., & Simon Shelley, C. (2013). CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target. *International Journal of Cancer*, *132*(8), 1761–1770. <https://doi.org/10.1002/ijc.27873>

Fukuda, M. (2002). Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1573*(3), 394–405. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00409-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00409-9)

Fulcher, J. A., Chang, M. H., Wang, S., Almazan, T., Hashimi, S. T., Eriksson, A. U., Wen, X., Pang, M., Baum, L. G., Singh, R. R., & Lee, B. (2009). Galectin-1 Co-clusters CD43/CD45 on Dendritic Cells and Induces Cell Activation and Migration through Syk and Protein Kinase C Signaling \*. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(39), 26860–26870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.037507>

Gaud, G., Lesourne, R., & Love, P. E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, *18*(8), 485–497. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0020-8>

Geltink, R. I. K., Kyle, R. L., & Pearce, E. L. (2018). Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annual Review of Immunology*, *36*(Volume 36, 2018), 461–488. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053019>

Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R., Salomon, D. R., & Su, A. I. (2018). A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics*, *19*(1), 334. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4718-6>

Goldman, N. A., Katz, E. B., Glenn, A. S., Weldon, R. H., Jones, J. G., Lynch, U., Fezzari, M. J., Runowicz, C. D., Goldberg, G. L., & Charron, M. J. (2006). GLUT1 and GLUT8 in endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Modern Pathology*, *19*(11), 1429–1436. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800656>

Hasegawa, K., Tanaka, S., Fujiki, F., Morimoto, S., Nakano, K., Kinoshita, H., Okumura, A., Fujioka, Y., Urakawa, R., Nakajima, H., Tatsumi, N., Nakata, J., Takashima, S., Nishida, S., Tsuboi, A., Oka, Y., Oji, Y., Miyoshi, E., Hirata, T., ... Hosen, N. (2016). Glycosylation Status of CD43 Protein Is Associated with Resistance of Leukemia Cells to CTL-Mediated Cytolysis. *PLOS ONE*, *11*(3), e0152326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152326>

Hashimoto-Tane, A., & Saito, T. (2016). Dynamic Regulation of TCR–Microclusters and the Microsynapse for T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*, *7*, 255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00255>

Hernandez, J. D., Nguyen, J. T., He, J., Wang, W., Ardman, B., Green, J. M., Fukuda, M., & Baum, L. G. (2006). Galectin-1 Binds Different CD43 Glycoforms to Cluster CD43 and Regulate T Cell Death1. *The Journal of Immunology*, *177*(8), 5328–5336. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5328>

- Hirano, K., Miki, Y., Hirai, Y., Sato, R., Itoh, T., Hayashi, A., Yamanaka, M., Eda, S., & Beppu, M. (2005). A Multifunctional Shuttling Protein Nucleolin Is a Macrophage Receptor for Apoptotic Cells \*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39284–39293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505275200>
- Holman, G. D. (2020). Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(9), 1155–1175. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02411-3>
- Hosokawa, H., & Rothenberg, E. V. (2021). How transcription factors drive choice of T cell fate. *Nature reviews. Immunology*, 21(3), 162–176. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00426-6>
- Hwang, J.-R., Byeon, Y., Kim, D., & Park, S.-G. (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(5), 750–761. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>
- Innate, Adaptative, Passive-Active Immunities. (s/f). *Glycopedia*. Recuperado el 24 de julio de 2024, de <https://glycopedia.eu/echapter/introduction-9/innate-adaptative-passive-active-immunities-2/>
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4(9), 648–657. <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), 984–993. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
- Khunkaewla, P., Schiller, H. B., Paster, W., Leksa, V., Čermák, L., Anděra, L., Hořejší, V., & Stockinger, H. (2008). LFA-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA-1 and CD147. *Molecular Immunology*, 45(6), 1703–1711. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.032>
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 377–391. <https://doi.org/10.1038/nri3667>
- Koh, C.-H., Lee, S., Kwak, M., Kim, B.-S., & Chung, Y. (2023). CD8 T-cell subsets: Heterogeneity, functions, and therapeutic potential. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(11), 2287–2299. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01105-x>
- Kudo, S., & Fukuda, M. (1991). A short, novel promoter sequence confers the expression of human leukosialin, a major sialoglycoprotein on leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8483–8489. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93000-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93000-0)
- Kudo, S., & Fukuda, M. (1994). Transcriptional activation of human leukosialin (CD43) gene by Sp1 through binding to a GGGTGG motif. *European Journal of Biochemistry*, 223(2), 319–327. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18997.x>

- Kudo, S., & Fukuda, M. (1995). Tissue-specific Transcriptional Regulation of Human Leukosialin (CD43) Gene Is Achieved by DNA Methylation \*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13298–13302. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13298>
- Kuhns, M. S., & Badgandi, H. B. (2012). Piecing together the family portrait of TCR - CD 3 complexes. *Immunological Reviews*, 250(1), 120–143. <https://doi.org/10.1111/imr.12000>
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Künzli, M., & Masopust, D. (2023). CD4+ T cell memory. *Nature Immunology*, 24(6), 903–914. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01510-4>
- Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., & Koyasu, S. (2012). PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation by Regulating Gfi1 Expression and Nuclear Translocation of ROR $\gamma$ . *Cell Reports*, 1(4), 360–373. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.007>
- Kvainickas, A., Orgaz, A. J., Nägele, H., Diedrich, B., Heesom, K. J., Dengjel, J., Cullen, P. J., & Steinberg, F. (2017). Retromer- and WASH-dependent sorting of nutrient transporters requires a multivalent interaction network with ANKRD50. *Journal of Cell Science*, 130(2), 382–395. <https://doi.org/10.1242/jcs.196758>
- Layseca-Espinosa, E., Pedraza-Alva, G., Montiel, J. L., del Río, R., Fierro, N. A., González-Amaro, R., & Rosenstein, Y. (2003). T cell aggregation induced through CD43: Intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(6), 1083–1093. <https://doi.org/10.1189/jlb.0303095>
- Lee, E. E., Ma, J., Sacharidou, A., Mi, W., Salato, V. K., Nguyen, N., Jiang, Y., Pascual, J. M., North, P. E., Shaul, P. W., Mettlen, M., & Wang, R. C. (2015). A Protein Kinase C Phosphorylation Motif in GLUT1 Affects Glucose Transport and is Mutated in GLUT1 Deficiency Syndrome. *Molecular Cell*, 58(5), 845–853. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.015>
- Lee, K., Gudapati, P., Dragovic, S., Spencer, C., Joyce, S., Killeen, N., Magnuson, M. A., & Boothby, M. (2010). Mammalian Target of Rapamycin Protein Complex 2 Regulates Differentiation of Th1 and Th2 Cell Subsets via Distinct Signaling Pathways. *Immunity*, 32(6), 743–753. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.06.002>
- Lee, M. J., Yun, S. J., Lee, B., Jeong, E., Yoon, G., Kim, K., & Park, S. (2020). Association of TIM-3 expression with glucose metabolism in Jurkat T cells. *BMC Immunology*, 21(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00377-6>
- Lee, P.-S., Beneck, D., Weisberger, J., & Gorczyca, W. (2005). Coexpression of CD43 by Benign B Cells in the Terminal Ileum. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 13(2), 138. <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000126115.09998.6c>

- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., & Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 System of T Cell co stimulation. *Annual Review of Immunology*, *14*(1), 233–258. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.233>
- Li, M. O., & Rudensky, A. Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, *16*(4), 220–233. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.26>
- Li, W., Qu, G., Choi, S.-C., Cornaby, C., Titov, A., Kanda, N., Teng, X., Wang, H., & Morel, L. (2019). Targeting T Cell Activation and Lupus Autoimmune Phenotypes by Inhibiting Glucose Transporters. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00833>
- Li, Y., Tong, X., Huang, L., Li, L., Wang, C., He, C., Liu, S., Wang, Z., Xiao, M., Mao, X., & Zhang, D. (2021). A new score including CD43 and CD180: Increased diagnostic value for atypical chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Medicine*, *10*(13), 4387–4396. <https://doi.org/10.1002/cam4.3983>
- Liu, T., Han, S., Yao, Y., & Zhang, G. (2023). Role of Human Monocarboxylate Transporter 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4) in Tumor Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Management and Research*, *15*, 957–975. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S421771>
- Liu, X., & Wu, J. (2018). History, applications, and challenges of immune repertoire research. *Cell Biology and Toxicology*, *34*(6), 441–457. <https://doi.org/10.1007/s10565-018-9426-0>
- Long, W., & Cheeseman, C. I. (2015). Structure of, and functional insight into the GLUT family of membrane transporters. *Cell Health and Cytoskeleton*, *7*, 167–183. <https://doi.org/10.2147/CHC.S60484>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Journal of Immunology Research*, *2012*(1), 925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Lunt, S. Y., & Heiden, M. G. V. (2011). Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*(Volume 27, 2011), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Luo, W., & Semenza, G. L. (2011). Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget*, *2*(7), 551–556.
- Ma, S., Ming, Y., Wu, J., & Cui, G. (2024). Cellular metabolism regulates the differentiation and function of T-cell subsets. *Cellular & Molecular Immunology*, *21*(5), 419–435. <https://doi.org/10.1038/s41423-024-01148-8>
- Ma, X., Zhong, Y., Zheng, Y., Jiang, J., & Wang, Y. (2018). Coexpression of CD5 and CD43 predicts worse prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Medicine*, *7*(9), 4284–4295. <https://doi.org/10.1002/cam4.1674>
- Macintyre, A. N., Gerriets, V. A., Nichols, A. G., Michalek, R. D., Rudolph, M. C., Deoliveira, D., Anderson, S. M., Abel, E. D., Chen, B. J., Hale, L. P., & Rathmell, J. C. (2014). The Glucose Transporter Glut1 is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell metabolism*, *20*(1), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>

- Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M., & Ardman, B. (1995). Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature*, *377*(6549), 535–539. <https://doi.org/10.1038/377535a0>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *14*(2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Matsumoto, M., Atarashi, K., Umemoto, E., Furukawa, Y., Shigeta, A., Miyasaka, M., & Hirata, T. (2005). CD43 Functions as a Ligand for E-Selectin on Activated T Cells<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*, *175*(12), 8042–8050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8042>
- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., Sullivan, S. A., Nichols, A. G., & Rathmell, J. C. (2011). Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cell Subsets. *The Journal of Immunology*, *186*(6), 3299–3303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>
- Miller, J. f. a. p. (2004). Events that led to the discovery of T-cell development and function – a personal recollection. *Tissue Antigens*, *63*(6), 509–517. <https://doi.org/10.1111/j.0001-2815.2004.00255.x>
- Mora, T., & Walczak, A. M. (2016). *Quantifying lymphocyte receptor diversity* (p. 046870). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/046870>
- Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2013). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annual Review of Immunology*, *31*(Volume 31, 2013), 137–161. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095954>
- Nathan, C., Xie, Q., Halbwachs-Mecarelli, L., & Jin, W. (1993). Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *Journal of Cell Biology*, *122*(1), 243–256. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.243>
- Nong, Y. H., Remold-O'Donnell, E., LeBien, T. W., & Remold, H. G. (1989). A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *170*(1), 259–267. <https://doi.org/10.1084/jem.170.1.259>
- Ogawa, S., & Abe, R. (2019). Signal Transduction Via Co-stimulatory and Co-inhibitory Receptors. In M. Azuma & H. Yagita (Eds.), *Co-signal Molecules in T Cell Activation: Immune Regulation in Health and Disease* (pp. 85–133). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9717-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9717-3_4)
- Ostberg, J. R., Barth, R. K., & Frelinger, J. G. (1998). The Roman god Janus: A paradigm for the function of CD43. *Immunology Today*, *19*(12), 546–550. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01343-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01343-7)
- Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, M. G., Fournier, R. E., Carlsson, S. R., Fukuda, M., & Frelinger, J. G. (1989). Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(4), 1328–1332. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1328>

- Palmer, C. S., Ostrowski, M., Balderson, B., Christian, N., & Crowe, S. M. (2015). Glucose Metabolism Regulates T Cell Activation, Differentiation, and Functions. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00001>
- Park, J. K., Rosenstein, Y. J., Remold-O'Donnell, E., Bierer, B. E., Rosen, F. S., & Burakoff, S. J. (1991). Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott–Aldrich syndrome. *Nature*, 350(6320), 706–709. <https://doi.org/10.1038/350706a0>
- Payen, V. L., Mina, E., Hée, V. F. V., Porporato, P. E., & Sonveaux, P. (2019). Monocarboxylate transporters in cancer. *Molecular Metabolism*, 33, 48. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.07.006>
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L. B., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (1996). CD43-specific Activation of T Cells Induces Association of CD43 to Fyn Kinase \*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27564–27568. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27564>
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L. B., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (1998). T Cell Activation through the CD43 Molecule Leads to Vav Tyrosine Phosphorylation and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Activation \*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14218–14224. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14218>
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L. B., del Rio, R., Fierro, N. A., Cruz-Muñoz, M. E., Olivares, N., Melchy, E., Igras, V., Holländer, G. A., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (2011). CD43 regulates the threshold for T cell activation by targeting Cbl functions. *IUBMB Life*, 63(10), 940–948. <https://doi.org/10.1002/iub.554>
- Peng, M., Yin, N., Chhangawala, S., Xu, K., Leslie, C. S., & Li, M. O. (2016). Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6311), 481–484. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6284>
- Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., & Baum, L. G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558), 736–739. <https://doi.org/10.1038/378736a0>
- Piller, F., Piller, V., Fox, R. I., & Fukuda, M. (1988). Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(29), 15146–15150.
- Pragallapati, S., & Manyam, R. (2019). Glucose transporter 1 in health and disease. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 23(3), 443–449. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_22\\_18](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_22_18)
- Qualls-Histed, S. J., Nielsen, C. P., & MacGurn, J. A. (2023). Lysosomal trafficking of the glucose transporter GLUT1 requires sequential regulation by TXNIP and ubiquitin. *iScience*, 26(3). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106150>
- Ramírez-Pliego, O., Escobar-Zárate, D. L., Rivera-Martínez, G. M., Cervantes-Badillo, M. G., Esquivel-Guadarrama, F. R., Rosas-Salgado, G., Rosenstein, Y., & Santana, M. A. (2007). CD43 signals induce Type One lineage commitment of human CD4+ T cells. *BMC Immunology*, 8(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-30>

- Rangel Rivera, G. O., Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Smith, A. S., Wyatt, M. M., Rivera-Reyes, A. M., Thaxton, J. E., & Paulos, C. M. (2021). Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *12*.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645242>
- Raynor, J. L., & Chi, H. (2024). Nutrients: Signal 4 in T cell immunity. *Journal of Experimental Medicine*, *221*(3), e20221839. <https://doi.org/10.1084/jem.20221839>
- Remold-O'Donnell, E., & Parent, D. (1995). Downregulation of Neutrophil CD43 by Opsonized Zymosan. *Blood*, *85*(2), 337–342. <https://doi.org/10.1182/blood.V85.2.337.337>
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, *148*(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Rosenkranz, A. R., Majdic, O., Stöckl, J., Pickl, W., Stockinger, H., & Knapp, W. (1993). Induction of neutrophil homotypic adhesion via sialophorin (CD43), a surface sialoglycoprotein restricted to haemopoietic cells. *Immunology*, *80*(3), 431.
- Rosenstein, Y., Park, J. K., Hahn, W. C., Rosen, F. S., Bierer, B. E., & Burakoff, S. J. (1991). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature*, *354*(6350), 233–235. <https://doi.org/10.1038/354233a0>
- Roumier, A., Olivo-Marin, J. C., Arpin, M., Michel, F., Martin, M., Mangeat, P., Acuto, O., Dautry-Varsat, A., & Alcover, A. (2001). The Membrane-Microfilament Linker Ezrin Is Involved in the Formation of the Immunological Synapse and in T Cell Activation. *Immunity*, *15*(5), 715–728. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00225-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00225-4)
- Roy, S., Leidal, A. M., Ye, J., Ronen, S. M., & Debnath, J. (2017). Autophagy-Dependent Shuttling of TBC1D5 Controls Plasma Membrane Translocation of GLUT1 and Glucose Uptake. *Molecular Cell*, *67*(1), 84–95.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.020>
- Salmond, R. J. (2018). mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00122>
- Salmond, R. J., Filby, A., Qureshi, I., Caserta, S., & Zamoyska, R. (2009). T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunological Reviews*, *228*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00745.x>
- Sanchez-Mateos, P., Campanero, M. R., Pozo, M. A. del, & Sanchez-Madrid, F. (1995). Regulatory Role of CD43 Leukosialin on Integrin-Mediated T-Cell Adhesion to Endothelial and Extracellular Matrix Ligands and Its Polar Redistribution to a Cellular Uropod. *Blood*, *86*(6), 2228–2239. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.6.2228.bloodjournal8662228>
- Sandoval-Hernández, M. A., Fierro, N. A., Veytia-Bucheli, J. I., Alvarado-Velázquez, D. A., Alemán-Navarro, E., Melchy-Pérez, E., Auvynet, C., Imaz-Rosshandler, I., Carneiro, J., Perez-Rueda, E., & Rosenstein, Y. (2024). Differential Impact of CD43 and CD28 on T-Cell Differentiation Depending on the Order of Engagement with the TCR. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms25063135>

Santamaría, M., López-Beltrán, A., Toro, M., Peña, J., & Molina, I. J. (1996). Specific Monoclonal Antibodies against Leukocyte-restricted Cell Surface Molecule CD43 React with Nonhematopoietic Tumor Cells. *Cancer Research*, *56*(15), 3526–3529.

Santana, M. A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (2000). CD43-mediated Signals Induce DNA Binding Activity of AP-1, NF-AT, and NFκB Transcription Factors in Human T Lymphocytes\*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(40), 31460–31468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005231200>

Sá-Nunes, A. (2021). Overview of Immune Responses. En N. O. S. Camara, J. C. Alves-Filho, P. M. M. de Moraes-Vieira, & V. Andrade-Oliveira (Eds.), *Essential Aspects of Immunometabolism in Health and Disease* (pp. 1–11). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-86684-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-86684-6_1)

Schmid, K., Hediger, M. A., Brossmer, R., Collins, J. H., Haupt, H., Marti, T., Offner, G. D., Schaller, J., Takagaki, K., & Walsh, M. T. (1992). Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: Identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(2), 663–667.

Schneider, U., Schwenk, H.-U., & Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, *19*(5), 621–626. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>

Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., Wang, C.-R., Schumacker, P. T., Licht, J. D., Perlman, H., Bryce, P. J., & Chandel, N. S. (2013). Mitochondria Are Required for Antigen-Specific T Cell Activation through Reactive Oxygen Species Signaling. *Immunity*, *38*(2), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.020>

Seo, W., & Ziltener, H. J. (2009). CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood*, *114*(17), 3567–3577. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-228791>

Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J., & Kazi, J. U. (2021). T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w>

Shan, X., Czar, M. J., Bunnell, S. C., Liu, P., Liu, Y., Schwartzberg, P. L., & Wange, R. L. (2000). Deficiency of PTEN in Jurkat T Cells Causes Constitutive Localization of Itk to the Plasma Membrane and Hyperresponsiveness to CD3 Stimulation. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(18), 6945–6957.

Shelley, C. S., Remold-O'Donnell, E., Davis, A. E., Bruns, G. A., Rosen, F. S., Carroll, M. C., & Whitehead, A. S. (1989). Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(8), 2819–2823. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2819>

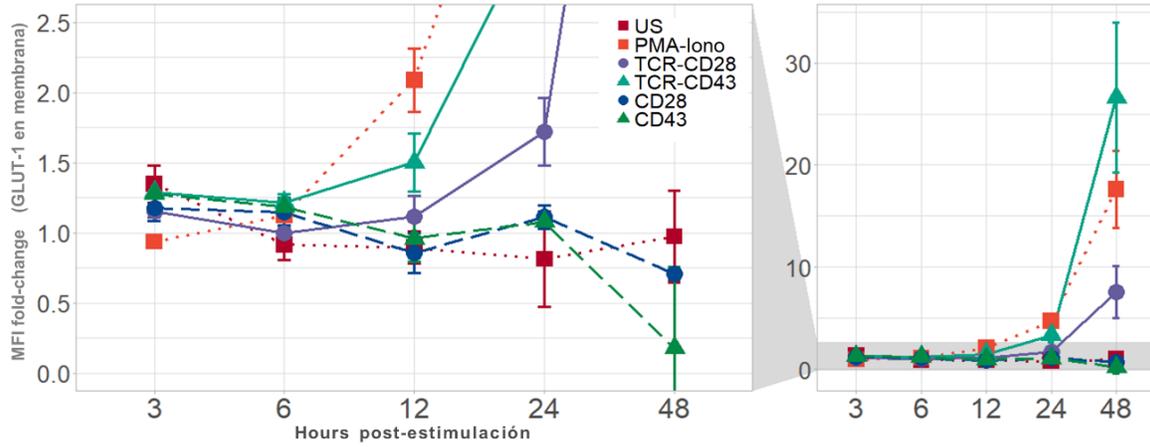
- Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R., & Chi, H. (2011). HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(7), 1367–1376. <https://doi.org/10.1084/jem.20110278>
- Shinde, S. R., & Maddika, S. (2017). PTEN Regulates Glucose Transporter Recycling by Impairing SNX27 Retromer Assembly. *Cell Reports*, *21*(6), 1655–1666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.053>
- Shyer, J. A., Flavell, R. A., & Bailis, W. (2020). Metabolic signaling in T cells. *Cell Research*, *30*(8), 649–659. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0379-5>
- Silverman, L. B., Wong, R. C., Remold-O'Donnell, E., Vercelli, D., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F., Geha, R., & Chatila, T. (1989). Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *The Journal of Immunology*, *142*(12), 4194–4200. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.142.12.4194>
- Simms, P. E., & Ellis, T. M. (1996). Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *3*(3), 301. <https://doi.org/10.1128/cdli.3.3.301-304.1996>
- Siska, P. J., & Rathmell, J. C. (2015). PKCs Sweeten Cell Metabolism by Phosphorylation of Glut1. *Molecular Cell*, *58*(5), 711–712. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.025>
- Sorigue, M. (2021). CD43 in the malignant flow cytometry laboratory in 2020. *Expert Review of Hematology*, *14*(1), 123–136. <https://doi.org/10.1080/17474086.2021.1856653>
- Sorigue, M., Juncà, J., Sarrate, E., & Grau, J. (2018). Expression of CD43 in chronic lymphoproliferative leukemias. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *94*(1), 136–142. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21509>
- Sperling, A. I., Green, J. M., Mosley, R. L., Smith, P. L., DiPaolo, R. J., Klein, J. R., Bluestone, J. A., & Thompson, C. B. (1995). CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(1), 139–146. <https://doi.org/10.1084/jem.182.1.139>
- Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas, E. C., Bell, A. J., Heesom, K. J., Tavaré, J. M., & Cullen, P. J. (2013). A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nature Cell Biology*, *15*(5), 461–471. <https://doi.org/10.1038/ncb2721>
- Stöckl, J., Majdic, O., Kohl, P., Pickl, W. F., Menzel, J. E., & Knapp, W. (1996). Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *Journal of Experimental Medicine*, *184*(5), 1769–1779. <https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1769>
- Stockton, B. M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., & Andrian, U. H. von. (1998). Negative Regulation of T Cell Homing by CD43. *Immunity*, *8*(3), 373–381. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80542-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80542-7)

- Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X., & Zhang, B. (2023). T cells in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–50. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>
- Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 579–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>
- Thorens, B., & Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(2), E141–E145. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>
- Torres-Huerta, A., Aleman-Navarro, E., Bravo-Adame, M. E., Sandoval-Hernandez, M. A., Migueles-Lozano, O. A., & Rosenstein, Y. (2018). CD43. En S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules* (pp. 893–905). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4\\_523](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_523)
- Trepel, F. (1974). Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift*, 52(11), 511–515. <https://doi.org/10.1007/BF01468720>
- Trinquand, A., dos Santos, N. R., Tran Quang, C., Rocchetti, F., Zaniboni, B., Belhocine, M., Da Costa de Jesus, C., Lhermitte, L., Tesio, M., Dussiot, M., Cosset, F.-L., Verhoeyen, E., Pflumio, F., Ifrah, N., Dombret, H., Spicuglia, S., Chatenoud, L., Gross, D.-A., Hermine, O., ... Asnafi, V. (2016). Triggering the TCR Developmental Checkpoint Activates a Therapeutically Targetable Tumor Suppressive Pathway in T-cell Leukemia. *Cancer Discovery*, 6(9), 972–985. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0675>
- Tsang, M., Gantchev, J., Ghazawi, F. M., & Litvinov, I. V. (2017). Protocol for adhesion and immunostaining of lymphocytes and other non-adherent cells in culture. *BioTechniques*, 63(5), 230–233. <https://doi.org/10.2144/000114610>
- Tuccillo, F. M., Palmieri, C., Fiume, G., de Laurentiis, A., Schiavone, M., Falcone, C., Iaccino, E., Galandrini, R., Capuano, C., Santoni, A., D'Armiento, F. P., Arra, C., Barbieri, A., Dal Piaz, F., Venzon, D., Bonelli, P., Buonaguro, F. M., Scala, I., Mallardo, M., ... Scala, G. (2014). Cancer-Associated CD43 Glycoforms as Target of Immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(3), 752–762. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0651>
- Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J., & Rossjohn, J. (2006). Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(12), 883–894. <https://doi.org/10.1038/nri1977>
- van den Berg, T. K., Nath, D., Ziltener, H. J., Vestweber, D., Fukuda, M., van Die, I., & Crocker, P. R. (2001). Cutting Edge: CD43 Functions as a T Cell Counterreceptor for the Macrophage Adhesion Receptor Sialoadhesin (Siglec-1). *The Journal of Immunology*, 166(6), 3637–3640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.3637>
- Vanhaesebroeck, B., & Alessi, D. R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochemical Journal*, 346(Pt 3), 561–576.
- Vega-Mendoza, D., Cañas-Linares, A., Flores-Alcantar, A., Espinosa-Neira, R., Melchy-Perez, E., Vera-Estrella, R., Auvynet, C., & Rosenstein, Y. (2021). CD43 (sialophorin) is involved in the

- induction of extracellular matrix remodeling and angiogenesis by lung cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 236(9), 6643–6656. <https://doi.org/10.1002/jcp.30308>
- Velázquez, F., Grodecki-Pena, A., Knapp, A., Salvador, A. M., Nevers, T., Croce, K. J., & Alcaide, P. (2016). CD43 Functions as an E-Selectin Ligand for Th17 Cells In Vitro and Is Required for Rolling on the Vascular Endothelium and Th17 Cell Recruitment during Inflammation In Vivo. *The Journal of Immunology*, 196(3), 1305–1316. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501171>
- Wang, B., Pei, J., Xu, S., Liu, J., & Yu, J. (2024). A glutamine tug-of-war between cancer and immune cells: Recent advances in unraveling the ongoing battle. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 43(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02994-0>
- Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., & Green, D. R. (2011). The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity*, 35(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.021>
- Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148–163. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>
- Weisel, F., & Shlomchik, M. (2017). Memory B Cells of Mice and Humans. *Annual Review of Immunology*, 35(Volume 35, 2017), 255–284. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055531>
- Wikén, M., Björck, P., Axelsson, B., & Perlmann, P. (1988). Induction of CD43 Expression during Activation and Terminal Differentiation of Human B Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 28(4), 457–464. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1988.tb01476.x>
- Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T. E., Kahn, B. B., & Cantley, L. C. (2013). AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell*, 49(6), 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.035>
- Wucherpfennig, K. W., Gagnon, E., Call, M. J., Huseby, E. S., & Call, M. E. (2010). Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), a005140–a005140. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005140>
- Yang, Y., Feng, J., Lü, S., & Wang, X. (2016). Energy metabolism of T-lymphocytes and its biological significance. *Science Bulletin*, 61(16), 1270–1280. <https://doi.org/10.1007/s11434-016-1138-3>
- Yin, Q., Fu, T.-M., Li, J., & Wu, H. (2015). Structural Biology of Innate Immunity. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 393–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112258>
- Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1998). Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins Bind to a Positively Charged Amino Acid Cluster in the Juxta-Membrane Cytoplasmic Domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *The Journal of Cell Biology*, 140(4), 885–895.

- Yoshimura, A., Asahina, Y., Chang, L.-Y., Angata, T., Tanaka, H., Kitajima, K., & Sato, C. (2021). Identification and functional characterization of a Siglec-7 counter-receptor on K562 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100477. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100477>
- Yun, K., Siegler, E. L., & Kenderian, S. S. (2023). Who wins the combat, CAR or TCR? *Leukemia*, 37(10), 1953–1962. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01976-z>
- Zambrano, A., Molt, M., Uribe, E., & Salas, M. (2019). Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3374. <https://doi.org/10.3390/ijms20133374>
- Zhang, S., Zhang, X., Wang, K., Xu, X., Li, M., Zhang, J., Zhang, Y., Hao, J., Sun, X., Chen, Y., Liu, X., Chang, Y., Jin, R., Wu, H., & Ge, Q. (2018). Newly Generated CD4+ T Cells Acquire Metabolic Quiescence after Thymic Egress. *The Journal of Immunology*, 200(3), 1064–1077. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700721>
- Zhou, H., Yan, H., Cannon, J. L., Springer, L. E., Green, J. M., & Pham, C. T. N. (2013). CD43-Mediated IFN- $\gamma$  Production by CD8+ T Cells Promotes Abdominal Aortic Aneurysm in Mice. *The Journal of Immunology*, 190(10), 5078–5085. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203228>
- Zindel, J., & Kubes, P. (2020). DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15(Volume 15, 2020), 493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>
- Zong, Z., Xie, F., Wang, S., Wu, X., Zhang, Z., Yang, B., & Zhou, F. (2024). Alanyl-tRNA synthetase, AARS1, is a lactate sensor and lactyltransferase that lactylates p53 and contributes to tumorigenesis. *Cell*, 187(10), 2375-2392.e33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.04.002>

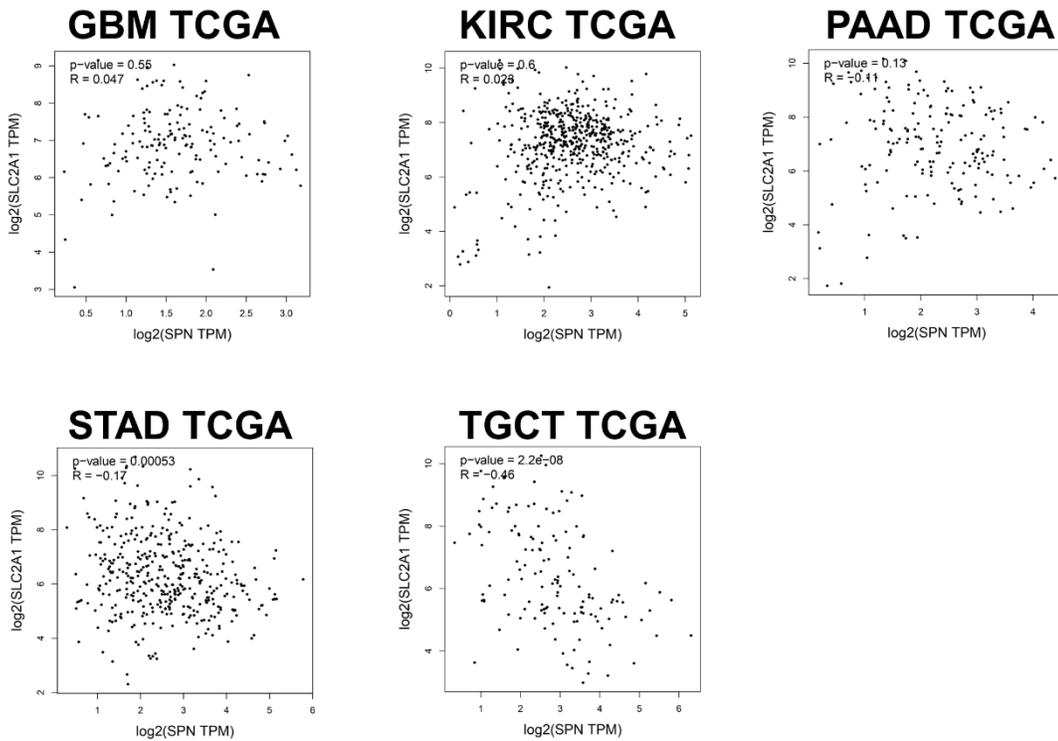
# **IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO**



**Figura S1.** Cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI Fold-change) para *Glut-1* en membrana de *LTs CD4+* estimulados durante tiempos cortos representada como: (MFI de *Glut-1* en Condición de estudio)/(MFI *Glut-1* en condición US a tiempo cero (0h)).







**Figura S4.** Correlación entre los niveles de GLUT-1 (SLC2A1) y CD43 en muestras tumorales con sobreexpresión de CD43. Los datos públicos de Bulk RNA-Seq de tumores y tejido sano extraídos de TCGA y GTEx se analizaron utilizando la plataforma GEPIA2. Se utilizó el análisis de correlación de spearman para los TPM.