



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Evaluación del papel de CRTAM en la generación de  
linfocitos T de memoria”**

**TESIS**

Que presenta

**QFB. GABRIELA HERNÁNDEZ GALICIA**

Para obtener el grado de  
**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de tesis:

**Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete**

**Dra. Irlanda Olvera Gómez**

Ciudad de México

Agosto, 2020.

## **Directores de tesis**

### **Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete**

Investigador titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

### **Dra. Irlanda Olvera Gómez**

Investigadora Titular del Hospital Nacional Homeopático.

## **Asesores de la Tesis**

### **Dr. Leopoldo Santos Argumedo.**

Jefe de departamento e investigador titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN.

### **Dra. María Carmen Sánchez Torres.**

Investigadora titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN.

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Vianney Ortiz Navarrete del Departamento de Biomedicina Molecular perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado a través de la beca número 724995 a la C. Gabriela Hernández Galicia con número de CVU 934094.

## **Agradecimientos**

Al *Dr. Vianney Ortiz* por su guía, enseñanza y por brindarme la confianza de poder desarrollar mi trabajo experimental en su laboratorio.

Al *Dr. Leopoldo Santos Argumedo* y la *Dra. María Carmen Sánchez Torres* por sus consejos y apoyo para la elaboración de este proyecto.

A *Benjamín Ortiz* y *Jesús Guzmán (Chuchín)* por su invaluable apoyo técnico para la realización de este proyecto.

A mis amigos de laboratorio, *Carlos Samuel*, *Luis Uriel* y *Julio* por sus valiosas enseñanzas, consejos, asesoría y apoyo para la realización del proyecto.

A mi *madre*, *padre* y *hermanas*, por siempre creer en mí y apoyarme en cada etapa de mi vida.

*A mis padres y hermanas,  
por su amor y apoyo incondicional.*

## Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1 Introducción.....	3
1.1 Memoria inmunológica.....	3
1.2 CRTAM.....	14
2 Antecedentes .....	16
3 Justificación.....	16
4 Hipótesis .....	17
5 Objetivos .....	17
6 Materiales y métodos.....	17
6.1 Ratones e infección .....	17
6.2 Obtención de células.....	18
6.3 Citometría de flujo.....	18
6.4 Unidades Formadoras de Colonias.....	19
6.5 Extracción de DNA y PCR .....	19
7 Resultados .....	20
7.1 En homeostasis la proporción de Tmem es independiente de CRTAM.....	20
7.2 CRTAM influye en la generación de Tcm y Tem.....	24
7.3 CRTAM se requiere para la formación de una adecuada inmunidad protectora ante una infección bacteriana.....	26
8 Discusión.....	27
9 Conclusión .....	29
10 Perspectivas .....	29
11 Referencias.....	30
12 Anexos .....	36

## Índice de figuras

Figura 1-1 El número de encuentros con el antígeno y el tiempo modifican la población de linfocitos T de memoria.....	13
Figura 7-1 En homeostasis la frecuencia de linfocitos de memoria es independiente de CRTAM.....	21
Figura 7-2 La expresión de CD44 y CD62L es independiente de CRTAM. ....	22
Figura 7-3 Dosis bajas de <i>Salmonella aroA</i> - son suficientes para inducir la expansión de linfocitos T.....	23
Figura 7-4 La expresión de CRTAM está asociada a la generación de linfocitos T de memoria. ....	23
Figura 7-5 La generación de linfocitos T de memoria es similar en ausencia de CRTAM posterior a un reto antigénico.. ....	24
Figura 7-6 CRTAM es necesario para la generación de inmunidad protectora ante una infección bacteriana.. ....	25
Suplementaria 1 Estrategia de análisis para la identificación de las poblaciones de memoria. ....	36
Suplementaria 2 En homeostasis el número de linfocitos de memoria es independiente de CRTAM.....	37
Suplementaria 3 Ante un estímulo antigénico la expresión de CD44 y CD62L es independiente de CRTAM. ....	38

## Índice de tablas

Tabla 1 Iniciadores y su secuencia.....	19
---	----

## Lista de abreviaturas

<b>Ag</b>	Antígeno
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígenos (por sus siglas en inglés, <i>Antigen presenting cells</i> )
<b>CD4+</b>	Linfocitos T CD4
<b>CD8+</b>	Linfocitos T CD8
<b>CRTAM</b>	Molécula asociada a linfocitos T restringida al complejo principal de histocompatibilidad clase I.
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b>GPD2</b>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2
<b>HK2</b>	Hexocinasa 2
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>MPEC</b>	Linfocito efector precursor de células de memoria (por sus siglas en inglés <i>memory precursor effector cells</i> )
<b>mTORC1</b>	Complejo sensible a rampamicina 1 (por sus siglas en inglés, <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i> )
<b>Ncl-2</b>	Tipo nectina-2 (por sus siglas en inglés, <i>nectin-like 2</i> )
<b>SLEC</b>	Linfocito efector de vida corta (por sus siglas en inglés, <i>short-lived effector cell</i> )
<b>Tcm</b>	Linfocito T de memoria central
<b>TCR</b>	Receptor de linfocitos T
<b>Tef</b>	Linfocito T efector

<b>Tem</b>	Linfocito T de memoria efectora
<b>Tmem</b>	Linfocito T de memoria
<b>Tn</b>	Linfocitos T naïve
<b>Trm</b>	Linfocito T de memoria residente de tejidos
<b>Tscm</b>	Linfocito T stem cell de memoria
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias

## Resumen

CRTAM es una molécula de adhesión que se expresa en células del sistema inmune tales como linfocitos T CD4+ y CD8+ posterior a la activación. CRTAM regula la producción de citocinas y participa en la polarización tardía de moléculas como CD44 y talina, en linfocitos T CD4+ activados *in vitro*. Por lo que se consideró relevante evaluar su participación en la generación de linfocitos T de memoria (Tmem). Para ello, se utilizó un modelo de infección con una cepa atenuada de *Salmonella (aroA-)* en ratones *Crtam<sup>-/-</sup>*. La frecuencia de los linfocitos Tmem se analizó por citometría de flujo en ganglios linfáticos y bazo. Los resultados indican que en condiciones homeostáticas la frecuencia de las poblaciones con un fenotipo de memoria central o efectora es independiente de CRTAM. Posterior a la inmunización con la cepa vacunal de *Salmonella aroA-* se detectó una disminución en las poblaciones de memoria central y efectora en ausencia de CRTAM(*Crtam<sup>-/-</sup>*); y ante un reto con la cepa virulenta de *Salmonella (14028)*, se observó un control deficiente en los ratones *Crtam<sup>-/-</sup>*. En conclusión, los resultados sugieren que CRTAM participa en la generación de inmunidad protectora.

## Abstract

CRTAM is an adhesion molecule that is expressed in cells of the immune system such as CD4 + and CD8 + T lymphocytes after activation. CRTAM regulates cytokine production and participates in the late polarization of molecules such as CD44 and talin, in CD4+ lymphocytes activated in vitro. Therefore, it was considered relevant to evaluate their participation in the generation of memory T lymphocytes (Tmem). For this, an infection model with an attenuated strain of *Salmonella* (*aroA*-) in *Crtam*<sup>-/-</sup> mice was used. The frequency of Tmem lymphocytes was analyzed by flow cytometry in lymph nodes and spleen. The results indicate that under homeostatic conditions the frequency of populations with a central memory or effector phenotype is independent of CRTAM. After immunization with the *Salmonella aroA*- vaccine strain, a decrease in the central memory and effector populations was detected in the absence of CRTAM (*Crtam*<sup>-/-</sup>); and upon challenge with the virulent strain of *Salmonella* (14028), poor control was observed in *Crtam*<sup>-/-</sup> mice. In conclusion, the results suggest that CRTAM participates in the generation of protective immunity.

# 1 Introducción

## 1.1 Memoria inmunológica

Posterior a la exposición a un antígeno, este es transportado por células presentadoras de antígenos (APCs) a órganos linfoides secundarios y activan a linfocitos T naïve ( $T_n$ ) específicos. La activación de los linfocitos conlleva a la proliferación, proceso que se denomina expansión clonal, y diferenciación a linfocitos efectores. Una vez que la concentración de antígeno (Ag) disminuye, hay una fase de contracción, en la que aproximadamente del 90% al 95% de estas clonas específicas mueren por apoptosis. El 5% al 10% restante persisten como linfocitos T de memoria ( $T_{mem}$ ). Ante una segunda exposición con su Ag afín, la respuesta inmune es más eficiente, esto se atribuye a que los linfocitos  $T_{mem}$  están en mayor número, tienen mejor capacidad efectora y proliferan más rápido comparado con linfocitos  $T_n$ (1).

Hoy en día, hay muchas incógnitas acerca de la generación de los linfocitos  $T_{mem}$ , entre ellas, qué es lo que determina su generación o en qué etapa de la respuesta inmune se forman. La evidencia sugiere que factores como: la interacción inicial y concentración del Ag, la intensidad de la señal de TCR, citocinas y la duración de la fase efectora influyen en el compromiso hacia  $T_{mem}$  (2)

### 1.1.1 Linfocitos T de memoria

#### 1.1.2 Características de las $T_{mem}$

Se sabe que los linfocitos  $T_{mem}$  son un grupo heterogéneo de células con características en común, destacan su capacidad de persistir por un largo tiempo y mantener un número constante en órganos linfoides secundarios y circulación.(1,3,4).

También, tienen un índice de proliferación mayor, por lo que ante una respuesta secundaria la fase de expansión es de mayor magnitud(5).

En cuanto a funciones efectoras, se ha demostrado que un mayor porcentaje de los linfocitos Tmem CD4+ o CD8+ son capaces de producir dos a tres citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL-2 o TNF (5,6). Esto puede explicarse por mecanismos epigénéticos, existe evidencia que los *loci* de genes de citocinas como el de *Il-2* o *IFN- $\gamma$*  sufren desmetilación del DNA en la región promotora, así como un enriquecimiento de marcas de activación (acetilación de la histona H3) posterior a la activación de los linfocitos y éstas marcas se mantienen en los Tmem(7). Para los linfocitos Tmem CD8+ se ha evidenciado que tienen mejor actividad citotóxica(8).

Se ha descrito que los linfocitos Tmem, se activan preferencialmente con Ag de alta afinidad y que están en mayor concentración si se comparan con los linfocitos Tn.(9,10). Esto podría explicarse debido a que los linfocitos Tmem tienen una menor concentración de complejos TCR en su superficie y una mayor cantidad de fosfatasa, lo que influye negativamente en la activación (11). Después de ser activados los linfocitos Tmem, tienen una mayor cantidad de balsas lipídicas, p-LAT (LAT fosforilado) y proteínas que participan en la vía de las MAP-quinasas fosforiladas (ej. ERK y JNK). Esto nos indica, que los linfocitos Tmem tienen mecanismos compensatorios que le permiten ser eficientes en la transducción de la señal del TCR(10,11).

En lo que concierne al metabolismo, se ha descrito que los linfocitos Tmem requieren de la oxidación de ácidos grasos como principal fuente de energía, a diferencia de los linfocitos T efectores (Tef), que utilizan como principal fuente de energía a la glucosa. Esto se explica principalmente por la segregación diferencial de componentes celulares posterior a la activación, como el complejo mTORC1 y c-myc, considerados reguladores maestros del

metabolismo. Se ha descrito que los MPECs (linfocitos T efectores precursores de memoria, por sus siglas en inglés *memory precursor effector cells*) tienen menor expresión de enzimas involucradas en el catabolismo de glucosa, como HK2 (hexocinasa 2) y la GPD2 (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2), así como una mayor concentración de compuestos involucrados en el metabolismo de ácidos grasos(12,13).

### 1.1.3 Modelos de diferenciación de linfocitos T de memoria

Se han propuesto múltiples modelos de diferenciación de los linfocitos Tmem. Uno de ellos, se denomina modelo de diferenciación lineal o progresivo, este propone que un linfocito Tn puede ser capaz de diferenciarse hacia Tef en el siguiente orden: Tn>Tscm>Tcm > Tem > Tef, esto dependerá de la duración y de la intensidad de la respuesta contra el Ag, lo que depende de la persistencia del mismo(4).

Si consideramos el modelo de diferenciación progresivo, conforme los linfocitos Tmem se van diferenciando, la capacidad de proliferar y de auto-renovación disminuyen y su localización es preferencialmente en circulación o en tejidos. (5).

En las primeras etapas de este proceso de diferenciación hay mayor enriquecimiento de marcas de activación transcripcional en genes asociados a un fenotipo de memoria y marcas de represión en aquellos asociados a un fenotipo efector, conforme se van diferenciando los linfocitos, este patrón se invierte. Esto concuerda con perfiles de expresión de genes como *Klrg1*, *Tbx21*, *Eomes*, *Foxo1*, *Il7r* y *Bcl2* (19,20).

Otro de los modelos indica que hay linfocitos T pre-programados para convertirse en Tmem, determinado principalmente por la duración del estímulo antigénico lo que promueve un perfil epigénético distinto, que impacta en el destino celular(21). Recientemente se ha descrito que el Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2, por sus siglas

en inglés *Polycomb Repressive Complex-2*), así como los factores transcripción Runx3 y Foxo1 son importantes en este proceso, ya que regulan el balance entre marcas de represión y de activación en genes asociados a un fenotipo de linfocito de Tmem o Tef(22,23).

Para la generación de los Trm, se ha propuesto un modelo de pre-acondicionamiento. En este las DCs (células dendríticas) migratorias de la epidermis que expresan las integrinas  $\alpha V\beta 8$ , migran a los ganglios linfáticos en condiciones homeostáticas, aquí son capaces de activar a TGF- $\beta$ , esto ocasiona cambios epigénéticos que condicionan a estos linfocitos a la formación de Trm(17).

#### 1.1.4 Subpoblaciones de linfocitos de memoria

Se han identificado diversas poblaciones de Tmem, que pueden ser identificadas con base en la expresión de moléculas en su superficie, patrones de migración y capacidad efectora. A continuación, se describen las características funcionales y efectoras de las poblaciones de memoria.

##### 1.1.4.1 Linfocitos T de memoria multipotentes (*Tscm*)

Los Tscm (del inglés, *stem cell memory*) son una población de linfocitos Tmem que conservan características de multipotencia y auto-renovación. Los Tscm se han descrito tanto en ratones como en humanos(5,14). Tienen el mismo patrón de migración que los linfocitos Tn y fenotípicamente son similares, ambas poblaciones son CD44<sup>low</sup>/CD62L<sup>high</sup>, aunque los Tscm pueden diferenciarse por la expresión de moléculas como Sca-1 (antígeno de célula troncal-1, *stem cell antigen-1*), Bcl-2 y CD122 (en ratones)(14).

Estos linfocitos tienen un índice de proliferación mayor comparado con otros linfocitos de memoria (en homeostáticas o ante un estímulo antigénico), tienen mejor

actividad anti-tumoral, una alta proporción de ellas conserva su fenotipo después de la activación y son capaces de dar origen a otras poblaciones de Tmem. Por algunas de estas características se denominan *stem cell* de memoria (5,14,15).

En cuanto a su formación, se conoce que la activación de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina favorece la formación de esta población por sobre la de linfocitos T efectores, a través de los factores de transcripción TCF1 y LEF1(14). También se ha descrito que una alta expresión de T-bet y Eomes inhiben la diferenciación a Tscm y promueven la de Tcm y Tem(4,15).

#### 1.1.4.2 Linfocitos T de Memoria Central ( $T_{cm}$ )

Esta población se caracteriza por estar preferentemente en ganglios linfáticos y en menor proporción en circulación, proliferar en mayor magnitud ante un reencuentro con su antígeno afín y ser importantes productoras de IL-2. Fenotípicamente se pueden identificar como: CCR7<sup>hi</sup>/CD62L<sup>hi</sup>, CD127<sup>hi</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> o CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>(humanos), lo que explica su ubicación preferencial en órganos linfoides secundarios. Por su ubicación, su función se ha asociado principalmente al control de infecciones sistémicas y crónicas(2).

#### 1.1.4.3 Linfocitos T de Memoria Efectora ( $T_{em}$ )

Se caracterizan principalmente por tener mejor actividad citotóxica y preferencialmente encontrarse en sangre y bazo, si se les compara con los Tcm tienen una mejor capacidad proliferativa, una mayor proporción de células son productoras de Gzm B e IFN- $\gamma$ . Fenotípicamente se pueden definir como: CCR7<sup>lo</sup>/CD62L<sup>lo</sup>, CD127<sup>hi</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD62L, CX3CR1<sup>hi</sup> o CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>(humanos)(16). Estas células son importantes para combatir infecciones que inician en tejidos no linfoides, así como aquellas ocasionadas por microorganismos intracelulares(2).

#### 1.1.4.4 *Linfocitos T de memoria residentes de tejidos (Trm)*

Los Trm se caracterizan por residir permanentemente en tejidos y no encontrarse en circulación. Estos se pueden identificar por la expresión de CD103, CD49a y CD69, que promueven la entrada y permanencia en tejidos, cabe destacar que no expresan KLRG1, CCR7 y CD62L, que son características de otras poblaciones de Tmem. Son importantes por su ubicación estratégica, ya que ante un reencuentro con su antígeno afín son capaces de proliferar *in-situ* y liberar citocinas que promueven el reclutamiento de células del sistema inmune innato, así como de linfocitos(2).

Evidencia reciente indica que la formación de los Trm de la epidermis requiere de pre-acondicionamiento, un fenómeno mediado por células dendríticas migratorias de la piel, que migran a los ganglios linfáticos y son capaces de activar a TGF- $\beta$ , lo que conlleva a cambios epigenéticos en los linfocitos T naïve que favorecen la generación de Trm, este mecanismo se ha descrito exclusivamente para los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (veasé:*Modelos de diferenciación de Tmem*, abajo)(17,18).

#### 1.1.4.5 *Linfocitos T de memoria periférica (Tpm)*

Esta población es la que se ha descrito más recientemente. Se diferencian de las Tem primordialmente por su capacidad de poder migrar a tejidos y regresar a órganos linfoides secundarios, principalmente a ganglios linfáticos. Se cree que son importantes en el combate contra infecciones crónicas. Los linfocitos Tef precursores se pueden identificar por la expresión de CX3CR1<sup>int</sup> (receptor de la quimiocina CX3CL1) (16).

### 1.1.5 Las señales 1, 2 y 3 son determinantes en la formación de Tmem

#### 1.1.5.1 *Afinidad por el Ag-MHC*

Uno de los factores que se conoce que influyen para la generación de Tmem es la afinidad del TCR por el complejo péptido-MHC(p-MHC). En este sentido, se ha

demostrado que Ags de baja o alta afinidad que son presentados son capaces de inducir la generación de Tmem, pero que tienen capacidades funcionales distintas(9).

Los Ags de baja afinidad que se presentan desencadenan una fase de proliferación más corta y de menor magnitud. Posterior a la activación con Ags de baja afinidad, una tercera parte de las clonas específicas expresan IL-7R $\alpha$  (cadena  $\alpha$  receptor de IL-7) a tiempos tempranos post-infección, aproximadamente tres veces más que los linfocitos activados con Ags de alta afinidad. Lo que implica que Ags de baja afinidad podrían favorecer la generación de MPECs-identificados por la expresión de IL-7R $\alpha$ - y estos preferencialmente darían origen a linfocitos Tmem con un fenotipo de Tcm(9).

A pesar de ello, estos Tmem generados con Ags de baja afinidad tienen capacidad efectora limitada, visto como una menor proporción de células que producen IFN- $\gamma$  y Granzima-B (Gzm-B), por lo que su capacidad protectora es inferior. Aunque su capacidad de persistir y de proliferar es similar a aquellas generadas con Ags de alta afinidad (9,24)

La afinidad del TCR por el complejo p-MHC, repercute en la capacidad que tienen los linfocitos T de establecer interacciones de larga duración con APCs. Al respecto, se ha demostrado que interacciones prolongadas de linfocitos T CD8+ naïve son necesarias para una adecuada formación de Tmem (24).

#### *1.1.5.2 Intensidad de la señalización del TCR*

En cuanto a la intensidad del TCR, se ha propuesto un modelo en el que a mayor intensidad de la señal se ve favorecida la generación de linfocitos Tef, pero con una intensidad baja o intermedia se favorece la generación de linfocitos Tcm o Tem respectivamente. Esto se explica, por la inducción diferencial de la expresión de factores

de transcripción asociados a un fenotipo de memoria como: Eomes y Bcl-6, sobre aquellos como Blimp-1 y T-bet asociados a linfocitos efectores(25).

Existe evidencia que la intensidad de la señal determina también el complejo de señalización que se ensambla, lo que podría influir en el destino del linfocito, favoreciendo un fenotipo efector sobre el de memoria y viceversa. Smith-Galvin y cols. demostraron que al hacer mutaciones puntuales en la proteína adaptadora SLP-76 se promueve la generación Tmem, preferencialmente de las CD62L<sup>high</sup> y Wiehagen y cols. que son capaces de persistir en ausencia de la señal tónica del TCR(26,27).

La concentración de antígeno ha sido considerada como otro de los factores determinantes para la generación de Tmem. Ensayos realizados con linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos, que fueron activados con DCs pulsadas con una baja o alta concentración de Ag, han demostrado, que hay una mayor proporción de Tmem en aquellos ratones a los que se le transfirieron DC pulsadas con alta concentración de Ag. Esto se atribuyó, a que existía un mayor número de interacciones DC-T CD8<sup>+</sup> y que además eran de mayor duración durante las primeras horas post-transferencia (24).

#### 1.1.5.3 Citocinas

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores pueden ser divididos en dos grupos con base en la expresión de IL-7R $\alpha$  (CD127) y KLRG-1. Los linfocitos Tef, con un fenotipo KLRG-1<sup>hi</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>lo</sup> se denominan SLECs (linfocitos efectores de vida corta, por sus siglas en inglés *short-lived effector cells*), y los denominados MPECs tienen un fenotipo KLRG-1<sup>lo</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>hi</sup> (1,23,27).

Las citocinas, como IL-7 e IL-15, influyen en la generación y homeostasis de los linfocitos Tmem(28). *In vivo*, se ha evidenciado, que los linfocitos que expresan CD127

durante la fase efectora de la respuesta, son los que preferencialmente resisten la fase de contracción. También, se ha demostrado que en ausencia de ambas citocinas, disminuye la proporción de Tmem posterior a una infección (9,29).

*In vitro*, se ha evidenciado que estas citocinas son suficientes para generar linfocitos Tmem, a partir de linfocitos Tn activados con anticuerpos agonistas ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28) y posteriormente cultivarlos con IL-7 e IL-15. Estos linfocitos Tmem tienen características fenotípicas, metabólicas y funcionales similares a las generadas *in vivo*(30).

El balance entre IL-2, IFN- $\gamma$  e IFN de tipo I se ha demostrado que tienen un efecto en la generación de Tmem, esto relacionado al tiempo de exposición a estas citocinas durante la primera fase de la respuesta. Una exposición intensa y prolongada a estas citocinas promueve una proliferación robusta de los linfocitos y diferenciación terminal hacia linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores, disminuyendo así su capacidad de resistir la fase de contracción y por ende de convertirse en Tmem(4,31,32).

#### 1.1.5.4 División asimétrica

Se denomina división asimétrica a la distribución desigual de componentes celulares. En los linfocitos esto ocurre durante el proceso de activación y es influenciado por la interacción con APCs(12). Con base en ello, se puede identificar un linfocito proximal y uno distal, que son metabólica, fenotípica y funcionalmente distintas. Los linfocitos distales, son las que preferencialmente persisten en el tiempo y proliferan ante una respuesta secundaria con su Ag afín. Algunas de las moléculas que se han descrito que se segregan diferencialmente son CD8, LFA-1, c-myc, mTORC1 y IFN- $\gamma$ R, por mencionar algunas, estas están en mayor cantidad en los linfocitos proximales, que por sus características podrían ser consideradas SLECs y los distales MPECs(12,13,33,34).

#### *1.1.5.5 Factores que influyen en la población de Tmem*

Dos de los factores principales que afectan a la población de linfocitos Tmem son: el tiempo y el número de encuentros con antígeno. Esto se ha descrito que modifica su capacidad efectora y también altera la conformación de la población de Tmem, favoreciendo unos fenotipos sobre otros(2,35).

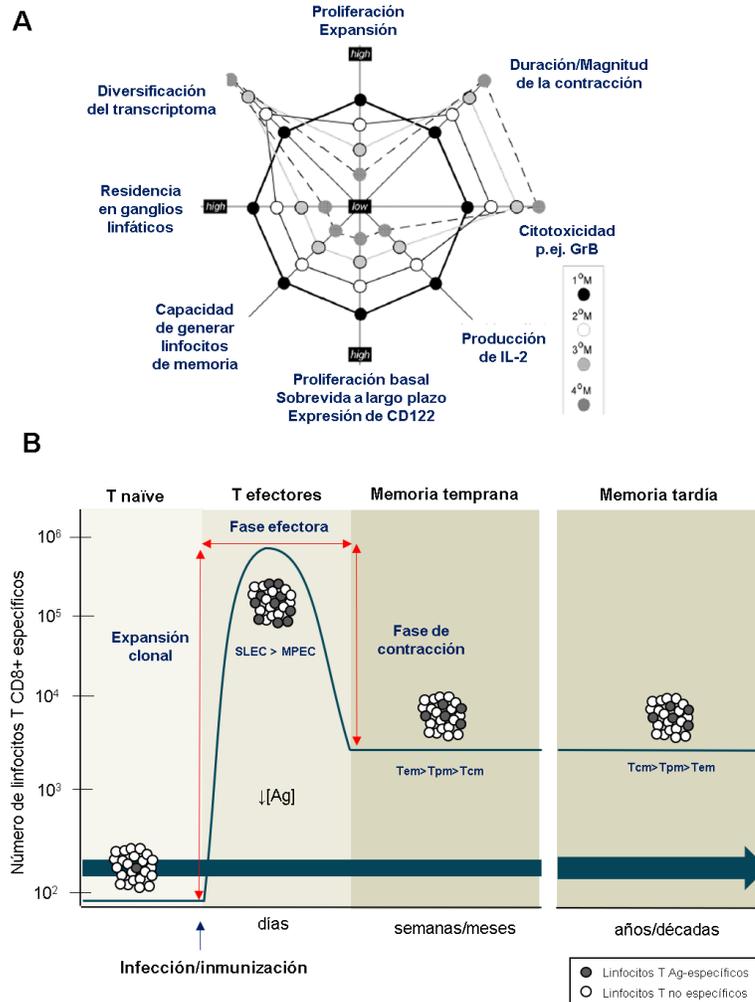
La capacidad de proliferación, la intensidad de la fase de contracción, la producción de IL-2, la localización en órganos linfoides secundarios, disminuyen a mayor número de encuentros con el antígeno, pero, la duración de la respuesta y la citotoxicidad aumentan(Figura 1-1A) (2,35).

Se ha descrito que los linfocitos T CD8+ de memoria secundaria con un fenotipo de Tcm o Tem, tienen una mejor capacidad de proliferación, tienen mejor actividad citotóxica y son capaces de producir más Granzima B. Lo que indica que son células más efectivas para controlar al Ag. A mayor cantidad de encuentros con el Ag, también aumenta el tiempo necesario para que estos linfocitos adquieran un fenotipo de memoria central o de memoria (8).

Si consideramos el tiempo posterior al primer encuentro con el antígeno, se ha propuesto que existe una memoria temprana y otra tardía, la primera es días o semanas posteriores y la segunda después de años o décadas de la infección o inmunización, y que las características de los Tmem en cada etapa son diferentes. La explicación a esto es que la proporción de Tmem se modifica en cada una de ellas, lo que ayuda a comprender que las características de la respuesta sean distintas(8,35).

En la etapa de memoria temprana se favorecen los linfocitos Tem y en la etapa tardía, son los Tcm, los que están en mayor proporción (Figura 1-1B). Lo anterior concuerda

con reportes en los que linfocitos de memoria “envejecidos” tienen mejor capacidad de proliferación y una disminuida capacidad efectora comparada con los “recientes”, asociado a un fenotipo de memoria central y efector respectivamente(36).



**Figura 1-1 El número de encuentros con el antígeno y el tiempo modifican la población de linfocitos T de memoria.** A. Las funciones efectoras y características de los linfocitos T de memoria se modifican con cada nuevo encuentro con su antígeno afín, se esquematizan hasta 4 encuentros. B. Fases de la respuesta inmune. Los linfocitos T naïve antígeno específico proliferan, en esta etapa hay una mayor proporción de SLECs que MPECs, una vez que se ha dado la resolución de la infección durante la fase de contracción aproximadamente el 90% de los linfocitos mueren por apoptosis (SLECs), días o semanas después esta resolución se favorece la población de linfocitos TEM (memoria temprana) y meses o años después los linfocitos TCM (memoria tardía). Abreviaturas: SLEC: linfocitos T efectores de vida corta; MPECs: linfocitos T precursores de células de memoria; TEM: linfocitos T de memoria efectora; TCM: linfocitos T de memoria central; TPM: linfocitos T de memoria periférica; Ag: antígeno. **Modificado de:** Martin & Badovinac, 2014, 2018)

## 1.2 CRTAM

CRTAM (Molécula Asociada a Linfocitos T restringida a MHC Clase I) es una proteína transmembranal perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, en su porción extracelular tiene un dominio tipo constante (C1) y uno variable (V), y en su región intracitoplásmica posee un dominio de interacción PDZ de tipo I, tiene un peso molecular aproximado de 45kDa(37).

Filogenéticamente se agrupa con la familia de las Nectinas, siendo más cercano a las proteínas tipo Nectinas (*Nectin-like*), que son proteínas que pertenecen a la superfamilia de moléculas específicas de adhesión celular (CAMs). Estas moléculas de adhesión tienen la característica de ser independientes de  $Ca^{2+}$ , tener 3 dominios tipo inmunoglobulina, uno tipo variable y dos tipo constante, una única región transmembranal y una región citoplásmica, por lo que CRTAM es un miembro atípico, al poseer solo dos dominios tipo inmunoglobulina(38). Se conoce que CRTAM puede establecer interacciones homotípicas (CRTAM-CRTAM) o heterotípicas con Necl-2 (CRTAM-Necl-2; del inglés *Nectin-like 2*) (39). Estas CAMs son importantes para la organogénesis, proliferación, diferenciación y movimiento celular (40).

Se ha demostrado que CRTAM se expresa post-activación en una amplia variedad de células del sistema inmune como: linfocitos T CD8+, NKT, células NK, iNKT y en una pequeña subpoblación de linfocitos T CD4+ citotóxicos, así como también en los timocitos DN (doble negativos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), en estos últimos su expresión disminuye conforme progresan en sus estadios de maduración(37,41). En tejidos no inmunes como en cerebelo (neuronas de Purkinje), pulmón, y testículos se ha reportado también su expresión (38).

En ciertas patologías se ha documentado un aumento en la proporción de células que expresan CRTAM. En pacientes asmáticos incrementa el porcentaje de linfocitos T

CD4+, CD8+, así como de neutrófilos y eosinófilos circulantes CRTAM+. En pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) hay una mayor proporción de células NK y NKT CRTAM+ en médula ósea, así como TGF- $\beta$ +, PD-1+ e IL-10+. Por lo que CRTAM podría ser importante para regular el microambiente supresor en la médula ósea (42).

En la inmunidad contra el cáncer, la interacción de CRTAM, expresado en células del sistema inmune, con Necl-2, expresado en células tumorales, ha demostrado que disminuye la tumorigénesis al promover la citotoxicidad específica de las células NK, así como la liberación de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T CD8+ contra las células tumorales (39).

Yeh y cols. en 2008, demostraron que aproximadamente un 25% de los linfocitos T CD4+ expresan CRTAM transitoriamente (14 a 24 horas) posterior a la activación vía TCR. En estos, CRTAM es necesaria para el mantenimiento de la polarización de CD44, talina y PKC- $\zeta$ , proteínas importantes para la sinapsis inmunológica tardía (14 horas) y la división asimétrica. También, influye en la proliferación y producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22. Además, demostraron que para esto se requiere la interacción de la proteína Scrib con el dominio tipo PDZ de CRTAM (37,43). También se sabe que la expresión de CRTAM en linfocitos T CD4+ les confiere actividad citotóxica, ya que promueve la expresión de perforina, granzima B e IFN- $\gamma$ , así como del factor de transcripción Eomesdermina que se asocia a citotoxicidad(44)

Para los linfocitos T CD8+ se ha descrito que la interacción de CRTAM con Necl-2, expresada en células dendríticas  $\alpha$ CD8+, es importante para la retención en los ganglios linfáticos, lo que es importante para su proliferación (45).

## **2 Antecedentes**

Yeh y cols. (2008) demostraron que aproximadamente una cuarta parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresan CRTAM 14h posterior a la activación. Esta molécula resulto ser importante para el mantenimiento de la polarización de CD44, CD3, talina y PKC- $\zeta$ , así como también influye en la producción de citocinas. Además, a través de su dominio citoplásmico CRTAM recluta a la proteína de andamiaje Scrib, la cual posiblemente interaccione con Cdc42, importante para la reorganización del citoesqueleto de actina.

Esto pone en evidencia un posible rol de CRTAM en el mantenimiento del complejo supramolecular de activación (SMAC). Esto sugiere que el proceso de división asimétrica, el cual se ha demostrado que influye en el compromiso hacia linfocitos T efectores o de memoria, podría afectarse en su ausencia (33,37).

Otros factores que se saben que repercuten en la generación de Tmem es la intensidad de la señal del TCR y el tiempo de interacción del complejo TCR-pMHC. En este sentido se ha descrito que la interacción de CRTAM con Necl-2 es necesario para que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> sean retenidos por más tiempo en los ganglios linfáticos, lo que permite que haya una adecuada proliferación de estas clonas específicas (45).

Takeuchi y cols. demostraron que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresan CRTAM son citotóxicos y que podría estar regulando el compromiso hacia Tmem, ya que al inducir su expresión hay una mayor proporción de linfocitos Tcm y Tem(44).

## **3 Justificación**

Se sabe que para la generación de linfocitos T de memoria influyen factores como la intensidad y duración de la señal del TCR, de coestimulación y citocinas. En este sentido se ha demostrado que la molécula de adhesión CRTAM es importante para la retención y

presentación de antígeno a los linfocitos T CD8+ en los ganglios linfáticos, producción de citocinas y para mantener en una etapa tardía la polarización de moléculas involucradas en la sinapsis inmunológica, proceso crucial para la división asimétrica de los linfocitos T activados. Es por ello por lo que proponemos que CRTAM es importante en el proceso de generación de linfocitos T de memoria. Determinar si repercute en el proceso de generación de Tmem nos permitirá entender mejor los requerimientos para la formación de estos.

## **4 Hipótesis**

La molécula de adhesión CRTAM influye en la generación y función de los linfocitos T de memoria.

## **5 Objetivos**

### **5.1.1 Objetivo general**

Evaluar el papel de CRTAM en la generación de linfocitos T de memoria.

### **5.1.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar las poblaciones de linfocitos T de memoria en el ratón carente del gen CRTAM.
2. Evaluar la generación de linfocitos T de memoria central y efectora ante una inmunización.
3. Evaluar el papel de CRTAM en la generación de inmunidad protectora.

## **6 Materiales y métodos**

### **6.1 Ratones e infección**

Los ratones *Crtam.KO.Lex.B6N* (*CRTAM*<sup>-/-</sup>) y C57BL/6 fueron obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV. Se usaron

ratones macho de 6-8 semanas de edad. La cepa de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® será usada como WT. La cepa de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium *aroA* será usada como cepa atenuada, esta tiene una mutación auxotrófica que afecta la síntesis de aminoácidos aromáticos.

Las cepas bacterianas se crecieron en medio LB sin antibiótico, a 37°C en agitación constante, el número de bacterias fue calculado a partir de una OD<sub>600</sub> y fueron resuspendidas en PBS para obtener la concentración adecuada. Se administraron vía intraperitoneal 100 o 150 Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) de *Salmonella* ser. Typhimurium *aroA* o *Salmonella* ser. Typhimurium 14028 en 100µL de PBS, respectivamente. Se extrajeron ganglios linfáticos y bazo 27 días post inmunización (*aroA*) o 7 días post reto (WT).

## **6.2 Obtención de células**

Los ganglios linfáticos y el bazo se disgregaron mecánicamente para la obtención de una suspensión celular en PBS. A la suspensión celular proveniente del bazo se le añadió buffer de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl, 155 mM; NaHCO<sub>3</sub> 12 mM; EDTA, 0.1 mM); se lavó y finalmente se resuspendió en PBS. La suspensión de células se mezcló en una proporción 1:1 con azul de tripán al 0.4% y se procedió al conteo de las células.

## **6.3 Citometría de flujo**

Se usaron 1x10<sup>6</sup> células recuperadas del bazo y ganglios linfáticos (mesentéricos e inguinales) para el análisis por citometría de flujo en el equipo CytoFLEX S™ (Beckman Coulter). Para la identificación de las células de memoria se usó el siguiente panel de anticuerpos: CD3-APC-Cy7(BD Biosciences), CD4-PE(Ebiosciences), CD8-FITC (Ebiosciences), CD62L-APC(BioLegend) y CD44-PB((BioLegend), y serán definidas como:

1) TSCM o Naïve: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, CD44<sup>lo</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, 2) TCM: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, CD44<sup>hi</sup>, CD62L<sup>hi</sup> y 3) TEM: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, CD44<sup>hi</sup>, CD62L<sup>lo</sup>.

#### 6.4 Unidades Formadoras de Colonias

El hígado, timo y bazo se disgregaron mecánicamente para la obtención de una suspensión celular en PBS, a la suspensión celular se le añadió 1 mL de buffer de lisis de eritrocitos, posteriormente se lavaron y centrifugaron. Las células se lisaron con PBS-Tritón al 2%. La carga bacteriana por órgano se analizó sembrando diluciones seriadas en agar LB a 37°C toda la noche.

#### 6.5 Extracción de DNA y PCR

Se extrajo DNA de la cola del ratón de acuerdo con lo descrito por (46). La genotipificación de los ratones CRTAM KO se hizo por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Cat. 18064022, ThermoFisher Scientific). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 4' a 95°C para la desnaturalización inicial, luego 30 ciclos de 30" a 95°C, 30" a 60°C y 30" a 72°C, por último 5' a 72°C. Los iniciadores utilizados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Iniciadores y su secuencia

Iniciadores	Secuencia
CRTAM sentido (Fw)	AGA GTA ACT GCC CTT GGA CGT G
CRTAM anti-sentido (Rv)	GCA GCG CAT CGC CTT CTA TC
Neo sentido	GAC ACA GGC AAG GTC ACA GA

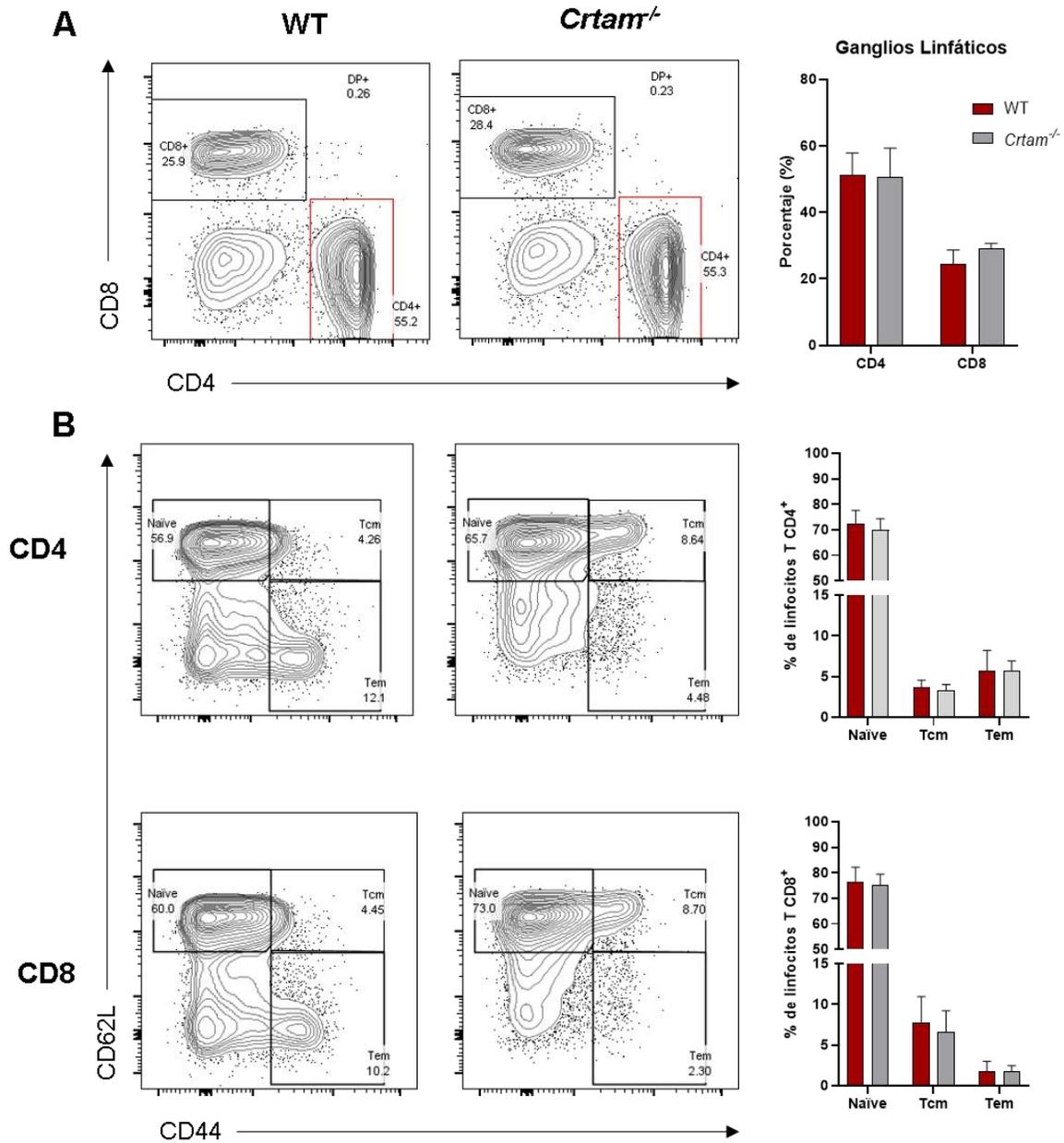
## 7 Resultados

### 7.1 En homeostasis la proporción de Tmem es independiente de CRTAM.

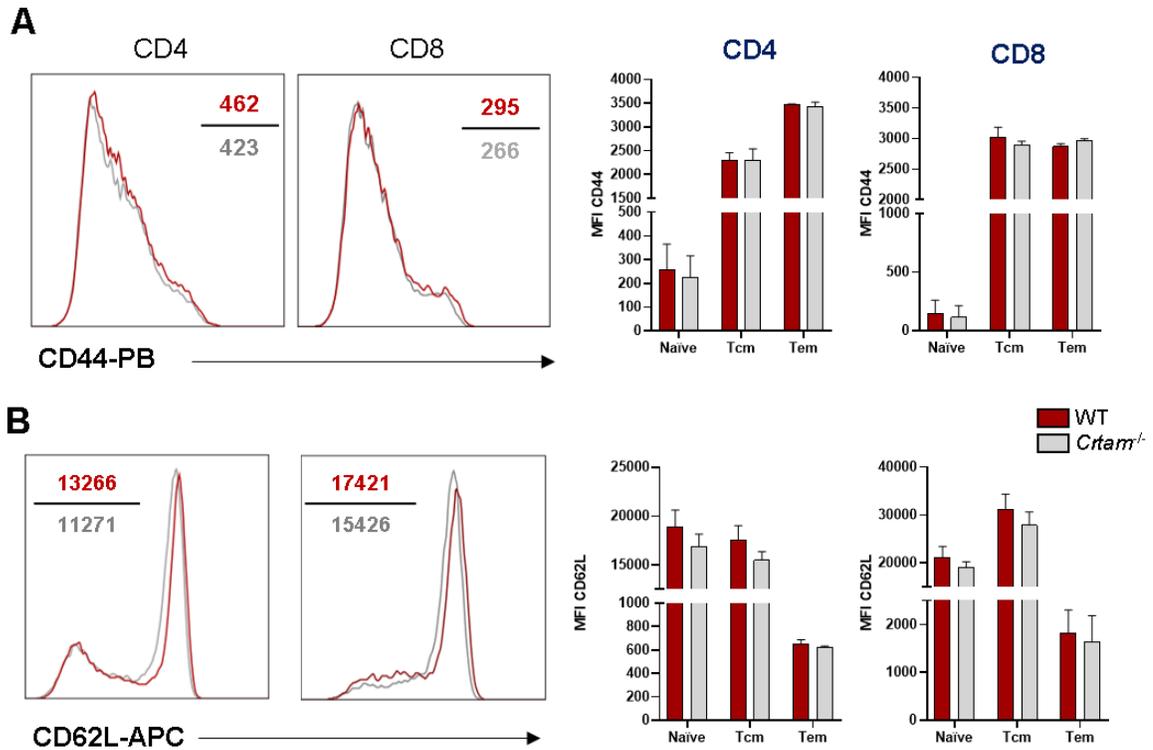
Con la finalidad de evaluar si CRTAM afecta la generación de linfocitos T de memoria (Tmem), se examinó la frecuencia de estas poblaciones en condiciones homeostáticas. Para esto se extrajeron el bazo y ganglios linfáticos de ratones deficientes de *Crtam* (*Crtam*<sup>-/-</sup>) o C57Bl/6J (WT) y se analizaron las poblaciones de Tmem por citometría de flujo (Suplementaria 1).

Dado que se ha demostrado que CRTAM es importante para una adecuada organogénesis del timo(41), se evaluó si la proporción de linfocitos T CD8+ y CD4+ en órganos linfoides secundarios estaban afectadas. En este sentido, no se detectaron diferencias en la frecuencia o en el número de linfocitos T CD8+ o CD4+ entre los ratones *Crtam*<sup>-/-</sup> y WT en ganglios linfáticos y bazo (Figura 7-1A).

Lo siguiente fue estudiar las poblaciones de Tmem en esos órganos. Con base en la expresión de CD44 y L-selectina (CD62L) se pueden identificar a los linfocitos Tn (CD44<sup>lo</sup> CD62L<sup>hi</sup>), los Tcm (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup>) y los Tem (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>). Los Tn representan más del 60% de los linfocitos T CD4+ o CD8+ en ganglios linfáticos y bazo (Figura 7-1A, Suplementaria 2A). Los linfocitos Tmem representan menos de una cuarta parte de los CD4+ o CD8+ tanto para en los ratones *Crtam*<sup>-/-</sup> como en los WT, no encontrándose diferencias en el porcentaje o número de estas (Figura 7-1B, Suplementaria 2 B y C). Tanto en los ratones *Crtam*<sup>-/-</sup> como WT, se observó que hay una mayor proporción de linfocitos Tmem con un fenotipo efector en la población CD4+ y en los CD8+ con un fenotipo de memoria central.



**Figura 7-1 En homeostasis, la frecuencia de linfocitos de memoria es independiente de CRTAM.** A) Detección de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de una suspensión celular de ganglios linfáticos, de ratones WT (silvestres) y KO (*Crtam*<sup>-/-</sup>). B) Fenotipificación de las poblaciones de linfocitos T naïve, Tcm y Tem, en ganglios linfáticos, para linfocitos T CD4<sup>+</sup> (superior) y T CD8<sup>+</sup> (inferior). Las células se tiñeron con anti-CD44 y CD62L para identificar las poblaciones de memoria (Tcm: CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup>, Tem: CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>) y naïve (CD44<sup>lo</sup> CD62L<sup>hi</sup>). Las gráficas de puntos son representativas de los animales analizados (izquierda). El porcentaje de las poblaciones analizadas se representa a la derecha. Los datos se presentan como media ± desviación estándar de al menos dos experimentos independientes (n=2, por experimento).



**Figura 7-2 La expresión de CD44 y CD62L es independiente de CRTAM.** Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD44 (A) y de CD62L (B) en linfocitos T CD4+ y CD8+ en ratones WT (líneas rojas) y KO (líneas grises, izquierda) de células recuperadas de ganglios linfáticos. A la derecha, se muestra la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de las poblaciones de linfocitos T naïve, Tcm y Tem. Los datos se muestran como media y desviación estándar, dos experimentos independientes (n=2, por experimento).

Yeh y cols. (2008) describieron que CRTAM ayuda a mantener la polarización tardía de CD44, una glucoproteína que es importante para la permanencia y reclutamiento de los linfocitos T a órganos linfoides secundarios. Por lo que, se evaluó si en ausencia de CRTAM, la concentración de esta molécula se afectaba en las poblaciones de Tmem. En condiciones sin estímulos antigénico se observó que la expresión de CD44 y CD62L en la superficie de los linfocitos T CD4+ o CD8+ es independiente de CRTAM (Figura 7-2). Al hacer el análisis en las subpoblaciones de linfocitos Tmem (Tcm y Tem), no se encontró diferencia en la expresión de estas moléculas en las poblaciones analizadas (Figura 7-2). De esto se concluye, que en homeostasis la ausencia de CRTAM no impacta en la frecuencia de Tmem o en la expresión de las moléculas de adhesión CD44 y CD62L.

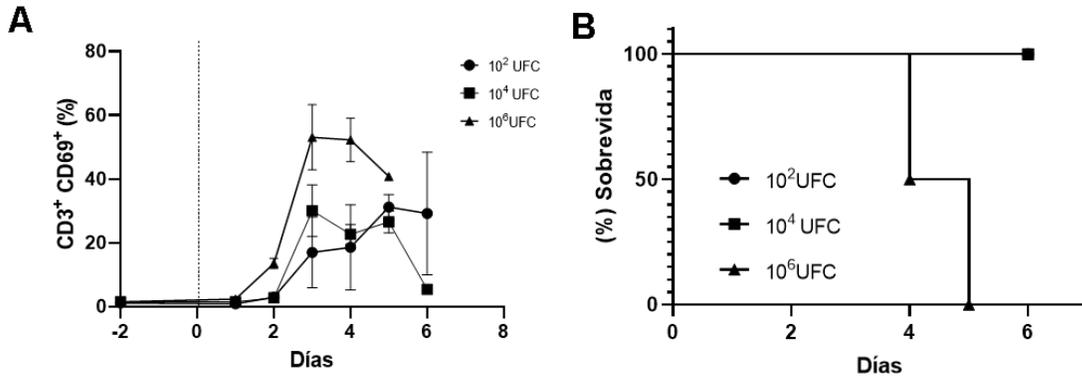


Figura 7-3 Dosis bajas de *Salmonella aroA*- son suficientes para inducir la expansión de linfocitos T. Se administró vía intraperitoneal 10<sup>2</sup> (●), 10<sup>4</sup> (■) o 10<sup>6</sup> (▲) UFCs de *Salmonella ΔaroA*- (atenuada), en ratones WT. Se evaluó por citometría de flujo la población de linfocitos T activados (CD3+CD69+) en sangre periférica, dos días antes de la infección y hasta el día 6 post-infección (A). En (B) se muestra el porcentaje de sobrevida de los animales infectados (n=2 ratones por grupo). Los datos se muestran como media y desviación estándar, un experimento.

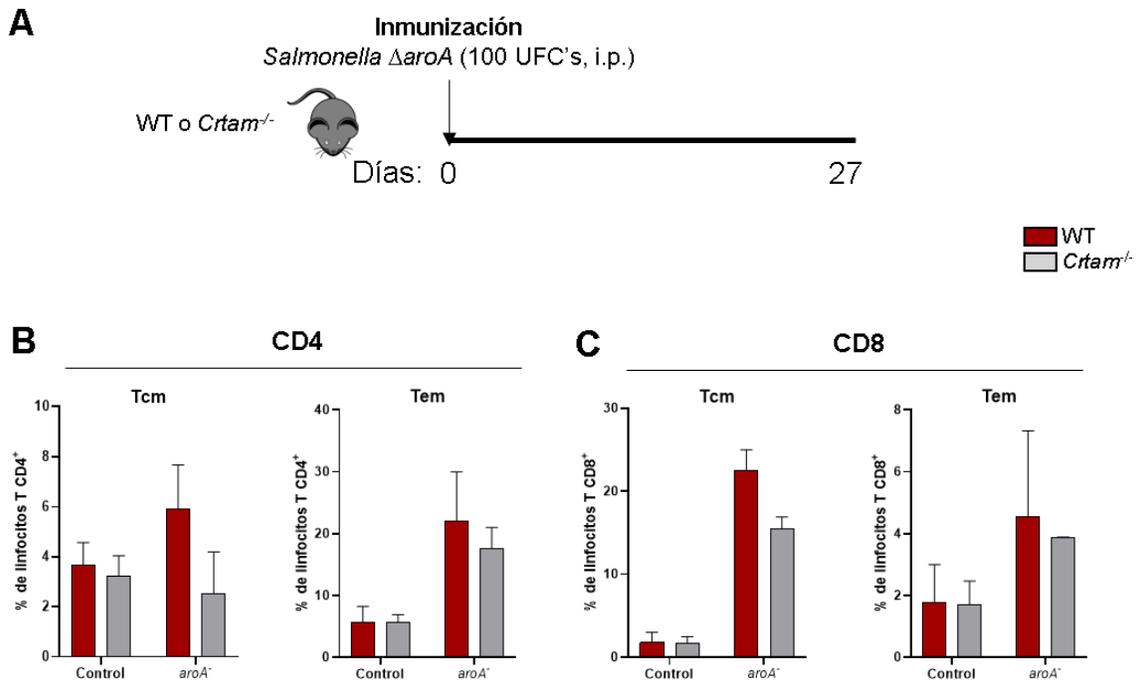
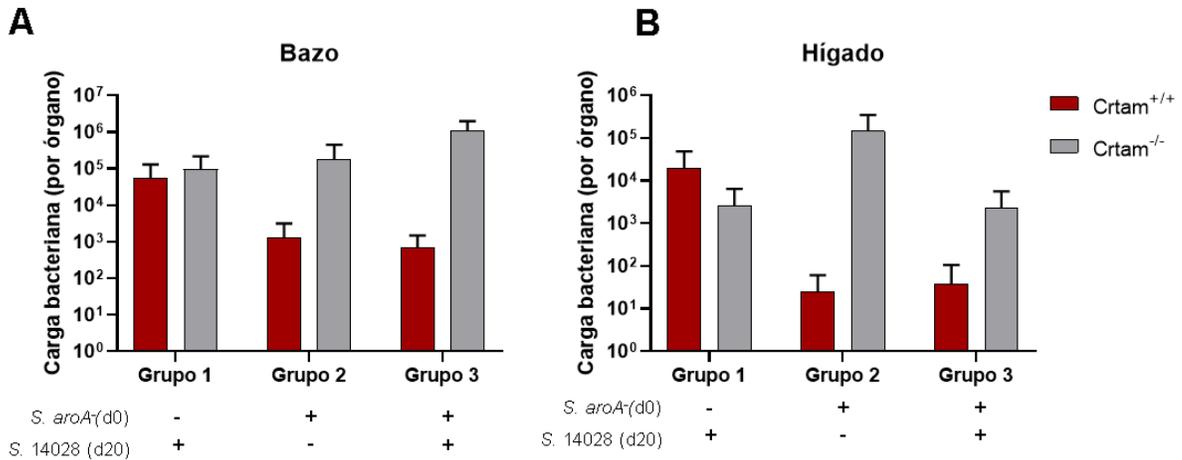


Figura 7-4 La expresión de CRTAM está asociada a la generación de linfocitos T de memoria. A) Esquema de inmunización para ratones WT y KO (*Crtam*<sup>-/-</sup>). Se administró vía intraperitoneal 100 UFCs de *Salmonella aroA*-, 27 días después se analizó la frecuencia de las poblaciones de linfocitos T de memoria por citometría de flujo. Frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos Tcm y Tem CD4+ (B) y CD8+ (C) en ganglios linfáticos de ratones silvestres y *Crtam*<sup>-/-</sup> (n=2 ratones por grupo). Control, ratones no inmunizados, Tcm, linfocitos T de memoria central, Tem, linfocitos T de memoria efectora. Los datos se muestran como media y desviación estándar, un experimento.





**Figura 7-4 CRTAM es necesario para la generación de inmunidad protectora ante una infección bacteriana.** Se muestra las UFCs recuperadas de bazo (A) e hígado (B) de ratones WT(*Crtam*<sup>+/+</sup>) y KO(*Crtam*<sup>-/-</sup>), evaluadas 27 días posterior a la inmunización (grupo 2) o 7 días después del reto (grupo 1 y 3) inmunizados, 27 días posterior a la inmunización (7 días después del reto), n=2 o 3 ratones por grupo. Los datos se muestran como media y desviación estándar de un experimento.

Typhimurium, denominada  $\Delta$ *aroA*. Esta cepa es deficiente en la producción de aminoácidos aromáticos, por lo que en ratones susceptibles se ha descrito que tiene una capacidad proliferativa limitada y es ampliamente utilizada como cepa vacunal(47). Se probaron tres dosis de inmunización distintas y se analizó la activación de los linfocitos T en sangre periférica en ratones WT (Figura 7-3A). Con la dosis más alta (10<sup>6</sup> UFC) de *Salmonella*  $\Delta$ *aroA* administrada, aproximadamente el 50% de los linfocitos T circulantes expresan CD69+ a las 48 horas, lo que indica que están activados. Sin embargo, los ratones no son capaces de controlar la infección (Figura 7-3B). Es de resaltar, que 10<sup>2</sup> UFCs promueven una respuesta equiparable a 10<sup>4</sup> UFCs (Figura 7-3A). Esto sugiere, que la administración de dosis bajas de *Salmonella*  $\Delta$ *aroA* sería suficiente para enriquecer las poblaciones de memoria.

Se evaluaron las poblaciones de memoria por citometría de flujo a los 27 post-inmunización con 100 UFCs de *Salmonella aroA*. La inmunización logró enriquecer las poblaciones de memoria, visto como un aumento en la frecuencia de estas poblaciones 27 post-

inmunización, lo que concuerda con los datos anteriores de activación en sangre periférica (Figura 7-3). Lo segundo, es que en ausencia de CRTAM se observa una disminución en la frecuencia de los Tcm y Tem CD4+, así como de los Tcm CD8+, esto en ganglios linfáticos (7-4B y C). Estos resultados sugieren que CRTAM podría estar influyendo en la formación de Tmem, primordialmente con un fenotipo de memoria central.

### **7.3 CRTAM se requiere para la formación de una adecuada inmunidad protectora ante una infección bacteriana.**

Los resultados anteriores nos sugerían que la protección generada en ausencia de CRTAM podía ser deficiente, dada la disminución en las poblaciones de memoria, por lo que se procedió a realizar un ensayo de protección (7-5A). En este, ratones *Crtam*<sup>+/+</sup> o *Crtam*<sup>-/-</sup> fueron inmunizados con 100 UFCs de *Salmonella*  $\Delta$ *aroA* y retados 20 días después con *Salmonella* 14028 (WT). Siete días después del reto se evaluó la frecuencia de las poblaciones de memoria en ganglios linfáticos y bazo. Siguiendo ese esquema de inmunización no fuimos capaces de evidenciar una diferencia en la generación los Tmem (Figura 7-5B y C). También se analizó la frecuencia de estas poblaciones únicamente ante la inmunización o el reto antigénico, administrados en el tiempo señalado en (Figura 7-5B).

Al analizar las Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) en el bazo e hígado, la carga bacteriana en ambos órganos fue mayor en los ratones *Crtam*<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que a pesar de que no haber diferencias en la frecuencia de los Tmem, la funcionalidad de estas si pudiera estar afectada. En conclusión, consideramos que CRTAM es necesario para la inducir inmunidad protectora ante una infección bacteriana.

## 8 Discusión

En el presente trabajo evaluamos si la molécula de adhesión CRTAM influye en la generación de Tmem. Takeuchi, et. al (2015), evidencian que CRTAM favorece la generación de linfocitos con un fenotipo de memoria (CD44<sup>hi</sup>) en un modelo murino, en este aproximadamente el 95% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresan CRTAM posterior a la activación. Nuestros resultados muestran que en condiciones homeostáticas no hay diferencia en la frecuencia de las poblaciones de Tcm y Tem en órganos linfoides secundarios entre el ratón silvestre y el *Crtam*<sup>-/-</sup> (Figura 1). Esto podría deberse a que en el modelo empleado evaluamos a toda la población de linfocitos T y no únicamente a la población Ag específico, por lo que no somos capaces de evaluar si la generación de linfocitos de memoria se está afectando o que podría existir algún fenómeno compensatorio. Lo que también nos sugiere es que CRTAM no influye en la proliferación homeostática de los Tmem, proceso dependiente de citocinas como IL-15 e IL-7, las cuales no se ha descrito que CRTAM afecte su producción (28,29,37). Tampoco encontramos diferencia en la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (37,45). Es de hacer notar, la tendencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria de tener un fenotipo de memoria central y los de los CD4<sup>+</sup> de memoria efectora, esto descrito en pacientes con melanoma que recibieron terapia con IL-2 (48).

CRTAM es una molécula necesaria para mantener la polarización tardía de moléculas involucradas en la sinapsis inmunológica, como es el caso de CD44. Por lo que consideramos importante evaluar la expresión de esta en la superficie de las poblaciones de memoria, pero no se observó una diferencia significativa (Figura 7-2). Esto podría explicarse por la proliferación homeostática de estas células, ya que se ha demostrado que este proceso favorece la expresión de moléculas como CD44(49)

Posterior a la inmunización con la cepa vacunal de *Salmonella*, la  $\Delta$ aroA, se observó una ligera disminución en la frecuencia de Tmem en los ratones carentes de CRTAM, este resultado nos sugiere que esta molécula influye en la generación de linfocitos de memoria y que se hace evidente posterior a un estímulo antigénico. La deficiencia de otras moléculas de adhesión como LFA-1 se ha descrito que impacta negativamente en la generación de memoria y de una eficiente inmunidad protectora(34). Esta diferencia es más evidente en los Tcm, tanto para CD4+ como CD8+, esto nos indica que el efecto de CRTAM en las Tcm y las Tem, es distinto, esto concuerda a lo reportado en la literatura en el que los requerimientos de las señales 1, 2 y 3 para la generación de ambas poblaciones cambia(2). En este sentido, se ha demostrado que CRTAM repercute en la producción de citocinas, así como en el mantenimiento de la sinapsis inmunológica a tiempos tardíos(37).

CRTAM interviene en la producción de IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD4+ y CD8+ posterior a la activación, y se sabe que la cantidad de esta citocina es importante para regular el balance entre linfocitos efectores y de memoria(31,32,37). La disminución de IFN- $\gamma$  en ausencia de CRTAM podría ser una posible explicación para la alteración en la generación de las Tmem.

Posterior a un esquema de inmunización y reto, no hubo diferencias evidentes en la frecuencia de Tmem en órganos linfoides secundarios entre los ratones carentes de CRTAM y los silvestres. A pesar de no haber diferencias en estas poblaciones, se fue evidente que en ausencia de CRTAM hay un control deficiente de la infección por *Salmonella* ser. Typhimurium, estos datos concuerdan con lo reportado en el laboratorio que indican que CRTAM es necesario para controlar la infección(50,51), ello debido a la baja producción de IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T.

## 9 Conclusión

En resumen, los resultados muestran que CRTAM podría estar influyendo en la generación y funcionalidad de los linfocitos T de memoria. También evidencian que CRTAM participa parcialmente para generar inmunidad protectora ante una infección bacteriana.

## 10 Perspectivas

- Evaluar la función de los Tmem del ratón carente de CRTAM.
- Generar la cepa de ratones OT-1 *Crtam*<sup>-/-</sup>, para evaluar la generación y función de Tmem en un modelo antígeno específico.
- Dilucidar el mecanismo de CRTAM involucrado en la generación y funcionalidad de los linfocitos T de memoria.

## 11 Referencias

1. W. C, S.M. K. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* [Internet]. 2010;236(1):151–66. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L359038126%0Ahttp://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00926.x%0Ahttp://rug.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=01052896&id=doi:10.1111%2Fj.1600-065X.2010.00926.x&atitl>
2. Martin MD, Badovinac VP. Defining memory CD8 T cell. *Front Immunol*. 2018;9(NOV):1–10.
3. Chen Y, Zander R, Khatun A, Schauder DM, Cui W. Transcriptional and Epigenetic Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation. *Front Immunol*. 2018;9(December):2826.
4. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2013;43(11):2797–809.
5. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17(10):1290–7.
6. Westerhof LM, Mcguire K, Maclellan L, Flynn A, Gray JI, Thomas M, et al. Multifunctional cytokine production reveals functional superiority of memory CD4 T cells. *Eur J Immunol*. 2019;1–11.
7. Northrop JK, Thomas RM, Wells AD, Shen H. Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN- $\gamma$  Loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *J Immunol*. 2006;177:1062–9.
8. Jabbari A, Harty JT. Secondary memory CD8+ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype. *J Exp Med*. 2006;203(4):919–32.
9. Knudson KM, Goplen NP, Cunningham CA, Daniels MA, Teixeira E. Low-Affinity T cells are programmed to maintain normal primary responses but are impaired in their recall to low-affinity ligands. *Cell Rep* [Internet]. 2013;4(3):554–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.008>

10. Mehlhop-Williams ER, Bevan MJ. Memory CD8+ T cells exhibit increased antigen threshold requirements for recall proliferation. *J Exp Med*. 2014;211(2):345–56.
11. Kersh EN, Kaech SM, Onami TM, Moran M, Wherry EJ, Miceli MC, et al. TCR Signal Transduction in Antigen-Specific Memory CD8 T Cells. *J Immunol*. 2003;170(11):5455–63.
12. Pollizzi KN, Sun IH, Patel CH, Lo YC, Oh MH, Waickman AT, et al. Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8+ T cell differentiation. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(6):704–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3438>
13. Verbist KC, Guy CS, Milasta S, Liedmann S, Kamiński MM, Wang R, et al. Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. *Nature* [Internet]. 2016;532(7599):389–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature17442>
14. Gattinoni L, Zhong X-S, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med*. 2009;15(7):808–8013.
15. Li G, Yang Q, Zhu Y, Wang HR, Chen X, Zhang X, et al. T-Bet and Eomes Regulate the Balance between the Effector/Central Memory T Cells versus Memory Stem Like T Cells. *PLoS One*. 2013;8(6):1–10.
16. Gerlach C, Moseman EA, Loughhead SM, Alvarez D, Zwijnenburg AJ, Waanders L, et al. The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity* [Internet]. 2016;45(6):1270–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.018>
17. Mani V, Bromley SK, Äijö T, Mora-Buch R, Carrizosa E, Warner RD, et al. Migratory DCs activate TGF- $\beta$  to precondition naïve CD8+T cells for tissue-resident memory fate. *Science* (80- ). 2019;366(6462).
18. Hirai T, Zenke Y, Yang Y, Bartholin L, Beura LK, Masopust D, et al. Keratinocyte-Mediated Activation of the Cytokine TGF- $\beta$  Maintains Skin Recirculating Memory

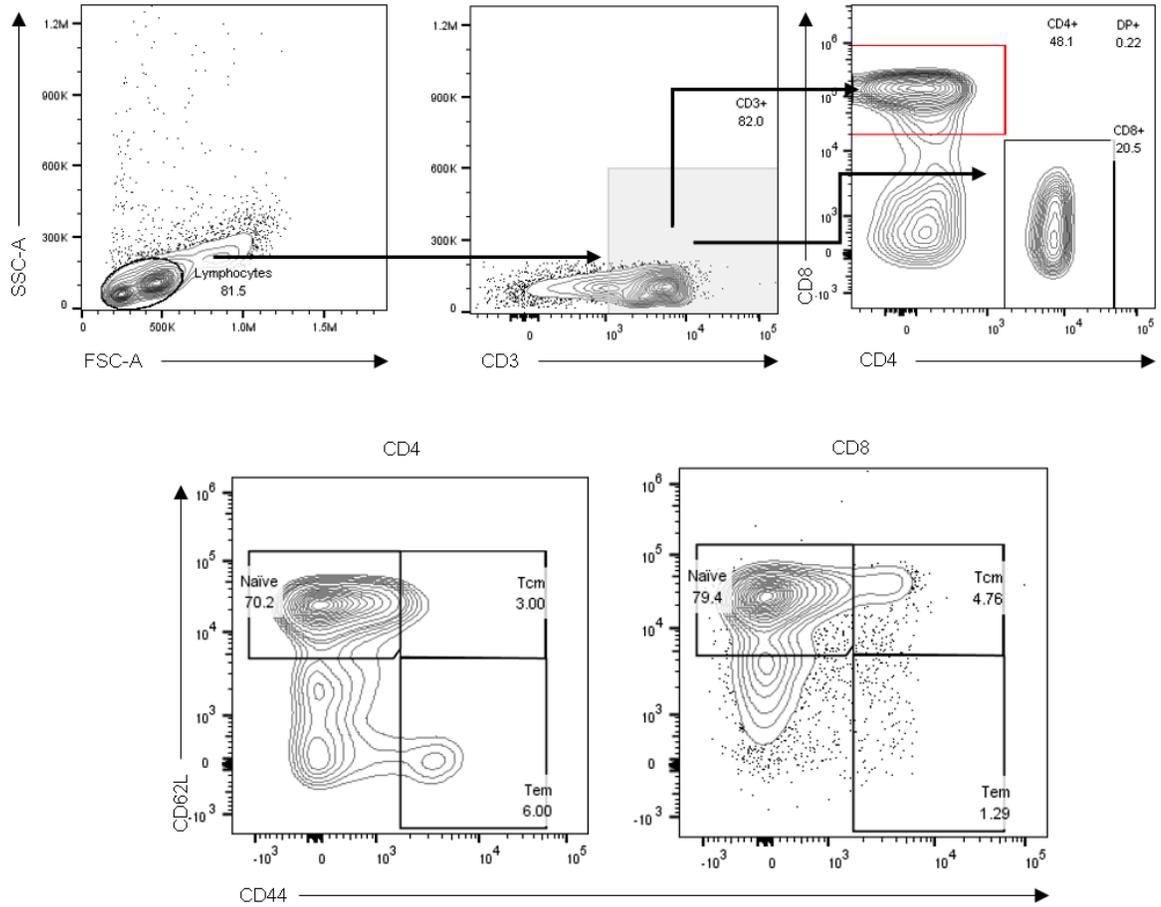
- CD8+ T Cells. *Immunity* [Internet]. 2019;50(5):1249-1261.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.002>
19. Roychoudhuri R, Lefebvre F, Honda M, Pan L, Ji Y, Klebanoff CA, et al. The transcriptional program of vaccine-induced CD8+ T cell memory. *Vaccine* [Internet]. 2014;1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.10.007>
  20. Henning AN, Roychoudhuri R, Restifo NP. Epigenetic control of CD8+ T cell differentiation. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.146>
  21. Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(2):217–25.
  22. Gray SM, Amezquita RA, Guan T, Kleinstein SH, Kaech SM. Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency. *Immunity* [Internet]. 2017;46(4):596–608. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.012>
  23. Wang D, Diao H, Getzler AJ, Rogal W, Frederick MA, Milner J, et al. The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Immunity* [Internet]. 2018;48(4):659-674.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.028>
  24. Henrickson SE, Perro M, Loughhead SM, Senman B, Stutte S, Quigley M, et al. Antigen availability determines CD8 + T cell-dendritic cell interaction kinetics and memory fate decisions. *Immunity* [Internet]. 2013;39(3):496–507. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.034>
  25. Daniels MA, Teixeira E. TCR signaling in T cell memory. *Front Immunol*. 2015;6(DEC):1–10.
  26. Wiehagen KR, Corbo E, Schmidt M, Shin H, Wherry EJ, Maltzman JS. Loss of tonic T-cell receptor signals alters the generation but not the persistence of CD8+ memory T cells. *Blood*. 2010;116(25):5560–70.

27. Smith-Garvin JE, Burns JC, Gohil M, Zou T, Kim JS, Maltzman JS, et al. T-cell receptor signals direct the composition and function of the memory CD8<sup>+</sup> T-cell pool. *Blood*. 2010;116(25):5548–60.
28. Xu A, Bhanumathy KK, Wu J, Ye Z, Freywald A, Leary SC, et al. IL-15 signaling promotes adoptive effector T-cell survival and memory formation in irradiation-induced lymphopenia. *Cell Biosci*. 2016;6(1):1–13.
29. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provasi E, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naïve precursors. *Blood*. 2013;121(4):573–85.
30. Zhang H, Tang K, Ma J, Zhou L, Liu J, Zeng L, et al. Ketogenesis-generated  $\beta$ -hydroxybutyrate is an epigenetic regulator of CD8<sup>+</sup> T-cell memory development. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2020;22(1):18–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-019-0440-0>
31. Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon- $\gamma$  acts directly on CD8<sup>+</sup> T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med*. 2005;201(7):1053–9.
32. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med*. 2005;202(5):637–50.
33. Metz PJ, Lopez J, Kim SH, Akimoto K, Ohno S, Chang JT. Regulation of asymmetric division by atypical protein kinase C influences early specification of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte fates. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(December 2015):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19182>
34. Capece T, Walling BL, Lim K, Kim K Do, Bae S, Chung HL, et al. A novel intracellular pool of LFA-1 is critical for asymmetric CD8 + T cell activation and differentiation. 2017;216(11):3817–29.
35. Martin MD, Badovinac VP. Influence of time and number of antigen encounters on memory CD8 T cell development. *Immunol Res*. 2014;59(1–3):35–44.
36. Martin MD, Condotta SA, Harty JT, Badovinac VP. Population Dynamics of Naive and Memory CD8 T Cell Responses after Antigen Stimulations In Vivo. *J*

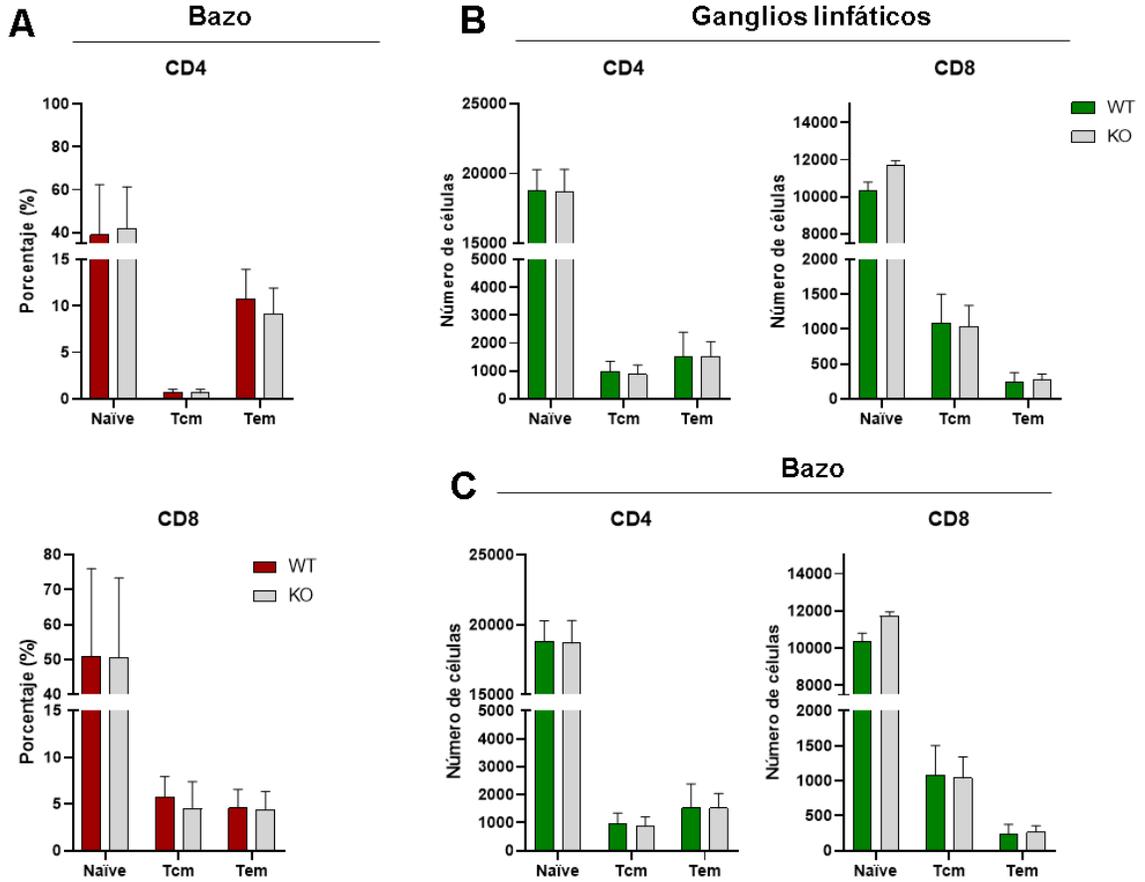
- Immunol. 2012;188:1255–65.
37. Yeh JH, Sidhu SS, Chan AC. Regulation of a Late Phase of T Cell Polarity and Effector Functions by Crtam. *Cell*. 2008;132(5):846–59.
  38. Patiño-Lopez G, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Verge GM, Lechner SM, et al. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 2006;171(1–2):145–55.
  39. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood*. 2005;106(3):779–86.
  40. Mandai K, Rikitake Y, Mori M, Takai Y. Nectins and nectin-like molecules in development and disease [Internet]. 1st ed. Vol. 112, Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Inc.; 2015. 197–231 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2014.11.019>
  41. Medina-Contreras O, Soldevila G, Patiño-López G, Canche-Pool E, Valle-Ríos R, Ortiz-Navarrete V. Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(2):196–202.
  42. Ramírez-Ramírez D, Galán-Enríquez CS, Prieto-Chávez JL, Vilchis-Ordóñez A, Pérez-Tapia SM, Padilla-Castañeda S, et al. CRTAM + NK cells endowed with suppressor properties arise in leukemic bone marrow. *J Leukoc Biol*. 2019;1–15.
  43. Dustin ML. Synaptic Asymmetry to Go. *Cell*. 2008;132(5):733–4.
  44. Takeuchi A, Badr MESG, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, et al. CRTAM determines the CD4 + cytotoxic T lymphocyte lineage . *J Exp Med*. 2016;213(1):123–38.
  45. Takeuchi A, Itoh Y, Takumi A, Ishihara C, Arase N, Yokosuka T, et al. CRTAM Confers Late-Stage Activation of CD8+ T Cells to Regulate Retention within Lymph Node. *J Immunol*. 2009;183(7):4220–8.
  46. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and

- tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 2000;29(1):52–4.
47. Hoiseth SK, Stocker BAD. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*. 1981;291(May):238–9.
  48. Sckisel GD, Mirsoian A, Minnar CM, Crittenden M, Curti B, Chen JQ, et al. Differential phenotypes of memory CD4 and CD8 T cells in the spleen and peripheral tissues following immunostimulatory therapy. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):1–11.
  49. Murali-Krishna K, Ahmed R. Cutting Edge: Naive T Cells Masquerading as Memory Cells. *J Immunol*. 2000;165(4):1733–7.
  50. Galán-Enriquez CS. Evaluación de la participación de CRTAM en la infección del linfocito B por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN; 2020.
  51. Castro de Aquino DV. Susceptibilidad de ratones carentes de crtam ante una infección por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Instituto Politécnico Nacional; 2019.

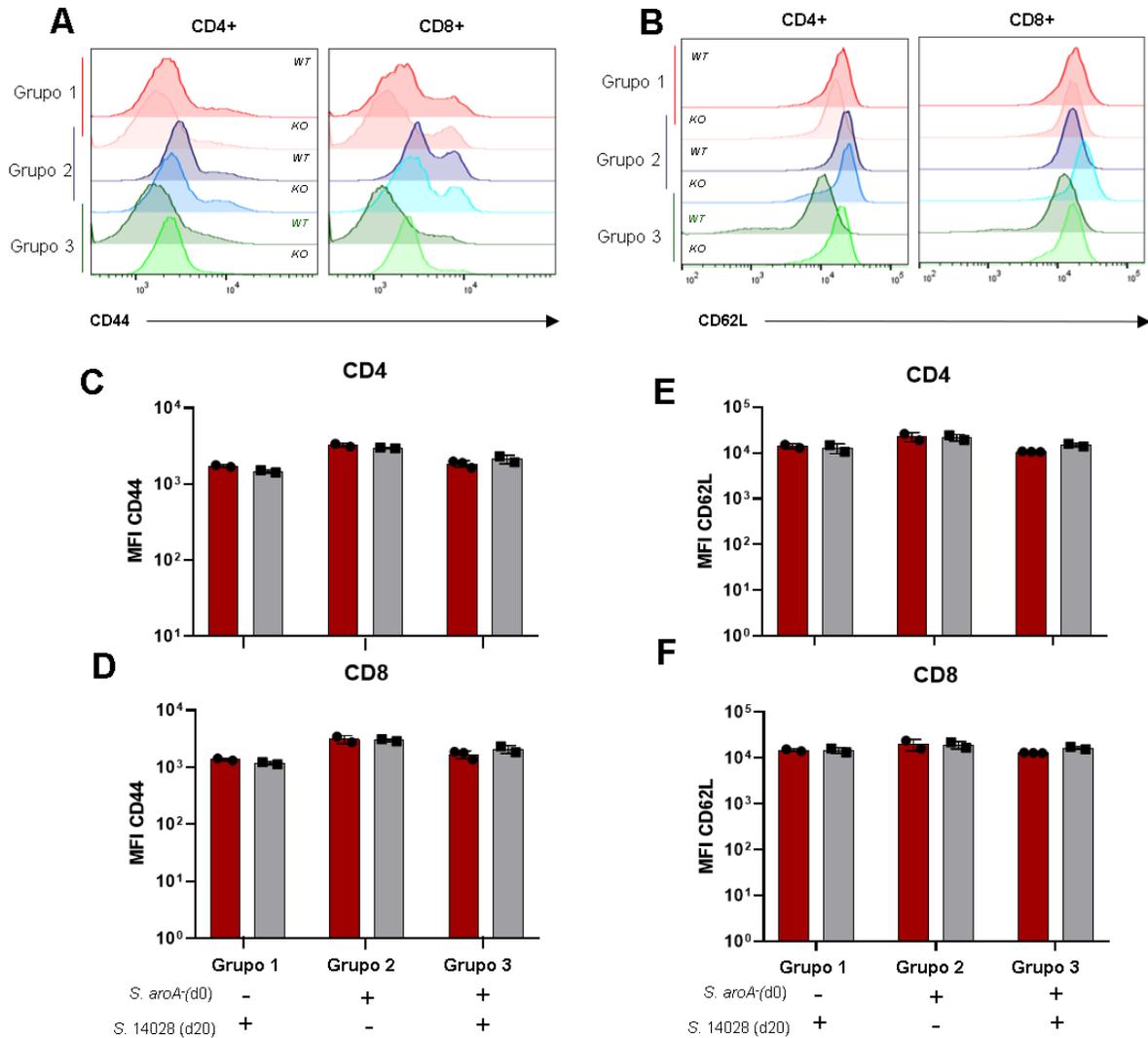
## 12 Anexos



Suplementaria 1 **Estrategia de análisis para la identificación de las subpoblaciones de memoria.** La región de linfocitos se delimitó con base a su tamaño (forward scatter, FSC-A) y complejidad (side scatter, SSC-A). Los linfocitos T se identificaron por la expresión de CD3, y posteriormente fueron divididos con base en la expresión de CD4 y CD8. La identificación de las subpoblaciones de memoria se basó en la expresión de CD44 y CD62L, identificando a las Tcm (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup>), Tem (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>) y naïve (CD44<sup>lo</sup> CD62L<sup>hi</sup>). Se muestran gráficas de contorno representativas. Las frecuencias de las poblaciones se muestran como porcentajes de las poblaciones parentales.



Suplementaria 2. **En homeostasis, el número de linfocitos de memoria es independiente de CRTAM.** A) Frecuencia de las poblaciones de memoria CD4+ o CD8+ en bazo en ratones WT y KO. Número absoluto de linfocitos con un fenotipo naïve, Tcm o Tem en ganglios linfáticos (B) y bazo (C), sin estímulo antigénico. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes.



Suplementaria 3 **Ante un estímulo antigénico la expresión de CD44 y CD62L es independiente de CRTAM.** Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD44 (A) y CD62L (B) en linfocitos T CD4+ y CD8+ recuperados de ganglios linfáticos al día 27 del experimento. Se resumen la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de CD44(C-D) y de CD62L (E-F) para linfocitos T CD4+(superior) y CD8+ (inferior) por grupo (n=2 ratones por grupo). Grupo 1: reto al día 20; grupo 2: inmunización al día 0; grupo 3: inmunización al día 0 y reto al día 20. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de un experimento.