



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Regulación de la subunidad  $\beta_4$  del canal de calcio tipo L por el *cluster* de  
microRNA 183/96/182 en linfocitos T activados”**

**M. en C. MAIKEL VALLE CLARA**

**Para obtener el grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN  
LA ESPECIALIDAD DE  
FARMACOLOGÍA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. JORGE ALBERTO SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

## Índice de Contenido

Agradecimientos.....	1
Resumen .....	2
Summary .....	3
Abreviaturas .....	4
1. Introducción. ....	5
1.1 Linfocitos T.....	5
1.2 Linfocitos T Auxiliares (Th).....	7
1.3 Diferenciación en Th1.....	7
1.4 Activación de los linfocitos T.....	9
1.5 La subunidad $\beta 4$ del canal de calcio tipo L y su función en las células T.....	11
1.6 MICRORNAs.....	13
.....	14
1.6.1 miRNAs en la respuesta inmune adaptativa.....	15
1.6.2 <i>Cluster</i> de miR-183/96/182 .....	18
1.6.3 Efecto del <i>cluster</i> miR-183/96/182 en la respuesta Inmune. ....	19
2. Justificación .....	21
3. Hipótesis.....	22
4. Objetivo general.....	22
5. Objetivos particulares. ....	22
6. Reactivos y Métodos.....	23
6.1 Animales .....	27
6.2 Células.....	27
6.3 Aislamiento y purificación de linfocitos T .....	28
6.4 Activación de las células T .....	29
6.5 Western Blot.....	29
6.6 Microscopía confocal.....	30
6.7 Cuantificación de mRNA y miRNA por PCR en tiempo real (RT-PCR).....	33
6.7.1 Predicción in silico de miRNAs que puedan hibridar en la región 3' UTR del mRNA de $\beta 4$ . ....	33
6.8 Transfección de Linfocitos con AntagomiRs. ....	33
6.9 Transfección de Jurkat .....	34
6.10 Proliferación de linfocitos.....	35
6.11 Análisis estadístico.....	35
7. Resultados.....	36

7.1 Activación de linfocitos Th1 .....	36
7.2 Subunidad $\beta$ 4 del canal de calcio tipo L en Linfocitos Th1.....	40
7.3 Microscopía confocal.....	42
7.4 Cluster de miRNAs miR-183/96/182.....	44
7.5 Efectos de los microRNAs 182/183 sobre la expresión de $\beta$ 4.....	48
7.6 Efectos de los microRNAs 182/183 sobre la proliferación de linfocitos Th1.....	50
8. Discusión .....	51
8.1 Consideraciones generales .....	51
8.2 Activación y diferenciación de linfocitos Th1.....	52
8.3 La subunidad $\beta$ 4 del canal de calcio tipo L en los linfocitos Th1.....	53
8.4 Localización de la $\beta$ 4 a través de la microscopía confocal.....	55
8.5 El cluster de microRNAs miR-183/96/182.....	56
8.6 Efectos de los miRNAs 182/183 sobre la expresión de la $\beta$ 4 y la proliferación de linfocitos Th1.....	58
9. Conclusiones .....	60
10. Referencias Bibliográficas.....	61

## Índice de Tablas

Tabla 6. 1 PBS 10X .....	23
Tabla 6. 2 Buffer de corrida para proteínas 10X.....	23
Tabla 6. 3 Buffer de Transferencia.....	23
Tabla 6. 4 Buffer RIPA .....	23
Tabla 6. 5 Buffer de carga de muestras 4X (SLB).....	24
Tabla 6. 6 Buffer de carga de muestras 6X (SLB).....	24
Tabla 6. 7 Acrilamida 30% y bisacrilamida 0.8%.....	24
Tabla 6. 8 Tris HCL/SDS 6.8% .....	24
Tabla 6. 9 Tris HCL/SDS 6.8% .....	25
Tabla 6. 10 Solución de Bloqueo .....	25
Tabla 6. 11 Solución de Azul de Coomassie.....	25
Tabla 6. 12 Solución de Rojo de Ponceau .....	25
Tabla 6. 13 Solución desteñidora.....	26
Tabla 6. 14 Solución de ACK 10X (Buffer de lisis de eritrocitos) .....	26
Tabla 6. 15 Medio RPMI para activación de linfocitos.....	26
Tabla 6. 16 Tabla de anticuerpos y proteínas a las que van dirigidas. ....	32

## Índice de Figuras

Figura 7. 1.....	37
Figura 7. 2.....	38
Figura 7. 3.....	39
Figura 7. 4.....	41
Figura 7. 5.....	43
Figura 7. 6.....	45
Figura 7. 7.....	47
Figura 7. 8.....	49
Figura 7. 9.....	50

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer, primeramente, de forma general a todas aquellas personas que han hecho posible esta tesis. Quisiera agradecer a mi asesor, el Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez, por el apoyo a este proyecto de investigación, por la motivación y el conocimiento transmitido en el transcurso de estos años.

Mi agradecimiento a todos los miembros de mi comité: Dra. María del Carmen García García, Dr. Pablo Muriel de la Torre, Dr. Francisco Javier Camacho y Dra. María del Carmen Cárdenas por sus preguntas estimulantes, comentarios alentadores y críticas constructivas. Sus comentarios me incentivaron para centrarme y mejorar en mis objetivos.

Me gustaría agradecer a la auxiliar de laboratorio Ascensión Hernández Pérez (Tere) por su amabilidad y disponibilidad en todo momento. Agradezco de forma muy especial a la Dra. Elba Dolores Carrillo Valero por el apoyo continuo, todas las sugerencias y el aprendizaje que obtuve en las muchas técnicas desde mi comienzo en nuestro laboratorio. Agradezco su incondicionalidad de estar ahí en todo momento, incluso en las etapas más riesgosas de la reciente pandemia. También me gustaría agradecer a nuestros técnicos de laboratorio Oscar Ramírez, Ivonne Lezama y Sergio Gómez por su ayuda a mantener las mejores condiciones para realizar nuestro trabajo. Agradezco a Jose Manuel Galindo por el apoyo y la disponibilidad al acceso de equipos y material para la realización de varios experimentos.

Mi agradecimiento especial a todos mis amigos por su apoyo moral y aliento durante los momentos difíciles de mi doctorado. También me gustaría agradecer a mis compañeros de laboratorio por su apoyo y por brindar un ambiente estimulante en el laboratorio: Erick, Andres, Wilibaldo, Joice, Gayathri y Eshwar.

Mi agradecimiento especial a mi familia, por su apoyo incondicional y su comprensión en todo momento. Agradezco a mi madre, por ser mi mayor incentivo para seguir adelante, a mis hermanos y a Jesús Ruiz porque sin ellos no hubiese sido posible.

Finalmente, agradezco la ayuda financiera del CONAHCYT, que financió partes de la investigación comentada en esta tesis y me apoyó con una beca durante cuatro años durante mi estudio doctoral.

Maikel Valle Clara

## Resumen

La subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio Tipo L interviene en la activación del factor activador de células T (NFAT) y en la secreción de interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), específicamente de los linfocitos T auxiliares o linfocitos T de helper (Th) <sup>1</sup>. Esta proteína es un blanco potencial para la regulación por varios miRNAs, entre los que se encuentra el *cluster* de miRNAs 183/96/182 <sup>2</sup>. Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de  $\beta 4$  afecta la progresión del ciclo celular y el rango de proliferación en líneas celulares <sup>3</sup>. Por otra parte, se ha demostrado un incremento del mensajero en el proceso de activación de los linfocitos <sup>1</sup>, aunque se desconoce el comportamiento de la proteína en el proceso de activación y diferenciación.

Los estudios de este proyecto se realizaron en poblaciones de linfocitos vírgenes que fueron activados y direccionados a la diferenciación de una subpoblación de linfocitos Th1.

En este trabajo se muestran los cambios en la expresión de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio Tipo L en linfocitos T tras la activación y diferenciación a una subpoblación de linfocitos Th1. A diferencia del RNA mensajero (mRNA) que aumenta a partir del cuarto día de activación alcanzando valores significativamente más altos al séptimo día, en la proteína se observa un incremento significativo a partir del segundo día con valores que se mantienen a lo largo del ciclo de diferenciación. Resultados similares se observaron en los estudios de microscopía confocal.

La expresión del *cluster* de miRNAs 183/96/182 se incrementa con la activación de los linfocitos alcanzando los valores más altos al 4to y 7mo día de activación. La proliferación celular que aumenta significativamente al cuarto día de activación disminuye por el efecto del Antagomir 182. El incremento temprano de la  $\beta 4$  al segundo día de activación, que no va en paralelo con el incremento progresivo y tardío del mensajero, nos sugiere una regulación postranscripcional de esta proteína.

## Summary

The  $\beta 4$  subunit of the Type L calcium channel is involved in the activation of T cell activating factor (NFAT) and the secretion of INF $\gamma$ , specifically from helper T lymphocytes (Th1) (1). This protein is a potential target for regulation by several miRNAs, among which is the 183/96/182 miRNA cluster (2). Previous studies have shown that overexpression of  $\beta 4$  affects cell cycle progression and the range of proliferation in cell lines (3). On the other hand, an increase in the messenger has been demonstrated in the lymphocyte activation process (1), although the behavior of the protein in the activation and differentiation process is unknown.

The studies of this project were carried out on populations of naïve lymphocytes that were activated and directed to the differentiation of a subpopulation of Th1 lymphocytes.

This work shows the changes in the expression of the  $\beta 4$  subunit of the Type L calcium channel in T lymphocytes after activation and differentiation to a subset of Th1. Unlike messenger RNA (mRNA), which increases at from the fourth day of activation reaching significantly higher values on the 7th day, a significant increase in the protein is observed from the second day with values that are maintained throughout the differentiation cycle. Similar results were observed in confocal microscopy studies.

The expression of the 183/96/182 miRNA cluster increases with lymphocyte activation, reaching the highest values on the 4th and 7th day of activation. The cell proliferation that increases significantly on the fourth day of activation decreases because of Antagomir 182. The early increase in  $\beta 4$  on the second day of activation, which does not go in parallel with the progressive and late increase of the messenger, suggests a post-transcriptional regulation. of this protein.

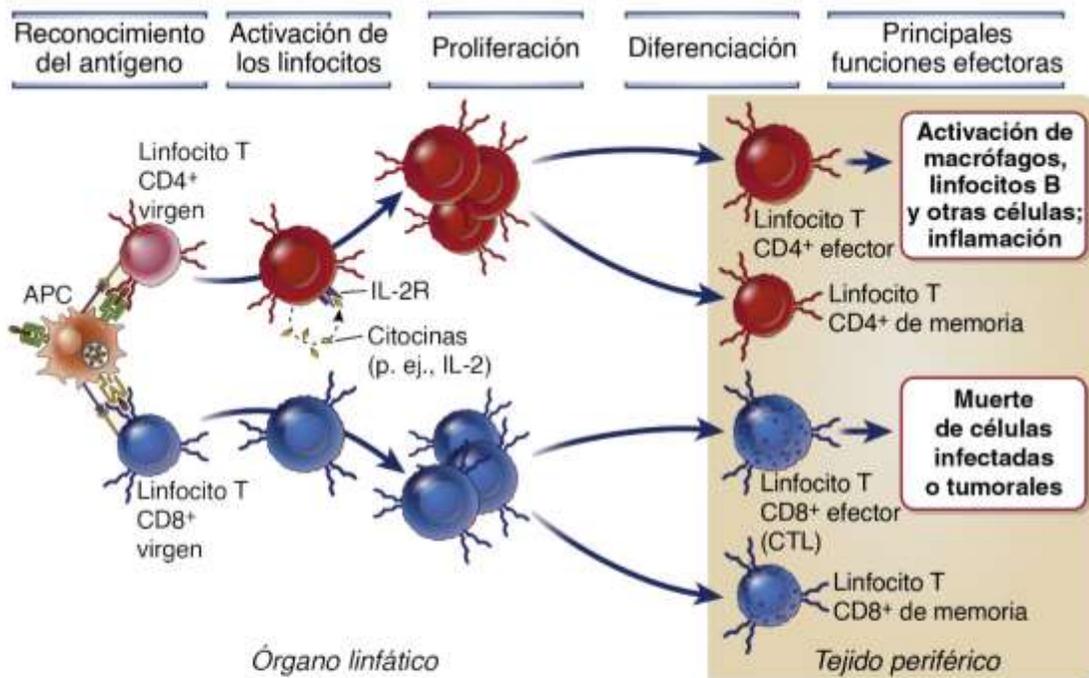
## Abreviaturas

AGO	Argonauta
APC	Células Presentadoras de Antígeno
BLIMP1	Proteína de Maduración Inducida por Linfocitos B 1
Cav1.1	Subunidad $\alpha$ 1s del Canal de Calcio Tipo L
CRAC	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ Activado por Liberación de $\text{Ca}^{2+}$
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
DUSP6	Proteína Fosfatasa 6 de Especificidad Dual
EGR1	Proteína de Respuesta de Crecimiento Temprano 1
EXP5	Exportina 5
FOXO1	Proteína O1 de la Caja Forkhead
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
IL-12	Interleucina-12
IL-4	Interleucina-4
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP3R	Receptor IP3
MHC	Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad
miR	microRNA
miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA mensajero
NFAT	Factor Nuclear Activador de las Células T
NK	Linfocitos T Asesinos Naturales
PLC- $\gamma$ 1	Fosfolipasa C- $\gamma$ 1
pre-miR	miRs precursores
pri-miR	miRs primario
PTEN	Homóloga de Fosfatasa y Tensina
PTK	Proteínas Tirosina Cinasas
PTPN22	Tirosina-Proteína Fosfatasa Tipo 22
RE	Retículo Endoplásmico
RNA	Ácido Ribonucleico
SHP2	Proteína Tirosina Fosfatasa 2 con Dominio SH2
STAT3	Activador de la Transcripción 3
TCR	Receptor de Células T
Tfh	Linfocito T Auxiliar Folicular
Th	Linfocitos T Auxiliares
Treg	Células T Reguladoras
TRP	Potencial del Receptor Transitorio
UTR	Región no Traducida de los RNA Mensajeros
VDCC	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ Dependientes del Voltaje
$\beta$ 4	Subunidad $\beta$ 4 del Canal de Calcio tipo L
(IL-2R)	Receptor de la IL2
OVA	Ovoalbúmina
ON	Overnight (Durante la noche)
WB	Western Blot
rpm	Revoluciones por Minutos

## **1. Introducción.**

### **1.1 Linfocitos T.**

Los linfocitos T (células T) son los principales componentes celulares del sistema inmunitario adaptativo, responsables de mediar las respuestas inmunitarias basadas en células para mantener sano al huésped y evitar diversos tipos de enfermedades. Los linfocitos T se desarrollan a partir de progenitores de timocitos derivados de la médula ósea en el timo y se agrupan ampliamente en linfocitos T CD4+ y CD8+  $\alpha\beta$  además de poblaciones de linfocitos T  $\gamma\delta$  y linfocitos T asesinos naturales (NK). Las células T  $\alpha\beta$  reconocen antígenos que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en células presentadoras de antígeno (APC), (Figura 1.1). Tras el reconocimiento de antígenos por el receptor de células T (TCR) y moléculas coestimuladoras en APC y la acción de citocinas, las células T CD4+ y CD8+ vírgenes experimentan activación, expansión clonal y diferenciación para ejecutar su función <sup>4</sup>. Las funciones de estas células consisten en eliminar células infectadas, producir citocinas y regular las respuestas inmunitarias. Una pequeña población de células T se convierte en células T de memoria que exhiben funciones efectoras rápidas al reencontrarse con los mismos antígenos y brindan al huésped una protección potente y a largo plazo. Paralelamente, existe una subpoblación de células T CD4+, denominadas células T reguladoras (Treg), que mantienen la tolerancia inmunitaria periférica <sup>4</sup>.



Fuente: *Inmunología celular y molecular, 10<sup>a</sup> ed.*  
 Abbas, A.K.  
 Disponible en [ClinicalKey](#)

**Figura 1. 1 Secuencia de acontecimientos en las respuestas de los linfocitos T.**

**Secuencia de acontecimientos en las respuestas de los linfocitos T.** El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T induce la secreción de citocinas (p. ej., interleucina 2 [IL-2]), particularmente en los linfocitos T CD4+, la expansión clonal como resultado de la proliferación celular y la diferenciación de los linfocitos T en linfocitos efectores o linfocitos de memoria. En la fase efectora de la respuesta, los linfocitos T efectores CD4+ responden al antígeno produciendo citocinas que ejercen varias acciones, como el reclutamiento y la activación de los leucocitos, y la activación de los linfocitos B, en tanto que los CTL CD8+ responden matando a otras células y secretando citocinas inflamatorias. APC, células presentadoras de antígenos; CTL, linfocito T citotóxico <sup>5</sup>.

En las últimas décadas, el conocimiento de las células T con respecto a su clasificación, diferenciación, mecanismos de regulación celular y molecular, particularmente fenotipos y funciones en condiciones saludables y enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico, se ha expandido significativamente. Por

lo tanto, se han desarrollado nuevas estrategias que involucran las funciones de las células T y han demostrado una eficacia clínica sin precedentes.

## **1.2 Linfocitos T Auxiliares (Th).**

Los linfocitos Th CD4+ son un grupo heterogéneo de linfocitos T que desempeñan funciones centrales en casi todos los aspectos de las respuestas inmunitarias. Los linfocitos T CD4+ pueden activarse mediante el complejo péptido-MHC de clase II en APC, coestimulación y señales de citocinas <sup>6</sup> y diferenciarse en varios subconjuntos con diferencias en la expresión de moléculas de superficie, citocinas y factores de transcripción como Th1, Th2, Treg, T auxiliar folicular (Tfh), Th17, Th9, Th22 y linfocitos T citotóxicos CD4+ <sup>7</sup>.

Los linfocitos T cometen errores o generan respuestas ocasionalmente, que podrían ser consideradas como no-benéficas, en el reconocimiento y control de la respuesta ante un antígeno <sup>8</sup>. En la peor situación, la respuesta de los linfocitos T puede llevar al fallecimiento del organismo. El sistema inmunitario debe lograr un balance de sensibilidad para poder responder a antígenos externos y evitar una respuesta exacerbada o contra el propio organismo. La hipersensibilidad de tipo 4, también conocida como hipersensibilidad tardía, es causada por la sobreestimulación de las células inmunitarias, lo que resulta en una inflamación crónica y liberación de citocinas <sup>8,9</sup>.

## **1.3 Diferenciación en Th1**

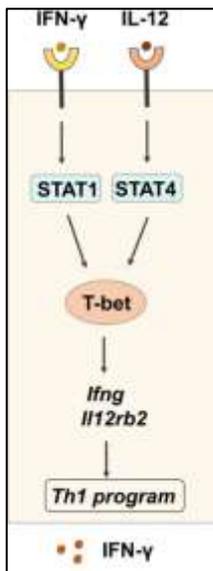
Durante varias décadas se ha reconocido que las células T CD4 se especializan en respuesta a antígenos como los desafíos microbianos. Los primeros subconjuntos identificados fueron células Th1 y Th2 basándose en la producción selectiva de sus citocinas, interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 4 (IL-4), respectivamente <sup>8</sup>.

Las células Th1 producen predominantemente IFN $\gamma$ , fundamental para las respuestas inmunes contra infecciones virales y bacterianas intracelulares. A su vez, el IFN $\gamma$  es importante para la diferenciación de las células Th1 productoras de

IFN $\gamma$  aunque la Interleucina-12 (IL-12) también es crítica para este proceso. De hecho, la neutralización *in vitro* de IFN- $\gamma$  a menudo disminuirá notablemente el desarrollo de Th1 <sup>10</sup>.

La generación de células T maduras a partir de células madre y la diferenciación de células Th a partir de precursores Th vírgenes son procesos de desarrollo estrechamente regulados. T-bet es un factor de transcripción, miembro de la familia de T-box del sistema linfóide y es responsable del desarrollo del linaje Th1 <sup>11</sup>.

T-bet no se expresa en células T CD4+ vírgenes, pero se induce fácilmente en respuesta a las vías de señalización de TCR, IFN- $\gamma$  e IL-12R. Este factor de transcripción se considera el regulador maestro para la diferenciación de células Th1 y la producción de IFN $\gamma$ . La expresión selectiva de T-bet representa el desarrollo de las células Th1 y la expresión específica de IFN $\gamma$  de las células TH1. La vía IFN $\gamma$ -STAT1-T-bet sirve como un poderoso mecanismo de amplificación para la diferenciación Th1 *in vitro*. La activación de STAT4 por IL-12 es crítica para las respuestas de los Th1 tanto *in vitro* como *in vivo* y el nivel de expresión de STAT4 es mayor en las células Th1 que en las células Th2 <sup>8</sup>. Figura 1.2.



**Figura 1. 2**

Las señales de citocinas regulan la diferenciación de las células Th CD4+. Tras la estimulación del TCR, las células T CD4+ vírgenes pueden diferenciarse en distintos subconjuntos de linfocitos Th efectores, bajo diferentes citocinas y estimulación coestimuladora. El IFN- $\gamma$  e IL-12 impulsan la diferenciación de células Th1 al inducir la expresión de TF T-bet a través de STAT1 y STAT4, respectivamente. (1)

#### 1.4 Activación de los linfocitos T

El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desempeña un papel fundamental como segundo mensajero en la regulación de numerosas funciones celulares de los linfocitos T, incluida la activación, la proliferación y la muerte celular <sup>12,13</sup>.

Los eventos que llevan a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células están estrechamente regulados a través de receptores de membrana, moléculas de señalización y canales iónicos. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se inicia a través del reconocimiento del MHC/antígeno por el TCR 1 / CD3 durante la activación de linfocitos T <sup>13</sup>. Tras la activación del TCR, las tirosinas cinasas no receptoras fosforilan y activan la fosfolipasa C, que escinde el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato de los fosfolípidos de la membrana plasmática para generar diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) <sup>14</sup>.

Los niveles elevados de IP3 en el citosol conducen a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares en el retículo endoplásmico (RE) y una afluencia sostenida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular <sup>15</sup>. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE provoca la activación de las moléculas de interacción estromal (STIM 1 y 2), que se oligomerizan y se translocan a las uniones entre el RE y la membrana plasmática. STIM1 y STIM2 se unen a la subunidad formadora del poro (ORAI1) de los canales CRAC , mediando así su apertura y entrada sostenida de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>16</sup>.

Para activar el factor nuclear activador de las células T (NFAT), un factor de transcripción que regula la expresión de varias citocinas, incluida la IL-2, es necesaria una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  sostenida superior a los 100 nM <sup>17</sup>. Los mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares dentro de los linfocitos T están bien caracterizados <sup>12</sup> y varias líneas de evidencia apoyan firmemente la idea de que los canales CRAC son los únicos responsables del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la activación de las células T <sup>17</sup>.

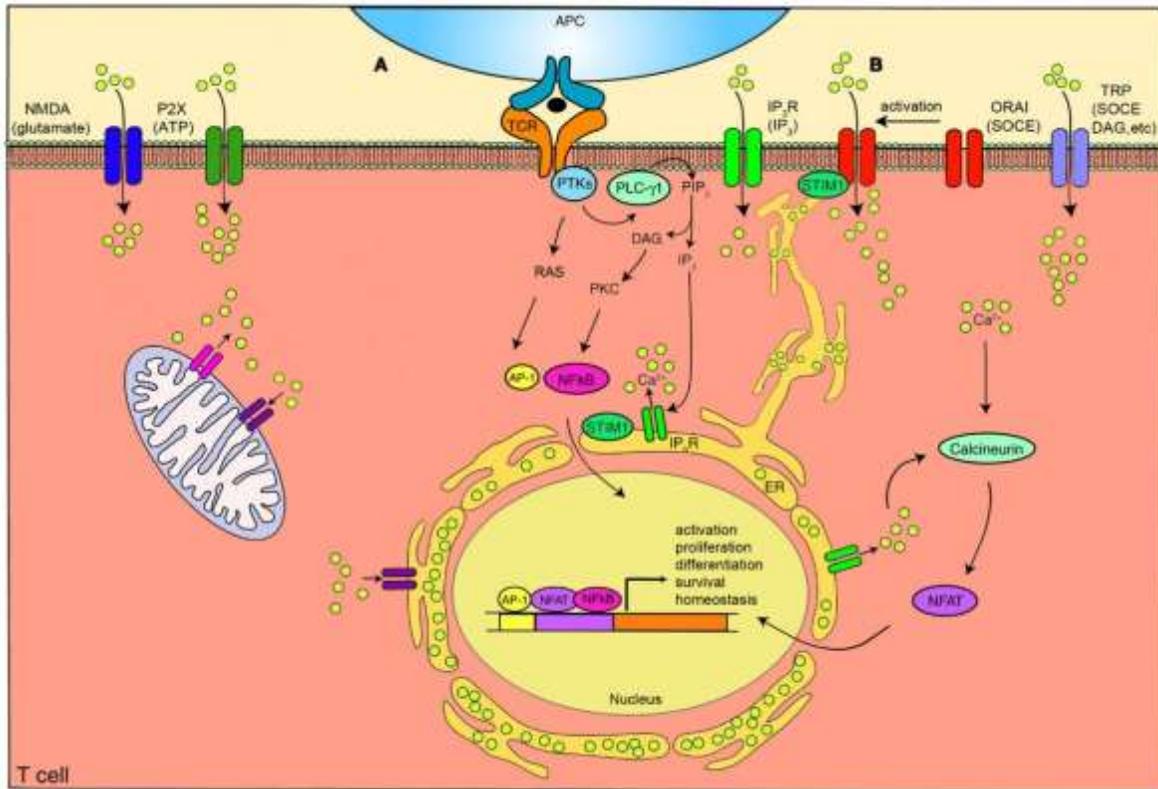
Se han propuesto varios modelos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática de los linfocitos T, incluidos los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor IP3 (IP3R) <sup>18</sup>, los

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del potencial del receptor transitorio (TRP), los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje (VDCC) de tipo L y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) <sup>12</sup>. La identidad molecular del canal CRAC, que había sido esquivada durante mucho tiempo, se resolvió con el descubrimiento de ORAI1 mediante el análisis de RNA de interferencia de todo el genoma y la clonación posicional en pacientes que carecen de la función del canal CRAC <sup>19-21</sup>. ORAI1 y sus dos homólogos, ORAI2 y ORAI3, son proteínas integrales de membrana. La mutagénesis y los análisis estructurales han demostrado que ORAI1 forma el poro del canal CRAC a través del cual los iones  $\text{Ca}^{2+}$  ingresan a la célula <sup>22-24</sup>. El análisis inmunocitoquímico muestra la localización y acumulación de los receptores de IP3 en la membrana plasmática en células Jurkat después de la estimulación con Con A <sup>18</sup>.

Hasta la actualidad se ha informado de la expresión de un número creciente de canales TRP en células T humanas y de roedores. En la mayoría de estos estudios, se empleó con frecuencia el análisis de la expresión del canal TRP a nivel de mRNA mediante técnicas de *Northern blot*, PCR en tiempo real (RT-PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR) <sup>25-27</sup>.

En las células T, se ha reportado la expresión de varios miembros de la familia de canales CaV de tipo L (CaV1), pero su contribución al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  sigue siendo controversial <sup>28</sup>.

Al aumentar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la calcineurina se activa y desfosforila a los miembros de la familia NFAT. Las proteínas NFAT desfosforiladas se translocan al núcleo, donde desempeñan un papel esencial en la regulación de la expresión de numerosas citocinas y la apoptosis de la célula <sup>29</sup>. Figura 1.3.



**Figura 1. 3**

La participación del TCR con un péptido-MHC en una célula APC, induce a las proteínas tirosina cinasas (PTK) a activar la fosfolipasa C-γ1 (PLC-γ1), que escinde el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) a partir de fosfolípidos de la membrana plasmática para generar diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). Los niveles elevados de IP3 en el citosol conducen a la liberación de Ca<sup>2+</sup> mediante los canales de Ca<sup>2+</sup> IP3R ubicados en el retículo endoplásmico (RE). El aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular da como resultado la activación de la vía calmodulina-calcineurina que induce la translocación nuclear de NFAT y la transcripción de genes diana para dirigir la homeostasis, activación, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células T. Tomado y modificado de la referencia <sup>30</sup>.

### 1.5 La subunidad β4 del canal de calcio tipo L y su función en las células T.

La importancia de los canales tipo L en las células T y de la subunidad β4 se hizo evidente en los ratones con la llamada mutación letárgica. En 1997, se demostró que la ataxia y las convulsiones en el ratón letárgico se deben a una mutación del gen de la subunidad β4 del canal de calcio tipo L <sup>31</sup>.

Las subunidades reguladoras  $\beta$  juegan un papel crítico en la función de los canales dependientes de voltaje, ya que son necesarias para la expresión funcional de estos canales en la membrana y modulan sus propiedades biofísicas interactuando con la subunidad principal formadora del poro <sup>32</sup>.

Los ratones letárgicos experimentan, además de los trastornos neurológicos, un trastorno inmunológico que incluye un defecto en la respuesta inmune celular <sup>33,34</sup>. El mecanismo del trastorno inmune descrito en estos animales letárgicos mutantes de  $\beta 4$ , aunque desconocido, es de gran interés, ya que apoya implícitamente la hipótesis de que los componentes de los canales tipo L se expresan en las células inmunes y desempeñan un papel crucial en la activación y función de estas.

En 2006, por primera vez, Badou y colaboradores proporcionaron evidencia de que las células T CD4, deficientes de  $\beta 3$  y  $\beta 4$ , presentan alteraciones en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de NFAT y la producción de citocinas <sup>1</sup>.

Se sabe desde hace mucho tiempo que la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  es crucial para la activación de las células T. Erdogmus y colaboradores evaluaron la función de las proteínas del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaV) dependientes de voltaje y descubrieron una función mediada por una subunidad accesoria. La delección de *Cacnb1* en ratones incrementa la apoptosis y altera la expansión clonal de las células T después de la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). Sin embargo no encontraron evidencia de corrientes iónicas a través del canal CaV en las células T tras la despolarización <sup>35,36</sup>, probablemente porque los mensajeros de las subunidades  $\alpha 1$  de los canales de calcio activados por voltaje, que se expresan en este tipo de células, sean formas truncadas <sup>35</sup>.

Otros autores refieren la importancia de la subunidad  $\beta 4$  en la proliferación celular donde demostraron que la expresión heteróloga de esta subunidad disminuye la proliferación de células CHO <sup>3</sup>, así como el papel que juega esta subunidad en

promover la expresión de genes relacionados con el IFN reduciendo la infección viral en células H9c2, demostrado por nuestro grupo de investigación <sup>37</sup>.

Estudios experimentales han demostrado que el mRNA de  $\beta 4$  disminuye en el hipocampo de ratones que sobreexpresan miR-183/96/182. Otros estudios evidencian, por ensayos de luciferasa, que la 3'UTR del mRNA de la  $\beta 4$  es blanco del miR-96 <sup>2,38</sup>.

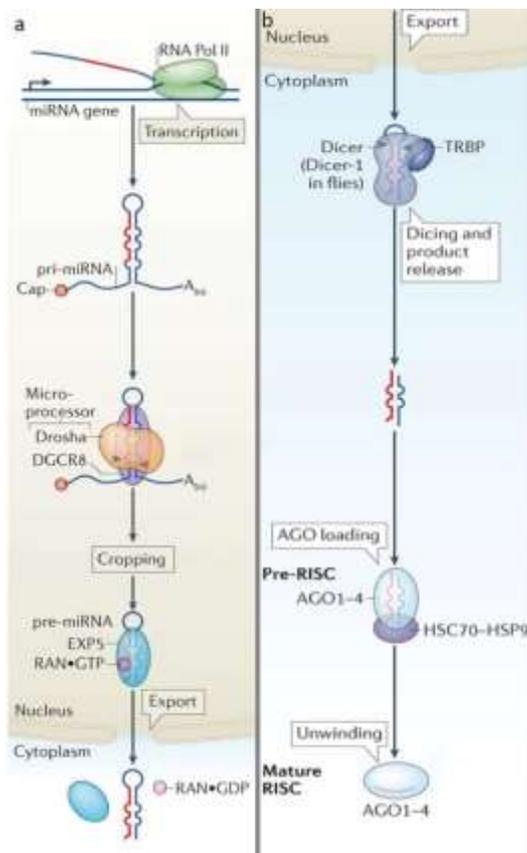
## 1.6 MICRORNAs

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas cortas de RNA de 19 a 25 nucleótidos de tamaño, que regulan el silenciamiento postranscripcional de los genes diana. Un solo miRNA puede dirigirse a cientos de mRNAs e influir en la expresión de muchos genes, a menudo implicados en una vía de interacción funcional. Se ha demostrado que los miRNAs están involucrados en la patogenia de muchas enfermedades alérgicas, como el asma, la esofagitis eosinofílica, la rinitis alérgica y el eccema <sup>39-41</sup>.

En el silenciamiento del RNA, el miRNA funciona mediante la hibridación de bases con sus mRNA diana, mientras que las proteínas argonautas (AGO) funcionan como efectores al reclutar factores que inducen la represión traduccional, la desadenilación del mRNA y la degradación <sup>42</sup>. Los sitios de unión del miRNA generalmente se encuentran en la región no traducida (UTR) 3' de los mRNA. El dominio en el extremo 5' de los miRNA, que se extiende desde la posición del nucleótido 2 a la 7, es crucial para el reconocimiento del objetivo y se ha denominado "secuencia *seed* del miRNA". Los nucleótidos corriente-abajo del miRNA (particularmente el nucleótido 8 y, en menor medida, los nucleótidos 13–16) también contribuyen al apareamiento de bases con los objetivos. Más del 60 % de los genes humanos que codifican proteínas contienen al menos un sitio de unión a algún miRNA conservado y, teniendo en cuenta que también existen numerosos sitios no conservados, la mayoría de los genes que codifican proteínas pueden estar bajo el control de los miRNA <sup>43</sup>. Por lo tanto, no sorprende que la biogénesis y la

función de los miRNA estén estrictamente reguladas, y su desregulación a menudo se asocia con enfermedades humanas, incluido el cáncer y los trastornos del neurodesarrollo <sup>39</sup>.

La regulación de los miRNAs se lleva a cabo en múltiples pasos, incluida su transcripción, su procesamiento por Drosha y Dicer, su carga en las proteínas AGO y el recambio de miRNA <sup>44</sup>. La célula aplica varias estrategias para interferir o facilitar cada paso, incluido el reclutamiento de factores de transcripción, proteínas de unión a RNA, enzimas modificadoras de proteínas, enzimas modificadoras de RNA, exoribonucleasas y endorribonucleasas <sup>39</sup>. Figura 1.4.



**Figura 1. 4**

a | Modelo esquemático de transcripción de miRNA por la RNA polimerasa II (Pol II), procesamiento nuclear por el complejo microprocesador (que comprende Drosha y DGCR8) y exportación por la exportina 5 (EXP5) en complejo con RAN-GTP.

b | Modelo esquemático de procesamiento mediado por Dicer y carga de proteínas AGO. Dicer interactúa con una proteína de dominio de unión a RNA bicatenario (dsRBD) (proteína de unión a RNA TAR (TRBP) en humanos y Loquacious (Loqs) en moscas). Después del procesamiento de Dicer, el dúplice de RNA se libera y posteriormente se carga en AGO1-4 humano. Un complejo de choque térmico 70 (HSC70)-proteína de choque térmico 90 (HSP90) hidroliza el ATP para cargar el dúplice de RNA. La cadena "pasajera" se descarta y el miRNA "guía" (maduro) (miRNA) permanece en una de las proteínas AGO (23).

### 1.6.1 miRNAs en la respuesta inmune adaptativa

El sistema inmunológico adaptativo comprende principalmente células B y células T, que juntas proporcionan una segunda línea de defensa inmune específica contra patógenos extraños después de la activación del sistema inmunológico innato.

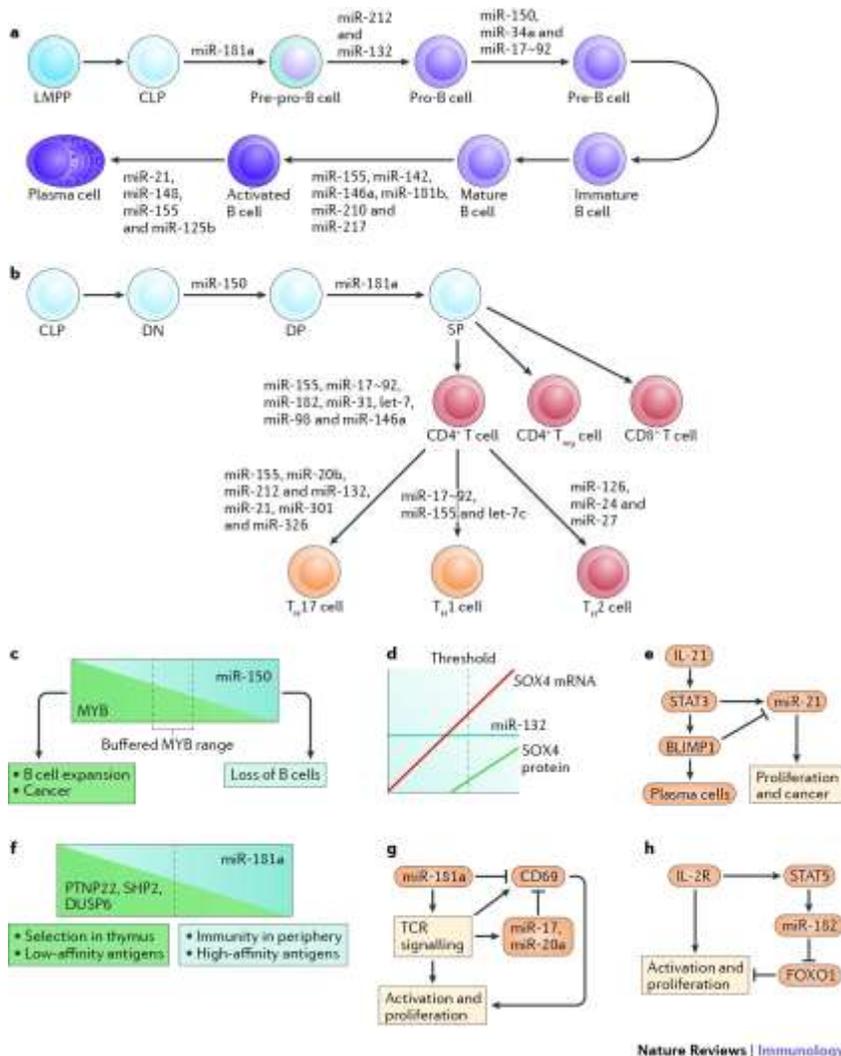
En los últimos años, la cantidad de miRNAs implicados en el desarrollo y la función del sistema inmunológico ha aumentado dramáticamente y ha habido un debate generalizado sobre su uso potencial como terapia para enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico. La expresión aberrante de ciertos miRNAs puede tener consecuencias patológicas, como autoinmunidad y cánceres hematológicos. Es importante considerar que muchos miRNAs pueden estar involucrados en la regulación de un solo mRNA y que un solo miRNA puede estar involucrado en la regulación de muchos mRNAs <sup>45</sup>.

La activación regulada de células T maduras implica una interacción compleja de varios miRNAs, que ha sido revisada en algunas publicaciones recientes <sup>46-48</sup>. La activación de las células T maduras está coordinada por miRNAs que alteran la señalización y proliferación de los TCR. El miR-181a reduce el umbral de señalización de TCR en células T adultas al regular negativamente varias fosfatasa <sup>49</sup> y además regula negativamente el CD69, que promueve la proliferación de células T <sup>50</sup>. Por lo tanto, este miRNA contribuye a un bucle de retroalimentación que inicialmente mejora la activación de las células T y luego reprime esta activación después de un retraso temporal. A través de un mecanismo similar, dos miRNAs en el grupo miR-17~92, miR-17 y miR-20a, también participan en un circuito de alimentación incoherente para regular la activación de las células T <sup>50</sup>. Ambos miRNAs se inducen con CD69 en respuesta a la señalización de TCR pero, a su vez, reprimen directamente la expresión de CD69. A través de este circuito de retroalimentación, se plantea la hipótesis de que estos miRNAs pueden reducir la variabilidad entre células en respuesta a la señalización de TCR <sup>50</sup>.

Curiosamente, se ha informado que los miembros del grupo miR-17~92 trabajan de manera coordinada en diferentes vías que convergen para alterar una única función

biológica <sup>51</sup>. En las células T, esto se evidencia por la regulación coordinada del Homóloga de Fosfatasa y Tensina (PTEN) por miR-19b y del receptor II de TGFβ y CREB1 por miR-17, que juntos promueven las respuestas de las células Th1<sup>52</sup>. En las células Th, la activación del receptor de IL-2 también conduce a la expresión de miR-182 a través de STAT5. miR-182, a su vez, reprime directamente FOXO1, un regulador negativo del ciclo celular, contribuyendo así a un circuito de retroalimentación positiva que impulsa la proliferación de células T activadas <sup>53</sup>. El miR-214, que se induce durante la activación de las células T, también impulsa la proliferación al regular a PTEN <sup>54</sup>. Trabajos recientes también han revelado un papel importante del miR-24 y del miR-27 en la inhibición de la función de las células Th2 de forma coordinada mediante la inhibición de la producción de IL-4 <sup>55,56</sup>.

Recientemente se ha dilucidado un papel interesante de las acciones contrarias de dos miRNAs inflamatorios, miR-146a y miR-155, en la inmunidad de las células T <sup>57,58</sup>. La activación de NF-κB a través del TCR conduce a la inducción de miR-146 <sup>59</sup>. Este miRNA, como en las células madre hematopoyéticas y las células mieloides, forma un circuito de retroalimentación negativa al regular negativamente los transductores de señal NF-κB TRAF6 e IRAK1 <sup>59</sup>. En ratones que carecen de miR-146a, la expresión elevada de NF-κB conduce a un aumento dependiente de miR-155 en las células Tfh <sup>57</sup>. La eliminación de ambos miRNA disminuye este efecto, lo que sugiere que la pérdida de miR-146a permite un aumento mediado por miR-155 en el número de células Tfh <sup>57</sup>. También se produce una interacción epistática entre estos dos miRNA durante la inmunidad antitumoral, mediante la cual miR-155 mejora y miR-146a inhibe la respuesta de IFNγ, donde el miR-155 tiene un papel dominante <sup>58</sup>. Es de destacar que miR-146 tiene un papel adicional en la función supresora de las células Treg al regular a STAT1<sup>60</sup>. Figura 1.5.



Nature Reviews | Immunology

**Figura 1. 5**

- (a) miRNAs con funciones clave en la actividad y el desarrollo inmunológico de las células B.
- (b) miRNAs con funciones clave en la actividad y el desarrollo inmunológico de las células T.
- (c) miR-150 amortigua la expresión del oncogén MYB dentro de un rango de concentración estrecho. Poco MYB produce un bloqueo del desarrollo de las células B, mientras que demasiado MYB conduce a una expansión desregulada de las poblaciones de células B y puede causar leucemia.
- (d) El grupo miR-212 y miR-132 establece un punto de control del desarrollo de células B al establecer un umbral para la expresión del mRNA de SRY-box 4 (SOX4) que es necesario para que continúe el desarrollo de las células B. La proteína SOX4 se expresa una vez que la expresión del mRNA de SOX4 aumenta lo suficiente como para anular la represión por parte de miR-132.
- (e) miR-21 participa en un bucle de retroalimentación incoherente. El transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) induce tanto miR-21 como la proteína de maduración inducida por linfocitos B 1 (BLIMP1), la cual, posteriormente reprime la expresión de miR-21. En conjunto, esto

inicia la proliferación de células B con una inhibición temporalmente retardada de esta señal para evitar la transformación cancerosa.

(f) miR-181a sirve como reóstato para la señalización del TCR. El aumento de la expresión de miR-181a en la periferia conduce a la represión dirigida de varias fosfatasa, incluido el no receptor de tirosina-proteína fosfatasa tipo 22 (PTPN22), la proteína tirosina fosfatasa 2 que contiene el dominio SH2 (SHP2) y la proteína fosfatasa 6 de especificidad dual (DUSP6), que a su vez puede potenciar la respuesta de señalización. Los niveles reducidos de miR-181a en el timo tienen el efecto opuesto y, por lo tanto, requieren señales de TCR más fuertes para que se produzca la transducción de señales.

(g) miR-181a también participa en un circuito de retroalimentación incoherente que impulsa la activación de las células T, pero imparte una mitigación temporalmente retrasada de esta respuesta para evitar la inmunidad aberrante. El aumento de la expresión de miR-181a conduce a la potenciación de la señalización de las células T y a una mayor activación de las células T; sin embargo, este miRNA también regula negativamente la expresión de CD69, lo cual es importante para esta respuesta. Curiosamente, un segundo bucle de retroalimentación mediado por miRNA también desempeña un papel en la activación de las células T. La activación de TCR induce la expresión de CD69, además de miR-17a y miR-20, que juntos inhiben directamente la expresión de CD69.

(h) La activación de miR-182 mediada por STAT5 por el receptor de interleucina-2 (IL-2R) inicia una respuesta de retroalimentación positiva. miR-182 inhibe directamente la proteína O1 de la caja *forkhead* (FOXO1), que es un inhibidor de la activación y proliferación de células T.

CLP, progenitor linfocito común; DN, doble negativo; DP, doble positivo; LMPP, progenitor multipotente preparado con linfocitos; célula pre-B, célula B precursora; célula pre-pro-B, célula B precursora-progenitora; célula pro-B, célula B progenitora; SP, único positivo; TH, T ayudante; Célula Treg, célula T reguladora<sup>45</sup>.

### **1.6.2 Cluster de miR-183/96/182**

Un *cluster* de miRs o miRNAs se define como varios genes miRs ubicados adyacentes entre sí en el cromosoma, que se transcriben como una transcripción larga de miRs primario (pri-miR) y luego se procesan en los miRs precursores individuales (pre-miR) <sup>61</sup>.

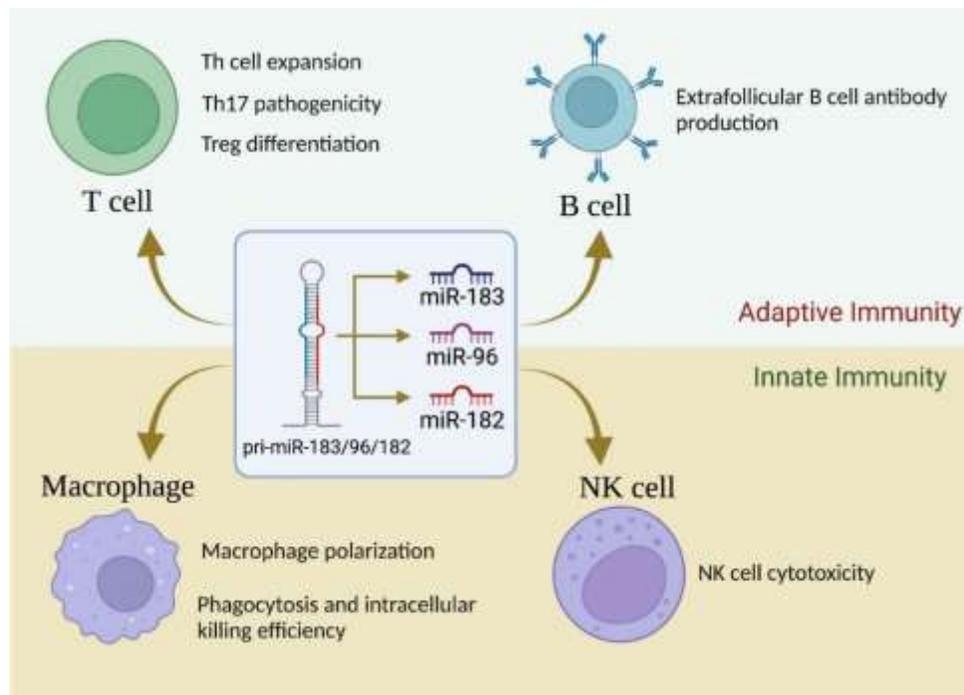
El *cluster* del miR-183, que está compuesto por los miRs-183/96 y 182, también es una familia de miRNAs con homología de secuencia. A pesar de la fuerte similitud en las secuencias de estos miRNAs, las pequeñas diferencias en sus secuencias *seed* dan como resultado que actúen en mRNA superpuestos y distintos, que a

menudo se encuentran dentro de la misma vía <sup>62</sup>. Estos miRs tienen una expresión estrechamente sincronizada durante el desarrollo y son necesarios para la maduración de los órganos sensoriales <sup>63</sup>. En comparación con su papel definido en el desarrollo normal, la familia de miR-183 se expresa con frecuencia en una variedad de enfermedades no sensoriales, que incluyen el cáncer, trastornos neurológicos y autoinmunes. Este grupo de miRs de la familia del miR-183 se ha conservado a través de 600 millones de años de evolución <sup>64</sup>.

### 1.6.3 Efecto del *cluster* miR-183/96/182 en la respuesta inmune.

El *cluster* de miRNA 183-96-182 juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune. El miR-183 y miR-96, similares a miR-182, promueven la proliferación de células T <sup>65</sup>. Figura 1.6.

El miR-183 y el miR-96 tienen la capacidad de regular la activación de las células T y por tanto el desarrollo y la gravedad de las enfermedades autoinmunes dependientes de este tipo de células <sup>66</sup>.



**Figura 1. 6**

El *cluster* del miR-183 es un regulador crucial del desarrollo, la diferenciación y la función de las células inmunitarias. Estos miRNAs son esenciales para el desarrollo de células T, desempeñan un

papel vital en la diferenciación, proliferación y función de Th1/Th17/Treg. Los miRNAs del *cluster* del miR-183 tienen un efecto mínimo sobre el desarrollo de células B, la respuesta de GC y la producción de anticuerpos, aunque el miR-182 parece tener un efecto promotor sobre la respuesta extrafolicular de las células B y la producción de anticuerpos. Por otra parte, estos miRNAs desempeñan un papel importante en la regulación de la polarización de los macrófagos, la fagocitosis y la citotoxicidad innata de las células NK <sup>65</sup>.

Tanto el miR-96 como el miR-183 regulan la proliferación de células T CD4+CD25- a través de la vía EGR1/PTEN/Akt. La sobreexpresión de miR-183 y miR-96 en células T CD4+ redujo directamente la expresión de la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), lo que condujo a una expresión reducida de la fosfatasa y del homólogo de tensina (PTEN) y, en consecuencia, aumentó la fosforilación de la proteína cinasa B (PKB o Akt) y la proliferación de células T. La transferencia adoptiva de células T CD4+CD25- específicas de hemaglutinina que sobreexpresan miR-183 y miR-96 en ratones INS-HA/Rag2KO propensos a la diabetes autoinmune dio como resultado la expansión de células T CD4+ específicas de antígeno y aceleró el desarrollo de diabetes autoinmune. Además, la inhibición simultánea del miR-183 y del miR-96 en células T CD4+CD25- con antagomiRs específicos promovió la expresión de EGR1 y PTEN y suprimió la proliferación de células T. La transferencia adoptiva de células T CD4+CD25- específicas de hemaglutininas transfectadas con antagomiR-183/96 a ratones INS-HA/Rag2KO retrasó la aparición de diabetes autoinmune <sup>66</sup>.

En un estudio reciente se demostró que en la última fase de la expansión clonal, la expresión de Foxo1 es regulada postranscripcionalmente por el miRNA miR-182, que a su vez es inducido por la señalización del receptor de la IL2 (IL-2R) <sup>53</sup>. La activación de TCR de las células T por el antígeno y la coestimulación a través del correceptor CD28 induce la proliferación y la producción de IL-2 de linfocitos Th CD4+. Una vez que comienza la proliferación, la expansión clonal de los linfocitos Th se vuelve independiente de la estimulación antigénica adicional y es promovida por la IL-2 paracrina o autocrina. Para iniciar y perpetuar la proliferación de células Th, las señales de activación de células T como la señalización por TCR-CD28 y el

IL-2R deben inhibir el factor de transcripción Foxo1, que bloquea la progresión del ciclo celular en células en reposo mediante la inducción del inhibidor del ciclo celular p27Kip1. <sup>67</sup>

La inhibición específica de miR-182 resultó en un incremento de la proteína FoxO1 y una menor expansión clonal. La sobreexpresión constitutiva de miR-182 en linfocitos Th activados dio como resultado una mayor expansión clonal. En un modelo de artritis inducida por ovoalbúmina (OVA), la inhibición de miR-182 en linfocitos Th disminuyó la gravedad de la enfermedad. Estos resultados indican una contribución crítica del miR-182 en la regulación de la población de células T <sup>53</sup>.

Si bien el miR-182 está altamente regulado positivamente en los linfocitos T activados, sorprendentemente, la desactivación sistémica de miR-182 en ratones B6 no tuvo ningún efecto obvio sobre el desarrollo y la función de los subconjuntos de células T como CD4+, CD8+, CD4-CD8-doble negativo (DN) células T y Tregs. Además, la respuesta inmune dependiente de células T a *Listeria monocytogenes* en ratones miR-182-/- fue similar a la de los controles <sup>68</sup>. El papel del miR-182 en el desarrollo y la función de los linfocitos de los ratones B6 probablemente se deba a la compensación de miR-96 y miR-183, ya que los tres miRNA tienen secuencias de *seed* similares y superposiciones de los genes diana <sup>65</sup>.

## 2. Justificación

Teniendo en cuenta:

- La importancia de la expresión de la subunidad  $\beta$ 4 del canal de calcio tipo L para la función de los linfocitos T.
- Que la deficiencia en la expresión de esta proteína está relacionada con la activación de factores de transcripción como NFAT, y la secreción de INF $\gamma$  e IL-2 de los linfocitos T activados.
- Que el *cluster* miR-183/96/182, regula a la baja a la subunidad  $\beta$ 4 del canal de calcio tipo L y que además se encuentra aumentado en reacciones inflamatorias donde hay un aumento de la proliferación de linfocitos T; planteamos las siguientes hipótesis:

### **3. Hipótesis.**

- La activación de linfocitos Th vírgenes produce un incremento de la proteína  $\beta 4$  en etapas tempranas del proceso de diferenciación.
- La expresión de  $\beta 4$  está regulada a la baja por los miRNAs que forman el *cluster* de miR-183/96/182, favoreciendo un incremento en la proliferación de linfocitos T activados.

### **4. Objetivo general**

- Evaluar la expresión de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio tipo L durante la activación y proliferación de linfocitos Th1.

### **5. Objetivos particulares.**

- Evaluar la expresión del *cluster* miR-183/96/182 durante la activación de los linfocitos Th.
- Evaluar la expresión de  $\beta 4$  durante la activación y proliferación de los linfocitos Th hasta el 7mo día de activación.
- Evaluar el efecto de la inhibición del miR-183/182 en la regulación de la subunidad  $\beta 4$  durante la activación y la diferenciación de los linfocitos Th.
- Evaluar el efecto de la inhibición del miR-183/182 en la proliferación de los linfocitos Th.

## 6. Reactivos y Métodos.

**Tabla 6. 1 PBS 10X**

Reactivos	Concentración por litros
KCL	2 g
NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.5 g

Ajustar pH a 7.4 con NaOH 1N

**Tabla 6. 2 Buffer de corrida para proteínas 10X**

Reactivos	Concentración por litros
Tris Base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Ajustar pH a 8.3 con HCl concentrado

**Tabla 6. 3 Buffer de Transferencia**

Reactivos	Concentración por litros
Tris base	0.532 g
Glicina	0.293 g
SDS 10%	0.375 ml
Metanol	20%

**Tabla 6. 4 Buffer RIPA**

Reactivos	Concentración
NaCl	150 mM
NP40	1%
Deoxicolato	0.5%
SDS	0.1%
Tris HCl pH 8.0	50 mM

Coctel de inhibidores de Fosfatasas	1X
Coctel de inhibidores de Proteasas	1X

**Tabla 6. 5 Buffer de carga de muestras 4X (SLB)**

Reactivos	Concentración para 10ml
Tris-HCL pH 6.8 1M	2 ml
SDS	0.8 g
Glicerol 10%	4 ml
2 Mercapto etanol 14.2 M	0.4 ml
EDTA 0.5M	1 ml
Azul de bromofenol	0.8 g

**Tabla 6. 6 Buffer de carga de muestras 6X (SLB)**

Reactivos	Concentración para 5 ml
Tris base	0.225 g
SDS	0.6 g
Glicerol 50%	3 ml
2 Mercapto etanol 14.2 M	1.5 ml
Azul de bromofenol	0.03 g

Filtrar en papel Whatman N° 1

**Tabla 6. 7 Acrilamida 30% y bisacrilamida 0.8%**

Reactivos	Concentración para 100 ml
Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

Aforar a 100 ml con agua desionizada.

Desionizar con 0.5 g de resina AG 501-X8 en agitación por 2 horas y filtrar en papel de filtro 0.45 µm. Almacenar a 4° en oscuridad.

**Tabla 6. 8 Tris HCL/SDS 6.8%**

Reactivos	Concentración para 100 ml
Tris base	6.05 g

Agua	40 ml
Ajustar pH a 6.8 con HCl 1N	
SDS	0.4 g

Filtrar por papel de 0.45 µm

**Tabla 6. 9 Tris HCL/SDS 6.8%**

Reactivos	Concentración para 500 ml
Tris base	91 g
Agua	300 ml
Ajustar pH a 8.8 con HCl 1N	
SDS	2 g

Filtrar por papel de 0.45 µm

**Tabla 6. 10 Solución de Bloqueo**

Leche en polvo baja en grasas	4.5% en PBS 1X
-------------------------------	----------------

**Tabla 6. 11 Solución de Azul de Coomassie**

Reactivos	Concentración para 200 ml
Ácido acético glacial	10%
Metanol: H <sub>2</sub> O	1:1
Azul brillante de Coomassie R-250	0.5 g/200ml

Filtrar en papel Whatman N° 1

**Tabla 6. 12 Solución de Rojo de Ponceau**

Reactivos	Concentración
Ácido acético	1%
Ponceau Red	0.5 g/100 ml

**Tabla 6. 13 Solución desteñidora**

Reactivos	Concentración
Ácido acético	7 %
Etanol	30 %

**Tabla 6. 14 Solución de ACK 10X (Buffer de lisis de eritrocitos)**

Reactivos	Concentración
NH <sub>4</sub> Cl	1.5 M
KHCO <sub>3</sub>	100 mM
EDTA-2Na	100 mM

**Tabla 6. 15 Medio RPMI para activación de linfocitos**

Suplementos	Concentración
Suero fetal bovino (inactivado)	10 %
2-mercapto etanol	50 uM
100 U/ml penicilina/100 mg/ml estreptomicina.	1 %
IL-2 (Recombinante Humano IL-2 (554603 BD Pharmingen™)	30 u/ml
IL-12 (Recombinante ratón IL-12 (15 ng/ml; 554592 BD Pharmingen™).	15 ng/ml
Anti-IL-4 (5 µg/ml; 554432 BD Pharmingen™)	5000 ng/ml
Anti-CD3ε (1 µg/ml; 553058 BD Pharmingen™)	1 mg/ml
Anti-CD28 (1 µg/ml; 553295 BD Pharmingen™).	1 mg/ml

**Kit de selección negativa de linfocitos vírgenes:** BD IMag™ Mouse T Lymphocyte Enrichment Set-DM (BD Biosciences 557793)

## **6.1 Animales**

Para los experimentos se usaron ratones C57BL/6 hembras de 7-10 semanas de edad y con un peso aproximado de 18-21 g debido a su alto porcentaje de células T vírgenes y menos grasa corporal en comparación con los machos o los ratones más viejos.

Los ratones hembra, de 5-10 semanas de edad, típicamente producirán  $3-6 \times 10^6$  células T CD4 + vírgenes por ratón. Sin embargo, el uso de diferentes cepas de ratones puede afectar el rendimiento y la eficiencia. Por ejemplo, las células de ratones C57BL / 6 son mejores para generar células Th1, mientras que las células de ratones Balbc son mejores para generar células Th2<sup>69</sup>.

Los ratones fueron criados bajo condiciones libres de patógenos. El manejo de los animales se hizo acorde con las buenas prácticas de animales, y fueron sacrificados por dislocación cervical, método de eutanasia aprobado para este tipo de animales. Según las recomendaciones de NOM-062-ZOO-1999 AVMA PANEL ON EUTHANASIA.

Nuestros protocolos experimentales fueron aprobados por la División de Unidades de Animales de Laboratorio, Cinvestav-IPN, de conformidad con la ley federal y los reglamentos del Consejo Nacional de Ciencia, Humanidades y Tecnología (CONAHCYT).

## **6.2 Células.**

Para la realización de los experimentos se usaron esplenocitos aislados de bazo de ratones C57BL / 6, cultivos de la línea celular de linfocitos T Jurkat E6 y se trabajó además con una población de linfocitos T vírgenes que posteriormente fueron activados con anticuerpos específicos y diferenciados a una subpoblación de linfocitos Th1.

### 6.3 Aislamiento y purificación de linfocitos T

El aislamiento de linfocitos se hizo a partir de bazos de ratones hembra C57BL / 6. En cada aislamiento se usaron de 4-6 animales.

Inmediatamente después de sacrificados los animales, se desinfectaron con alcohol al 70% y se les extrajo el bazo a la brevedad. Los bazos se colocaron en placas de recolección con PBS 1X frío para eliminar los restos de sangre. Posteriormente se hizo un macerado con los órganos, se resuspendió en una solución de PBS 1X estéril con 1% de suero fetal bovino (SFB) y se filtró por un tamiz para eliminar los restos de la cápsula del bazo. El sedimento celular, que se obtuvo después de centrifugar a 300 x g por 7 minutos, es tratado con solución de ACK 1X, 1 ml por bazo durante un minuto para lisar los eritrocitos. Después de enjuagar estas células dos veces con PBS 1X+SFB al 1% para eliminar los restos de eritrocitos lisados se eliminó el sobrenadante y se obtuvo una pastilla de células con las que se hizo un preplaqueo para obtener una población de esplenocitos más purificada. El preplaqueo consiste en sembrar estas células en placas P-100 con medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% y antibiótico (penicilina/estreptomicina 1%) durante 90 min en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se recuperan las células que se encuentran en suspensión y se desechan las células que se adhieren a la placa (macrófagos en su mayoría). Esto nos permite trabajar con una población de esplenocitos no adheribles que en su mayoría está formada por linfocitos T.

Los linfocitos vírgenes fueron aislados partiendo de esta población de esplenocitos mediante selección negativa con el kit de selección: BD IMag™ Mouse T Lymphocyte Enrichment Set-DM (BD Biosciences) conforme está establecido en el protocolo del kit.

Brevemente, el aislamiento y purificación de los linfocitos por selección negativa consiste en descartar todas aquellas células que no son linfocitos T vírgenes. Para esto se utilizó microesferas magnéticas y un coctel enriquecido de anticuerpos biotinilados que reconocen marcadores de activación (CD11b, CD45R, CD49b entre otros), que se expresan en las membranas de las células que queremos descartar.

## 6.4 Activación de las células T

Una vez obtenida la población de linfocitos vírgenes se sembraron en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, antibióticos 1% y 2-Mercapto etanol (50  $\mu$ M) enriquecido con anticuerpos (CD3 (1mg/ml) y CD28 (1mg/ml)) e interleucinas específicas (IL-2 (30  $\mu$ /ml), IL-12 (15 ng/ml), Anti IL-4 (5000 ng/ml)) para producir una activación y una diferenciación de estos a Th1<sup>70</sup>. Al inicio de cada experimento se colectó un aproximado de  $6 \times 10^6$  linfocitos vírgenes, así como al 2do, 4to y 7mo día de activación, para la obtención de extractos de proteína, RNAs y células para estudios de Microscopía confocal.

Los experimentos realizados con poblaciones de esplenocitos siguieron el mismo protocolo para la obtención de muestras de proteínas y RNA con la diferencia que esta población de células fueron activados con Con A a una dosis de 30  $\mu$ g/ml de medio.

## 6.5 Western Blot

Para obtener los extractos de proteínas se utilizaron de 6 a  $10 \times 10^6$  linfocitos aproximadamente, los cuales fueron resuspendidos en 50  $\mu$ l del buffer de lisis (Ripa) con inhibidores de proteasas y fosfatasa 1X.

Las células suspendidas en el buffer de lisis se homogenizaron con homogenizadores manuales en tubos de 0.6 ml.

Se cuantificaron las concentraciones de proteína de los extractos por el método colorimétrico de Bradford<sup>71</sup>.

La técnica de *Western blot* permite la identificación de proteínas mediante la unión específica antígeno-anticuerpo, atendiendo al peso molecular de dichas proteínas. Los lisados celulares se mezclaron con SLB 1X y se incubaron 30 minutos a 37°C para desnaturalizar las proteínas. A continuación, las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa

0.45 $\mu$ m (Thermo Scientific) en el sistema semi-seco Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, (BioRad, Hercules, CA).

Finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con colorante Rojo de Ponceau y se capturó la imagen en un escaner. Posteriormente se bloqueó la membrana en una solución de PBS 1X con 4.5 % de leche en polvo durante una hora en agitación. De esta manera se eliminaron las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo. Una vez bloqueada la membrana, se retiró la solución de bloqueo y se añadió el correspondiente anticuerpo primario (Tabla), diluido en PBS 1X, incubándolo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados con PBS 1X-Tween 20 (0.1%) de 10 minutos cada uno, todo ello en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla), diluido en PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se retiró el anticuerpo secundario y se lavó la membrana con PBS 1X-Tween 20 (0.1%) del mismo modo que se hizo cuando se retiró el anticuerpo primario.

Finalmente, se procedió a la inmunodetección de las proteínas mediante luminol y peróxido (Milipore, Immobilon Western, Cat. WBKLS0500), el cual se basa en la reacción química de la peroxidasa que origina un producto quimioluminiscente detectado por la película autorradiográfica Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm). Para ello, se colocó la membrana en el *cassette* de revelado y en completa oscuridad, se expuso la película autorradiográfica durante el tiempo adecuado y se reveló en el sistema de revelado.

La expresión relativa de la proteína de interés se determinó por el análisis densitométrico de las bandas con respecto al normalizador para la carga de proteínas.

## **6.6 Microscopía confocal**

Los cubreobjetos se incubaron con Poly-L-lisina 0.01% (Sigma p-4707) 16 horas a 4 °C (ON) 150  $\mu$ l por cubre. Pasado este tiempo se dejaron secar a temperatura ambiente. Se centrifugaron los cultivos de células a 250 g por 5 min 21 °C y se retiró

el medio. La pastilla se resuspendió en PBS 1X de forma que quedó a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. Se pusieron  $2 \times 10^5$  células en cada cubreobjeto previamente tratado con Poly-L-lisina y se incubó por 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el exceso de PBS 1X y aquellas células que no se adherieron. Las células fueron fijadas con PFA 4% por 15 min, 100  $\mu$ l de PFA por cada cubre. Se retiró el exceso de PFA escurriendo los cubres en papel absorbente.

Se hicieron 3 lavados con BSA 1% en PBS 1X (5 min cada lavado) y se permeabilizaron con 0.1 % Tritón X-100 en PBS 1X por 10 minutos. Se realizaron nuevamente 3 lavados con BSA 0.1% en PBS 1X (5 min cada lavado). El bloqueo de antígenos inespecíficos fue con BSA 0.1% en PBS 1X 1 hora a 4°C y después se dejó incubando con el anticuerpo primario contra  $\beta 4$  (Tabla) diluido en BSA 0.1% en PBS 1X. ON a 4°C.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con BSA 0.1% en PBS 1X (5 min cada lavado) y se incubó con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 555, Anti-goat IgG H+L) (Tabla) diluido en BSA 0.1% en PBS 1X. 1h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizaron 3 lavados con BSA 0.1% en PBS 1X (5 min cada lavado). Se incubaron las muestras con Hoescht dye H3570 Invitrogen™ (1:10 000) 1  $\mu$ g/ml para teñir el núcleo por 10 min seguido de 2 lavados con BSA 0.1% en PBS 1X (5 min cada lavado). Para el montaje se coloca una gota de medio de montaje Vecta shield (Cat: H-1000, VECTOR Laboratories) (3.5  $\mu$ l) en el portaobjeto donde se va a poner el cubre con las células. Se pone el cubre y posteriormente se sella con esmalte de uñas alrededor del mismo.

Las imágenes, fueron captadas en el microscopio confocal LEICA TCS SP5. La selección de la célula de interés en el campo elegido se realizó con una resolución de 512x512 píxeles con el fin de no dañar la preparación. Se capturaron alrededor de 12 imágenes (*slíces*) por célula de 0,5  $\mu$ m de sección, a una resolución de 1024x1024 y una profundidad de 8 bits por píxel, dirigido por el programa LAS AF LITE (Leica Microsystems, GE). Para la captura de las imágenes, se utilizó el objetivo de aceite de inversión 63X (1,4 AN) <sup>72,73</sup>.

**Tabla 6. 16 Tabla de anticuerpos y proteínas a las que van dirigidas.**

Proteína	Anticuerpos primarios	Dilución	epítotope	especie
Cacnb4	Abcam ab-26060	WB 1:100 IF (1:100)	508-520 (13)	chivo
Cacnb4	Santa Cruz sc-376432	WB 1:100	425-463 (39)	ratón
Cacnb4	Stress Marq SMC-318	WB (1:100) IF (1:50)	458-474 (17)	ratón
Cacnb4	Abcam ab-85788	WB (1:100)	458-474 (17)	ratón
Cacnb4	Biorbyt orb156242	WB (1:250) IF (1:100)	aa311-390 (80)	Conejo
Cacnb4	ABclonal A9304	WB 1:1000	401-520 (120)	Conejo
Actina	Sigma A 3853	WB (1:1000)		ratón
GAPDH	Sigma-Aldrich G8795	WB 1:2500		ratón

Proteína	Ac. Secundarios y colorantes	Dilución		especie
anti-Mouse IgG (H+L)	ThermoFisher A-21202	IF 1:250	Alexa Fluor® 488	burro
anti-Rabbit IgG	Thermo A-31572	IF 1:200	Alexa Fluor® 555	conejo
Anti-goat IgG H+L	Thermo A-21432	IF 1:250	Alexa Fluor® 555	burro
anti-Rabbit IgG	Antirabbit cat. 81-6120 Invitrogen	WB 1: 800000		conejo
Anti-Mouse IgG	Antimouse cat. 81-6520 Invitrogen	WB 1:800000		ratón
trihydrochloride, trihydrate, (H3570)	Invitrogen Stains Hoechst 33342,	IF 1:10000		

## 6.7 Cuantificación de mRNA y miRNA por PCR en tiempo real (RT-PCR)

Para la obtención de RNA se usaron alrededor de  $1 \times 10^6$  células a las que se les retiró el medio por centrifugación a 5000 rpm, 5 min. La pastilla de células se resuspendió en 700  $\mu$ l de QIAzol (cat. 79306 Qiagen)

Para los ensayos de qRT-PCR se usó 1  $\mu$ g de RNA de las células en cada condición experimental. Se extrajo el RNA con el kit miRNeasy (Qiagen). La cuantificación se realizó por espectrofotometría (Nanofotómetro; IMPLEN). La RT-PCR se realizó con 500 ng de RNA tratado con DNasa I en reacciones de 20  $\mu$ l. La síntesis de DNA complementario se realizó con Superscript III RT (Invitrogen) y *random hexameres* (250 ng) según las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el mRNA, se usaron ensayos TaqMan (Applied Biosystems) con un iCycler iQ (Bio-Rad) usando la mezcla maestra de expresión génica TaqMan (4369016) y los siguientes ensayos Tagman:  $\beta$ 4 (Cacnb4, Mm 00521623\_m1), Tbx21 (Mm 00450960\_m1) miR-96 (mmu-miR-96-5p 000186), miR-182 (mmu-miR-182-5p 002599), miR-182 (mmu-miR-183-5p 002269) cat. 4427975. El ensayo Tagman que se usó como control para los mRNA fue (Hs99999901\_s1) que corresponde al 18s y para el control de los micro RNA el ensayo de U87 (442795, ID 001712) y U6 (U6snRNA 4427975).

La cuantificación se realizó por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>74</sup>. Este procedimiento es válido si las eficiencias de amplificación de los genes objetivo y de referencia son aproximadamente iguales, como fue el caso en nuestros experimentos.

### 6.7.1 Predicción in silico de miRNAs que puedan hibridar en la región 3' UTR del mRNA de $\beta$ 4.

Para predecir la orientación de los miRNAs 183/96/182 con la 3' UTR del mRNA de  $\beta$ 4 se utilizó TargetScan ([https:// www. target scan. org/](https://www.targetscan.org/)) y RNAhybrid ([https:// bibis erv. cebitec. unibiele feld. de/ rnahy brid/](https://bibiserv.cebitec.unibielefeld.de/rnahybrid/)).

## 6.8 Transfección de Linfocitos con AntagomiRs.

Al segundo día de activación se contaron las células y se hizo cambio de medio de cultivo por medio fresco. Las células se mantuvieron en un tubo a una concentración

de  $2 \times 10^6$  células/ml para posteriormente ser transfectadas. En este caso se realizaron transfecciones inversas: las placas de cultivo de 12 pozos se prepararon con la mezcla de transfección (Lipofectamine 3000) y los antagomiR (miRCURY LNA Power inhibitor) correspondientes a cada grupo y posteriormente se le adicionan las células resuspendidas en el medio de cultivo. Tanto los antagomirs específicos como los controles negativos se ocuparon en una dosis de 50nM con 3  $\mu$ l de Lipofectamine 3000. Estudios previos demostraron que con dosis menores hay una menor eficiencia de transfección en nuestras condiciones experimentales y dosis superiores a los 50nM resultan tóxicas para las células. En todos los experimentos se pusieron: un grupo de células no transfectadas con lipofectamina 3000 en el medio, un grupo control negativo que se transfectó con un Antagomir *scramble* (Negative Control A Cat. 339136 YI00199006-DDB), un grupo con el Antagomir-182 (MMU-MIR-182-5P Cat. 339131 YI04101243-DDB), un grupo con el Antagomir-183 (MMU-MIR-183-5P Cat. 339131 YI04101800-DDB) y un grupo con la mezcla de los Antagomir 182 y 183 a una dosis de 25nM cada uno. Todo el procedimiento con los Antagomirs se hace en oscuridad. Después de sembrar las células en los pozos correspondientes para cada tratamiento se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al cuarto día de activación y 2 días postransfección se hizo un cambio de medio y se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo hasta el 7mo día que se cosechan las células.

## **6.9 Transfección de Jurkat**

Las células Jurkat se encuentran almacenadas en nitrógenos líquido. Al descongelarse se sembraron en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, antibióticos 1% y 2-Mercapto etanol (50  $\mu$ M) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células se deben usar con menos de 14 días después de la descongelación y no pueden superar una confluencia mayor a los  $3 \times 10^6$ /ml de medio. 16 horas antes de ser transfectadas fueron privadas de SFB en el medio. Pevio a la transfección las células se contaron y se resuspendieron en medio RPMI 1640 sin suplementar. Las transfecciones se hicieron de manera inversa, colocando la mezcla (plásmido 5  $\mu$ g + 10  $\mu$ l de Lipofectamina ) en la placa p-35 y pasados 5 min se adicionaron  $4 \times 10^6$

células suspendidas en 500 µl de medio. Pasados 5 horas se adicionó a las placas 1 ml de medio RPMI suplementado con SFB al 20%, antibióticos 2% y 2-Mercapto etanol (100 µM). 48 horas postransfección las células fueron cosechadas para muestras de RNA y de proteínas.

### **6.10 Proliferación de linfocitos.**

La proliferación de los linfocitos se infirió mediante la duplicación acumulada de la población que se calculó utilizando la ecuación:  $PD = 3,32 (\log N1 - \log N0)$ , donde PD representa la población duplicada, N0 representa el número de células sembradas inicialmente y N1 representa el número de células recolectadas en cada momento, respectivamente <sup>75</sup>.

$$PD = 3.32 (\log N1 - \log N0)$$

### **6.11 Análisis estadístico**

Los datos se expresan como las medias  $\pm$  SE. Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software) y Sigma Stat 2.0. Para comparaciones de dos grupos, se realizó la prueba t de Student. Para comparaciones múltiples, los datos con una distribución normal se analizaron mediante análisis de varianza unidireccionales (ANOVA) seguidos de la prueba de Post test de Tukey. Se consideró estadísticamente significativa una  $p < 0,05$ .

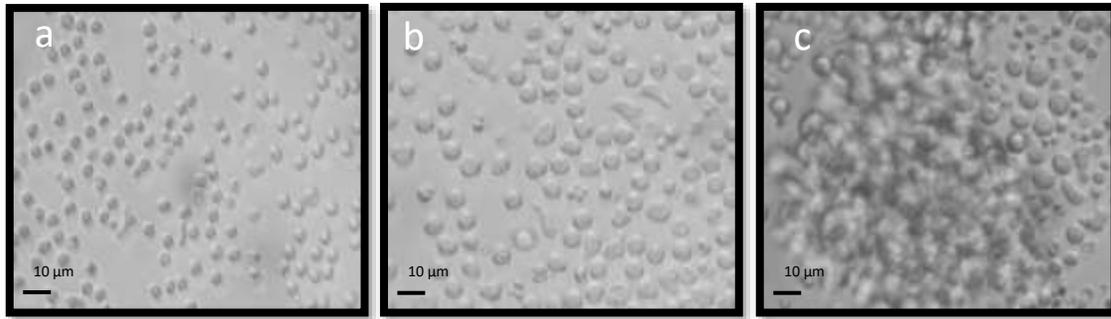
## 7. Resultados

### 7.1 Activación de linfocitos Th1

La activación de células T inicia con la interacción entre el TCR y un péptido antigénico enclavado en la hendidura del MHC. Esta interacción ternaria se ve potenciada por la presencia de correceptores y otras moléculas de membrana, que funcionan para fortalecer la interacción TCR-péptido-MHC, y para transducir la señal activadora al interior de la célula T. Ello desencadena la proliferación clonal y diferenciación en subpoblaciones de linfocitos T, que va a estar regulada por un conjunto de factores de transcripción, citocinas y por miRNAs que a su vez regulan la expresión genética de diversas proteínas mediante la inhibición de sus mRNAs.

Los primeros resultados del proyecto estuvieron encaminados en estandarizar el aislamiento y purificación de los linfocitos Th vírgenes de ratones C57BL/6 en nuestras condiciones de laboratorio, además de la activación y diferenciación de estas células a una subpoblación de linfocitos Th1.

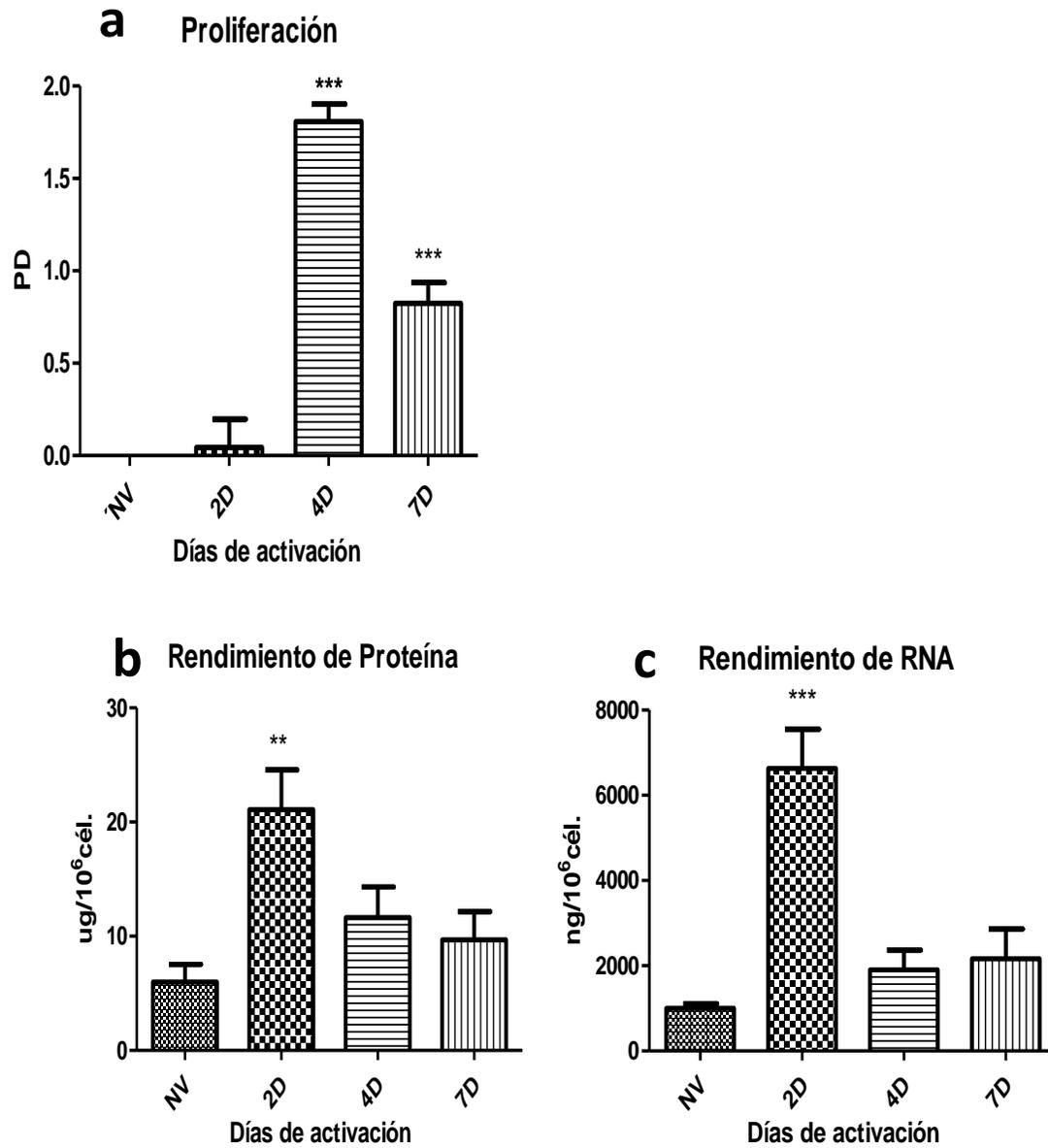
Tras la activación de los linfocitos T se ponen de manifiesto algunos cambios morfológicos en el cultivo de estas células. Al segundo día de activación se pudo apreciar un aumento de tamaño en las células y la pérdida de la forma circular, además de la formación de conglomerados celulares llamados *clusters*, del inglés, a partir del tercer día de activación. Figura 7.1.



**Figura 7. 1**

a) Cultivo de linfocitos vírgenes purificados de ratones inmunes C57B6 por selección negativa, son células de pequeño tamaño y mayormente con forma redondeada. b) Linfocitos al segundo día de activación, donde se observa un incremento en el tamaño de las células y en alguna de ellas cambia la forma circular por un alargamiento de estas. c) Linfocitos al cuarto día de activación, formación de conglomerados celulares.

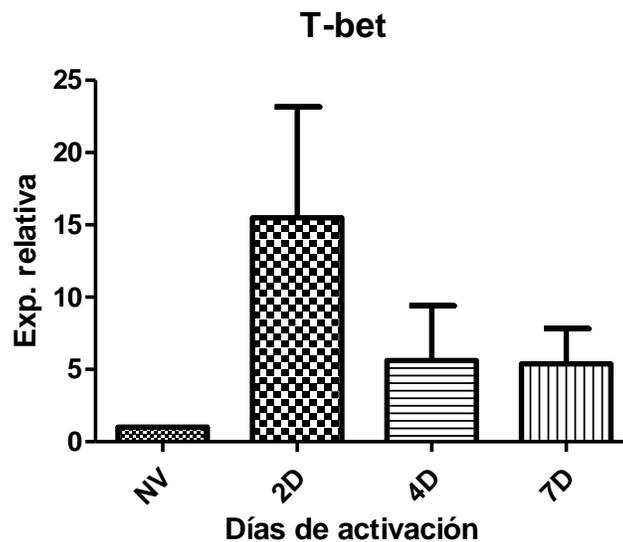
Al segundo día de activación con anti-CD3 y anti-CD28, a pesar de que el aumento en el número de células no es estadísticamente significativo, hay un incremento en el rendimiento de proteínas y de RNA por millón de células procesadas (Figs. 7.2 a, b y c). Estos hechos confirman la activación de los linfocitos y la preparación de las células para su posterior proceso de división celular. Al cuarto día de la activación de los linfocitos, incrementó significativamente el número de células con respecto al número de células sembradas inicialmente. (Fig. 7.2 a).



**Figura 7. 2**

(a) Promedio de la cuantificación de 6 experimentos en la duplicación acumulada de la población de células (PD), (b) el rendimiento de proteínas (b) y el rendimiento de RNA (c) por millón de células procesadas a lo largo de 7 días de activación con anti-CD3 y anti-CD28. Los experimentos comienzan en el día cero con la activación de los linfocitos *naive* (NV) y son evaluados al segundo, 4to y 7mo días. Datos como Media  $\pm$  SE (error estándar de la media) \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Comparación vs grupo NV. ANOVA de una vía.

Uno de los marcadores de la diferenciación a una subpoblación de linfocitos Th1 es la expresión del factor de transcripción T-bet <sup>11</sup>. Para corroborar que en nuestras condiciones de laboratorio estábamos direccionando la diferenciación de los linfocitos vírgenes a linfocitos Th1 fue necesario evaluar la expresión de este factor de transcripción. Los niveles del mRNA de T-bet se vieron incrementados a partir del segundo día de activación.



**Figura 7. 3**

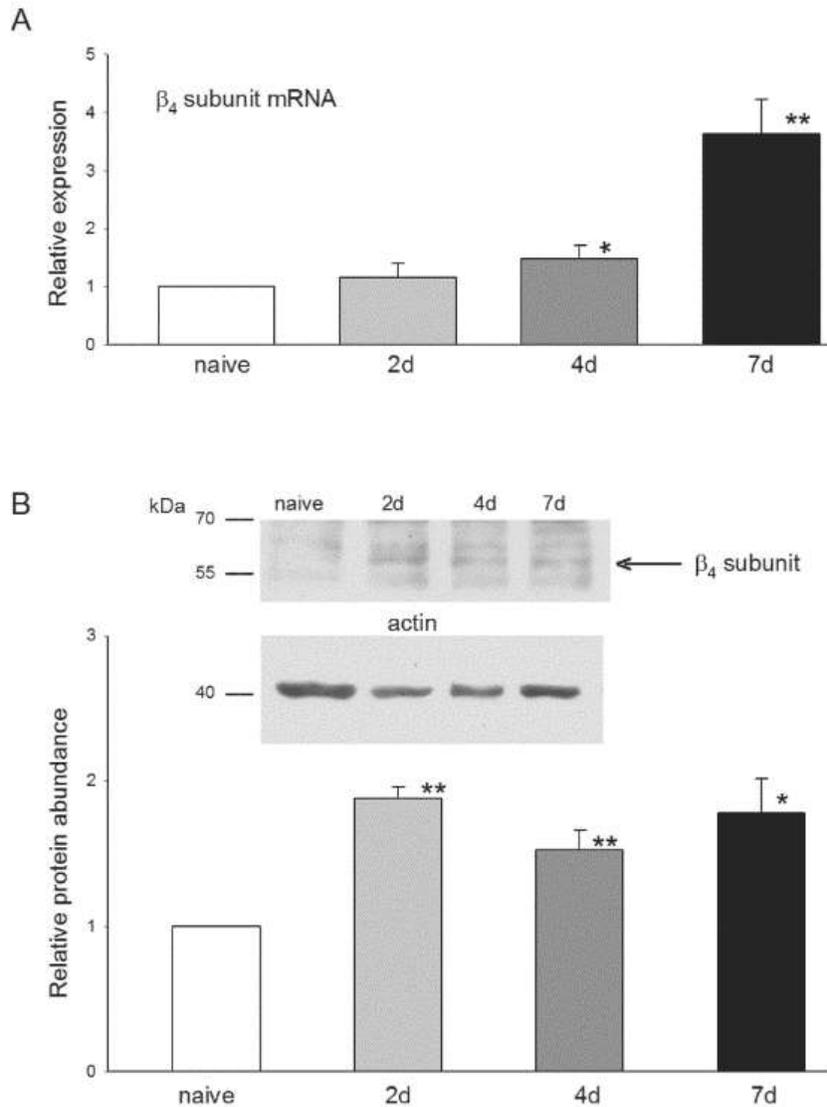
Expresión relativa del mRNA de T-bet por qRT-PCR normalizado con 18s  $n=2$  en un tiempo de 7 días de activación con anti-CD3 y anti-CD28. Los experimentos comienzan en el día cero con la activación de los linfocitos *naive* (NV) y son evaluados al segundo, 4to y 7mo días.

## 7.2 Subunidad $\beta 4$ del canal de calcio tipo L en Linfocitos Th1.

Teniendo en cuenta la importancia de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio tipo L en la activación de factores de transcripción como NFAT y la secreción de interleucinas necesarias para la función efectora de los linfocitos T, se evaluó el comportamiento de esta, tanto a nivel de mensajero como a nivel de proteína a lo largo del proceso de diferenciación.

El mensajero de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio tipo L aumentó significativamente al cuarto y séptimo día de activación con Anti-CD3 y Anti-CD28 en los linfocitos Th1 (Fig.7.4 a). A partir del segundo día se vio una tendencia a aumentar a medida que transcurre el curso temporal de la diferenciación.

Los estudios de *Western Blot* demuestran por primera vez la expresión de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio Tipo L en linfocitos Th1 a nivel de proteína y su comportamiento a lo largo de 7 días de activación *in vitro*. La expresión de la proteína  $\beta 4$  aumentó al segundo día de activación, con respecto al grupo de linfocitos vírgenes. Al 4to día disminuyó la expresión (Fig. 7.4 b), a diferencia de la expresión del mensajero donde su aumento significativo se observó a partir del 4to día de activación, como mencionamos anteriormente.



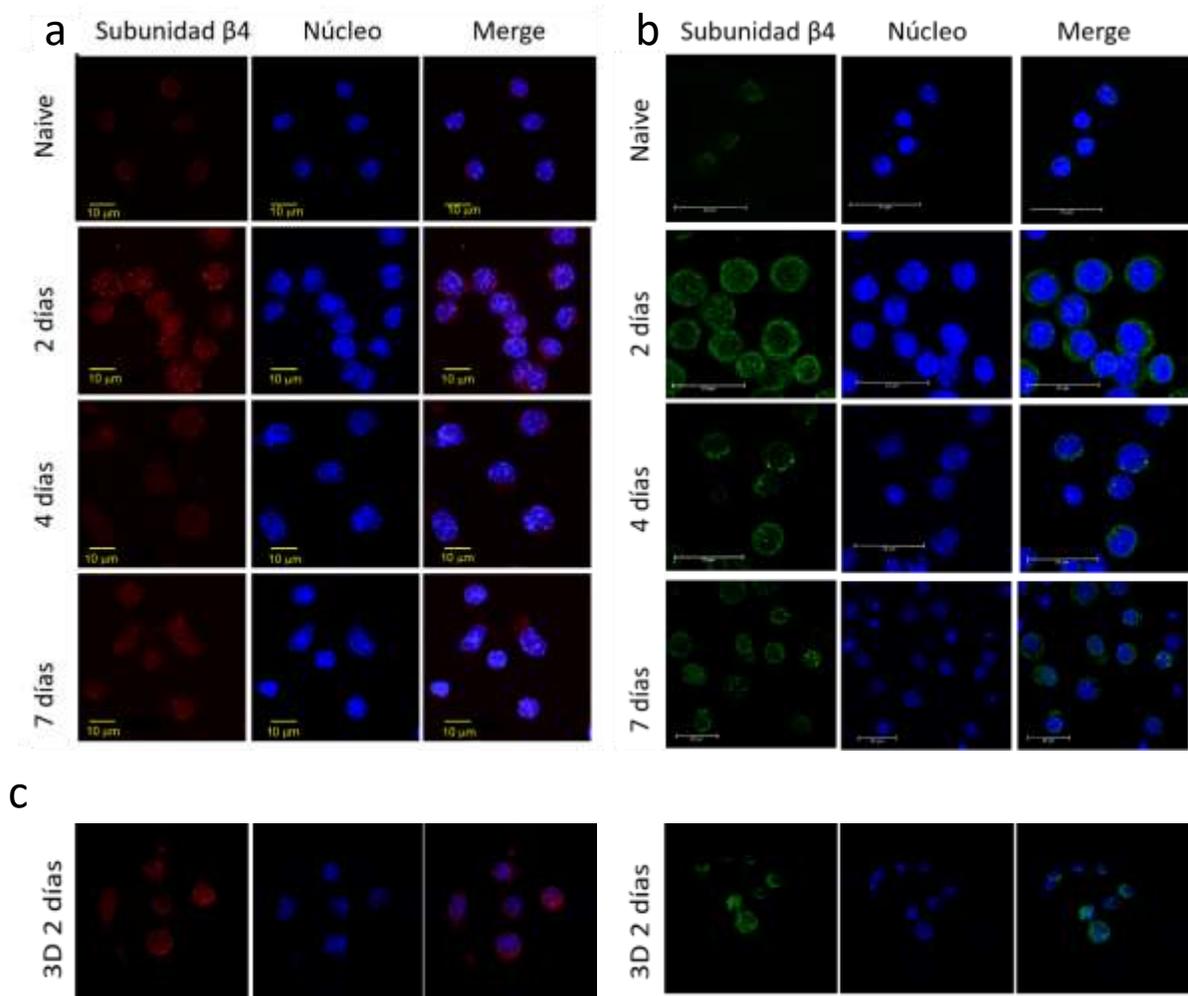
**Figura 7. 4**

(A) Expresión relativa del mRNA de  $\beta_4$  por qRT-PCR normalizado con 18s  $n=6$  y la expresión relativa de la proteína  $\beta_4$  normalizada con Actina,  $n=4$  en un tiempo de 7 días de activación con anti-CD3 y anti-CD28. Los experimentos comienzan en el día cero con la activación de los linfocitos vírgenes o *naive* (NV) y son evaluados al segundo, 4to y 7mo días. (B) Western Blot de  $\beta_4$  y del normalizador Actina. Datos como Media  $\pm$  SE (error estándar de la media) \*\* $p<0,01$ ; \* $p<0,05$ ; Comparación vs grupo NV. ANOVA de una sola vía.

### 7.3 Microscopía confocal.

Las evidencias de la expresión de  $\beta 4$  en los estudios de *Western Blot* fueron corroboradas con estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen diferentes epítopes de la proteína. Los estudios de microscopía confocal revelaron la expresión y localización de la subunidad  $\beta 4$  tanto en linfocitos vírgenes como en linfocitos Th1 activados. Los resultados de estos estudios mostraron que al segundo día de activación hay un incremento en la señal que corresponde a la  $\beta 4$  si se compara con las imágenes del grupo de linfocitos vírgenes.

Las imágenes siguientes son una representación de cuatro experimentos donde se usaron dos anticuerpos distintos contra la subunidad  $\beta 4$  que están hechos en especies diferentes (Fig. 7.5).

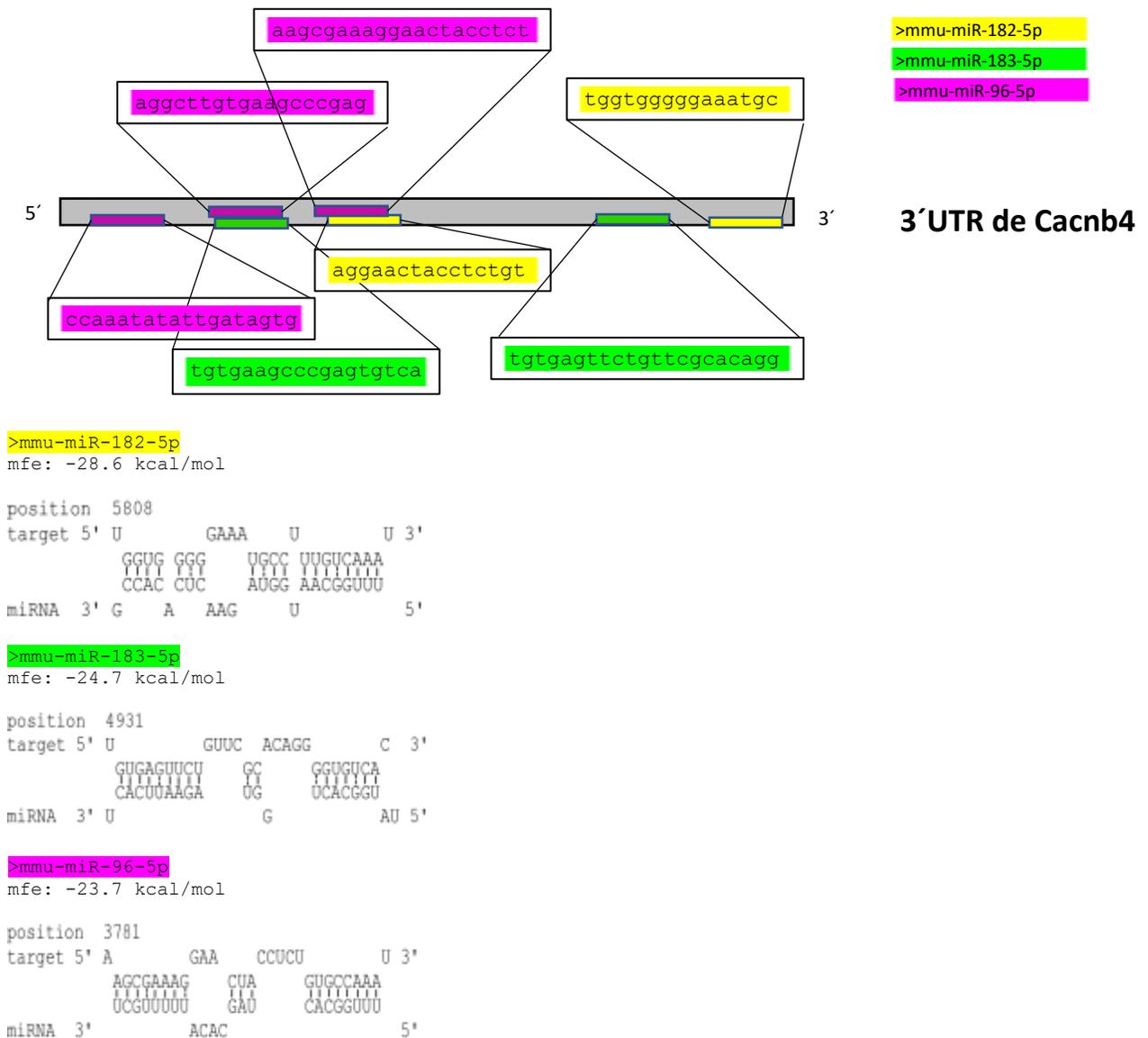


**Figura 7. 5**

Imágenes de microscopía confocal de linfocitos T vírgenes (*Naive*) y activados al segundo, cuarto y séptimo día de activación, marcados con técnicas de inmunofluorescencia para detectar la expresión y localización de la proteína β4 (a) color rojo (b) de color verde con anticuerpos que reconocen dos epítopes diferentes de esta proteína. Los núcleos de las células están marcados con Hoechst 33342 de color azul. (c) Reconstrucción de la imagen en 3D por el solapamiento de varias imágenes.

#### 7.4 Cluster de miRNAs miR-183/96/182

Los estudios *in silico* en diferentes bases de datos como *TargetScan* propusieron varios candidatos de miRNA bien conservados que podrían regular la expresión de la  $\beta 4$ , pero solo el *cluster* miR-183/96/182 tenía evidencias experimentales de una regulación de la expresión de esta proteína <sup>2,38</sup>. La hibridación de este *cluster* se corroboró con el programa RNA hybrid donde se observó que cada miembro del *cluster* hibridaba al menos en dos sitios de la región 3'UTR de  $\beta 4$  con una energía libre inferior a los -20 Kcal/mol (Fig. 7.6).



**Figura 7. 6**

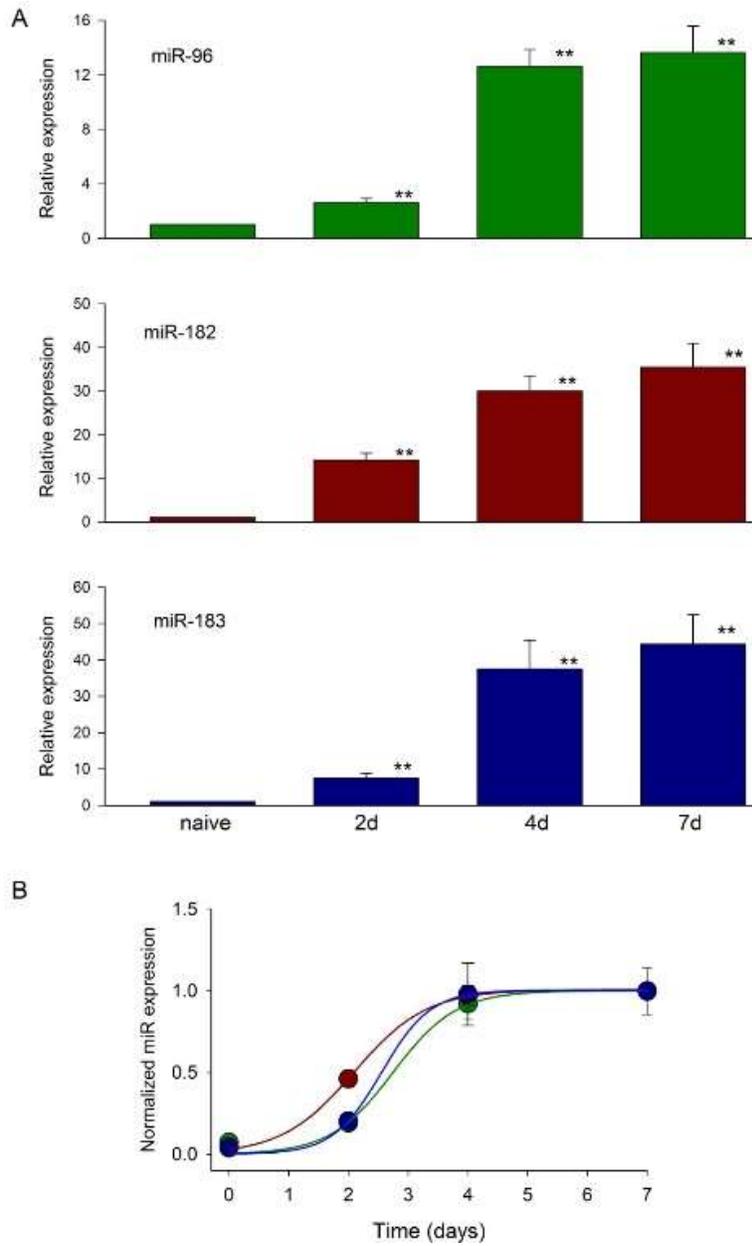
(a) Cada miembro del *cluster* miR-183/96/182 hibrida al menos en dos sitios de la región 3'UTR de  $\beta 4$  con una energía libre inferior a los -20 Kcal/mol. (b) Se muestran ejemplos de las alineaciones detalladas de cada miRNA que conforman el *cluster* en la posición de la región 3'UTR del mRNA de la subunidad  $\beta 4$ . Se muestra la alineación detallada de la región 3'UTR del mRNA de Cacnb4. Las bases emparejadas por enlaces Watson-Crick se indican con líneas verticales continuas y los pares G: U se indican con líneas discontinuas.

En vista de los antecedentes acerca de los miRNAs que pudieran estar regulando la  $\beta 4$ , en este tipo de células y los estudios *in silico*, se evaluó la expresión de los miRNAs que conforman el *cluster* 183/96/182.

Los estudios de qRT-PCR mostraron que los miRNAs que conforman el *cluster* de miR-183/96/182 aumentaron significativamente a través del tiempo después de la activación de los linfocitos. La expresión de los miR-182 y miR-183 aumentó más de 30 veces al cuarto día de activación con respecto al grupo de linfocitos vírgenes (Fig. 7.7 a).

El miR-96 se incrementó más de 10 veces a partir del 4to día con respecto al grupo control de linfocitos vírgenes (Fig. 7.7 a). El incremento significativo del miR-96 en cultivo primario de linfocitos activados no había sido reportado en la literatura, aunque estudios recientes han descrito su papel como promotor de la proliferación en células cancerígenas conjuntamente al miR-183<sup>66</sup>.

El curso temporal que se muestra en la Fig. 7.7 (b) reveló que el miR-182 se adelanta en el tiempo alcanzando valores de expresión muy elevados alrededor de un día antes con respecto a los otros miembros del *cluster* de miRNAs.



**Figura 7. 7**

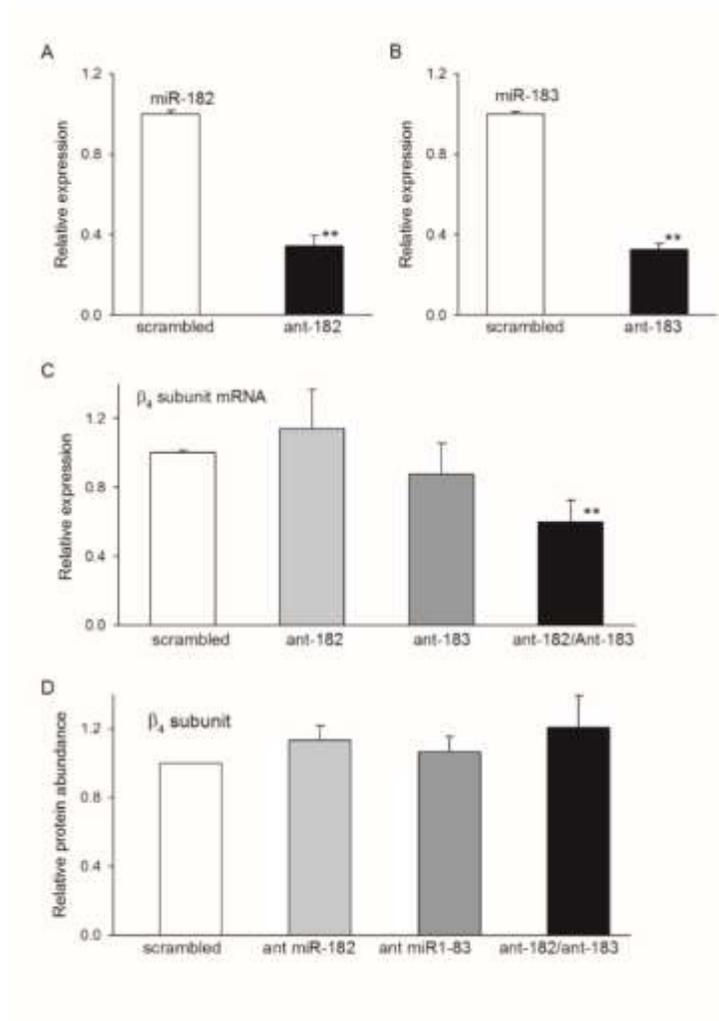
La expresión de los miRNAs que conforman el cluster miR-183/96/182 a través del tiempo después de la activación de los linfocitos con anti-CD3 y anti-CD28. (A) Cuantificación por qRT-PCR normalizado con 18s n=6. (B) Expresión de los miRNAs, normalizados con un modelo matemático, en el transcurso de 7 días. Datos como Media  $\pm$  SE (error estándar de la media) \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05. Comparación vs grupo NV. ANOVA de una sola vía.

## 7.5 Efectos de los microRNAs 182/183 sobre la expresión de $\beta 4$

Para evaluar el efecto del incremento de los miRNAs que forman el *cluster* de miR183/96/182 sobre la expresión de  $\beta 4$  a lo largo de los 7 días de activación se realizaron experimentos de transfección en cultivo primario de linfocitos Th1. Las células fueron transfectadas con Antagomir Power inhibitor de los miRNAs 182 y 183 respectivamente. La eficiencia de transfección de los antagomiRs se evaluó por citometría de flujo. A las 48 horas postransfección se obtuvo una eficiencia entre el 65 y el 85% respectivamente.

En los grupos de células transfectados con los antogomiRs se observó una disminución mayor al 50% del miRNA correspondiente al compararlos con el grupo control (Figs. 7.8 a y b).

La disminución en la expresión de los miRNAs 182 o 183 por el efecto de los antagomiRs no tuvo efectos sobre el mensajero de  $\beta 4$ , sin embargo, al mezclar ambos antagomiRs, el mensajero de  $\beta 4$  disminuyó significativamente. La expresión de la proteína  $\beta 4$  no se vio afectada en ninguno de los grupos al compararlos con el grupo control. A pesar de que puede verse una tendencia en el aumento de la proteína  $\beta 4$  en los grupos transfectados con el Antagomir del 182 no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Figs. 7.8 c y d).

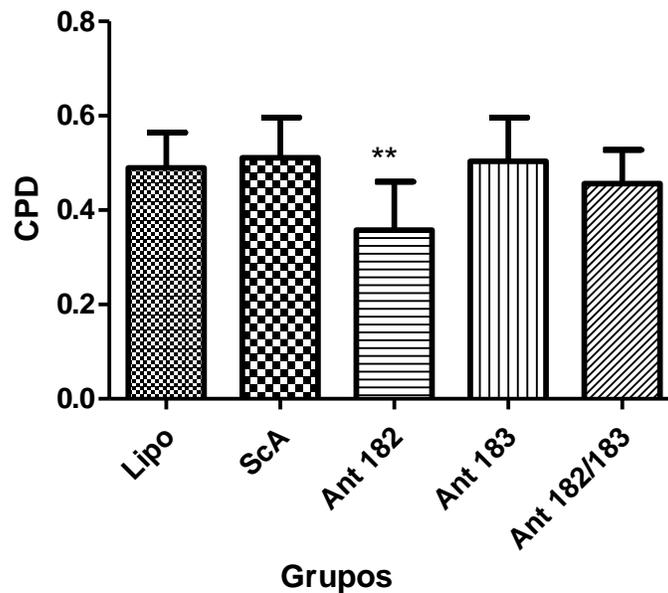


**Figura 7. 8**

(a y b) Efecto de los antagonomiRs 182/183 y la mezcla de estos sobre la expresión de los miRNAs correspondientes en linfocitos Th1 al 7mo día de activación. (c y d) Efecto de los antagonomiRs 182/183 y la mezcla de estos sobre la expresión del mensajero de la  $\beta_4$  y la proteína. n=6 Datos como Media  $\pm$  SE (error estándar de la media) \*\*p<0,01; Comparación vs grupo control (*Scramble*). ANOVA de una sola vía.

## 7.6 Efectos de los microRNAs 182/183 sobre la proliferación de linfocitos Th1.

En los grupos de células controles la proliferación celular se comportó de manera similar al resto de los experimentos anteriores a lo largo del periodo de activación y diferenciación. Las células transfectadas con el antagonomiR 182 disminuyeron la proliferación con respecto los grupos controles (Fig. 7.9). La transfección del antagonomiR 183 y la mezcla de ambos antagonomiRs no produjo efecto sobre la proliferación de las células.



**Figura 7. 9**

Promedio de la duplicación acumulada de la población de células (PD) en grupos de células controles y transfectadas con antagonomiR 182, 183 y la mezcla de estos.  $n=6$ , Datos como Media  $\pm$  SE (error estándar de la media)  $**p<0,01$ ; Comparación vs grupo ScA. ANOVA de una sola vía.

## **8. Discusión**

### **8.1 Consideraciones generales**

Las experiencias enmarcadas en el desarrollo del presente proyecto de tesis perseguían demostrar el comportamiento de la proteína  $\beta 4$  y su posible papel en la función de la respuesta inmune, específicamente en el proceso de activación y diferenciación de linfocitos Th1. Las células T vírgenes pueden diferenciarse en subpoblaciones de linfocitos según las señales a las que se enfrentaron. La estimulación correcta y moderada conducirá a respuestas precisas de las células T CD4+, mientras que las señales incorrectas causarán disfunciones como enfermedades autoinmunes y alergias <sup>8</sup>. Es por esto que, identificar factores que puedan influir en el proceso de activación, diferenciación y proliferación de Linfocitos T es de gran importancia. Estos factores pueden representar un blanco terapéutico para varias enfermedades causadas por disfunciones de las células T como las reacciones inmunes exacerbadas que ocurren en la artritis reumatoide.

El modelo clásico de células Th nos dice que cada subpoblación se desarrolla produciendo sus citocinas únicas y su regulador maestro. Pero investigaciones recientes muestran que estos procesos tal vez sean un poco más complicados. Con nuevas tecnologías como CHIP-seq, RNA-seq y análisis de bases de datos, se encontraron posibles factores de transcripción y sus sitios de unión en diferentes subpoblaciones y etapas de las células T. Estos resultados indican que la diferenciación de las células T no está totalmente esclarecida; se encuentra regulada por un gran número de señales y moléculas, que a su vez están bajo el control sutil, por parte de un regulador maestro. Entonces no se habla de un simple encendido y apagado de genes. A nivel epigenético, la modificación del DNA o de las histonas puede ayudar a decidir el destino celular, facilitando o bloqueando la unión del factor de transcripción maestro <sup>8</sup>.

La estimulación de TCR y la señalización de IFN- $\gamma$  STAT1 inducen la expresión de T-bet (codificado por Tbx21), el principal factor de transcripción que impulsa la diferenciación de Th1 al tiempo que suprime los linajes Th2/Th17 <sup>4</sup>.

## 8.2 Activación y diferenciación de linfocitos Th1

Tras la activación de los linfocitos T vírgenes con Anti-CD3 y Anti-CD28, en nuestras condiciones de laboratorio, se observaron cambios morfológicos en el cultivo de estas células, que indicaban el desencadenamiento de los procesos de diferenciación y proliferación bajo las condiciones de cultivo a las que estuvieron sometidas. Al segundo día de activación no hubo gran cambio en el número de células (Fig. 7.2 a), sin embargo, al analizar los rendimientos obtenidos del RNA y de las proteínas, por millón de células cosechadas, hubo un aumento significativo en estas variables al compararlo con los grupos de células vírgenes. El incremento en el rendimiento de las proteínas y del RNA nos sugiere que las células se estaban preparando para un proceso de expansión clonal, si además tenemos en cuenta que al cuarto día de activación la población se duplicó casi dos veces con respecto a las células que se sembraron inicialmente (Fig. 7.2 b y c).

El comportamiento de las variables se analizó en diferentes puntos del proceso de diferenciación de células vírgenes a linfocitos Th1. Para evaluar el direccionamiento de la diferenciación a esta subpoblación de linfocitos se analizó la expresión del mRNA de T-bet, un miembro de la familia de T-box responsable del desarrollo del linaje Th1 <sup>11</sup>. Al segundo día de activación hubo una tendencia al incremento en los niveles del mensajero de este factor de transcripción y su expresión se mantuvo a lo largo del proceso de diferenciación (Fig. 7.3).

T-bet no se expresa en células T CD4+ vírgenes, pero se induce fácilmente en respuesta a las vías de señalización de TCR, IFN- $\gamma$  e IL-12R. La expresión selectiva de T-bet representa el desarrollo de las células Th1 y la expresión específica de IFN $\gamma$  de estas células <sup>8</sup>.

### 8.3 La subunidad $\beta 4$ del canal de calcio tipo L en los linfocitos Th1.

Además de la señal generada tras el reconocimiento del antígeno específico (péptido presentado en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)) por el complejo del receptor del linfocito T (TCR), a las células les resulta imprescindibles señales coestimuladoras adicionales para lograr la completa activación. Además, necesitan la participación de citocinas que consolidan el proceso de activación. Tras la activación del TCR se desencadenan un conjunto de procesos metabólicos que inician con la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para finalmente activar a NFAT, un factor de transcripción que regula la expresión de varias citocinas, incluida la IL-2,<sup>13</sup>.

Entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática de los linfocitos T, descritos en la literatura se encuentran los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje (VDCC) de tipo L<sup>12</sup> y sus subunidades reguladoras.

La importancia de los canales tipo L en las células T y de la subunidad  $\beta 4$  se hizo evidente en los ratones con la llamada mutación letárgica. La ataxia y las convulsiones en el ratón letárgico surgen de una mutación del gen de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio tipo L<sup>31</sup>. Esta mutación produce además un trastorno inmunológico que incluye un defecto en la respuesta inmune celular<sup>33</sup>. El mecanismo del trastorno inmune descrito en estos animales letárgicos mutantes de  $\beta 4$ , aunque desconocido, es de gran interés, ya que apoya implícitamente la hipótesis de que los componentes de los canales tipo L se expresan en las células inmunes y desempeñan un papel crucial en la activación y función de estas.

Nuestros resultados confirman que el mensajero de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio tipo L, aumenta a partir del cuarto y séptimo día de activación con Anti-CD3 y Anti-CD28 en el proceso de diferenciación a linfocitos Th1 (Fig. 7.4 a). Badou y colaboradores mostraron evidencias de un incremento del mensajero de esta subunidad hasta el cuarto día de activación<sup>1</sup>, pero hasta el momento se desconocía la expresión de esta proteína a lo largo del proceso de diferenciación a Th1.

Curiosamente nuestros resultados revelan un comportamiento distinto del mensajero y la proteína en el transcurso de los 7 días de diferenciación después que son activados los linfocitos.

Los estudios de *Western Blot* mostraron por primera vez que la subunidad  $\beta 4$  aumenta de forma significativa al segundo día de activación, con respecto al grupo de linfocitos vírgenes. Resulta interesante el hecho de que la proteína se vea incrementada dos días antes de ver el incremento en la expresión del mensajero. Al 4to día de activación se observó una tendencia a disminuir la expresión de la  $\beta 4$ , cuando el mensajero de esta proteína alcanza valores significativos en el incremento de su expresión (Fig. 7.3 b).

Este fenómeno inesperado de la elevación de los niveles de proteína de la subunidad  $\beta 4$  de forma prematura al incremento en su RNA mensajero podría explicarse principalmente por una disminución significativa en la degradación de proteínas y, en menor medida, por un aumento en la síntesis de proteínas <sup>76</sup>, por lo que sería interesante evaluar la tasa de síntesis vs de degradación de esta proteína así como sus mecanismos de reciclaje en este modelo experimental.

La expresión de la subunidad  $\beta 4$  se corroboró con el uso de varios anticuerpos que reconocen diferentes epítopes de la proteína, en estudios de *Western Blot*, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación. Sin embargo, verificar la expresión de la misma por estudios de espectrometría de masa, le daría una robustez adicional a este planteamiento.

Varios estudios experimentales han reportado que las células T deficientes de  $\beta 4$  presentan alteraciones en la activación de NFAT y la producción de citocinas <sup>1</sup>. El hecho de que en nuestros resultados se aprecie un incremento de esta proteína en las primeras etapas de la activación de los linfocitos Th confirma la importancia y el papel que juega la subunidad  $\beta 4$  en la función efectora y el proceso de diferenciación en este tipo de células.

Por otra parte, varios autores refieren la importancia de la subunidad  $\beta 4$  en la proliferación celular donde demostraron que la expresión heteróloga de esta subunidad disminuye la proliferación de células CHO <sup>3</sup>. Así como el papel que juega

esta subunidad en promover la expresión de genes relacionados con el IFN reduciendo la infección viral en células H9C2 <sup>37</sup>.

En tal sentido, el incremento de la  $\beta 4$  al segundo día de activación podría explicar al menos en parte el retraso en la expansión clonal de esta población de células hasta el cuarto día de activación (Fig. 7.2 a).

#### **8.4 Localización de la $\beta 4$ a través de la microscopía confocal.**

Si bien fue novedoso, demostrar a nivel de *Western blot* la expresión de la proteína  $\beta 4$  y su comportamiento en el transcurso del proceso de diferenciación en linfocitos Th1, también era necesario confirmar su expresión con técnicas inmunofluorescencia, así como su localización en este tipo de células.

Los estudios de microscopía confocal revelaron la expresión y localización de la subunidad  $\beta 4$  tanto en linfocitos vírgenes como en linfocitos activados. Los resultados de estos estudios mostraron que al segundo día de activación hay un incremento en la señal que corresponde a la  $\beta 4$  si se compara con las imágenes del grupo de linfocitos vírgenes. El uso de diferentes anticuerpos que reconocen epítopes diferentes de esta proteína les confiere robustez a los resultados obtenidos con esta técnica. Si bien este tipo de ensayos no es mayormente cuantitativo, los resultados en la intensidad de la señal que reconoce a la proteína corresponden con las concentraciones relativas de proteínas obtenidas en los estudios con WB.

Estudios recientes han demostrado una relocalización de la subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio Tipo L que es promovida por su interacción con Ppp2r5d, una subunidad reguladora de PP2A. La formación, así como la translocación nuclear, del complejo  $\beta 4$ /Ppp2r5d/PP2A está totalmente alterada por una mutación prematura de  $\beta 4$  que se ha asociado previamente con la epilepsia juvenil. La expresión de  $\beta 4$  mutada en células HEK293 da como resultado la regulación de un conjunto de genes diferentes a la regulación genética que se produce en las células que expresan la  $\beta 4$  sin mutaciones <sup>77</sup>.

Las imágenes tridimensionales construidas por el solapamiento de varias imágenes en nuestros estudios de confocal permitieron mostrar la localización y la distribución perinuclear y nuclear de la proteína  $\beta 4$  (Fig. 7.5 c). Los cortes transversales de estas reconstrucciones en tercera dimensión muestran una señal que corresponde al reconocimiento de la proteína en el interior del núcleo. La presencia de  $\beta 4$  tanto en el citosol como en el núcleo de los linfocitos T sugieren una función reguladora importante en el proceso de activación linfocitaria independiente a su función reguladora del canal de calcio Tipo L. Tammineni y colaboradores demostraron que la abundancia de la subunidad  $\beta 4$  aumentó y se translocó al núcleo en células tratadas con IFN- $\beta$ , infectadas con el virus del dengue (DENV) o transfectadas con poli(I:C), un análogo sintético del RNA bicatenario <sup>37</sup>.

Una variante de  $\beta 4$  identificada, interactúa directamente con el dominio cromosoma (CSD) de la proteína cromobox 2/proteína heterocromatina 1 $\gamma$  (CHCB2/HP1 $\gamma$ ), una proteína nuclear que modula la transcripción de varios genes regulando la conformación de la heterocromatina. y por tanto el silenciamiento genético <sup>78</sup>.

## **8.5 El cluster de microRNAs miR-183/96/182**

Teniendo en cuenta la poca correlación en la expresión del mensajero y la proteína de  $\beta 4$  a lo largo del proceso de diferenciación de los linfocitos, era lógico pensar en factores que pudieran estar regulando la síntesis de esta proteína.

Los estudios *in silico* propusieron varios candidatos de miRNA bien conservados que podrían regular la expresión de la  $\beta 4$  como let-7-5p, miR-155-5p y miR-7-5p, sin embargo solo el *cluster* miR-183/96/182 tenía evidencias experimentales de una regulación de la expresión de esta proteína <sup>2,38</sup>.

En vista de estos antecedentes acerca de los miRNAs que pudieran estar regulando la  $\beta 4$  en este tipo de células y los estudios de hibridación *in silico*, se evaluó la expresión de los miRNAs que conforman el *cluster* 183/96/182.

Son muchos los miRNAs implicados en el desarrollo y la función del sistema inmunológico y ha habido un debate generalizado sobre su uso potencial como terapia para enfermedades relacionadas con la inmunidad. La expresión aberrante de ciertos miRNAs puede tener consecuencias patológicas, como autoinmunidad y cánceres hematológicos <sup>45</sup>.

El miR-182 es uno de los miembros del *cluster* 183/96/182, y está implicado en muchos aspectos de la función de los linfocitos, la reparación del ADN y la progresión del cáncer <sup>68</sup>.

Los experimentos de silenciamiento mediados por AntagomiR demostraron un papel central de miR-182 en la respuesta inmune dependiente de células Th impulsada por IL-2 a través de la capacidad del miRNAs para regular la expresión del factor transcripcional Foxo1. Se demostró que el miR-182 es un efector clave de la actividad supresora de las células T reguladoras durante una respuesta inmune <sup>53</sup>.

La activación de los linfocitos con Anti-CD3 y Anti-CD28 aumentaron significativamente la expresión de los miRNAs que conforman el cluster de miR-183/96/182 de forma progresiva a través del tiempo durante los 7 días del proceso de diferenciación in vitro. La expresión de los miR-182 y miR-183 aumentó más de 30 veces al cuarto día de activación con respecto al grupo de linfocitos vírgenes al mismo tiempo que aumenta la proliferación de estas células activadas (Fig. 7.7 a y Fig. 7.2 a). Estos resultados que concuerdan con lo reportado por otros autores <sup>53</sup> y sin duda sugieren un papel crítico para estos miRNAs en las células Th activadas. El incremento significativo del miR-96 en linfocitos activados y diferenciados a Th1 no había sido reportado en la literatura, aunque estudios recientes han descrito su papel como promotor de la proliferación en células cancerígenas conjuntamente al miR-183 <sup>66</sup>.

Los resultados de este trabajo demuestran el comportamiento en la expresión de la  $\beta 4$  en el proceso de activación y diferenciación de los Linfocitos T, su incremento al segundo día de activación y su tendencia a disminuir al cuarto día en el que se incrementó la expresión del *cluster* miR-183/96/182 y al mismo tiempo ocurre la mayor expansión clonal de estas células en los 7 días de activación.

Si tenemos en cuenta el comportamiento inverso de estas variables podríamos sugerir que el incremento en el número de linfocitos al cuarto día de activación está relacionado al menos en parte por la aparente disminución en la expresión de  $\beta 4$  que pudiera estar siendo regulada postranscripcionalmente por los miR-183/96/182. Si bien no se observa una disminución significativa de esta proteína después del segundo día de activación cuando tampoco hay un incremento paulatino que pueda correlacionarse con el incremento de su mensajero.

### **8.6 Efectos de los miRNAs 182/183 sobre la expresión de la $\beta 4$ y la proliferación de linfocitos Th1.**

El uso de AntagomiRs para abatir la función reguladora de los miRNAs es una de las formas de comprobar su efecto sobre la regulación de la proteína blanco. En nuestros experimentos se usaron AntagomiRs específicos para los miRNAs 182 y 183 en linfocitos T activados que disminuyeron la expresión de estos miRNAs de forma significativa (Fig. 7.8 b).

La disminución de los miRNAs no tuvo un efecto marcado sobre la proteína  $\beta 4$  al compararlo con el grupo control. A pesar de que podemos apreciar una tendencia al incremento en la proteína, por el efecto de los AntagomiRs, no alcanzó valores significativos. Sin embargo, no podemos descartar un efecto al menos parcial de estos miRNAs sobre la regulación de la proteína si tenemos en cuenta el papel prescindible de miR-182 en el desarrollo y la función de los linfocitos de los ratones B6 probablemente debido a la compensación de miR-96 y miR-183, ya que los tres miRNA tienen secuencias *seed* similares y superposiciones en los genes diana (Fig. 7.6) <sup>65</sup>. Si bien el miR-182 y miR-183 están altamente regulados positivamente en los linfocitos T activados, sorprendentemente, la desactivación sistémica de miR-182 en ratones B6 no tuvo ningún efecto obvio sobre el desarrollo y la función de las subpoblaciones de células T como CD4+, CD8+, CD4-CD8-doble negativo (DN) células T y Tregs. Además, la respuesta inmune dependiente de células T a *Listeria monocytogenes* en ratones miR-182-/- fue similar a la de los controles <sup>68</sup>.

Por otra parte, el efecto de la transfección del AntagomiR 182 disminuyó significativamente la proliferación de linfocitos al compararlo con los grupos controles (Fig. 7.9). Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura donde demuestran que la inhibición específica de miR-182 resultó en un incremento de la proteína FoxO1 y menor expansión clonal <sup>53</sup>. Resultados diferentes fueron obtenidos con la transfección del AntagomiR 183. A pesar de que nuestros experimentos mostraron una disminución de este miRNA por el efecto de su AntagomiR, no se observaron efectos sobre la proliferación de las células T, independientemente de los efectos como promotor de la proliferación reportados en números estudios <sup>65,79</sup>.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis dan pie a otras preguntas experimentales que se abordarán posteriormente. Abre otras perspectivas no conocidas al inicio del proyecto, que pudieran esclarecer dudas sobre el(los) mecanismo(s) por el(los) cual(es) la subunidad  $\beta 4$  juega un papel la función linfocitaria.

Indiscutiblemente investigar la contribución de la regulación de esta proteína en el proceso de activación linfocitaria y por ende en la respuesta inmune debe representar una etapa ulterior de esta línea de trabajo. En tal sentido, investigar los efectos del incremento acelerado de  $\beta 4$  en la primera etapa de diferenciación debe constituir una nueva tarea a acometer.

## 9. Conclusiones

- La subunidad  $\beta 4$  del canal de calcio Tipo L se expresa en linfocitos Th1 con un incremento significativo a partir del segundo día de activación, mientras que el incremento en el mensajero se puede observar más tardíamente.
- La proteína  $\beta 4$ , en los linfocitos Th1, se localiza en núcleo y citoplasma incrementando la señal de localización después del segundo día de activación.
- La proliferación de linfocitos T se incrementó de manera significativa a partir del 4 día de activación con Anti-CD3 y Anti-CD28, coincidiendo con la mayor expresión de los miembros del *cluster* de miR-183/96/182 en el transcurso de los 7 día de diferenciación linfocitaria.
- La inhibición de los miRNAs 182 y 183 no afectan de manera significativa la expresión de la proteína  $\beta 4$  en el proceso de activación de los linfocitos Th1 y solo la inhibición del miR-182 produjo una disminución en la proliferación de linfocitos.

## 10. Referencias Bibliográficas

1. Badou, A. *et al.* Critical role for the  $\beta$  regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15529–15534 (2006).
2. Woldemichael, B. T. *et al.* The microRNA cluster miR-183/96/182 contributes to long-term memory in a protein phosphatase 1-dependent manner. *Nat Commun* **7**, 12594 (2016).
3. Rima, M. *et al.* Down-regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by Cacnb4. *Mol Biol Cell* **28**, 3699–3708 (2017).
4. Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X. & Zhang, B. T cells in health and disease. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 235 (2023).
5. Inmunología celular y molecular - 9788413822068. *ES Elsevier Health*  
<https://tienda.elsevier.es/inmunologia-celular-y-molecular-9788413822068.html>.
6. Ruterbusch, M., Pruner, K. B., Shehata, L. & Pepper, M. In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annual Review of Immunology* **38**, 705–725 (2020).
7. Hosokawa, H. & Rothenberg, E. V. Cytokines, Transcription Factors, and the Initiation of T-Cell Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, a028621 (2018).
8. Zhang, Y., Zhang, Y., Gu, W. & Sun, B. Th1/Th2 Cell Differentiation and Molecular Signals. in *T Helper Cell Differentiation and Their Function* (ed. Sun, B.) 15–44 (Springer Netherlands, 2014).  
doi:10.1007/978-94-017-9487-9\_2.
9. Khan, U. & Ghazanfar, H. T Lymphocytes and Autoimmunity. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 341 125–168 (Elsevier, 2018).
10. Lighvani, A. A. *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon- $\gamma$  in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15137–15142 (2001).

11. Szabo, S. J. *et al.* A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).
12. Kotturi, M. F., Carlow, D. A., Lee, J. C., Ziltener, H. J. & Jefferies, W. A. Identification and Functional Characterization of Voltage-dependent Calcium Channels in T Lymphocytes\*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46949–46960 (2003).
13. Scharenberg, A. M. & Kinet, J.-P. PtdIns-3,4,5-P3: A Regulatory Nexus between Tyrosine Kinases and Sustained Calcium Signals. *Cell* **94**, 5–8 (1998).
14. Patel, S., Joseph, S. K. & Thomas, A. P. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* **25**, 247–264 (1999).
15. Akimzhanov, A. M. & Boehning, D. IP3R function in cells of the immune system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* **1**, 329–339 (2012).
16. Feske, S. Ca<sup>2+</sup> Influx in T Cells: How Many Ca<sup>2+</sup> Channels? *Front Immunol* **4**, 99 (2013).
17. Lewis, R. S. Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology* **19**, 497–521 (2001).
18. Khan, A. A., Steiner, J. P., Klein, M. G., Schneider, M. F. & Snyder, S. H. IP<sub>3</sub> Receptor: Localization to Plasma Membrane of T Cells and Cocapping with the T Cell Receptor. *Science* **257**, 815–818 (1992).
19. Feske, S. *et al.* A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179–185 (2006).
20. Vig, M. *et al.* CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Science* **312**, 1220–1223 (2006).
21. Zhang, S. L. *et al.* Genome-wide RNAi screen of Ca<sup>2+</sup> influx identifies genes that regulate Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9357–9362 (2006).

22. Prakriya, M. *et al.* Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**, 230–233 (2006).
23. Yeromin, A. V. *et al.* Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* **443**, 226–229 (2006).
24. McNally, B. A., Somasundaram, A., Yamashita, M. & Prakriya, M. Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature* **482**, 241–245 (2012).
25. Schwarz, E. C. *et al.* TRP Channels in Lymphocytes. in *Transient Receptor Potential (TRP) Channels* (eds. Flockerzi, V. & Nilius, B.) 445–456 (Springer, 2007). doi:10.1007/978-3-540-34891-7\_26.
26. Inada, H., Iida, T. & Tominaga, M. Different expression patterns of TRP genes in murine B and T lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 762–767 (2006).
27. Wenning, A. S. *et al.* TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1813**, 412–423 (2011).
28. Hogan, P. G., Lewis, R. S. & Rao, A. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* **28**, 491–533 (2010).
29. Robert, V., Triffaux, E., Savignac, M. & Pelletier, L. Singularities of calcium signaling in effector T-lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**, 1595–1602 (2013).
30. Omilusik, K. D., Nohara, L. L., Stanwood, S. & Jefferies, W. A. Weft, warp, and weave: the intricate tapestry of calcium channels regulating T lymphocyte function. *Front Immunol* **4**, 164 (2013).

31. Burgess, D. L., Jones, J. M., Meisler, M. H. & Noebels, J. L. Mutation of the Ca<sup>2+</sup> Channel  $\beta$  Subunit Gene *Cchb4* Is Associated with Ataxia and Seizures in the Lethargic (lh) Mouse. *Cell* **88**, 385–392 (1997).
32. Badou, A., Jha, M. K., Matza, D. & Flavell, R. A. Emerging Roles of L-Type Voltage-Gated and Other Calcium Channels in T Lymphocytes. *Front Immunol* **4**, 243 (2013).
33. Dung, H. C. & Swigart, R. H. Histo-pathologic observations of the nervous and lymphoid tissues of 'lethargic' mutant mice. *Tex Rep Biol Med* **30**, 23–39 (1972).
34. Morrison, D. G., Moyer, M. P., Dung, H. C., Rogers, W. & Moyer, R. C. Tumor growth rate varies with age in lethargic mutant BALB/cGnDu mice. *Dev Comp Immunol* **8**, 435–442 (1984).
35. Erdogmus, S. *et al.* Cav $\beta$ 1 regulates T cell expansion and apoptosis independently of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel function. *Nat Commun* **13**, 2033 (2022).
36. Cahalan, M. D. Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel proteins do not function as ion channels in T cells. *Science Signaling* **15**, eabq5594 (2022).
37. Tammineni, E. R. *et al.* The  $\beta_4$  subunit of Ca<sub>v</sub> 1.2 channels is required for an optimal interferon response in cardiac muscle cells. *Sci. Signal.* **11**, eaaj1676 (2018).
38. Soldà, G. *et al.* A novel mutation within the MIR96 gene causes non-syndromic inherited hearing loss in an Italian family by altering pre-miRNA processing. *Hum Mol Genet* **21**, 577–585 (2012).
39. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 509–524 (2014).
40. Vishnoi, A. & Rani, S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. in *MicroRNA Profiling: Methods and Protocols* (ed. Rani, S.) 1–10 (Springer, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-6524-3\_1.
41. Lu, T. X. & Rothenberg, M. E. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol* **141**, 1202–1207 (2018).

42. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* **12**, 99–110 (2011).
43. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**, 92–105 (2009).
44. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**, 597–610 (2010).
45. Mehta, A. & Baltimore, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat Rev Immunol* **16**, 279–294 (2016).
46. Podshivalova, K. & Salomon, D. R. microRNA regulation of T lymphocyte immunity: modulation of molecular networks responsible for T cell activation, differentiation and development. *Crit Rev Immunol* **33**, 435–476 (2013).
47. Jeker, L. T. & Bluestone, J. A. microRNA regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev* **253**, 65–81 (2013).
48. Baumjohann, D. & Ansel, K. M. MicroRNA Regulation of T Helper Cell Differentiation and Plasticity. *Nat Rev Immunol* **13**, 666–678 (2013).
49. Li, Q.-J. *et al.* miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. *Cell* **129**, 147–161 (2007).
50. Blevins, R. *et al.* microRNAs Regulate Cell-to-Cell Variability of Endogenous Target Gene Expression in Developing Mouse Thymocytes. *PLoS Genet* **11**, e1005020 (2015).
51. Han, Y.-C. *et al.* An allelic series of miR-17~92–mutant mice uncovers functional specialization and cooperation among members of a microRNA polycistron. *Nat Genet* **47**, 766–775 (2015).
52. Jiang, S. *et al.* Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood* **118**, 5487–5497 (2011).

53. Stittrich, A.-B. *et al.* The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nat Immunol* **11**, 1057–1062 (2010).
54. Jindra, P. T., Bagley, J., Godwin, J. G. & Iacomini, J. Costimulation-Dependent Expression of MicroRNA-214 Increases the Ability of T Cells To Proliferate by Targeting Pten. *The Journal of Immunology* **185**, 990–997 (2010).
55. Cho, S. *et al.* miR-23~27~24 clusters control effector T cell differentiation and function. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 235–249 (2016).
56. Pua, H. H. *et al.* MicroRNAs 24 and 27 Suppress Allergic Inflammation and Target a Network of Regulators of T Helper 2 Cell-Associated Cytokine Production. *Immunity* **44**, 821–832 (2016).
57. Hu, R. *et al.* miR-155 Promotes T Follicular Helper Cell Accumulation during Chronic, Low-Grade Inflammation. *Immunity* **41**, 605–619 (2014).
58. Huffaker, T. B. *et al.* Epistasis between MicroRNAs 155 and 146a during T Cell-Mediated Antitumor Immunity. *Cell Reports* **2**, 1697–1709 (2012).
59. Yang, L. *et al.* miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 1655–1670 (2012).
60. Lu, L.-F. *et al.* Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell* **142**, 914–929 (2010).
61. Altuvia, Y. *et al.* Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* **33**, 2697–2706 (2005).
62. Jalvy-Delvaile, S. *et al.* Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Res* **40**, 1356–1365 (2012).
63. Pierce, M. L. *et al.* MicroRNA-183 family conservation and ciliated neurosensory organ expression. *Evol Dev* **10**, 106–113 (2008).

64. Dambal, S., Shah, M., Mihelich, B. & Nonn, L. The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic Acids Res* **43**, 7173–7188 (2015).
65. Wang, Z., Dai, R. & Ahmed, S. A. MicroRNA-183/96/182 cluster in immunity and autoimmunity. *Frontiers in Immunology* **14**, (2023).
66. Thiel, J. *et al.* MicroRNA-183 and microRNA-96 are associated with autoimmune responses by regulating T cell activation. *Journal of Autoimmunity* **96**, 94–103 (2019).
67. Peng, S. L. Foxo in the immune system. *Oncogene* **27**, 2337–2344 (2008).
68. Pucella, J. N. *et al.* miR-182 Is Largely Dispensable for Adaptive Immunity: Lack of Correlation between Expression and Function. *The Journal of Immunology* **194**, 2635–2642 (2015).
69. Das, A. *et al.* Effector/memory CD4 T cells making either Th1 or Th2 cytokines commonly co-express T-bet and GATA-3. *PLOS ONE* **12**, e0185932 (2017).
70. Flaherty, S. & Reynolds, J. M. Mouse Naïve CD4+ T Cell Isolation and In vitro Differentiation into T Cell Subsets. *J Vis Exp* 52739 (2015) doi:10.3791/52739.
71. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
72. Tsang, M., Gantchev, J., Ghazawi, F. M. & Litvinov, I. V. Protocol for adhesion and immunostaining of lymphocytes and other non-adherent cells in culture. *BioTechniques* **63**, 230–233 (2017).
73. Brennan, A. J. *et al.* A Method for Detecting Intracellular Perforin in Mouse Lymphocytes. *The Journal of Immunology* **193**, 5744–5750 (2014).
74. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

75. Ghaffari, S. *et al.* Optimizing interleukin-2 concentration, seeding density and bead-to-cell ratio of T-cell expansion for adoptive immunotherapy. *BMC Immunol* **22**, 43 (2021).
76. Kristensen, A. R., Gsponer, J. & Foster, L. J. Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation. *Mol Syst Biol* **9**, 689 (2013).
77. Ronjat, M., Kiyonaka, S., Barbado, M., De Waard, M. & Mori, Y. Nuclear life of the voltage-gated Cacnb4 subunit and its role in gene transcription regulation. *Channels (Austin)* **7**, 119–125 (2013).
78. Vergnol, A., Traoré, M., Pietri-Rouxel, F. & Falcone, S. New Insights in CaV $\beta$  Subunits: Role in the Regulation of Gene Expression and Cellular Homeostasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
79. Wang, Y. *et al.* Effect of miR-183-5p on Cholestatic Liver Fibrosis by Regulating Fork Head Box Protein O1 Expression. *Frontiers in Physiology* **12**, (2021).