



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Efecto de CRTAM en la generación y función de los linfocitos
T CD8 de memoria”**

TESIS

Que presenta

M. en C. GABRIELA HERNÁNDEZ GALICIA

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de tesis:

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Dra. Irlanda Olvera Gómez

Ciudad de México

Noviembre, 2024

Directores de tesis

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Investigador Titular y Encargado del Despacho de la Jefatura del Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav.

Dra. Irlanda Olvera Gómez

Investigadora en Ciencias Médicas, División de Investigación, Hospital Juárez de México.

Asesores de tesis

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Investigadora Titular del Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav.

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav.

Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav.

Dr. Oscar Medina Contreras

Investigador en Ciencias Médicas, Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, ubicado en las instalaciones del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), Unidad Zacatenco.

El CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías) aportó el apoyo económico número -779649- a la M. en C. Gabriela Hernández Galicia, con número de CVU 934034, para la realización de los estudios de doctorado.

I. Índice

I.	Índice	III
II.	Lista de figuras	V
III.	Agradecimientos	VI
IV.	Resumen.....	VIII
V.	Abstract	IX
VI.	Abreviaturas/Acrónimos	X
VII.	Introducción	1
	a. CRTAM	1
	b. Memoria inmunológica	7
VIII.	Antecedentes directos.....	17
IX.	Planteamiento del problema	18
X.	Justificación	19
XI.	Hipótesis	20
XII.	Objetivos	20
	a. Objetivo general	20
	b. Objetivos específicos	20
XIII.	Materiales y métodos	21
XIV.	Resultados	26
XV.	Discusión	36
XVI.	Conclusiones.....	39

XVII.	Perspectivas	39
XVIII.	Artículos	40
XIX.	Referencias	41
XX.	Anexos	52

II. Lista de figuras

Figura- 1 Estructura de CRTAM.....	2
Figura- 2 Subpoblaciones y factores que impactan en la generación de linfocitos T de memoria.....	12
Figura- 3 En condiciones homeostáticas, la frecuencia de las poblaciones de memoria es independiente de CRTAM.	26
Figura- 4 CRTAM es necesario para el control de la infección por Salmonella Typhimurium virulenta.....	27
Figura- 5 CRTAM impacta en el establecimiento de las subpoblaciones de memoria.....	28
Figura- 6 El mantenimiento de la subpoblación de linfocitos T CD8+ de memoria central es dependiente de CRTAM.	30
Figura- 7 CRTAM impacta en el balance entre linfocitos T CD8+ efectores y de memoria.....	31
Figura- 8 CRTAM favorece respuestas de memoria más eficaces.....	33
Suplementaria- 1. Estrategia de análisis por citometría de flujo.	53
Suplementaria- 2 Los ratones silvestres y carentes para CRTAM son capaces de controlar la inmunización con STm atenuada.....	54
Suplementaria- 3 . Los ratones carentes de CRTAM tienen una mayor cantidad de IFN- γ intracelular.....	55

III. Agradecimientos

- Al **Dr. Vianney**, por “rescatarme” de una decisión del pasado, además de sus consejos y guía científica.
- A la **Dra. Irlanda**, por sus consejos y guía para el desarrollo del proyecto.
- A la **Dra. Carmen, Dr. Leopoldo, Dr. Villegas, Dr. Oscar y Dra. Cedillo**, por sus comentarios y opiniones que han enriquecido el proyecto y mi vida académica a lo largo de los años.
- A **Dana, Luis Uriel, Carlos Samuel y Julio Ángel**, por su amistad y por enseñarme que en el laboratorio lo único que debemos tomarnos seriamente son los experimentos y la discusión científica.
- A **Jesús Guzmán** (Chuchino), sin ti ningún experimento en el laboratorio sería posible y por siempre apoyarme. **Benja**, por tu actitud y ser el mejor compañero de mesa.
- A **Diana Berenice, Diana Zuleika, Rosario, Uriel, América, Mónica y Jocelyn Carolina**, por su retroalimentación y apoyarme en la mayoría de mis ocurrencias.

*A mis **padres** y **hermanas**,
por impulsarme (aunque no lo supieran) y
ser mi ejemplo a seguir.*

IV. Resumen

CRTAM es una molécula de adhesión con función inmunoreguladora, que participa en el mantenimiento de la polarización tardía de proteínas como talina, CD3 y PKC- ζ , así como en la secreción de citocinas, como IFN- γ , IL-17 e IL-22. Esos procesos intervienen en la generación de linfocitos T CD8 de memoria. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la expresión de CRTAM en la generación de linfocitos T CD8 de memoria. Demostramos que CRTAM es necesario para el establecimiento de la subpoblación CD8_{EM}, así como para el mantenimiento a tiempo tardíos (d60) de los CD8_{CM}. También, que durante la fase aguda se favorece un fenotipo efector de vida corta, y este proceso es dependiente de la expresión de CRTAM. La capacidad protectora contra una cepa virulenta de *Salmonella* es independiente de la expresión de CRTAM. Sin embargo, la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ o Grz-B⁺ y, la retención de los linfocitos T CD8 se ven afectadas. Todo lo anterior, nos indica que la expresión de CRTAM es necesaria para regular la dinámica de las subpoblaciones de linfocitos T CD8 de memoria.

V. Abstract

CRTAM, an adhesion molecule with an immunoregulatory function, participates in the late polarization maintenance of proteins such as talin, CD3, and PKC- ζ and cytokine secretion, such as IFN- γ , IL.17 and, IL-22. These processes are involved in the generation of memory CD8 T lymphocytes. This work aimed to evaluate the impact of CRTAM expression on the generation of memory CD8 T lymphocytes. We demonstrated that CRTAM is necessary for establishing the CD8_{EM} subpopulation and for the late maintenance (day 60) of CD8_{CM}. Additionally, during the acute phase, a short-lived effector phenotype is favored, and this process is dependent on CRTAM expression. The protective capacity against a virulent strain of *Salmonella* is not affected, but the CD8+ IFN+ or Grz-B+ frequency and CD8 T lymphocyte retention are. All the above indicates that CRTAM expression is necessary to regulate the dynamics of memory CD8 T lymphocyte subpopulations

VI. Abreviaturas/Acrónimos

CRTAM	Molécula Citotóxica y Reguladora de linfocitos T
mTORC1	Objetivo en Mamíferos del Complejo de Rapamicina 1
KLRG1	Receptor tipo Lectina de células asesinas/citotóxicas G1
MPEC	Linfocitos Efectores Precursores de Memoria
SLEC	Linfocitos Efectores de Vida Corta
IgSF	Superfamilia de Inmunoglobulinas
Nect-2	Tipo Nectina 2
HTLV-1	Virus linfotrópico humano de linfocitos T de tipo 1
DC	Células Dendríticas
APC	Célula Presentadora de Antígenos
TCR	Receptor de Linfocitos T
MHC I/II	Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I /II
CX3CR1	Receptor de Quimiocinas con Motivo con CX3C

VII. Introducción

a. CRTAM

CRTAM (CD355; por las siglas en inglés para: Molécula asociada a linfocitos T restringida a Clase-I o Molécula reguladora y citotóxica de linfocitos T), es una molécula de adhesión que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) con función inmunoreguladora (Kennedy et al., 2000; Patiño-Lopez et al., 2006). Por aproximación bioinformática, se describió que filogenéticamente está relacionada con las moléculas de adhesión denominadas tipo-Nectinas (Nectin-like; Necl) (Patiño-Lopez et al., 2006).

Estructuralmente, en la porción extracelular CRTAM tiene un dominio inmunoglobulina tipo variable (IgV) y un dominio de inmunoglobulina tipo constante (IgC); en la porción intracelular de la proteína tiene un motivo de interacción (ESIV) con proteínas con dominios PDZ de tipo I; experimentalmente la única proteína que se ha demostrado que interactúa con CRTAM a través de este motivo es Scrib. CRTAM es capaz de establecer interacciones homotípicas CRTAM-CRTAM u heterotípicas con su único ligando reconocido Necl-2 (tipo Nectina 2) (Barragan-Galvez et al., 2020; Vázquez-Martínez et al., 2020; Yeh et al., 2008).

**Molécula Citotóxica y Reguladora
de linfocitos T
CRTAM (CD355)**

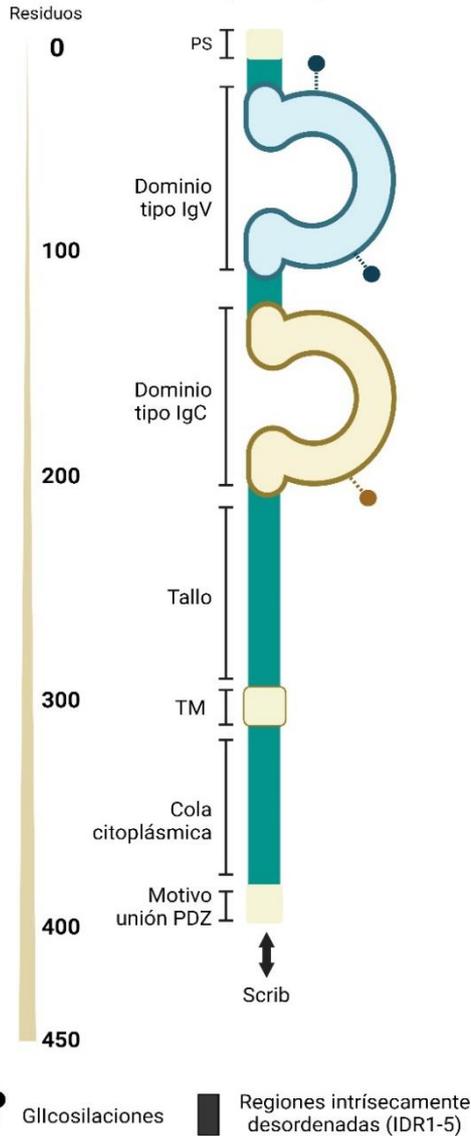


Figura- 1 Estructura de CRTAM.

Se muestra el dominio tipo Ig-V, el tipo Ig-C, la porción del tallo, transmembrana (TM) y la cola citoplásmica. Se ilustra en la región terminal de la proteína el motivo de unión a proteínas con dominios PDZ de tipo I (ESIV), localizado en la posición 389 a 393. La proteína que interactúa con CRTAM a través de este motivo es la proteína adaptadora Scrib.

Inicialmente, la propuesta de modelo de interacción de CRTAM con Necl-2, es que ambas moléculas interactuaban exclusivamente a través del dominio tipo IgV de ambas proteínas, actualmente un nuevo modelo sugiere que CRTAM interactúa en *cis* con otras moléculas CRTAM, formando agregados, e interactúa con células Necl-2⁺ a través de sus dominios tipo IgV y tipo IgC, favoreciendo se establezcan interacciones de mayor afinidad (Barragan-Galvez et al., 2024; S. Zhang et al., 2013).

A la fecha, se ha descrito que CRTAM se expresa, preferencial pero no exclusivamente, en células del sistema inmune con capacidad citotóxica (Kennedy et al., 2000). Inicialmente se describió en células NKT y linfocitos T CD8, cuya expresión en estas células es inducible por activación (Kennedy et

al., 2000). Posteriormente, también se demostró que los linfocitos T CD4 con capacidad citotóxica pueden identificarse por la expresión de CRTAM⁺ en su superficie. Estos linfocitos T CD4⁺ CRTAM⁺ también expresan Eomesodermina (Eomes), IFN- γ y Granzima-B, además que experimentalmente se demostró que son capaces de inducir la muerte de una célula blanco, indicando que estas moléculas son funcionales (Takeuchi et al., 2016).

En ratones, se identificó que durante la ontogenia de los linfocitos T en timo, específicamente de las etapas de DN1 a DN4 (dobles negativos 1-4) expresan constitutivamente CRTAM, la cual disminuye conforme progresan en esta fase de maduración; y su interacción con Necl-2 es necesaria para la formación del timo (Medina-Contreras et al., 2010).

Además de células o tejidos inmunes, se ha identificado a nivel de RNA mensajero o proteína la expresión de CRTAM en sistema nervioso central, específicamente en las neuronas de Purkinje, en el que su expresión es constitutiva, y en células epiteliales (Patiño-López et al., 2006).

Regulación transcripcional de CRTAM

Una de las incógnitas iniciales tras la identificación de CRTAM fue porque en unas células su expresión es constitutiva y en otras inducible. Se analizó *in-silico*, la región promotora de CRTAM, dentro de la cual se identificaron, dos posibles sitios de interacción, con el factor de transcripción AP-1 (-1436 y -1482) y, dos sitios de interacción con el factor de transcripción NF- κ B (-134 y -1573), ambos resultaron reguladores positivos de la expresión de CRTAM, inducidos río debajo

de la señalización vía TCR tras la activación de estas células(Valle-Ríos et al., 2009).

Zeb-1 se identificó como represor transcripcional de CRTAM, el cual interactúa en dos sitios de interacción distales en la región promotora de CRTAM (Rojas-Márquez et al., 2015). Experimentalmente se demostró que las líneas celulares que expresan constitutivamente Zeb-1 no expresan CRTAM (p.ej. MDA-MB-231), y viceversa (p. ej. MCF-7) (Valle-Ríos et al., 2009).

CRTAM en la biología de los linfocitos T

Se ha descrito que CRTAM interviene en diversos procesos celulares indispensables para la función de los linfocitos T tanto CD4 como CD8. Principalmente, se ha relacionado con la producción y/o secreción de citocinas como IFN- γ e IL-22, y que este efecto se maximiza cuando CRTAM y Necl-2 interactúan (Yeh et al., 2008). De igual forma, se comprobó que esta molécula favorece la retención en ganglios linfáticos de linfocitos T CD8 y por ende afecta la proliferación de estos, lo que conlleva a que *in-vivo* se detecten una menor proporción de linfocitos CD8 antígeno específicos(Takeuchi et al., 2009).

Por otra parte, se evidenció que CRTAM se polariza hacia el sitio de sinapsis inmunológica y que esta relocalización es dependiente de PKC- $\lambda/1$ (Yang et al., 2009). Al polarizarse CRTAM, promueve el mantenimiento de la polarización tardía de proteínas, como CD3, talina y PKC- θ hacia el polo donde se establece la interacción con la célula presentadora de antígeno (APC), y hacia el polo opuesto se relocaliza la molécula CD44, cuyo principal ligando es el ácido

hialurónico presente en la matriz extracelular, y que se ha involucrado en el proceso de migración de los linfocitos T (Yeh et al., 2008).

CRTAM como mediador de la citotoxicidad en diversas patologías

Experimentalmente se ha demostrado que la interacción de CRTAM con su ligando Necl-2, mejora la capacidad de los linfocitos T CD8⁺ de mediar la lisis de células infectadas con el virus linfotrópico humano de linfocitos T de tipo 1 (HTLV-1), células de timoma (EL-4)-Necl-2⁺, además, la expresión de esta proteína en muestras de cáncer de mamá triple negativo es un marcador de mejor pronóstico, ya que se asoció con mayor infiltrado de linfocitos T CD8⁺ al tumor (Boles et al., 2005; Nakahata et al., 2012; Zheng et al., 2024).

En contraparte, se ha probado que la interacción de CRTAM-Necl-2 es la principal responsable del daño al folículo piloso en la alopecia autoinmune, y en patologías como asma alérgica se encontró una expresión aberrante de CRTAM en neutrófilos y eosinófilos, sin que el rol funcional de su presencia en estas células se haya esclarecido (Giangreco et al., 2012; Ramirez-Velazquez et al., 2014).

En pacientes con autoinmunidad, específicamente diabetes mellitus tipo 1 (DM1), se demostró que en circulación los linfocitos NKT CRTAM⁺ son los que preferencialmente son IFN- γ ⁺, lo que podría contribuir a la fisiopatología de la enfermedad, aunque aún falta esclarecer la relevancia de este fenómeno (Beristain-Covarrubias et al., 2017).

CRTAM en el control de infecciones

Por ensayos *in-vivo* se demostró que CRTAM es indispensable para el control de infecciones bacterianas, parasitarias y virales. Para el caso de bacterias gramnegativas como *Citrobacter rodentium* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, se comprobó que la presencia de CRTAM impacta en la eliminación de la bacteria, ya que en ausencia de esta proteína se detecta una mayor carga bacteriana en órganos como bazo o hígado (Castro de Aquino, 2019; Yeh et al., 2008).

En un modelo en ratón de infección intestinal por el parásito *Toxoplasma gondii*, la expresión de CRTAM en linfocitos T es perjudicial, ya que favorece la retención de estas células al sitio de infección, favoreciendo el microambiente proinflamatorio, principalmente por un incremento en la secreción de IL-17 (Cervantes-Barragan et al., 2019; Cortez et al., 2014).

Para infecciones en un modelo en ratón de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, se ha descrito que los ratones deficientes para CRTAM no controlan eficientemente la infección por esta bacteria, lo que tiene como resultado una disminución de la supervivencia de estos ratones en los primeros siete días de la infección. En este modelo, se detecta una mayor carga bacteriana en ratones deficientes en bazo, timo, riñón e hígado (Castro de Aquino, 2019; Perez-Lopez et al., 2019). Lo anterior, se ha explicado principalmente por una disminución en la producción de IFN- γ por células NK y linfocitos T.

b. Memoria inmunológica

Fases de la respuesta inmunológica

Posterior a la exposición a un antígeno (Ag), las células dendríticas (DC) u otras células presentadoras de antígenos (APC) como macrófagos o linfocitos B, son activadas *in-situ*, lo que promueve que estas células migren hacia órganos linfoides secundarios (OLS), principalmente a ganglios linfáticos drenantes (GD) o bazo (Martin & Badovinac, 2018; W. & S.M., 2010). En los OLS ocurrirá el proceso de activación de linfocitos T naïve (T_N) o de memoria (T_{mem}) Ag específico, como resultado del reconocimiento de los péptidos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I o clase II en las APC, por el receptor de células T (TCR) (W. & S.M., 2010).

La activación de linfocitos T, tiene como consecuencia que estas células proliferen en gran magnitud, fase que se denomina expansión clonal, que tiene que haya un mayor número de estas clonas Ag específico (Bresser et al., 2022). También, resultado de la activación es la diferenciación a linfocitos T efectores (T_{eff}), en el caso de los linfocitos T CD4 promueve la polarización hacia diversos fenotipos efectores como Th1, Th2, Th17 o Th9, cada uno de ellos con un perfil de secreción de citocinas característico, que determina la diversidad de microorganismos y/o Ag a las que pueden responder (Bresser et al., 2022). En el caso de los linfocitos T CD8, adquieren capacidad citotóxica, lo que implica secreción de ciertas citocinas como $IFN-\gamma$, y la síntesis de proteínas como Granzima-B (Grz-B) y perforina, estas influyen directamente en la capacidad de estas células de promover la muerte de células infectadas, lo que en su mayoría

conlleva al control del patógeno y por ende su eliminación (Bresser et al., 2022; Martin et al., 2012).

La duración de la respuesta inmune está determinada por la concentración de Ag en el microambiente. Conforme esta disminuye da inicio la fase de contracción, lo implica la muerte por apoptosis de aproximadamente el 95% de las células específicas. El 5% restante, lo constituyen el conjunto de linfocitos T_{mem} (Martin et al., 2012; Martin & Badovinac, 2018).

Linfocitos T de memoria

Características

Los T_{mem} , son un grupo un grupo de linfocitos T que se pueden identificar con base en la expresión de moléculas de adhesión (p.ej. CCR7), patrones de migración y capacidad efectora. Se han descrito al menos cinco sub-poblaciones de T_{mem} CD8, todas ellas comparten características como, mayor índice de proliferación comparadas con los T_N , capacidad de persistir en el tiempo, mantienen un número constante en órganos linfoides secundarios o tejidos periféricos y, su sobrevivencia es dependiente de citocinas como IL-7 e IL-15, y su mantenimiento se ve especialmente afectado por la concentración de $IFN-\gamma$ en el medio (Mahnke et al., 2013; Martin & Badovinac, 2018; Mueller et al., 2012).

Otra característica que se ha considerado importante para los T_{mem} , es su capacidad de poder activarse con una menor concentración de Ag. Esto se ha explicado principalmente por una mayor cantidad de proteínas involucradas en la señalización río debajo del TCR, por ejemplo, p-LAT, Lck o ERK. Aunque, esto es aún es controversial en la literatura, dado que algunos grupos indican que las

T_{mem} requieren para su activación una mayor concentración de Ag, lo que podría favorecer interacciones más duraderas con las APC (Henrickson et al., 2013; Kersh et al., 2003; Martin et al., 2012; Martin & Badovinac, 2014; Mehlhop-Williams & Bevan, 2014).

El perfil metabólico de los T_{mem} y sus precursores, los denominados MPECs (linfocitos efectores precursores de memoria), es característico, ya que estos utilizan como principal fuente de energía los ácidos grasos (H. Zhang et al., 2020). Esto se ha atribuido principalmente a una segregación diferencial de ciertos componentes celulares durante la fase de proliferación de los linfocitos T, por ejemplo, el complejo mTORC1, c-myc o moléculas de adhesión como LFA-1 (Capece et al., 2017; Metz et al., 2016; Pollizzi et al., 2016). En este mismo sentido, se ha descrito que los MPECs tienen una menor expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa, como lo son la HK2 (hexocinasa 2) y la GPD2 (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2), lo que tiene un impacto en las vías metabólicas que utilizan estas células (Pollizzi et al., 2016)

Subpoblaciones de linfocitos T CD8 de memoria

Linfocitos T de memoria multipotentes (T_{SCM})

Población de T_{SCM} con capacidad de auto-renovación, y dar origen a otras de las poblaciones de memoria (multipotentes) (Gattinoni et al., 2011). Este grupo de células fue descrito inicialmente en humanos, pero ya también se ha identificado en ratones (Fazeli et al., 2023). Preferencialmente los CD8 T_{SCM} se encontrarán en órganos linfoides secundarios y en menor proporción en circulación sanguínea (Figura 2A) (Gattinoni et al., 2011; Mueller et al., 2012).

Se diferencian de las otras poblaciones de memoria y linfocitos T_N por características funcionales como: un mayor índice de proliferación ante un estímulo antigénico o en presencia de citocinas homeostáticas (IL-7 e IL-15), y poseer una más eficiente actividad antitumoral, (Mahnke et al., 2013; Mueller et al., 2012). Por fenotipo se puede diferenciar de los T_N con base en la expresión de la proteína Sca-1 (exclusivamente en ratones; por las siglas en inglés para *Stem cell antigen-1*), Bcl-2 y CD122(Fazeli et al., 2023).

Se ha descrito que la inducción de los factores de transcripción TCF-1 y LEF1, a través de la vía de Wnt/ β -catenina, favorece la adquisición de este fenotipo por sobre linfocitos T CD8 efector, caso contrario, la inducción de la expresión de otros factores de transcripción como T-bet y Eomes, regula negativamente este proceso(Gattinoni et al., 2009; Li et al., 2013).

Linfocitos T de memoria central (T_{CM})

Al igual que las T_{SCM} son preferencialmente residentes de órganos linfoides secundarios, aunque se ha descrito en la literatura que son capaces de ingresar a tejidos periféricos y posteriormente continuar migrando (Figura 2A)(Martin & Badovinac, 2018; Mueller et al., 2012). Por este patrón de migración su función se ha asociado principalmente al control de infecciones sistémicas y crónicas (Martin & Badovinac, 2018). Una de sus características más sobresalientes es que son importantes productoras de IL-2 posterior a su activación (Martin & Badovinac, 2018). En humanos, se pueden identificar con base a la expresión de CD27 y CD45RA, en el caso de ratones se utiliza la expresión de CCR7, CD62L, CD127 o CD44(Mahnke et al., 2013; Martin & Badovinac, 2018). Un modelo reciente, describe que esta población de linfocitos T de memoria, se

generan a partir de linfocitos efectores, que tuvieron múltiples rondas de proliferación durante la fase aguda de la respuesta inmune (Bresser et al., 2022).

Linfocitos T de memoria efectora (T_{EM})

Como su nombre lo indica, este grupo de T_{mem} se asemejan a los Teff citotóxicos, ya que se ha comprobado que tienen una mejor capacidad citotóxica y, que una mayor proporción de estas células tienen proteínas preformadas como granzima B, perforina, T-bet, $IFN-\gamma$ posterior a su activación (Figura 2A)(Bresser et al., 2022; Gattinoni et al., 2011; Martin & Badovinac, 2018; Sallusto et al., 1999). Estas células se encuentran re-circulando principalmente entre la sangre y bazo(Martin & Badovinac, 2018). Se piensa que las T_{EM} son importantes para el control de infecciones ocasionados por microorganismos intracelulares o aquellas infecciones que inicien en tejidos periféricos(Martin & Badovinac, 2018). Se pueden identificar fenotípicamente como: $CCR7^{lo}/CD62L^{lo}$, $CD127^{hi}$, $CD44^{+}/CD62L^{+}$, $CX3CR1^{hi}$ o $CD27^{-}/CD45RA^{-}$ (humanos)(Mahnke et al., 2013; Martin & Badovinac, 2018).

Linfocitos T de memoria residentes de tejido (T_{RM})

Las T_{RM} son un grupo de T_{mem} que no recirculan en órganos linfoides secundarios o circulación sanguínea, esto principalmente se debe por la

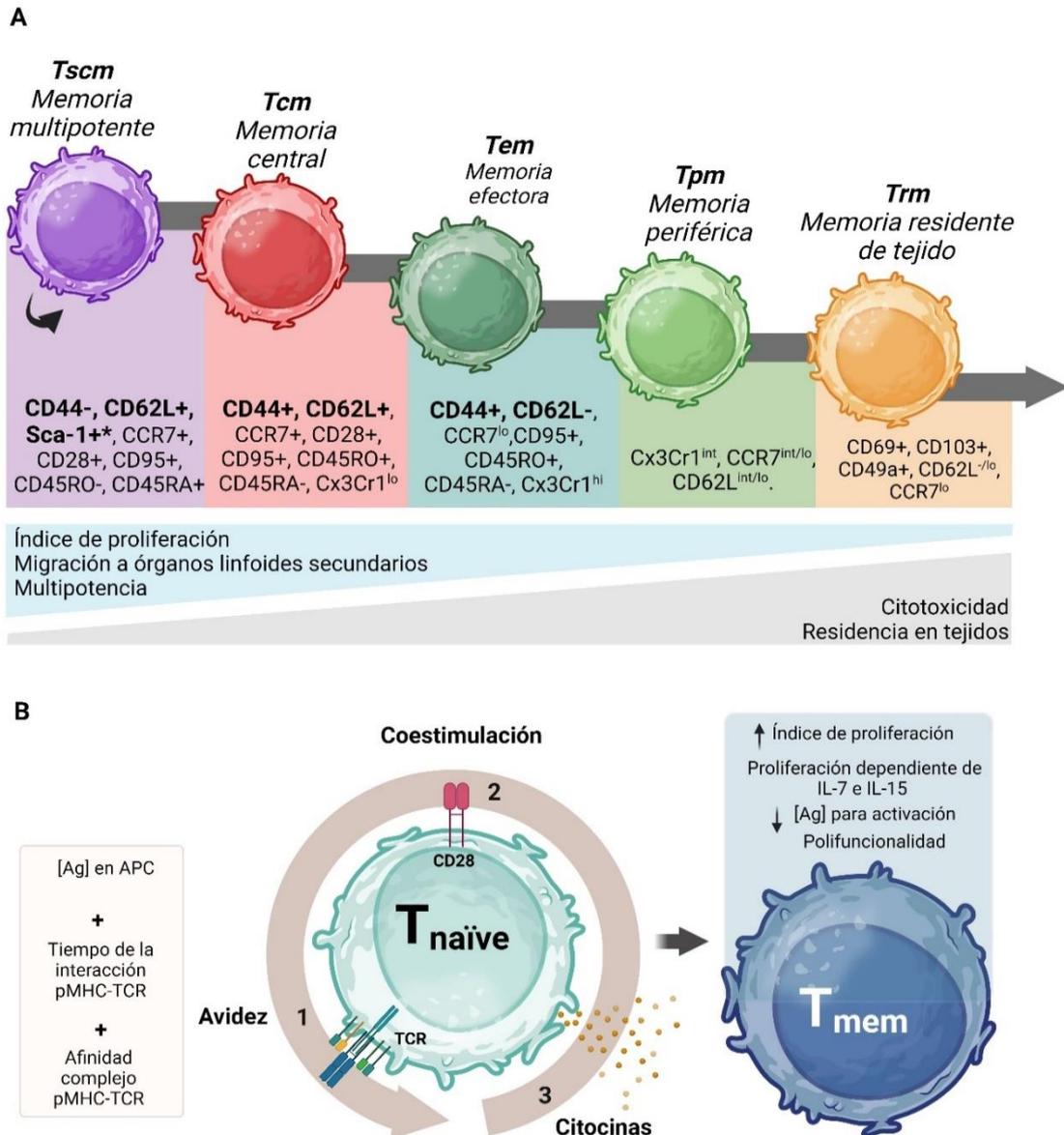


Figura- 2 Subpoblaciones y factores que impactan en la generación de linfocitos T de memoria.

A. Se muestran las cinco subpoblaciones de linfocitos T CD8 de memoria que se han descrito, las proteínas de superficie que se pueden usar para su identificación, así como características generales de estas células. **B.** Se ilustra el modelo de los 3 “golpes” para la generación de linfocitos T CD8 de memoria, el primero, relacionado con la avidéz de la interacción del linfocito T CD8 naíve con la APC, el segundo las señales de coestimulación, por ejemplo, a través de CD28 y el contexto de citocinas en el que se lleva a cabo la activación determinará la generación de un linfocito T CD8 de memoria; las características de estas células se muestran en la imagen.

expresión de moléculas como CD103, CD49a y CD69, que favorecen el ingreso a los tejidos y su permanencia en los mismos (Figura 2A) (Mueller et al., 2012). Se ha establecido que su generación se regula desde el proceso de activación mismo y que existen linfocitos T CD8 previamente acondicionados para derivar en T_{RM} , todo este proceso directamente orquestado por DC y TGF- β (Hirai et al., 2019; Mani et al., 2019). Las T_{RM} se consideran centinelas del sistema inmune adaptativo, ya que se ha demostrado que éstas son capaces de ser activadas *in-situ* y liberar citocinas, por lo que son importantes para el inicio y mantenimiento de la respuesta contra un determinado Ag (Hirai et al., 2019; Mani et al., 2019).

Linfocitos T de memoria periférica (T_{PM})

Los T_{PM} se pueden identificar por una expresión intermedia del receptor de quimiocina CX3CR1 y principalmente se ha diferenciado de otros grupos de T_{mem} por su capacidad de migrar a tejidos periféricos y regresar a ganglios linfáticos (Figura 2A) (Gerlach et al., 2016).

Modelos de diferenciación de T_{mem}

Modelo de diferenciación lineal

Este modelo propone que un CD8 T_N es capaz de diferenciarse progresivamente hacia T_{mem} o un linfocito T efector. Este proceso es regulado por el microambiente y el contexto de citocinas en el que ocurra la activación. Se ha propuesto que la diferenciación pudiera ocurrir en el siguiente orden:

$T_N > T_{CM} > T_{EM} > T_{eff}$ (Gattinoni et al., 2011; Mahnke et al., 2013). Dependiendo de la temporalidad o fase de la respuesta se favorece algún fenotipo de T_{mem} que estará migrando en órganos linfoides secundarios (Mahnke et al., 2013).

Conforme se van diferenciando se modifica el perfil transcriptómico de estos linfocitos, en las primeras etapas hay un enriquecimiento de genes asociados a un fenotipo de memoria, pero, conforme progresan y el microambiente es principalmente proinflamatorio se enriquecen genes asociados a fenotipo efector (Gattinoni et al., 2011). Entre los genes que modifican su expresión se encuentran *Klrg1*, *Tbx21*, *Eomes*, *Foxo1*, *Il7r* y *Bcl2* (Gattinoni et al., 2011; Mahnke et al., 2013).

Modelo de programación

Este modelo sugiere, que la duración del estímulo antigénico promueve la generación de una población heterogénea de T_{eff} , dentro de los cuales se pueden identificar a los MPECs, SLECs (por las siglas en inglés para Linfocitos Efectores de Vida Corta) o EEC (por las siglas en inglés para Linfocitos Efectores Tempranos), con base en el análisis de la expresión de las moléculas CD127 ($IL-7R\alpha$) y KLRG1 (Joshi et al., 2007; W. & S.M., 2010). Esta programación se ha descrito que principalmente está regulada epigenéticamente por el Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2), la expresión de *Runx3* y *Foxo1* (Gray et al., 2017). También se ha descrito, que los T_N que se encuentran en ganglios linfáticos y que interaccionan con DC migratorias de la epidermis capaces de activar a $TGF-\beta$, son los que preferencialmente darán origen a T_{RM} , esto es independiente de la interacción del complejo péptido MHC (pMHC) (Mani et al., 2019).

Factores que influyen en la generación de T_{mem}

Se han descrito múltiples factores que tienen un impacto en la formación de T_{mem} . El primero de ellos es la afinidad del TCR (en CD8) por el complejo péptido MHC (en DC)(Martin et al., 2012). La evidencia en la literatura apoya que tanto antígenos de baja o alta afinidad, son capaces de inducir la generación de linfocitos T de memoria, pero la afinidad repercute en la “calidad” de estas T_{mem} , evaluado como su capacidad funcional(Henrickson et al., 2013; Kersh et al., 2003).

Por ejemplo, en la literatura se ha reportado que, una mayor proporción de T_{eff} que fueron activados con Ags de baja afinidad expresan IL-7R α , el cual es un marcador que se utiliza para identificar a MPECs en esta etapa, esto tiene como consecuencia un incremento en la frecuencia de T_{mem} con fenotipo de memoria central, la funcionalidad de éstas es limitada, ya que una menor proporción de éstas producen IFN- γ y Granzima-B(Knudson et al., 2013).

La cantidad de Ag tiene un impacto directo en el tiempo de interacción entre un linfocito T y la APC, que a su vez estará dictando la distribución de componentes celulares en los linfocitos que inician el proceso de proliferación(Henrickson et al., 2013). Mayor tiempo de interacción entre el linfocito y la APC favorece la división asimétrica de proteínas como CD8, LFA-I, c-myc, IFN γ R y aquellas que forman parte del mTORC1(Capece et al., 2017; Henrickson et al., 2013; Pollizzi et al., 2016).

Lo anterior, tiene un impacto directo en la intensidad de la señalización del TCR y la cantidad de complejos de señalización que se ensamblen. Si la intensidad de la señal es baja o intermedia se favorecerá la generación de poblaciones de

T_{mem} , principalmente se han descrito T_{CM} o T_{EM} , ya que esto favorece la expresión de proteínas como Eomes y Bcl-6, que se sabe que son reguladores para la generación de T_{mem} .

De igual forma, el contexto de citocinas influye en la generación y mantenimiento de los T_{mem} . Dos citocinas que se han reportado ser primordiales para la regulación de este proceso son IL-7 e IL-15, ya que, en ausencia de ambas, la frecuencia de T_{mem} disminuye (Cieri et al., 2013; Xu et al., 2016). *In vitro*, estas citocinas son suficientes para generar linfocitos con características fenotípicas, metabólicas y funcionales de T_{mem} (H. Zhang et al., 2020).

A pesar de que las anteriores son indispensables, no son las únicas, la concentración de $IFN-\gamma$, IFNs de tipo I e IL-2, también impactan en la generación y mantenimiento de estas poblaciones (Setoguchi et al., 2024). Lo anterior, está principalmente relacionado al tiempo al que se expongan las células a estas citocinas, mientras mayor tiempo de exposición durante la fase aguda de la respuesta, se favorece un fenotipo efector terminal sobre precursores de memoria (Setoguchi et al., 2024).

VIII. Antecedentes directos

La evidencia indica que CRTAM participa durante la fase de activación de los linfocitos T, ya que, ayuda a mantener la polarización de proteínas como CD3, CD44, talina y PKC- ζ a tiempos tardíos (aproximadamente a las 12 horas posterior a la activación) y, que podría estar regulando la reorganización del citoesqueleto de actina por su interacción con Cdc42. Además, se describió que los linfocitos T CD8 con fenotipo naïve o efector/memoria (CD44^{hi}) producen menos IFN- γ cuando son incapaces de expresar CRTAM.

La interacción de CRTAM con su ligando Necl-2 también ha demostrado ser importante para que los linfocitos T CD8 establezcan interacciones de mayor duración con DC en los ganglios linfáticos. Lo anterior, se demostró que tiene un impacto directo en la magnitud de la fase de expansión, ya que, en ausencia de esta proteína, es menor, evaluado como un menor número de linfocitos T CD8 específicos. En este sentido, también se conoce que CRTAM es importante para el control de infecciones ante virus como influenza, bacterias como *C. rodentium* y el parásito *T. gondii* en modelos murinos.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio, se ha descrito que CRTAM es necesario para el control de la infección por *Salmonella* Typhimurium durante una respuesta primaria y también durante una respuesta secundaria.

IX. Planteamiento del problema

La generación de linfocitos T de memoria, es un proceso central en la adquisición de inmunidad protectora. Su génesis, es altamente regulada en el que se conocen intervienen diversos procesos celulares, en el que el microambiente generado durante la respuesta primaria a un antígeno también juega un rol indispensable. Hoy en día, hay un creciente esfuerzo por entender y dilucidar los actores que participan y regulan la generación de los linfocitos T CD8 de memoria. Por lo anterior, nos hemos propuesto determinar si la molécula de adhesión CRTAM impacta en la generación o capacidad funcional de los linfocitos CD8 de memoria.

X. Justificación

Se ha demostrado que la molécula de adhesión CRTAM, está involucrado en el mantenimiento de la polarización tardía de proteínas, que participan en la sinapsis inmunológica, como CD3, talina y CD44; la retención de los linfocitos T CD8 en los ganglios linfáticos y, regulando la secreción de citocinas como IFN- γ , y estos procesos celulares impactan la generación de linfocitos T CD8 de memoria.

Lo anterior, principalmente debido a un efecto sobre la duración o intensidad de la señal del complejo TCR, de coestimulación y el contexto de citocinas en el que se lleva a cabo la activación de linfocitos T. Esto, impacta en la polarización de proteínas al Complejo Supramolecular de Activación (SMAC) y por ende en la segregación diferencial de proteínas en los linfocitos CD8 en proliferación, lo que puede ocasionar la reducción de poblaciones de linfocitos T de memoria o afectar su función.

Por todo lo anterior, proponemos que CRTAM participa en el proceso de generación de los T_{mem}.

XI. Hipótesis

La expresión de CRTAM es necesaria para la generación de las poblaciones de linfocitos T CD8 de memoria central y efectora e impacta en su capacidad funcional.

XII. Objetivos

a. Objetivo general

Determinar el impacto de la expresión de CRTAM en la generación y función de linfocitos T CD8 de memoria.

b. Objetivos específicos

1. Evaluar, en condiciones homeostáticas, la frecuencia de linfocitos T de memoria en el ratón deficiente para CRTAM.
2. Determinar la frecuencia de linfocitos T de memoria posterior a una inmunización con *Salmonella* Typhimurium.
3. Evaluar durante la fase aguda de la respuesta inmune la frecuencia de MPEC.
4. Determinar el impacto de la expresión de CRTAM en la inducción de inmunidad protectora contra *Salmonella* Typhimurium.

XIII. Materiales y métodos

Diseño del estudio

El objetivo del presente trabajo es identificar el papel de la expresión de CRTAM en la generación y capacidad efectora de los linfocitos T CD8+ de memoria. Para ello, se utilizaron ratones genéticamente modificados inmunizados con una cepa atenuada de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (SL3261) y retados con una cepa virulenta (14028). La evaluación del fenotipo de las poblaciones de linfocitos T CD8 de memoria se realizó por citometría de flujo multiparamétrica.

Ratones de experimentación

Se utilizaron ratones *Crtam*^{+/+} (C57Bl6/J) o *Crtam*^{-/-} (*Crtam.Ko.Lex.B6*) machos o hembras de 6 a 10 semanas, los cuales se mantuvieron en condiciones asépticas con agua y alimento *ad libitum*, de acuerdo a lo establecido por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav, con número de protocolo aprobado 00-7814, por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). La administración 100 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Salmonella* atenuada o virulenta se realizó vía intraperitoneal (i.p).

Genotipo de ratones de experimentación

El fondo genético de los ratones salvajes y deficientes para CRTAM se corroboró por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final, utilizando los siguientes iniciadores (5'-3'): *Sentido*-GACACAGGCAAGGTCACAGA; *Anti*

sentido-AGAGTAACTGCCCTTGGACGTG y *Neo*-GCAGCGATCGCCTTCTATC. Para los ratones salvajes se espera una banda de ~300 pb y la banda en los ratones deficientes de ~190 pb (Suplementaria 1A). Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción:

Fase/Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	4 min
Desnaturalización	95°C	30''*
Alineamiento	60°C	30''
Elongación	72°C	30''
Elongación final	72°C	5 min

30-35 ciclos

Simbología: * '' : segundos

Cultivo bacteriano

Alícuotas descongeladas de las cepas de *Salmonella* atenuada (SL3261; Δ *aroA*) o virulenta (14028) se crecieron en agar Luria Bertani (LB) a 37°C con agitación constante (150-200 rpm) por 18 horas. A partir de estos cultivos, se realizó un subcultivo en 3 mL de caldo LB fresco, el cual se cultivó en las mismas condiciones hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (densidad óptica de 0.6). A partir de este cultivo, se preparó una suspensión bacteriana con 100 UFC por cada 100 mL de Buffer de Fosfatos (PBS) estéril para la administración vía i.p.

Inmunizaciones o infecciones

La suspensión bacteriana se administró vía i.p. para todos los experimentos. En algunos casos, los ratones exclusivamente recibieron 100 UFC de *Salmonella* atenuada y se realizó la evaluación del fenotipo de las poblaciones celulares por citometría de flujo entre los días 7-60 posterior a la inmunización. Para la evaluación de la respuesta de memoria, los ratones fueron retados 30 días después de la inmunización con 150 UFC de *Salmonella* virulenta. Posterior a la administración de las bacterias (inmunización o reto), se realizó un seguimiento del peso y signos clínicos cada segundo o tercer día hasta el final de los experimentos.

Citometría de flujo

Un millón de células de bazo o ganglios linfáticos mesentéricos (drenantes) se tiñeron para su análisis por citometría de flujo. Brevemente, en algunos casos, las células se tiñeron inicialmente con el colorante de viabilidad Zombie NIR (BioLegend), posteriormente para el análisis del fenotipo de las poblaciones celulares se añadieron los siguientes anticuerpos: anti-CD3 conjugado a FITC (BioLegend) o APC-Cy7 (BioLegend), anti-CD8 conjugado a FITC (BioLegend), APC (BioLegend), PE (BioLegend), PerCP-Cy5.5 (BioLegend) o PE-eFluor 610 (Invitrogen), anti-CD62L conjugado a APC (BioLegend) o PE (BioLegend), anti-CD44 conjugado a PB (BioLegend), anti-KLRG1 conjugado a PerCP-Cy5.5 (BioLegend), anti-CD127 conjugado a FITC (BioLegend) o PE (BioLegend), anti-CD69 conjugado a APC (BioLegend) o PE (BioLegend). Para la evaluación de proteínas intracelulares, las células se permeabilizaron con PermWash 1x

(BioLegend) siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se emplearon alguno de los siguientes anticuerpos: anti-IFN- γ conjugado a APC (BioLegend) o PE (BioLegend) y anti-Granzima B conjugado a APC (BioLegend). La estrategia de análisis general se muestra en la Suplementaria 2. Las poblaciones celulares se definieron como se enlistan a continuación:

Subpoblación de linfocitos T	Fenotipo
CD8⁺	
Naïve (T _N)	CD62L ⁺ CD44 ⁻
Memorias pluripotentes (T _{SCM})	CD62L ⁺ CD44 ⁻ Sca-1 ⁺
Memoria efectora (T _{EM})	CD62L ⁻ CD44 ⁺
Efectores	CD62L ⁻ CD44 ⁻
Precusores de memoria (MPEC)	CD127 ⁺ KLRG1 ⁻
Efectores de vida corta (SLEC)	KLRG1 ⁺ CD127 ⁻
Dobles positivos	KLRG1 ⁺ CD127 ⁺

Obtención de células

Se recuperaron el bazo y ganglios linfáticos drenantes de ratones *Crtam*^{+/+} o *Crtam*^{-/-}, en condiciones asépticas. Posteriormente, los órganos se disgregaron mecánicamente para obtener una suspensión celular. En el caso del bazo, se añadió Buffer de Lisis de Eritrocitos (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 1mM, EDTA 0.1 mM), para conservar los leucocitos. Utilizando una cámara de Neubauer se cuantificaron las células en la suspensión celular. Las células se mantuvieron en Buffer de Fosfatos (PBS) frío hasta su uso.

Análisis de datos

FlowJo v.10.10.0 fue utilizado para el análisis de los datos de citometría de flujo. GraphPad Prism v.8 fue utilizado para el análisis estadístico de los datos y la generación de gráficas. ImageJ 1.54g fue utilizado para el análisis digital de imágenes.

XIV. Resultados

CRTAM impacta en la frecuencia de linfocitos T CD8_{mem} exclusivamente tras un estímulo antigénico

Dado que se ha demostrado que CRTAM se expresa durante la ontogenia de los linfocitos T en el timo, específicamente en las etapas de DN1 a DN4,

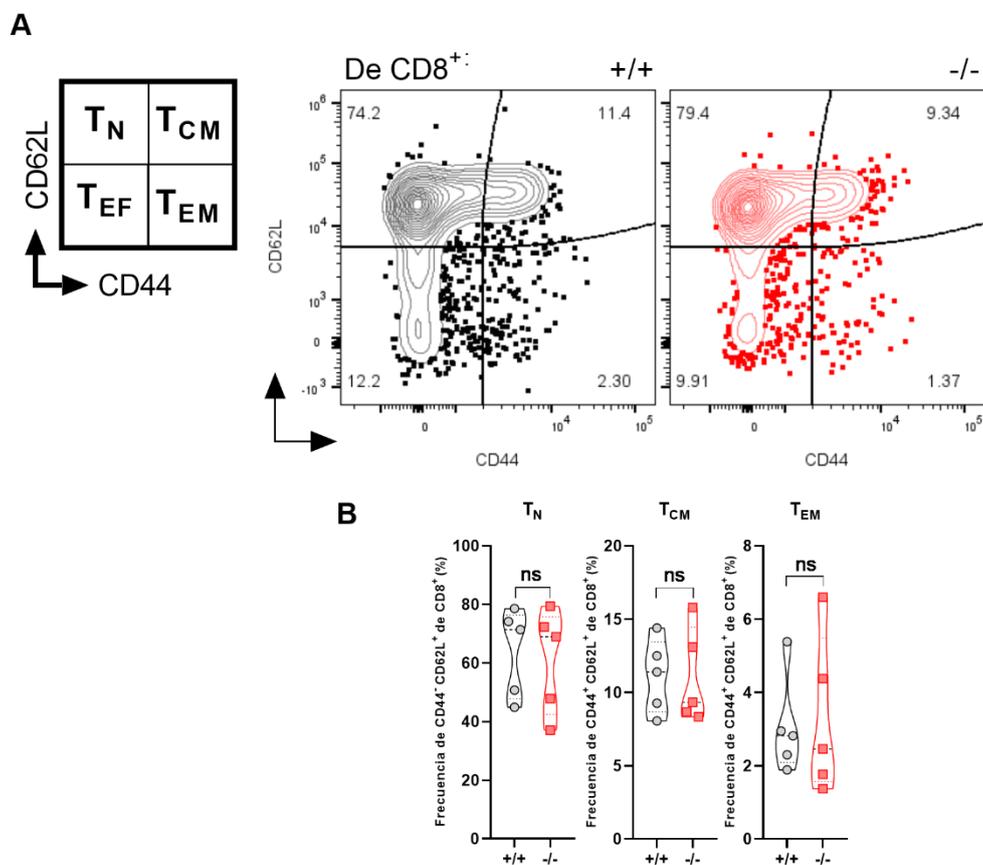


Figura- 3 En condiciones homeostáticas, la frecuencia de las poblaciones de memoria es independiente de CRTAM.

A. Izq. Imagen representativa de la identificación de las subpoblaciones de memoria con base en la expresión de L-selectina (CD62L) y CD44 (T_N: Naïve; T_{CM}: Memoria central; T_{EM}: Memoria efectora). **A. Der.** Gráficos de contorno representativos de las subpoblaciones de memoria en linfocitos T CD8⁺ recuperados de ratones silvestres (B6; +/+; ○) y carentes para CRTAM (-/-; □). **B.** Frecuencia de las subpoblaciones de CD8⁺ T_N, T_{CM} y T_{EM} recuperados de bazo. Cada punto representa un ratón analizado. La línea central de la gráfica representa la mediana. Datos de al menos 2 experimentos independientes. *t* de Student *P*<0.05.

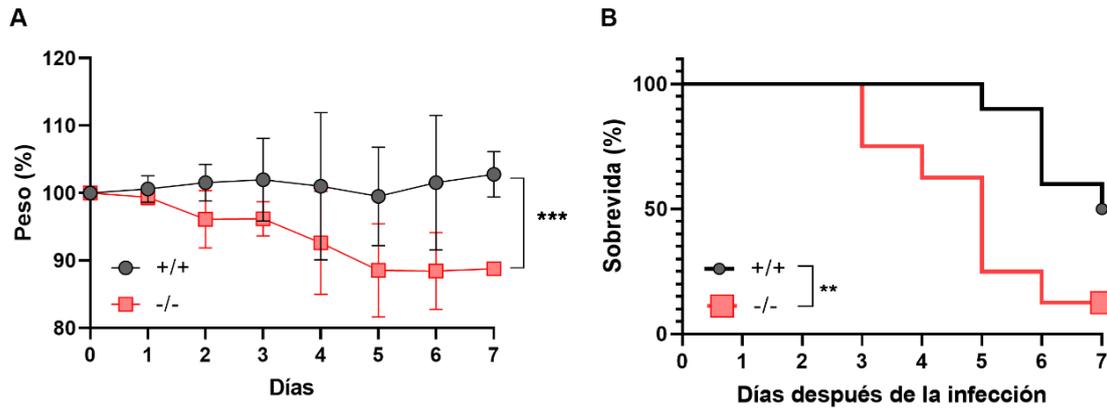


Figura- 4 CRTAM es necesario para el control de la infección primaria por *Salmonella Typhimurium virulenta*

A. Gráfica de porcentaje peso de los ratones hasta 7 días posterior a la administración de 100 UFC de STm cepa 14028 (virulenta), con respecto al día 0 (basal). **B.** Curva de supervivencia de ratones silvestres (B6; +/+; ○; n=9) y deficientes para CRTAM (-/-; □; n=9) posterior a la infección con STm virulenta. Los datos se muestran como media +/- desviación estándar. *t* de Student $P < 0.05$ (A) o Prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon $P < 0.05$ (B).

inicialmente nos propusimos evaluar, si en condiciones homeostáticas la frecuencia de linfocitos T CD8 estaban alteradas en ratones carentes de CRTAM (Figura 3).

Al evaluar la frecuencia de los linfocitos CD8 en bazo y ganglios mesentéricos no se encontraron diferencias (Suplementaria 2 A-B). Posteriormente, se evaluó la frecuencia de linfocitos T CD8 con fenotipo de CM, EM y la población naïve, tanto en bazo como en ganglios mesentéricos (Figura 3A). En esta condición, no encontramos diferencia alguna en la frecuencia de las poblaciones analizadas en bazo (Figura 3B).

Derivado de los resultados anteriores, se administraron 100 UFC de STm virulenta con la finalidad de inducir la activación *in-vivo* y la expresión de CRTAM en los linfocitos T CD8 Ag específico. Tras la administración de la bacteria,

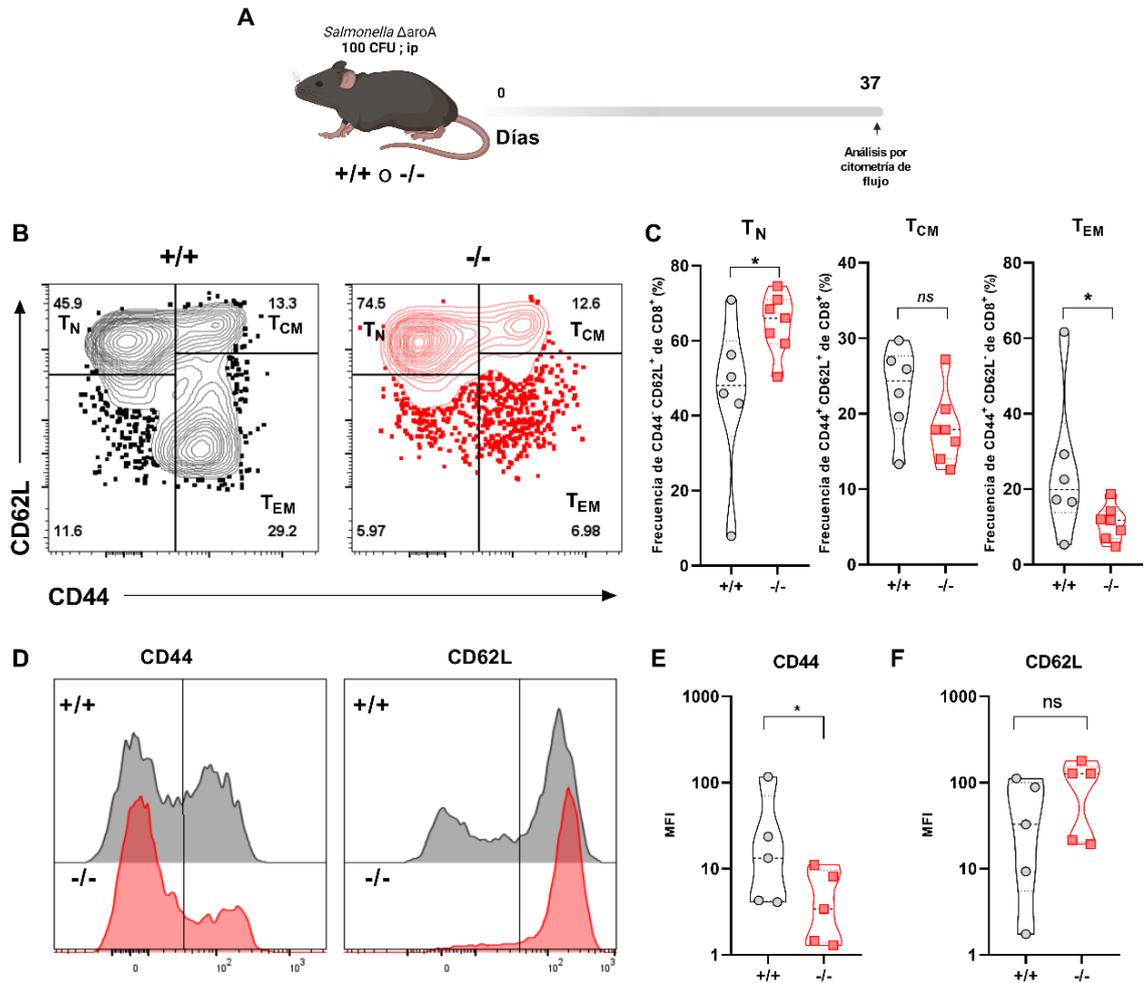


Figura- 5 CRTAM impacta en el establecimiento de las subpoblaciones de memoria.

A. Esquema representativo de la estrategia experimental. Los ratones fueron inmunizados con la cepa atenuada de STm (SL3261). **B.** Gráfico de contorno representativo del análisis de las subpoblaciones de memoria de linfocitos T CD8 provenientes de ratones silvestres y carentes para CRTAM. Naïve: T_N; Memoria central: T_{CM}; Memoria efectora: T_{EM}. **C.** Frecuencia de las subpoblaciones T_N, T_{CM} y T_{EM} analizadas. Ratones silvestres (B6; +/+; ○) y deficientes para CRTAM (-/-; □). **D.** Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de CD44 y CD62L en la superficie de los linfocitos T CD8. **E-F.** Gráfica de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia para CD44 (**E**) y CD62L (**F**). Cada punto representa un ratón analizado. Datos de al menos dos experimentos independientes. *t* de Student $P < 0.05$; *ns*: Sin significancia estadística.

observamos una pérdida significativa de peso en el grupo de ratones carentes de CRTAM (Figura 4A), a partir de las primeras 48 horas post-infección y que

tenía un impacto en la supervivencia de estos ratones (Figura 4B). Lo anterior, nos sugiere que CRTAM es necesario para el control temprano de la infección por STm.

Basado en los resultados anteriores, planteamos un esquema de inmunización con STm atenuada (SL3261). Tras la inmunización se observó una pérdida de peso preferencial en los ratones carentes de CRTAM, pero sin afectar la supervivencia (Suplementaria 2 C-D), por lo que para los experimentos siguientes exclusivamente administramos la cepa atenuada de STm.

Tras la inmunización con STm atenuada, evaluamos durante la fase de memoria (37 días) la dinámica de las poblaciones de linfocitos T_{mem} (Figura 5A). Aquí observamos, que la expresión de CRTAM impacta en la adquisición del fenotipo de linfocitos T CD8 de memoria efectora, y que estos estarían conservando el fenotipo de linfocitos T CD8 naïve (Figura 5 B-C).

También, se analizó el nivel de expresión de las moléculas CD44 y CD62L en los linfocitos T CD8 provenientes de ratones silvestres o carentes de CRTAM, ambas moléculas permiten la identificación de las poblaciones de linfocitos T CD8_{mem}. Encontramos que, en el caso de CD44, pero no para CD62L, CRTAM es necesario para el incremento de la densidad de esta molécula en la superficie de los linfocitos T CD8 (Figura 5 D-F).

Nos preguntamos si los cambios que observamos se mantenían a través del tiempo, por lo que las poblaciones de linfocitos T CD8 naïve, CM y EM, se evaluaron hasta 60 días posterior al estímulo antigénico como STm atenuada. Observamos que, preferencialmente a través del tiempo los linfocitos T CD8 de ratones carentes de CRTAM conservaban un fenotipo naïve (Figura 6A), que la

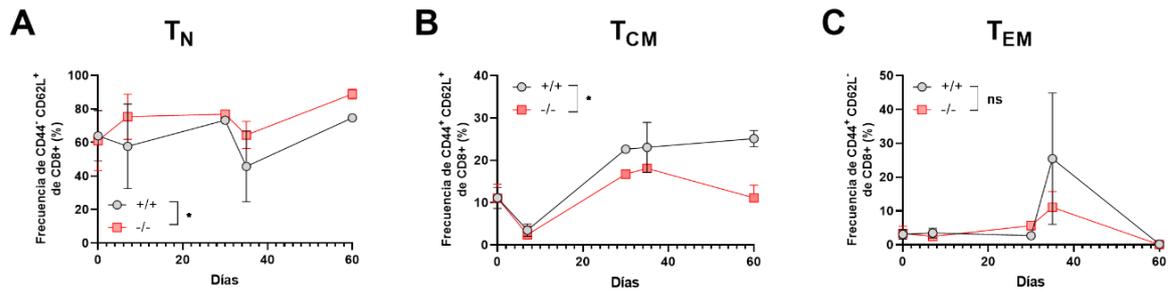


Figura- 6 El mantenimiento de la subpoblación de linfocitos T CD8+ de memoria central es dependiente de CRTAM.

A-C. Cinética de las subpoblaciones de linfocitos T_N (A), T_{CM} (B) y T_{EM} (C) recuperados de bazo. Los datos se muestran como media +/- desviación estándar. *t* de Student $P < 0.05$; ns: Sin significancia estadística.

población de memoria central disminuía porcentualmente (Figura 6B) y la frecuencia de linfocitos T CD8 de memoria efectora (Figura 6C), se restableció, todo esto evaluado hasta el día 60, comparándolo con ratones silvestres. Esto sugiere, que CRTAM podría estar involucrado en el mantenimiento o retención de las poblaciones de linfocitos T CD8_{mem} en bazo.

CRTAM impacta en el balance entre linfocitos T CD8 efectores y de memoria durante la fase aguda de la respuesta inmune.

En la literatura se ha establecido, que la generación de las poblaciones de linfocitos T CD8_{mem}, ocurre durante los 7 a 10 días posteriores a un estímulo antigénico, es decir, durante la fase aguda de la respuesta inmune. Por ello, evaluamos las poblaciones de linfocitos T CD8_{mem} al día 7 posterior a la administración de STm atenuada, en bazo y ganglios mesentéricos (Figura 7 A-D).

Encontramos, que a ese tiempo los linfocitos T CD8 recuperados de ratones carentes de CRTAM mantenían el fenotipo naïve, esto en ganglio mesentérico,

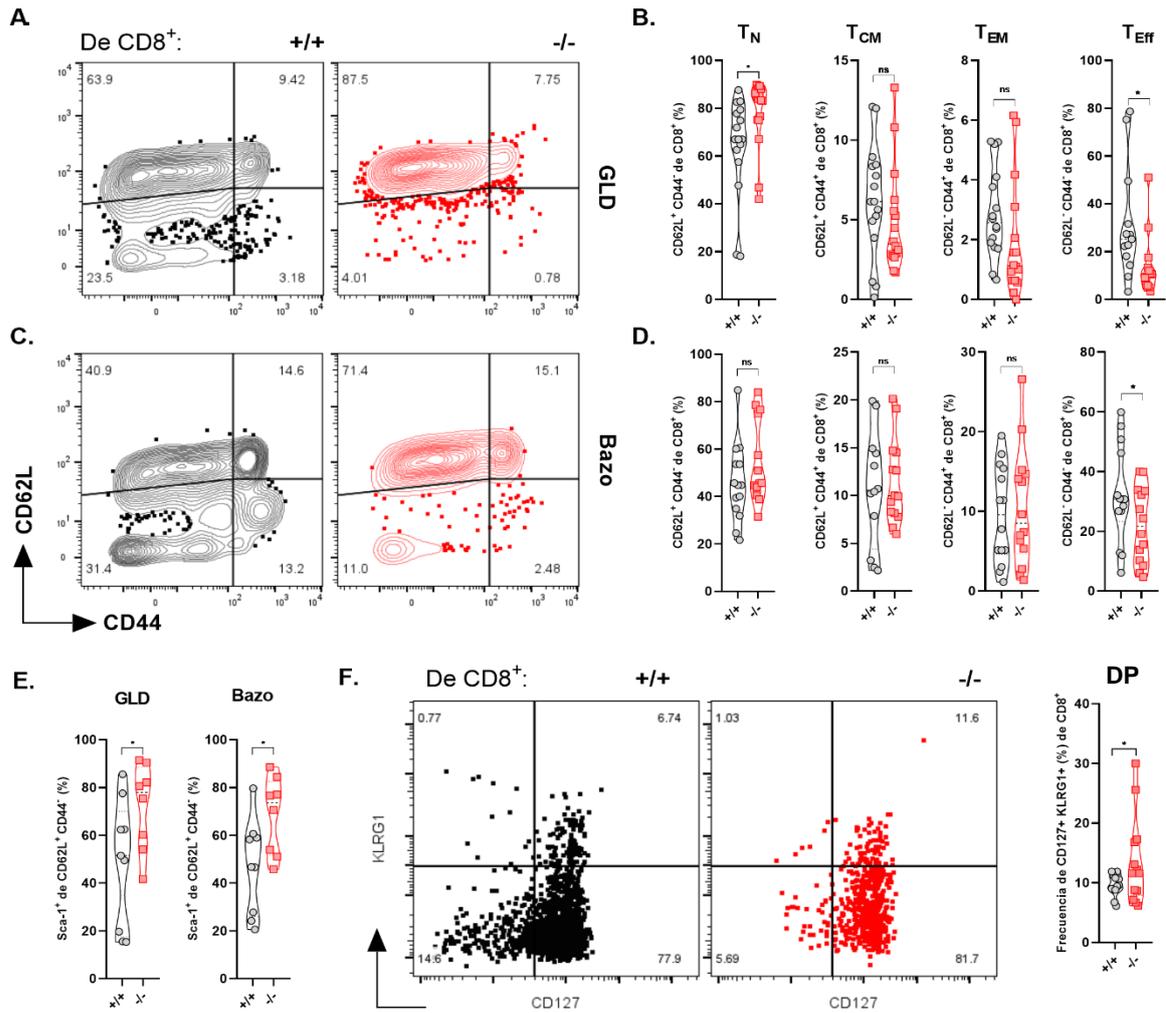


Figura- 7 CRTAM impacta en el balance entre linfocitos T CD8+ efector y de memoria.

A y **C**. Gráficos de contorno representativos de las subpoblaciones de memoria analizadas en GLD. **B** y **D**. Proporción de linfocitos CD8⁺ T_N, T_{CM}, T_{EM} y Efectores en ganglio drenante y bazo analizados 7 días posterior a la administración de STm atenuada. **E**. Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ de memoria multipotente (CD62L⁺ CD44⁻ Sca-1⁺) en GLD y bazo. **F**. Gráfico de puntos del análisis de linfocitos T CD8⁺ con base en la expresión de KLRG1 y CD127 (IL-7R α) para identificar efector (KLRG1⁺), efector precursor de memoria (CD127⁺) y dobles positivos (KLRG1⁺ CD127⁺). Cada punto representa un ratón analizado. Datos de al menos dos experimentos independientes. *t* de Student $P < 0.05$; *ns*: Sin significancia estadística.

con la consecuente disminución porcentual de los linfocitos T CD8 efector (CD44⁻ CD62L⁻), esto replicándose también en bazo. Observamos, también que

dentro del conjunto de linfocitos T CD8 naïve de ratones CRTAM^{-/-}, una mayor proporción conservaban la expresión de la molécula Sca-1⁺ (por las siglas en inglés para *Stem cell antigen 1*) (Figura 7 E), que se ha asociada a pluripotencia y permite identificar a la población de linfocitos T CD8 de memoria multipotentes (SCM).

Durante esta etapa, se pueden identificar a la población de linfocitos T CD8 que primordialmente serán linfocitos de memoria o MPECs y aquellos efectores de vida corta o SLECS, con base a la expresión de las moléculas CD127 (IL-7R α) y KLRG1, respectivamente. Observamos, que en ausencia de CRTAM se favorece un fenotipo de linfocitos Efectores tempranos o EEC (Figura 7 F). Todo lo anterior, sugiere que CRTAM podría estar impactando en el balance entre linfocitos efectores y precursores de memoria en una respuesta primaria.

CRTAM impacta en la respuesta de memoria contra Salmonella

Para poner en evidencia el impacto de CRTAM en la capacidad protectora contra STm, los ratones silvestres (C57BL6/J) o ratones deficientes de CRTAM fueron inmunizados con STm atenuada y 30 días después fueron retados con STm virulenta. En la respuesta secundaria contra *Salmonella*, los ratones deficientes para CRTAM tuvieron una pérdida significativa de peso, lo que sugiere un control deficiente de la bacteria (Figura 8 A). Al analizar las poblaciones de memoria, encontramos que hay una reducción en los linfocitos T CD8 de memoria efectora tanto en bazo como en ganglio linfático drenante (Figura 8 C; Suplementaria 3A).

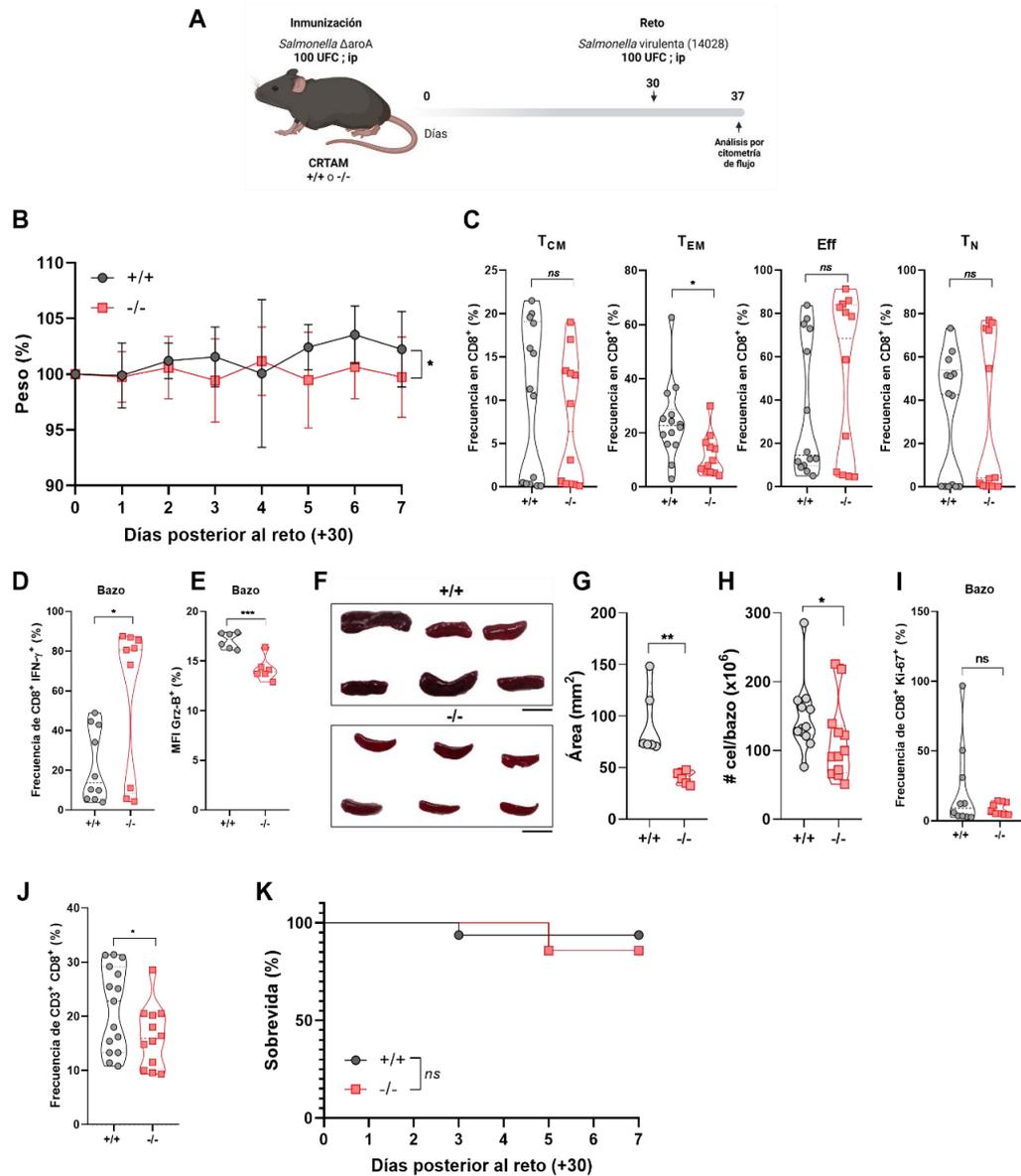


Figura- 8 CRTAM favorece respuestas de memoria más eficaces.

A. Esquema de la estrategia experimental. **B.** Porcentaje de peso de los ratones silvestres y carentes de CRTAM tras el reto antigénico (+d30) con 150 UFC de STm virulenta. Los datos se muestran como media +/- desviación estándar. **C.** Frecuencia de las subpoblaciones analizadas de linfocitos T CD8 recuperados de bazo, 7 días después de la administración de STm virulenta. **D.** Frecuencia en bazo de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺. **E.** Mediana de intensidad de fluorescencia de Granzima B (Grz-B) analizado en linfocitos T CD8. **F.** Imágenes representativas del bazo recuperados de ratones silvestres o carentes de CRTAM 7 días después de la administración de STm virulenta. La barra equivale a 10 mm. *Continúa siguiente página...*

Figura- 8 CRTAM favorece respuestas de memoria más eficaces.

G. Área en mm² del tamaño del bazo. **H.** Número de células totales del bazo provenientes de ratones silvestres o carentes de CRTAM. **I.** Frecuencia en bazo de linfocitos T CD8⁺ Ki-67⁺. **J.** Frecuencia de linfocitos CD3⁺ CD8⁺ en bazo, 7 días después del reto antigénico. **K.** Curva de supervivencia de los ratones silvestres y carentes de CRTAM tras 7 días de administración de STm virulenta. Cada punto representa un ratón analizado. Datos de al menos dos experimentos independientes. *t* de Student $P < 0.05$; Prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon $P < 0.05$ (K); *ns*: Sin significancia estadística.

Lo siguiente, fue evaluar la capacidad funcional de estos linfocitos T CD8 analizado como producción de IFN- γ y Granzima B (Grz-B). Observamos que tanto en bazo como en GLD en los ratones carentes de CRTAM hay una mayor proporción de linfocitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺, así como un mayor contenido intracelular de esta citocina (Figura 6D; Suplementaria 3 B-D). El efecto opuesto fue observado en el caso de Grz-B, en el que los linfocitos T CD8 deficientes en CRTAM de bazo tienen un menor contenido intracelular de la proteína, sin diferencia en la frecuencia en CD8⁺ Grz-B⁺ (Figura 8 E; Suplementaria 3 E-F). En GLD se observó que los ratones silvestres tienen una mayor proporción de linfocitos CD8⁺ Grz-B⁺, sin diferencia en el contenido intracelular (Suplementaria 3 G-H). Lo anterior, sugiere que CRTAM podría estar participando en la producción y/o secreción de estas moléculas en los linfocitos T CD8⁺.

Observamos que el bazo de los ratones silvestres era significativamente de mayor área, comparados con los de los ratones carentes para CRTAM, con un mayor número de células (Figura 8 G-H). Lo anterior, podría ser debido a dos posibilidades, la que inicialmente nos planteamos es que ciertas poblaciones celulares estuvieran proliferando más *in-situ*, pero no encontramos diferencia en

la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ Ki-67⁺. Ninguno de los parámetros anteriores estaba afectado en los GLD (Suplementaria 3 I-K). Lo que sugiere un efecto dependiente de sitio anatómico o del lugar en el preferentemente estaría el antígeno.

Al analizar el estado de activación de las células y la supervivencia encontramos que ambos son independientes del genotipo de los linfocitos T CD8⁺ (Suplementaria 3 L-M; Figura 6K).

XV. Discusión

En el presente trabajo, demostramos que la expresión de CRTAM es necesaria para mantener las poblaciones de linfocitos T CD8 de memoria efectora y central, en órganos linfoides secundarios. Para esto, utilizamos un modelo murino deficiente de CRTAM, el cual fue inmunizado con una cepa atenuada de *Salmonella* (SL3261).

Inicialmente, evaluamos en condiciones homeostáticas la frecuencia de linfocitos T CD8 de memoria central y efectora. En estas condiciones no encontramos diferencias en la frecuencia de linfocitos T CD4, T CD8, T CD8_{CM} y CD8_{EM}, esto concuerda con lo reportado previamente en la literatura, en la que en los ratones carentes para CRTAM la ontogenia de estas poblaciones no está alterada o su frecuencia en bazo o ganglios linfáticos (Takeuchi et al., 2009). Así mismo como la expresión de moléculas en su superficie como CD44 y CD62L (Yeh et al., 2008).

Observamos que los parámetros de peso y sobrevivencia se ven afectados por la expresión de CRTAM ante una infección primaria con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Esta susceptibilidad a infecciones bacterianas se ha reportado previamente en el caso de *Citrobacter rodentium*, así como para infección con virus de la influenza (Takeuchi et al., 2009; Yeh et al., 2008).

Observamos que, en el modelo de estudio utilizado, *in-vivo* se modifica la población de linfocitos T CD8_{EM}, esto nos indica que para generación y/o mantenimiento de esta población es indispensable la interacción de CRTAM con

su ligando Necl-2, como lo sugieren ensayos *in-vitro* de (Takeuchi et al., 2016). También, para el mantenimiento de la población T CD8_{CM}.

Previamente, Yeh y cols., reportaron que CRTAM mantiene la polarización tardía de CD44 durante la activación de los linfocitos T (+12 horas) (Yeh et al., 2008). Lo anterior, puede explicar que la observación de que los linfocitos T CD8 provenientes del ratón carente para CRTAM, durante la fase aguda y fase de memoria, conservan un fenotipo CD8_N. Durante la fase aguda de la respuesta, observamos una disminución en la frecuencia de linfocitos T CD8 efectores y que esto preferentemente tienen un fenotipo de linfocitos efectores tempranos, por lo que este es el primer reporte que se tiene del impacto de CRTAM regulando el balance entre linfocitos T CD8 efectores y de memoria.

Al evaluar la capacidad protectora en los ratones carentes para CRTAM, observamos un control inferior de la infección por *Salmonella*, sin que esto afectara la sobrevivencia. Esto puede ser debido al modelo de infección utilizado, se ha demostrado que para la eliminación de *Salmonella* en la respuesta primaria son indispensables los linfocitos T CD8 efectores, pero no para una respuesta secundaria, de acuerdo con los datos de (Lee et al., 2012). A pesar de esto, ese control deficiente, visto como una disminución del peso de los ratones carentes de CRTAM, podría explicarse probablemente por el acumulo intracelular que reportamos de IFN- γ , con base en ello sugerimos que CRTAM estaría implicado en la secreción de esta citocina y no en su producción, aunque el posible mecanismo necesita ser elucidado. Lo anterior, concuerda con lo reportado en linfocitos T carentes de *Crtam* activados policlamente, en el que se detectó una menor concentración de esta citocina en el sobrenadante (Yeh et al., 2008). Hasta el momento, una limitante del trabajo es que no hemos evaluado esta

citocina en el suero de los ratones inmunizados, un dato que nos permitirá apoyar nuestra hipótesis al respecto.

La disminución intracelular que observamos de granzima B en los linfocitos T CD8, podría deberse a una menor transcripción del mRNA mensajero del gene *GrzB*, o alteraciones en la vía granulocítica en ausencia de CRTAM, aunque para dilucidar el posible rol de CRTAM en esto se requieren experimentos para demostrar cómo se estaría regula granzima B en estas condiciones (Boivin et al., 2009). Al evaluar el marcador de activación CD69⁺, no encontramos diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ CD69⁺, esto en concordancia con datos de la expresión de moléculas de activación como CD25 (IL-2R α) (Takeuchi et al., 2016).

Demostramos que la celularidad del bazo se afecta, y que este fenómeno es dependiente de la expresión de CRTAM, y que no esto no es debido a una mayor proliferación de los linfocitos T CD8, sino preferentemente por una disminución ciertas poblaciones celulares, como los linfocitos T CD8, aunque consideramos importante evaluar la frecuencia de otras poblaciones en estas condiciones experimentales. Anteriormente, se demostró que la interacción de CRTAM-Necl-2 es indispensable para la retención de linfocitos T CD8 en ganglios linfáticos, por lo que sugerimos que al estar alterado este proceso *in-vivo*, la migración y la permanencia de las poblaciones CRTAM⁺ están alteradas.

XVI. Conclusiones

En el presente trabajo, evaluamos el impacto de CRTAM en la generación de linfocitos T CD8 de memoria. Nuestros hallazgos muestran que la expresión de CRTAM es necesaria para la generación de linfocitos T de memoria efectora, un efecto evidenciado exclusivamente posterior a un estímulo antigénico. Además, que los linfocitos T CD8 deficientes de CRTAM tienen un acumulo intracelular de la citocina proinflamatoria IFN- γ .

XVII. Perspectivas

1. Evaluar la secreción de IFN- γ en linfocitos T CD8 deficientes para CRTAM activados policlonalmente.
2. Realizar ensayos de transferencia de linfocitos CD8 Ag específicos (OT-I deficientes para CRTAM) y evaluar su capacidad protectora.
3. Determinar el mecanismo de susceptibilidad de los ratones carentes de CRTAM ante una infección primaria por *Salmonella* Typhimurium.

XVIII. Artículos

- **Hernandez-Galicia G**, Gomez-Morales L, Lopez-Bailon LU, Valdovinos-Torres H, Contreras-Ochoa CO, Díaz Benítez CE, Martinez-Barnetche J, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V. Presence of SARS-CoV-2-specific T cells before vaccination in the Mexican population. *J Leukoc Biol.* 2024 Jun 28;116(1):95-102. doi: 10.1093/jleuko/qiae111. PMID: 38717738.

En colaboración:

- Castellanos-Martínez R, León-Vega II, Guerrero-Fonseca IM, Vargas-Robles H, Jiménez-Camacho KE, **Hernández-Galicia G**, Ortiz-Navarrete VF, Rottner K, Medina-Contreras O, Schnoor M. T cell functions and organ infiltration by leukemic T cells require cortactin. *J Leukoc Biol.* 2023 Mar 1;113(3):315-325. doi: 10.1093/jleuko/qiad001. Erratum in: *J Leukoc Biol.* 2023 Oct 26;114(5):513. doi: 10.1093/jleuko/qiad105. PMID: 36808495.
- Cruz-Cruz AD, Pérez-Lara JC, Velázquez DZ, **Hernández-Galicia G**, Ortiz-Navarrete V. B cells as a host of Persistent Salmonella Typhimuirum. *Authorea.* 2024 Aug 30. doi: 10.22541/au.172500369.97344953/v1

XIX. Referencias

- Barragan-Galvez, J. C., Gonzalez-Orozco, M., Hernandez-Flores, A., Maravillas-Montero, J. L., Chavez-Guerrero, Y., & Ortiz-Navarrete, V. (2020). Prokaryotic Expression of the Immunoglobulin's Domains of CRTAM to Characterize a Monoclonal Antibody. *Protein Journal*, 39(3), 224–231. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09896-y>
- Barragan-Galvez, J. C., Hernandez-Flores, A., Lopez-Ortega, O., Rodriguez-Alvarez, A. A., Maravillas-Montero, J. L., & Ortiz-Navarrete, V. (2024). The constant domain of CRTAM is essential for high-affinity interaction with Nectin-like 2. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101813>
- Beristain-Covarrubias, N., Canche-Pool, E. B., Ramirez-Velazquez, C., Barragan-Galvez, J. C., Gomez-Diaz, R. A., & Ortiz-Navarrete, V. (2017). Class I-restricted T cell-associated molecule is a marker for IFN- γ -producing iNKT cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 37(1), 39–49. <https://doi.org/10.1089/jir.2016.0006>
- Boivin, W. A., Cooper, D. M., Hiebert, P. R., & Granville, D. J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: Challenging the dogma. In *Laboratory Investigation* (Vol. 89, Issue 11, pp. 1195–1220). <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.91>
- Boles, K. S., Barchet, W., Diacovo, T., Cella, M., & Colonna, M. (2005). The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses

- through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood*, 106(3), 779–786.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0817>
- Bresser, K., Kok, L., Swain, A. C., King, L. A., Jacobs, L., Weber, T. S., Perié, L., Duffy, K. R., de Boer, R. J., Scheeren, F. A., & Schumacher, T. N. (2022). Replicative history marks transcriptional and functional disparity in the CD8+ T cell memory pool. *Nature Immunology*, 23(5), 791–801.
<https://doi.org/10.1038/s41590-022-01171-9>
- Capece, T., Walling, B. L., Lim, K., Kim, K. Do, Bae, S., Chung, H. L., & Topham, D. J. (2017). A novel intracellular pool of LFA-1 is critical for asymmetric CD8+ T cell activation and differentiation. 216(11), 3817–3829.
- Castro de Aquino, D. V. (2019). *Susceptibilidad de ratones carentes de crtam ante una infección por Salmonella enterica serovar. Typhimurium* [Licenciatura en Biología]. Instituto Politécnico Nacional.
- Cervantes-Barragan, L., Cortez, V. S., Wang, Q., McDonald, K. G., Chai, J. N., Luccia, B. Di, Gilfillan, S., Hsieh, C. S., Newberry, R. D., David Sibley, L., & Colonna, M. (2019). CRTAM protects against intestinal dysbiosis during pathogenic parasitic infection by enabling Th17 maturation. *Frontiers in Immunology*, 10(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01423>
- Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provasi, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., Lupo-Stanghellini, M. T., Mavilio, F., Mondino, A., Bicciato, S., Recchia, A., & Bonini, C. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naïve precursors. *Blood*, 121(4), 573–585. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431718>.There

- Cortez, V. S., Cervantes-Barragan, L., Song, C., Gilfillan, S., McDonald, K. G., Tussiwand, R., Edelson, B. T., Murakami, Y., Murphy, K. M., Newberry, R. D., Sibley, L. D., & Colonna, M. (2014). CRTAM controls residency of gut CD4⁺CD8⁺ T cells in the steady state and maintenance of gut CD4⁺ Th17 during parasitic infection. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(4), 623–633. <https://doi.org/10.1084/jem.20130904>
- Fazeli, P., Kalani, M., & Hosseini, M. (2023). T memory stem cell characteristics in autoimmune diseases and their promising therapeutic values. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1204231>
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D. A., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M., & Restifo, N. P. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*, *17*(10), 1290–1297. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>
- Gattinoni, Luca., Zhong, X.-Song., Palmer, D. C., Ji, Yun., Hinrichs, C. S., Yu, Zhiya., Wrzesinski, Claudia., Boni, Andrea., Cassard, Lydie., Church, Lindsay., Paulos, C. M., Muranski, Pawel., & Restifo, N. P. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Nature Medicine*, *15*(7), 808–8013. <https://doi.org/808–813>. doi:10.1038/nm.1982
- Gerlach, C., Moseman, E. A., Loughhead, S. M., Alvarez, D., Zwijnenburg, A. J., Waanders, L., Garg, R., de la Torre, J. C., & von Andrian, U. H. (2016). The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T

- Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity*, 45(6), 1270–1284. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.018>
- Giangreco, A., Hoste, E., Takai, Y., Rosewell, I., & Watt, F. M. (2012). Epidermal Cadm1 Expression Promotes Autoimmune Alopecia via Enhanced T Cell Adhesion and Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 188(3), 1514–1522. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003342>
- Gray, S. M., Amezquita, R. A., Guan, T., Kleinstein, S. H., & Kaech, S. M. (2017). Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8⁺ T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency. *Immunity*, 46(4), 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.012>
- Henrickson, S. E., Perro, M., Loughhead, S. M., Senman, B., Stutte, S., Quigley, M., Alexe, G., Iannaccone, M., Flynn, M. P., Omid, S., Jesneck, J. L., Imam, S., Mempel, T. R., Mazo, I. B., Haining, W. N., & Von Andrian, U. H. (2013). Antigen availability determines CD8⁺ T cell-dendritic cell interaction kinetics and memory fate decisions. *Immunity*, 39(3), 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.034>
- Hirai, T., Zenke, Y., Yang, Y., Bartholin, L., Beura, L. K., Masopust, D., & Kaplan, D. H. (2019). Keratinocyte-Mediated Activation of the Cytokine TGF- β Maintains Skin Recirculating Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity*, 50(5), 1249-1261.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.002>
- Joshi, N. S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H. K., Urso, D. R., Hagman, J., Gapin, L., & Kaech, S. M. (2007). Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet

- Transcription Factor. *Immunity*, 27(2), 281–295.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.010>
- Kennedy, J., Vicari, A. P., Saylor, V., Zurawski, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., & Zlotnik, A. (2000). A molecular analysis of NKT cells: Identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *Journal of Leukocyte Biology*, 67(5), 725–734.
<https://doi.org/10.1002/jlb.67.5.725>
- Kersh, E. N., Kaech, S. M., Onami, T. M., Moran, M., Wherry, E. J., Miceli, M. C., & Ahmed, R. (2003). TCR Signal Transduction in Antigen-Specific Memory CD8 T Cells. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5455–5463.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5455>
- Knudson, K. M., Goplen, N. P., Cunningham, C. A., Daniels, M. A., & Teixeira, E. (2013). Low-Affinity T cells are programmed to maintain normal primary responses but are impaired in their recall to low-affinity ligands. *Cell Reports*, 4(3), 554–565. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.008>
- Lee, S. J., Dunmire, S., & McSorley, S. J. (2012). MHC class-I-restricted CD8 T cells play a protective role during primary Salmonella infection. *Immunology Letters*, 148(2), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.10.009>
- Li, G., Yang, Q., Zhu, Y., Wang, H. R., Chen, X., Zhang, X., & Lu, B. (2013). T-Bet and Eomes Regulate the Balance between the Effector/Central Memory T Cells versus Memory Stem Like T Cells. *PLoS ONE*, 8(6), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067401>
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M., & Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European*

Journal of Immunology, 43(11), 2797–2809.
<https://doi.org/10.1002/eji.201343751>

Mani, V., Bromley, S. K., Äijö, T., Mora-Buch, R., Carrizosa, E., Warner, R. D., Hamze, M., Sen, D. R., Chasse, A. Y., Lorant, A., Griffith, J. W., Rahimi, R. A., McEntee, C. P., Jeffrey, K. L., Marangoni, F., Travis, M. A., Lacy-Hulbert, A., Luster, A. D., & Mempel, T. R. (2019). Migratory DCs activate TGF- β to precondition naïve CD8⁺T cells for tissue-resident memory fate. *Science*, 366(6462). <https://doi.org/10.1126/science.aav5728>

Martin, M. D., & Badovinac, V. P. (2014). Influence of time and number of antigen encounters on memory CD8 T cell development. *Immunologic Research*, 59(1–3), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8522-3>

Martin, M. D., & Badovinac, V. P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 2692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02692>

Martin, M. D., Condotta, S. A., Harty, J. T., & Badovinac, V. P. (2012). Population Dynamics of Naive and Memory CD8 T Cell Responses after Antigen Stimulations In Vivo. *The Journal of Immunology*, 188, 1255–1265. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101579>

Medina-Contreras, O., Soldevila, G., Patiño-Lopez, G., Canche-Pool, E., Valle-Rios, R., & Ortiz-Navarrete, V. (2010). Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(2), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.09.009>

Mehlhop-Williams, E. R., & Bevan, M. J. (2014). Memory CD8⁺ T cells exhibit increased antigen threshold requirements for recall proliferation. *Journal of*

Experimental Medicine, 211(2), 345–356.
<https://doi.org/10.1084/jem.20131271>

Metz, P. J., Lopez, J., Kim, S. H., Akimoto, K., Ohno, S., & Chang, J. T. (2016). Regulation of asymmetric division by atypical protein kinase C influences early specification of CD8⁺ T lymphocyte fates. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep19182>

Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2012). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 137–161. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095954>

Nakahata, S., Saito, Y., Marutsuka, K., Hidaka, T., Maeda, K., Hatakeyama, K., Shiraga, T., Goto, A., Takamatsu, N., Asada, Y., Utsunomiya, A., Okayama, A., Kubuki, Y., Shimoda, K., Ukai, Y., Kurosawa, G., & Morishita, K. (2012). Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia*, 26(6), 1238–1246. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.379>

Patiño-Lopez, G., Hevezi, P., Lee, J., Willhite, D., Verge, G. M., Lechner, S. M., Ortiz-Navarrete, V., & Zlotnik, A. (2006). Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8⁺ T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 171(1–2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.09.017>

Perez-Lopez, A., Nuccio, S.-P., Ushach, I., Edwards, R. A., Pahu, R., Silva, S., Zlotnik, A., & Raffatellu, M. (2019). CRTAM Shapes the Gut Microbiota and

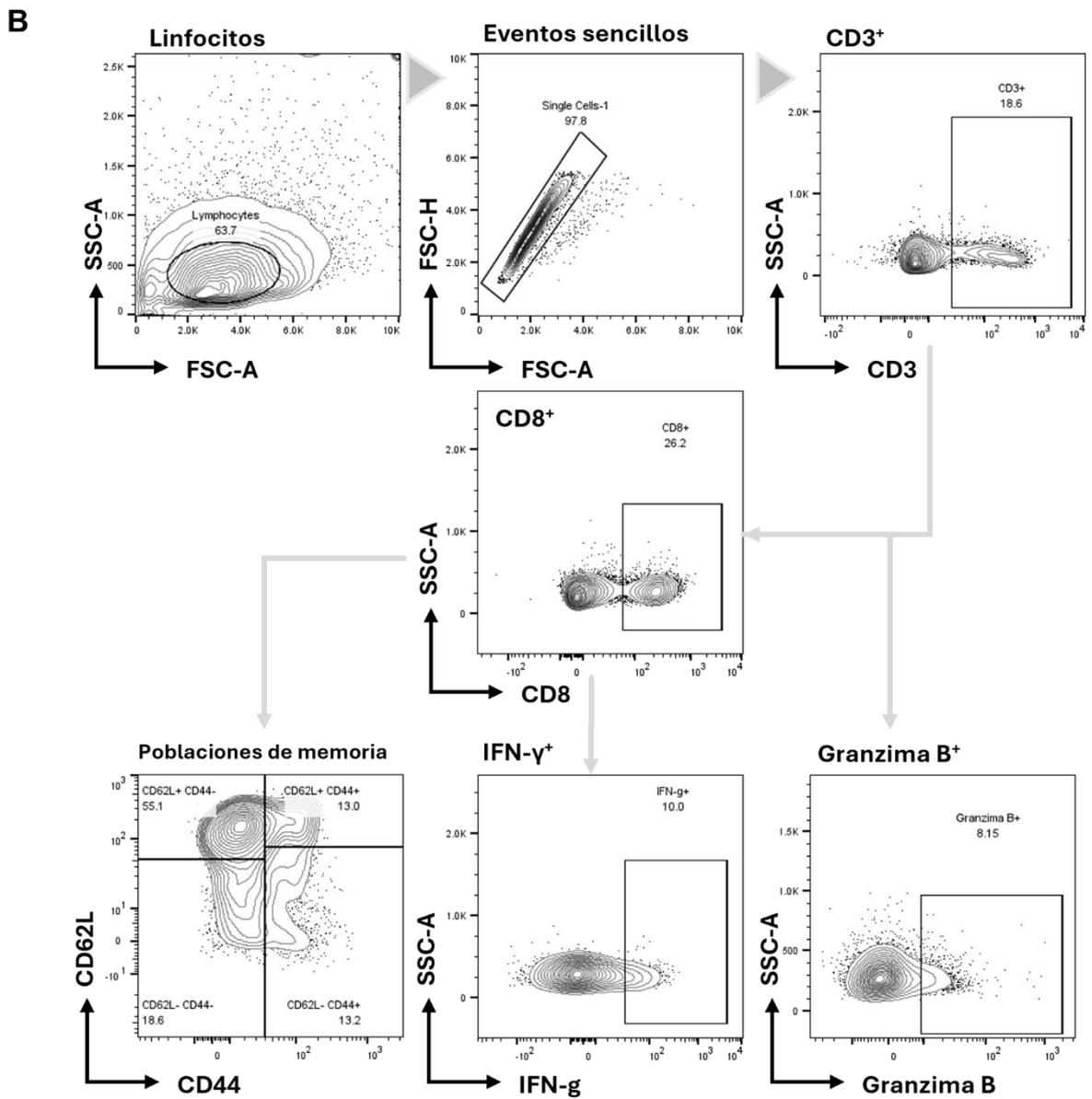
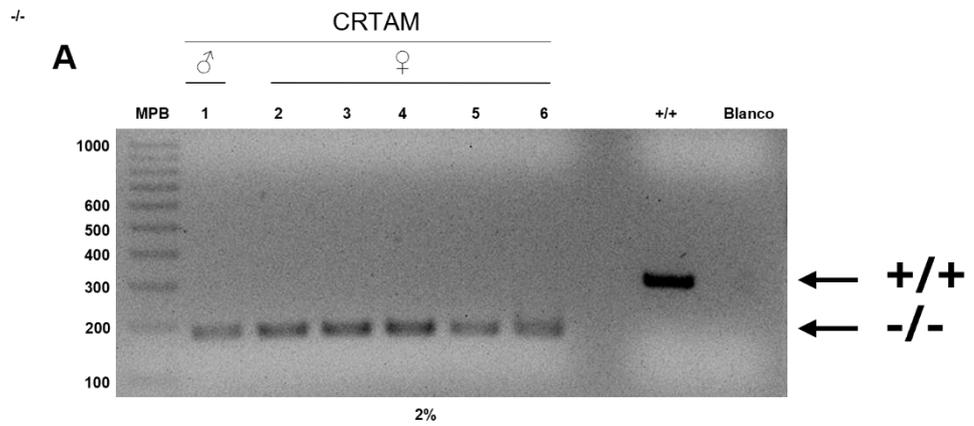
- Enhances the Severity of Infection. *The Journal of Immunology*, 203(2), 532–543. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800890>
- Pollizzi, K. N., Sun, I. H., Patel, C. H., Lo, Y. C., Oh, M. H., Waickman, A. T., Tam, A. J., Blosser, R. L., Wen, J., Delgoffe, G. M., & Powell, J. D. (2016). Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8⁺ T cell differentiation. *Nature Immunology*, 17(6), 704–711. <https://doi.org/10.1038/ni.3438>
- Ramirez-Velazquez, C., Beristain-Covarrubias, N., Guido-Bayardo, L., & Ortiz-Navarrete, V. (2014). Peripheral blood T cells and neutrophils from asthma patients express class-I MHC-restricted T cell-associated molecule. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-46>
- Rojas-Marquez, C., Valle-Rios, R., Lopez-Bayghen, E., & Ortiz-Navarrete, V. (2015). CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells. *Molecular Immunology*, 66(2), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, L. (1999). *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/44385>
- Setoguchi, R., Sengiku, T., Kono, H., Kawakami, E., Kubo, M., Yamamoto, T., & Hori, S. (2024). Memory CD8 T cells are vulnerable to chronic IFN- γ signals but not to CD4 T cell deficiency in MHCII-deficient mice. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48704-4>
- Takeuchi, A., Badr, M. E. S. G., Miyauchi, K., Ishihara, C., Onishi, R., Guo, Z., Sasaki, Y., Ike, H., Takumi, A., Tsuji, N. M., Murakami, Y., Katakai, T., Kubo,

- M., & Saito, T. (2016). CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *Journal of Experimental Medicine*, 213(1), 123–138. <https://doi.org/10.1084/jem.20150519>
- Takeuchi, A., Itoh, Y., Takumi, A., Ishihara, C., Arase, N., Yokosuka, T., Koseki, H., Yamasaki, S., Takai, Y., Miyoshi, J., Ogasawara, K., & Saito, T. (2009). CRTAM Confers Late-Stage Activation of CD8+ T Cells to Regulate Retention within Lymph Node. *The Journal of Immunology*, 183(7), 4220–4228. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901248>
- Valle-Rios, R., Patiño-Lopez, G., Medina-Contreras, O., Canche-Pool, E., Recillas-Targa, F., Lopez-Bayghen, E., Zlotnik, A., & Ortiz-Navarrete, V. (2009). Characterization of CRTAM gene promoter: AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes. *Molecular Immunology*, 46(16), 3379–3387. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.07.016>
- Valle-Ríos, R., Recillas Targa, F., & Ortíz-Navarrete, V. O. (2009). *Regulación transcripcional del gen CRTAM humano*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Vázquez-Martínez, J. A., Gómez-Lim, M. A., Morales-Ríos, E., Gonzalez-Ymerchand, J. A., & Ortiz-Navarrete, V. (2020). Short disordered epitope of CRTAM Ig-like V domain as a potential target for blocking antibodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21228798>
- W., C., & S.M., K. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological Reviews*, 236(1), 151–166. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00926.x>

- Xu, A., Bhanumathy, K. K., Wu, J., Ye, Z., Freywald, A., Leary, S. C., Li, R., & Xiang, J. (2016). IL-15 signaling promotes adoptive effector T-cell survival and memory formation in irradiation-induced lymphopenia. *Cell and Bioscience*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0098-2>
- Yang, J. Q., Leitges, M., Duran, A., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2009). Loss of PKC λ i impairs Th2 establishment and allergic airway inflammation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1099–1104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805907106>
- Yeh, J. H., Sidhu, S. S., & Chan, A. C. (2008). Regulation of a Late Phase of T Cell Polarity and Effector Functions by Crtam. *Cell*, 132(5), 846–859. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.013>
- Zhang, H., Tang, K., Ma, J., Zhou, L., Liu, J., Zeng, L., Zhu, L., Xu, P., Chen, J., Wei, K., Liang, X., Lv, J., Xie, J., Liu, Y., Wan, Y., & Huang, B. (2020). Ketogenesis-generated β -hydroxybutyrate is an epigenetic regulator of CD8+ T-cell memory development. In *Nature Cell Biology* (Vol. 22, Issue 1, pp. 18–25). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0440-0>
- Zhang, S., Lu, G., Qi, J., Li, Y., Zhang, Z., Zhang, B., Fan, Z., Yan, J., & Gao, G. F. (2013). Competition of cell adhesion and immune recognition: Insights into the interaction between CRTAM and nectin-like 2. *Structure*, 21(8), 1430–1439. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.006>
- Zheng, S., Yang, B., Li, L., Chen, M., Zhang, L., Chi, W., Shao, Z. M., Xiu, B., Chi, Y., & Wu, J. (2024). CRTAM promotes antitumor immune response in triple negative breast cancer by enhancing CD8+ T cell infiltration.

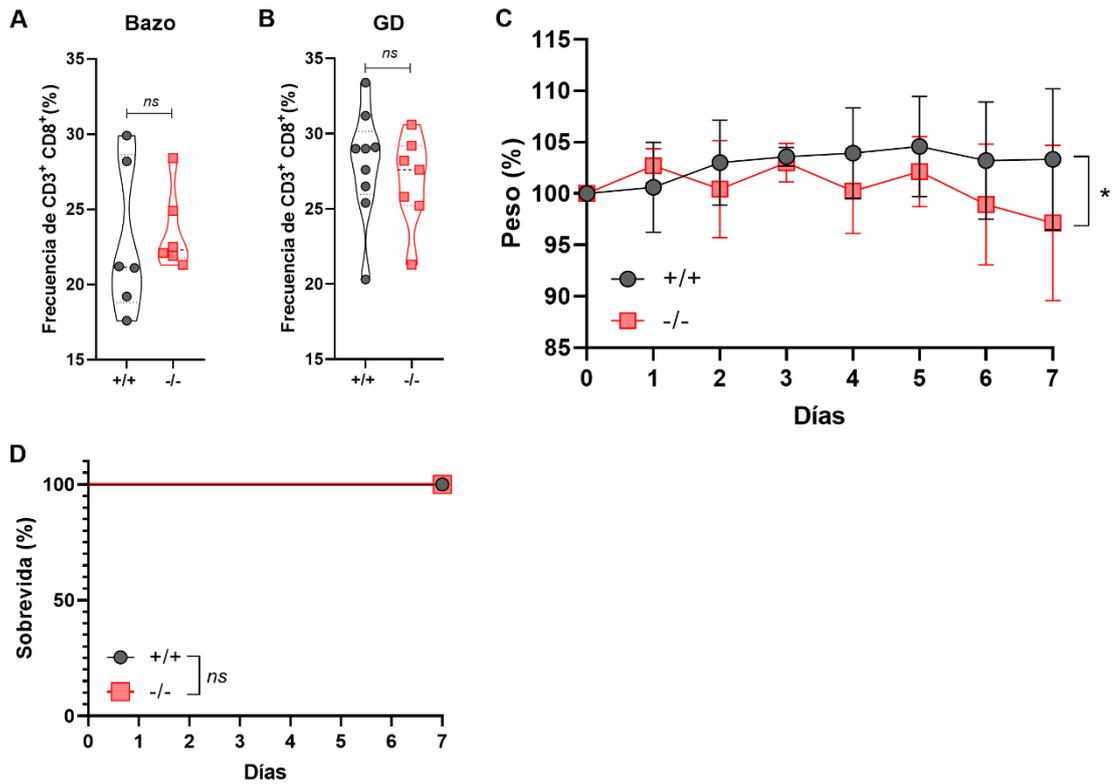
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111625>

XX. Anexos



Suplementaria- 1. **Estrategia de análisis por citometría de flujo.**

A. Genotipo de ratones CRTAM. Se muestra un gel representativo de la caracterización genotípica de ratones carentes del gene de *Crtam*; la banda de aprox. 300 pb identifica a ratones silvestres (*Crtam*^{+/+}) y la banda de aprox. 200 pb identifica a los ratones deficientes (*Crtam*^{-/-}). **B.** Estrategia de análisis por citometría de flujo para la identificación de las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria, IFN- γ y Granzima-B.

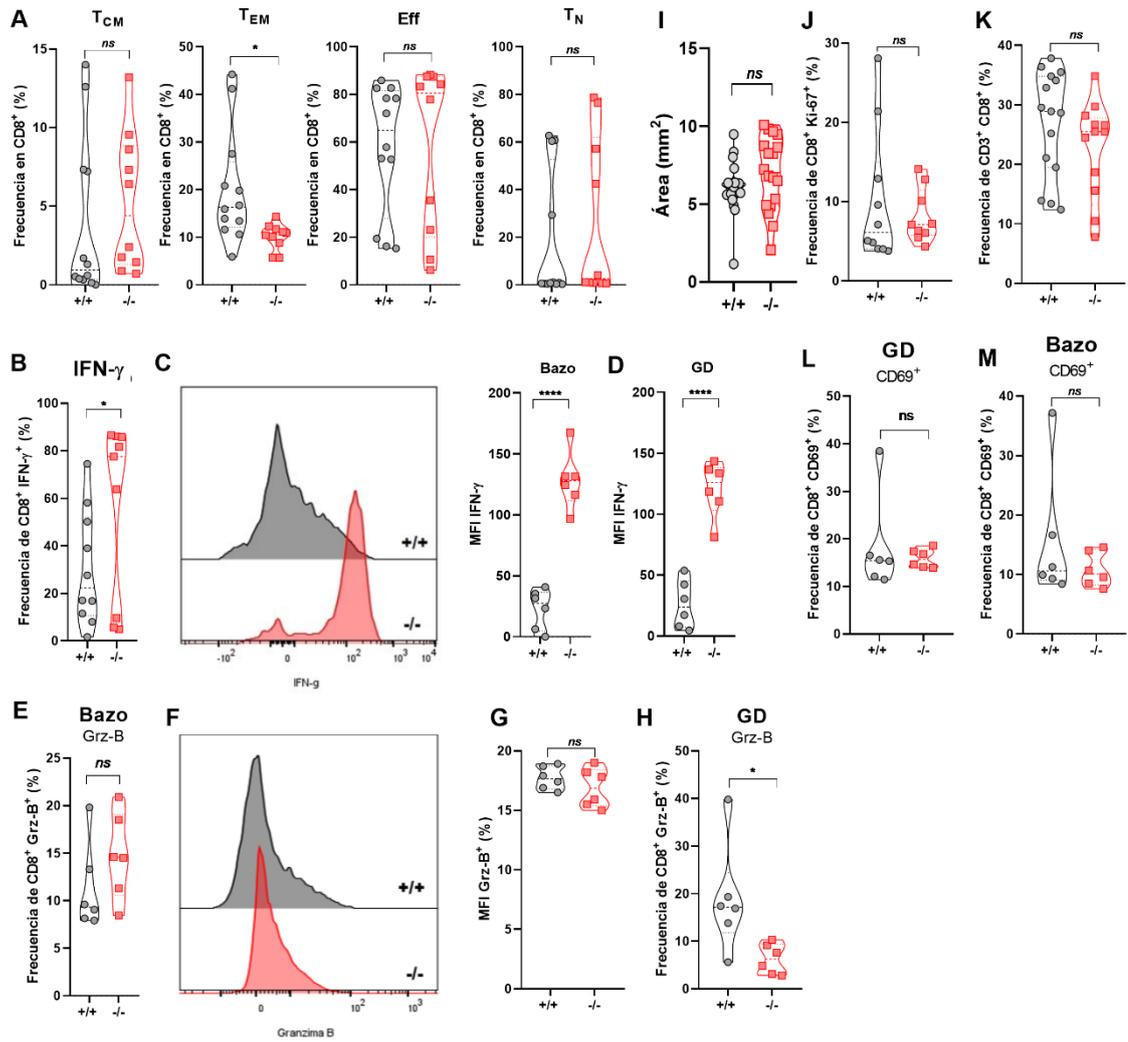


Suplementaria- 2 Los ratones silvestres y carentes para CRTAM son capaces de controlar la inmunización con STm atenuada.

A. Frecuencia en bazo y ganglios linfáticos de los linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ en condiciones sin estímulo antigénico. Cada punto representa un ratón analizado.

B-C. Porcentaje del peso (B) o curva de supervivencia (D) de ratones silvestres y carentes de CRTAM por 7 días tras la administración de 100 UFC de STm atenuada. Los datos se muestran como media +/- desviación estándar. Datos de al menos cuatro experimentos independientes. t de Student P<0.05 (A-C); Prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon P <0.05 (D). ns: Sin significancia estadística.

Ganglio drenante



Suplementaria- 3 . **Los ratones carentes de CRTAM tienen una mayor cantidad de IFN- γ intracelular.**

A. Frecuencia de linfocitos CD3⁺ CD8⁺ con fenotipo TN, TCM, TEM o efectores 7 días después del reto antigénico en ganglio linfático drenante (GD). Cada punto representa un ratón analizado. **B.** Frecuencia de CD3⁺ CD8⁺ IFN- γ ⁺ en GLD. **C-D.** Histograma representativo de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI) para IFN- γ de bazo (C) y en GLD (D). **E-F.** Frecuencia de linfocitos CD3⁺ CD8⁺ Grz-B⁺ (E) e histogramas representativos de la MFI de Grz-

B en bazo (F). **G-H.** MFI y frecuencia de Granzima-B analizado en linfocitos CD3⁺ CD8⁺ en GD.**I.** Área en mm² de los GD provenientes de ratones silvestres o carentes de CRTAM 7 días después de la administración de STm virulenta. **J-K.** Frecuencia de linfocitos CD3⁺ CD8⁺ Ki-67⁺ (J) o solo de CD3⁺ CD8⁺ (K) en GD. **L-M.** Frecuencia en GD (L) o bazo (M) de los linfocitos CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺. Los datos se muestran como media +/- desviación estándar. Datos de al menos cuatro experimentos independientes. t de Student P<0.05 (A-C); Prueba Gehan-Breslow-Wilcoxon P <0.05 (D). ns: Sin significancia estadística.