



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**DETERMINACIÓN DE CONDICIONES *IN-VITRO* PARA LA
EXPANSIÓN DE CÉLULAS T *STEM* DE MEMORIA PARA
TERAPIA ADOPTIVA DE CÉLULAS**

Nicolás Lalinde Ruiz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2022

DETERMINACIÓN DE CONDICIONES *IN-VITRO* PARA LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS T *STEM* DE MEMORIA PARA TERAPIA ADOPTIVA DE CÉLULAS

Nicolás Lalinde Ruiz

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

Magister en Inmunología

Director:

Carlos Alberto Parra López, MD, PhD.

Línea de Investigación:

Medicina Traslacional

Grupo de Investigación:

Inmunología y Medicina Traslacional

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología

Bogotá, Colombia

2022

“Soy porque somos”

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me dieron su apoyo para poder terminar este trabajo. Sin ustedes me hubiera sido imposible sobrevivir a la academia.

A mi mamá, por todo el cuidado que siempre he recibido de ella y que me ha permitido llegar a donde estoy ahora. Por enseñarme a seguir luchando por lo que creo e inspirarme a ser una mejor persona todos los días. Cada logro de mi vida ha sido posible gracias a todo su trabajo y amor. A mis nonxs y a mis tíos por darme su apoyo cuando lo necesité y alentarme cuando me sentía débil.

A mis amigos del laboratorio por ser una red incondicional que me ha acompañado en los mejores y peores momentos de esta tesis y todo lo que significa el trabajo en investigación. A Manuela, con quien entramos al mismo tiempo al grupo y con quien he crecido estos siete años. No me imagino una mejor compañera de trabajo que, además, se convirtió en una amiga invaluable. Le agradezco ser mi polo a tierra, tanto en la escritura de proyectos como en mi vida en general; por enseñarme de café y por todas las tardes de trabajo, crisis y risas. Por recogerme cuando estaba en el suelo, así ella estuviera igual o peor. A Ivón, por enseñarme tanto sobre tantos temas, pero especialmente por su generosidad y por darme una de las lecciones más importantes que he recibido en mi vida. A Oscar, por siempre estar dispuesto a teorizar conmigo sobre inmunología y preguntarnos sobre la vida. A Laura, por ser la tercera en la dupla y escucharnos cuando Manuela y yo necesitábamos hablar de nosotros. A Esteban y María Alejandra, por siempre estar dispuestxs a escucharme y a enseñarme tantas cosas también.

A mis amigos que conocí antes de la maestría y me acompañaron durante todo este proceso. A Stefhania, por tener la fuerza de continuar y verme entregar, por fin, este trabajo. La persona que hoy soy en gran parte es por todo lo que he aprendido de ella. A Melisa, por volver a ser parte de mi vida, aunque no fuera de la forma que esperábamos y por ser una de las personas que mejores consejos me ha dado. A Catalina, por ser de las personas más firmes en mi vida, por su constante amistad

y por todos los conciertos que pudimos compartir. A Mauricio, por siempre hacerme reír y enseñarme que los mejores amigos siempre están sin importar la distancia.

A lxs amigos que he conocido durante la maestría que, aunque no les conozca por tanto tiempo, ahora son muy cercanos a mi corazón. A Diego, por hacerme sentir que mi forma de cuidar es valiosa y motivarme a tomar riesgos por más miedo que tenga. A Mike, por ser incondicional desde que lo conozco y tomarse siempre el tiempo de saber cómo estoy. A Migue, por todas las discusiones que hemos tenido y lo mucho que he aprendido de ellas. A Javier, Jors, Cristian, Aurelia, Andrés, Sebs, los Julianes, por su amistad y darme un espacio seguro para ser yo.

A mi director de tesis, el Dr. Parra, por enseñarme todo lo que sé de inmunología y el trabajo de laboratorio. Por toda la confianza que depositó en mi para la escritura de mi proyecto de tesis y de todos los otros proyectos en los que trabajamos en el grupo. Por siempre estar dispuesto a embarcarse en cosas que motivaran a sus estudiantes, así estuvieran por fuera de su zona de confort. Por la paciencia en el último año, que fue tan difícil para mí. A David, Alejandra y Anamaria, por su labor pedagógica invaluable que hizo que decidiera hacer mi tesis de pregrado y posgrado con el grupo.

A la Universidad Nacional de Colombia, por ser mi segundo hogar durante tantos años y forjar la persona que hoy soy. A todos los profesores de la maestría de Inmunología, especialmente la profesora Myriam Navarrete, por cuidar tanto a sus estudiantes y siempre estar pendiente.

A la DIB, MinCiencias y la Fundación Salud de los Andes por apoyar financieramente este proyecto y todos los productos que se realizaron en el contexto de este trabajo de grado. Al IDC BIS y a las personas vacunadas por donar las muestras utilizadas en este trabajo.

A todas las personas que mencioné y las que quedaron por fuera, gracias por su apoyo y porque, por ustedes, las risas nunca faltaron.

Resumen

La terapia adoptiva de células (TAC) es una modalidad de inmunoterapia que persigue aumentar la inmunidad antitumoral de los pacientes y demanda la expansión *in-vitro* de linfocitos T antitumorales. Múltiples ensayos clínicos de TAC han demostrado respuestas clínicas favorables, principalmente en pacientes con melanoma y malignidades hematológicas, evidenciando los mejores resultados cuando se transfieren células de memoria no terminalmente diferenciadas. Recientemente, una población de linfocitos T de memoria con un fenotipo intermedio entre células vírgenes y de memoria central denominada células T “*stem cell-like*” de memoria (Tscm) fue descrita. Las Tscm cuentan con una sobrevivencia considerable y la capacidad de diferenciarse en otras subpoblaciones de memoria y efectoras, haciéndola una población de particular interés en el contexto de la TAC. Por este motivo, la determinación de condiciones *in-vitro* para expandir preferencialmente linfocitos Tscm ha sido motivo de extensa investigación en los últimos años.

En este trabajo evaluamos la capacidad que tienen diferentes citoquinas pertenecientes a la familia gamma común, solas o en combinación, de expandir linfocitos T CD4, así como el fenotipo de memoria que inducen en las células después de dos semanas de cultivo *in-vitro*. Partiendo de Linfocitos T CD4 vírgenes, en respuesta a un estímulo policlonal, la adición exógena de IL-7, IL-15 e IL-21 promovió una expansión significativa de linfocitos Tscm, respecto a otras condiciones de cultivo analizadas. Mientras que la IL-15 suscitó una proliferación sostenida de estos linfocitos, la IL-7 e IL-21 tuvieron una acción sinérgica que permitió mantener el estado de diferenciación de memoria de la subpoblación Tscm. Nuestros resultados muestran que el fenotipo de las Tscm es comparable al reportado en otros estudios.

Por otro lado, haciendo uso de células de personas inmunizadas con Toxoide Tetánico (TT), señalamos la capacidad que tienen los individuos jóvenes de expandir linfocitos CD4 Tscm en respuesta a la vacunación, siendo el fenotipo de estas células similar al de las células expandidas *in-vitro*, y que esta expansión se

ve limitada en adultos mayores. Adicionalmente, tanto *in-vitro* como *in-vivo* encontramos que los linfocitos Tscm guardan una estrecha relación con el programa de diferenciación de linfocitos CD4 foliculares “*helper*”, lo que consideramos contribuye al entendimiento de mecanismos celulares y moleculares de la generación de la memoria. En conclusión, los hallazgos de esta tesis permitieron establecer condiciones *in-vitro* para expandir linfocitos CD4 Tscm, cuyo fenotipo es similar a los que expanden en respuesta a la vacunación en individuos jóvenes y cuya deficiente expansión en respuesta al reestímulo con el antígeno en adultos mayores podría explicar la disminuida respuesta a las vacunas en individuos de la tercera edad.

Palabras Clave

Terapia Adoptiva de células, Memoria, Linfocitos T CD4, Vacunación, Linfocitos foliculares *helper*.

DETERMINATION OF *IN-VITRO* CONDITIONS TO EXPAND STEM MEMORY T CELLS FOR ADOPTIVE CELL THERAPY

Abstract

Adoptive cell therapy (ACT) is a type of immunotherapy that seeks to increase antitumor immunity of patients and requires *in-vitro* expansion of antitumor T lymphocytes. Clinical trials of ACT have shown favorable responses, mainly in patients with melanoma and hematologic malignancies. These studies have shown that better results are associated with the transfer of non-terminally differentiated memory cells. Recently, a population of memory T lymphocytes with an intermediate phenotype between naïve and central memory cells called “stem-like” memory T cells (Tscm) was described. These cells have considerable survival and the ability to differentiate into other memory and effector subpopulations, making it a population of particular interest in the context of ACT. For this reason, the determination of *in-vitro* conditions to preferentially expand Tscm lymphocytes has been the object of extensive research in recent years.

In this work, we tested the ability of different cytokines belonging to the common gamma family, alone or in combination, to expand CD4 T lymphocytes, as well as the memory phenotype that they induced in the cells after two weeks of *in-vitro* culture. Starting from virgin CD4 T lymphocytes, in response to a polyclonal stimulus, the exogenous addition of IL-7, IL-15 and IL-21 promoted a significant expansion of Tscm lymphocytes, compared to the other culture conditions analyzed. While IL-15 elicited a sustained proliferation of these lymphocytes, IL-7 and IL-21 had a synergistic action that allowed maintaining the memory differentiation state of the Tscm subpopulation. Our results show that the Tscm phenotype is comparable to that reported in other studies.

On the other hand, using cells from people immunized with Tetanus Toxoid (TT), we found the ability of young individuals to expand CD4 Tscm lymphocytes in response to vaccination. These cells had a similar phenotype to LTscm expanded *in-vitro*, and older adults showed a limited expansion of this population. Additionally, both *in-vitro* and *in-vivo* Tscm lymphocytes were found to be closely related to the helper follicular CD4 lymphocyte differentiation program, which we believe contributes to the understanding of cellular and molecular mechanisms of memory generation. In conclusion, the findings of this thesis allowed to establish *in-vitro* conditions to expand CD4 Tscm lymphocytes, whose phenotype is similar to those that expand in response to vaccination in young individuals and whose poor expansion in response to restimulation with the antigen in adults could explain the diminished response to vaccines in elderly individuals.

Keywords

Adoptive Cell Therapy, Memory, CD4 T Lymphocytes, Vaccination, Helper Follicular Lymphocytes.

Tabla de Contenidos

Agradecimientos.....	4
Resumen	6
Abstract.....	8
Tabla de Contenidos.....	10
Índice de Figuras	12
Índice de Tablas.....	15
Índice de Figuras Suplementarias	16
Índice de Tablas Suplementarias.....	17
Lista de Anexos	18
Lista de Abreviaturas	19
1. Introducción.....	20
2. Planteamiento del problema y justificación.....	22
3. Objetivos	24
3.1. Objetivo General.....	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. Marco Teórico	25
4.1. Terapia Adoptiva de Células.....	25
4.2. Memoria de linfocitos T.....	27
4.2.1. Clasificación de las subpoblaciones de memoria	27
4.2.2. Generación y mantenimiento de la memoria	29
4.3. Citoquinas de la familia gamma común	32
4.4. Subpoblaciones Th.....	34
4.4.1. Células T Foliculares “ <i>Helper</i> ”	35
4.5. Metabolismo y Memoria.....	36
5. Materiales y Métodos.....	38
5.1. Definición de los sujetos de estudio:.....	38
5.1.1. Criterios de exclusión:.....	39

5.2.	Diseño del estudio	39
5.2.1.	Tamaño muestral	40
5.3.	Muestras de sangre:	41
5.4.	Hipótesis operativas generales:	42
5.5.	Resumen ejecutivo de la metodología.	43
5.6.	Metodología detallada y actividades para alcanzar cada objetivo específico:	45
5.6.1.	OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Establecer condiciones de cultivo <i>in-vitro</i> , que permitan una expansión de LTscm a partir de células vírgenes.....	45
5.6.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Evaluar la relación entre el fenotipo T Follicular <i>Helper</i> y la diferenciación de LTscm.	48
5.6.3.	OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Determinar la actividad mitocondrial a través de la medición del potencial de membrana mitocondrial de las células obtenidas en los diferentes cultivos.	50
5.7.	Colección y análisis de datos:.....	51
5.8.	Sitio de investigación y manejo de sustancias o especímenes biológicos:.....	52
6.	Resultados	52
6.1.1.	La expansión de linfocitos partiendo de PBMCs decae después del décimo día de cultivo.	52
6.1.2.	Una estimulación continua induce la expresión del eje PD-1/PD-L1 tanto en linfocitos T como en células presentadoras de antígeno.....	58
6.1.3.	Las IL-7, IL-15 e IL-21 aumentan la expansión de linfocitos T.....	63
6.1.4.	La IL-21 promueve la generación de células <i>stem</i> de memoria.....	65
6.1.5.	La expresión de receptores de citoquinas de la familia gamma común no se ve afectada por los distintos tratamientos.....	69
6.2.	Memoria y diferenciación Tfh.....	72
6.2.1.	La IL-21 induce el fenotipo folicular <i>helper</i>	72
6.2.2.	El programa de diferenciación de los LTscm converge con el de los LTfh.....	74
6.2.3.	Los LTscm expandidos <i>in-vitro</i> se asemejan a los expandidos <i>in-vivo</i> en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico.....	78
6.2.4.	La expansión de LTscm en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico se ve afectada por el envejecimiento.....	84
6.2.5.	Análisis automatizado confirma el enriquecimiento de LT con fenotipo Tfh/Tscm en respuesta a la vacunación.....	91
6.3.	Análisis de Enriquecimiento de Genes.....	94
6.3.1.	Las células Tfh tienen una menor capacidad de autorrenovación que los linfocitos Tscm y Tcm.	94
6.4.	Memoria y actividad mitocondrial.....	99
6.4.1.	Los LTscm tienen un mayor potencial de memoria que las otras subpoblaciones de memoria.	99
6.4.2.	Los LTfh son las células con mayor capacidad energética.....	103
7.	Discusión	109
8.	Perspectivas	122
9.	Consideraciones Éticas	124
10.	Apropiación Social del Conocimiento.....	125
11.	Bibliografía.....	127

12. Figuras Suplementarias	133
----------------------------------	-----

Índice de Figuras

Esquema 1. Esquema de la expansión de células antígeno-específicas para una aproximación a la Terapia Adoptiva de Células.	26
Figura 1. Modelos de generación de memoria de los Linfocitos T.....	30
Figura 1. Señalización citoquinas de la familia gamma común.....	33
Esquema 2. Diseño experimental.	41
Figura 3. Expansión y viabilidad de PBMCs totales durante 15 días con un estímulo policlonal.....	54
Figura 4. Perfil de memoria de LT al día 7 de los cultivos.	56
Figura 5. Expresión PD-1 en LT y APCs 10 días después de un estímulo policlonal. 60	
Figura 6. Expresión PD-L1 en LT y APCs 10 días después de un estímulo policlonal. 61	
Figura 7. Expresión eje PD-1 en las subpoblaciones de memoria de LT 10 días después de un estímulo policlonal.....	62
Figura 8. Estrategia de “gating” de enriquecimiento de la fracción naive de LT CD4. 64	
Figura 9. Expansión de LT partiendo de células naive en respuesta a diferentes citoquinas de la familia gamma común.....	65
Figura 10. Estrategia de gating de determinación de la población stem de memoria. 66	
Figura 11. Distribución de las subpoblaciones de memoria al día 15 de los cultivos. 67	
Figura 12. Expresión de receptores de citoquinas de la familia gamma común.....	70
Figura 13. Expresión de receptores de citoquinas de la familia gamma común de las subpoblaciones de memoria.....	71
Figura 14. Expansión de LT CD4 foliculares helper al día 15 de los cultivos.....	73

Figura 15. Correlación del fenotipo LTscm y el fenotipo folicular helper al día 15 de los cultivos.....	74
Figura 16. Expresión de CXCR5 y PD-1 en LT CD4 Totales al día 15.....	75
Figura 17. Expresión de CXCR5 y PD-1 en LTscm.	76
Figura 19. Perfil de memoria de los LT CD4 foliculares helper.	78
Figura 21. Expansión Tfh en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico y relación con las Tscm.	80
Figura 22. Fenotipo LTscm expandidas in-vitro vs in-vivo.....	81
Figura 24. Marcadores Tfh en Memoria.....	83
Figura 25. LTscm en respuesta a la re-estimulación con TT	84
Figura 26. Subpoblaciones de Memoria en CD4 en adultos jóvenes y adultos mayores.	85
Figura 27. LTscm de adultos mayores en respuesta a vacunación con Toxoide Tetánico.....	86
Figura 28. Expansión Tfh en adultos mayores en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico.	87
Figura 29. Marcadores Tfh en Tscm se mantienen con la edad.	88
Figura 30. LTscm de adultos mayores en respuesta a la re-estimulación con TT.	89
Figura 31. Delta de LTscm y Tfh de adultos jóvenes vs adultos mayores en respuesta a la re-estimulación con TT.....	90
Figura 32. LTscm de adultos mayores en respuesta a la re-estimulación con TT	90
Figura 33. Poblaciones diferenciales entre adultos jóvenes y adultos mayores encontradas mediante el agrupamiento de células automatizado utilizando el software Citrus.....	92
Figura 34. Poblaciones diferenciales entre los adultos jóvenes y mayores en respuesta a la vacunación con TT mediante el agrupamiento de células automatizado utilizando el software FlowSOM.	93
Figura 35. Análisis Enriquecimiento de genes de vías de autorrenovación celular.	94
Figura 36. Análisis Enriquecimiento de genes asociados a autorrenovación	95
Figura 37. Análisis Enriquecimiento de genes de vías JAK/STAT.	97
Figura 38. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas con fenotipo Tfh.	98
Figura 39. Potencial de membrana mitocondrial de las poblaciones de memoria en linfocitos T CD4.	100

Figura 40. Efecto de las citoquinas en el potencial de membrana mitocondrial.....	101
Figura 41. Distribución potencial de membrana mitocondrial.....	102
Figura 42. Fenotipo de memoria de acuerdo con el potencial de membrana mitocondrial.	103
Figura 43. Potencial de membrana mitocondrial en LTfh.	103
Figura 44. Potencial de membrana en memoria y Tfh en cultivos	104
Figura 45. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas a metabolismo..	106
Figura 46. Poblaciones diferenciales entre los distintos cultivos encontradas mediante el agrupamiento de células automatizado utilizando el software FlowSOM	107

Índice de Tablas

Tabla 1. Expresión de marcadores de membrana de las diferentes poblaciones de memoria.....	29
Tabla 2. Panel de anticuerpos para la fenotipificación de las células al día 0 y 15 de los cultivos.....	48
Tabla 3. Panel de anticuerpos para la fenotipificación de primera cohorte de donantes vacunadas/os con TT.	49
Tabla 4. Panel de anticuerpos para la fenotipificación de segunda cohorte de donantes vacunadas/os con TT.....	50
Tabla 5. Expansión y viabilidad de LT presentes en PBMCs totales estimuladas con un estímulo policlonal durante 15 días en presencia de citoquinas exógenas.....	55
Tabla 6. Perfil de memoria de LT CD4 al día 7 de los cultivos.....	57
Tabla 7. Perfil de memoria de LT CD8 al día 7 de los cultivos.....	58
Tabla 8. Perfil de memoria al día 15 de los cultivos.	68

Índice de Figuras Suplementarias

Figura S1. Control de Fluorescencia Menos Uno (FMO).....	134
Figura S2. Estrategia de expansión de LTscm partiendo de PBMCs totales.	135
Figura S3. Estrategia de enriquecimiento de la fracción naive de LT CD4.....	136
Figura S4. Expresión diferencial de CCR7 y CD62L para definición de las poblaciones de memoria	137
Figura S5. Estrategia del gating de la población T folicular helper.....	138
Figura S6. Expresión de proteínas asociadas a fenotipo Tfh en LTscm.....	139
Figura S7. Estrategia de vacunación con Toxoide Tetánico	140
Figura S8. Producción de anticuerpos IgG contra TT en respuesta a la vacuna antitetánica.....	141
Figura S9. Expresión de los marcadores de las poblaciones diferenciales entre adultos jóvenes y mayores encontradas mediante agrupamiento de células automatizado utilizando el software Citrus.....	142
Figura S10. Mapa de calor genes vías autorrenovación enriquecidos en Tscm.....	143
Figura S11. Mapa de calor genes vías JAK/STAT enriquecidos en Tscm.	145
Figura S12. Análisis Enriquecimiento de genes de vías JAK/STAT.....	147
Figura S13. Mapa de calor genes vías asociadas a fenotipo Tfh.	148
Figura S14. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas a fenotipo Tfh.	150
Figura S15. Potencial de membrana mitocondrial de linfocitos T CD4 y CD8 en respuesta a la estimulación.	151
Figura S16. Histogramas de fluorescencia de MitoTracker día 15 de los cultivos..	152
Figura S17. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas a metabolismo.	153

Índice de Tablas Suplementarias

Tabla S1. Datos demográficos de los participantes.....	133
Tabla S2. Enriquecimiento de genes vías autorrenovación Tscm vs Tfh.....	144
Tabla S3. Enriquecimiento de genes vías JAK/STAT Tscm vs Tfh.	146
Tabla S4. Enriquecimiento de genes vías asociadas a fenotipo Tfh.....	149

Lista de Anexos

- Anexo I**.....Tabla de valores de enriquecimiento de Genes (GSEA).
- Anexo II**.....Artículo publicado: “*Young but not older adults exhibit an expansion of CD45RA+CCR7+CD95+ T follicular helper cells in response to tetanus vaccine*”.
- Anexo III**.....Artículo publicado: “*Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review*”.
- Anexo IV**..... Documento de recomendaciones para el manejo de tumores extraídos en cirugía.
- Anexo V**.....Documento de recomendaciones sobre vacunas personalizadas.
- Anexo VI**.....Infografía importancia de los tumores como fuente de información para posibles tratamientos.
- Anexo VII**.....Infografía Inmunosenescencia.
- Anexo VIII**.....Programas radiales de difusión sobre inmunoterapia.
- Anexo IX**.....Memorias evento “El futuro de la Medicina Traslacional en Colombia: Avances internacionales y nacionales”.
- Anexo X**.....Presentación resultados en el XIII Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología (ACAAI) y el V Encuentro de la Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI).

Lista de Abreviaturas

APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> – Células presentadoras de antígeno
CG	Centros germinales
FAO	<i>Fatty acid oxidation</i> – Oxidación de ácidos grasos
GSEA	<i>Gene set enrichment análisis</i>
IL	Interleuquina
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
LTscm	Linfocitos T “ <i>stem cell-like</i> ” de memoria
NCI	<i>National Cancer Institute of the United States of America</i>
NK	<i>Natural Killers</i> – Células asesinas naturales
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> – Células mononucleares de sangre periférica
SRC	<i>Spare respiration capacity</i> – Capacidad respiratorio extra
TAC	Terapia adoptiva de células
Tem	Células T efectoras de memoria
TemRA	Células T terminalmente diferenciadas
TCA	Ciclo de ácidos tricarbóxico
Tcm	Células T de memoria central
TCR	<i>T Cell Receptor</i> – Receptor de células T
TILs	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> – Linfocitos infiltrantes de tumor
Tfh	Células T foliculares “ <i>helper</i> ”
TMA	Terapias médicas avanzadas
Tregs	Células T reguladoras
Trm	Células T residentes de memoria
Tscm	Células T “ <i>stem cell-like</i> ” de memoria

TT	Toxoide Tetánico
Ttm	Células T de memoria transicional

1. Introducción

La inmunoterapia hoy es considerada como el cuarto pilar del tratamiento contra el cáncer, acompañando a la cirugía, la quimio y la radioterapia (1). A diferencia de los otros tres pilares, esta se basa en la capacidad natural que tiene el sistema inmune de distinguir entre células sanas y células tumorales o potencialmente cancerosas (2). En las últimas décadas, múltiples ensayos clínicos fundados en este principio han sido desarrollados en Estados Unidos, Europa y China, y han demostrado una buena eficacia en el manejo de distintos tipos de malignidades (3, 4). La terapia adoptiva de células (TAC) es una de las modalidades que existe de inmunoterapia y consiste en el trasplante autólogo o alogénico de linfocitos T (LT) que reconocen de manera específica el tumor e inducen una respuesta antitumoral robusta, que en algunos casos puede llegar a generar una remisión completa de la enfermedad (5, 6).

Los LT transfundidos pueden provenir de diferentes fuentes; pueden ser linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), LT periféricos que se expanden artificialmente usando células presentadoras de antígeno (APCs) o LT modificados genéticamente para que expresen receptores de células T (TCRs) o receptores quiméricos específicos a uno o varios antígenos tumorales (5). Indistintamente del origen de los LT transfundidos, una de las grandes conclusiones a la que se ha llegado en los ensayos clínicos basados en TAC es que, para lograr respuestas clínicas favorables, es necesaria la transferencia de un gran número de células (7, 8). Por lo anterior, la investigación en ciencias básicas se ha centrado en desarrollar sistemas de expansión que permitan la proliferación de linfocitos T antígeno-específicos, que tengan una acción antitumoral robusta (8).

Si bien los resultados de los estudios iniciales han sido en su mayoría prometedores y brindan evidencia robusta de prueba de principio, todavía es necesario optimizar varios aspectos de la TAC (1). La tasa de recaída es un factor que podría limitar considerablemente la implementación de esta modalidad de inmunoterapia (3, 7). La actividad efectora de las células transfundidas por sí sola no es suficiente para garantizar una protección duradera; estas células también deben ser capaces de proliferar en respuesta a la estimulación de su TCR y ser resistentes al microambiente tumoral, evitando diferenciarse en células agotadas (2).

La IL-2 ha sido la citoquina más utilizada en los sistemas de expansión *in-vitro*, generando grandes números de células antígeno-específicas en poco tiempo. Sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que las células obtenidas con IL-2 no sólo corresponden a células efectoras, sino también hay un porcentaje de estas células que son T reguladoras (Tregs), las cuales podrían estar afectando negativamente la capacidad antitumoral de las células transferidas (9, 10). Otras citoquinas pertenecientes a la familia gamma común como la IL-7 y la IL-15 también cuentan con la capacidad de inducir proliferación de LT sin favorecer a la Tregs por lo que su uso en nuevos diseños experimentales se ha propuesto (11, 12).

Actualmente, varias estrategias de expansión capaces de generar células con una mayor persistencia en circulación están siendo investigadas, buscando así aumentar la sobrevida libre de enfermedad en respuesta a la TAC. Dentro de estas estrategias no sólo se han tenido en cuenta citoquinas como la IL-7 o 15, sino también agentes moduladores de la diferenciación celular, el metabolismo y la senescencia (13). En este sentido, características como la expresión de ciertos factores de transcripción, el perfil de memoria, el grado de agotamiento y las rutas bioenergéticas de las células que están siendo expandidas deben ser considerados para determinar el fenotipo celular más adecuado para la TAC, y así mejorar la eficacia y duración de los beneficios clínicos de esta inmunoterapia.

Teniendo en cuenta lo anterior y siguiendo con la línea de investigación en inmunoterapias del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional, el propósito de

este trabajo estuvo orientado a la determinación de condiciones *in-vitro* para la expansión de LT con potencial uso en el contexto de la TAC, así como la evaluación de rutas de diferenciación celular relacionadas con una mayor persistencia y capacidad proliferativa de las células expandidas.

2. Planteamiento del problema y justificación

Los avances terapéuticos observados en la inmunoterapia contra el cáncer durante los últimos años han mejorado nuestra comprensión sobre los mecanismos y las vías que regulan la interacción entre el sistema inmune y el cáncer (14). Sin embargo, el número de pacientes terminales que se benefician con estos nuevos tratamientos sigue siendo limitado, lo que refleja la alta complejidad que tiene el diseño de estrategias de inmunoterapia (15). Dentro de los obstáculos que existen en el campo de las terapias médicas avanzadas (TMA) se incluyen la falta de biomarcadores celulares de buen pronóstico y la alta tasa de recaída observada en los pacientes (15).

Particularmente, para que la TAC sea capaz de lograr una respuesta antitumoral efectiva y duradera, las células transferidas deben ser capaces de expandir inmediatamente después de la transfusión y persistir en circulación posterior al control inicial del tumor (16). Ambas características pueden lograrse enriqueciendo células de memoria poco diferenciadas, al tener estas una sobrevivencia y actividad antitumoral mayor que sus contrapartes efectoras (17). No obstante, la proporción de estas células en sangre periférica es baja, lo que limita su aplicación en inmunoterapia (18).

La búsqueda de estrategias *in-vitro* que permitan expandir preferencialmente poblaciones de memoria poco diferenciadas ha sido objeto de investigación exhaustiva durante la última década, sin embargo, el conocimiento que se tiene sobre la generación de la memoria inmune es aún muy incipiente. Este aspecto de la inmunología ha sido uno de los principales intereses en el desarrollo de vacunas,

y aunque este se ha centrado mayoritariamente en la memoria de la respuesta humoral, los estudios realizados en este campo nos permiten vislumbrar algunos de los mecanismos que subyacen la generación y el mantenimiento de la memoria de los linfocitos T (19).

En consecuencia, en este trabajo de maestría nos planteamos las siguientes preguntas de investigación, las cuales consideramos contribuirán a un mejor entendimiento de la memoria de LT CD4:

- I) ¿Qué combinación de citoquinas expande, en mayor número, los linfocitos T CD4 de memoria poco diferenciadas?

- II) ¿Qué vías de señalización de diferenciación y metabolismo se ven involucradas en la generación y mantenimiento de la memoria?

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

- Determinar condiciones *in-vitro* que permitan la expansión de Linfocitos T “*stem cell-like*” de memoria (LTscm).

3.2. Objetivos Específicos

- Establecer condiciones de cultivo *in-vitro* que permitan una expansión de LTscm a partir de células vírgenes.
- Evaluar la relación entre el fenotipo T Folicular *Helper* y la diferenciación de LTscm.
- Determinar la actividad mitocondrial a través de la medición del potencial de membrana mitocondrial de las células obtenidas en los diferentes cultivos.

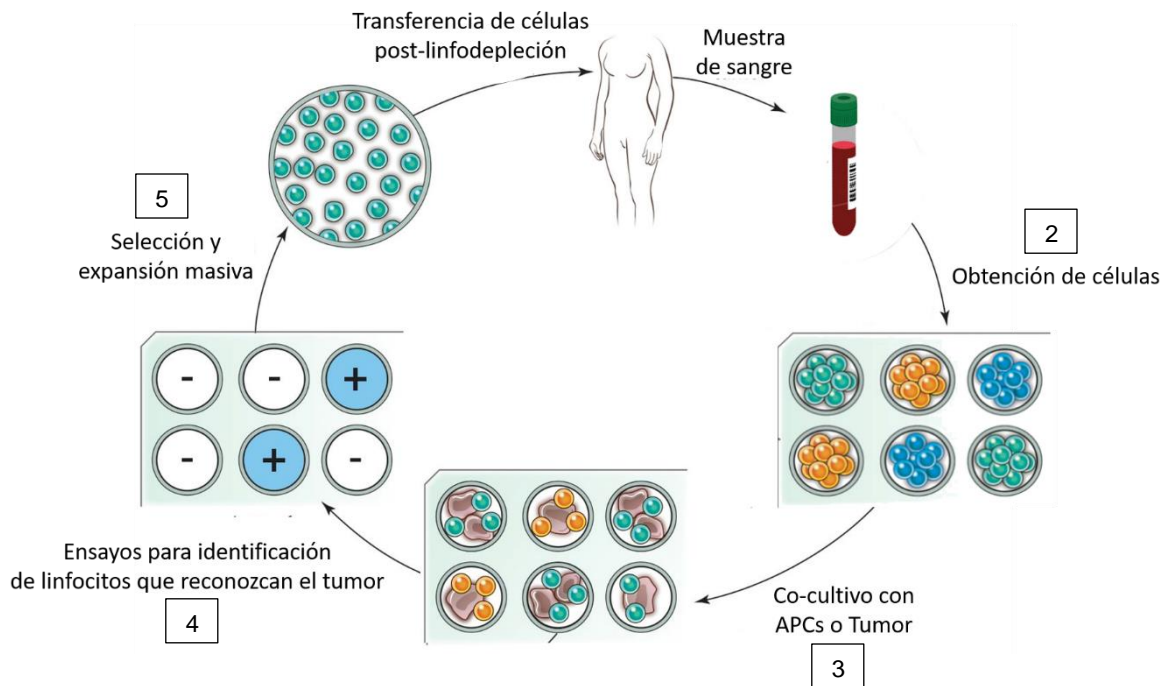
4. Marco Teórico

4.1. Terapia Adoptiva de Células

La terapia adoptiva de células consiste en la transferencia de células T antígeno-específicas autólogas o alogénicas con fines terapéuticos (1). Esta estrategia se puede llevar a cabo por medio de tres aproximaciones: (i) el aislamiento de células T específicas a antígenos tumorales que pueden estar presentes en el sitio del tumor (TILs); (ii) la expansión de LT de sangre periférica en respuesta a un antígeno tumoral presentados por APCs (iii) la modificación por ingeniería genética de células T de sangre periférica para que estas puedan identificar de manera específica al tumor (8). Todas estas estrategias requieren de la manipulación *in-vitro* de los LT para su expansión y posterior re-infusión en la o el paciente (Esquema 1).

6

1



Esquema 1. Esquema de la expansión de células antígeno-específicas para una aproximación a la Terapia Adoptiva de Células. Adaptado de Rosenberg & Restifo, 2015 (20).

Con el descubrimiento de los TILs, la TAC empezó a consolidarse como una estrategia prometedora para el manejo del cáncer, sin embargo, la dificultad para extraer estas células representó su primer gran obstáculo (1). Por este motivo, varios investigadores empezaron a diseñar protocolos de cultivos *in-vitro* que permitieran la expansión de grandes números de LT citotóxicos específicos de tumor. Finalizando la década de los 80's, el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI) estableció unas condiciones de cultivo para la expansión de TILs contra melanoma, utilizando IL-2 para su posterior transfusión a pacientes con este tipo de cáncer en estadios avanzados (21, 22).

Para aumentar el grado de expansión de los TILs, al protocolo desarrollado por el NCI se le adicionó el uso de fragmentos del tumor o células tumorales irradiadas en conjunto con la IL-2 durante siete días, y posteriormente una activación policlonal usando un anticuerpo agonista de CD3 en presencia de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) irradiadas y una nueva dosis de IL-2 (22). No obstante,

durante las primeras décadas del nuevo milenio, la evidencia de que la IL-2 favorecía células muy diferenciadas y Tregs llevó a explorar el uso de otras citoquinas (9, 10).

La observación del incremento significativo de la persistencia de las células transferidas, así como una mayor duración de la respuesta clínica en pacientes que habían recibido un esquema quimioterapéutico linfodepletante previo a la transfusión, sugirió la presencia de factores en el nicho hematopoyético que favorecían la generación de memoria (23). Posteriores estudios hallaron que la IL-7 y la IL-15 eran responsables de este potenciamiento de la actividad antitumoral y aumento de la supervivencia de las células transfundidas por lo que desde entonces han sido incorporadas en nuevos protocolos de investigación (12).

Una de las posibles explicaciones de que estas citoquinas induzcan una mejor respuesta antitumoral es que estén promoviendo células poco diferenciadas capaces de volverse células efectoras al momento de reconocer antígenos tumorales, y que a su vez se mantenga un porcentaje de estas células con un fenotipo de memoria para evitar recaídas en los pacientes (24). Las diferentes características fenotípicas y funcionales de las células de memoria han demostrado ser de suma importancia para proveer una adecuada protección inmune duradera, por lo que entender los mecanismos de generación y mantenimiento de las subpoblaciones de memoria es clave para el desarrollo de estas terapias.

4.2. Memoria de linfocitos T

4.2.1. Clasificación de las subpoblaciones de memoria

La primera clasificación de memoria fue propuesta por Sallusto y colaboradores (25), quienes de acuerdo con la expresión de receptores de superficie de “homing” a órganos linfáticos como CCR7 y CD62L, dividieron a las células de memoria en memoria central (T_{cm}; CCR7⁺CD62L⁺) y efectoras de memoria (T_{em}; CCR7⁻CD62L^{+/-}). El advenimiento de técnicas que permitieron fenotipificar finamente células únicas (i.e. citometría de flujo) facilitó explorar aún más la heterogeneidad

del compartimento de memoria (Tabla 1); la expresión de CD103, que permite la migración a piel y epitelio gástrico, se ha propuesto como marcador para las células residentes de memoria (Trm) (26), y la pérdida de CCR7, pero no de CD28, constituye una subpoblación intermedia entre Tcm y Tem, denominada memoria transicional (Ttm). Además de estas dos, la idea de una población que precedía a las Tcm, contenida dentro del fenotipo virgen (CCR7⁺CD62L⁺CD45RA⁺), dotada con una mayor capacidad de autorrenovación y de reabastecer el pool de memoria, llevó al descubrimiento de las Tscm, que después de haberse generado *in-vitro* activando la vía de Wnt-β-Catenina (27), se caracterizó en PBMCs de humanos como células CD45RA⁺CCR7⁺CD62L⁺CD95⁺ (28).

Además de esta diversificación fenotípica, hay marcadas diferencias entre las poblaciones tanto en su distribución anatómica como en sus funciones efectoras. Las células vírgenes maduras residen principalmente en los nódulos linfáticos, son quiescentes y tienen un programa transcripcional que mantiene su alta capacidad de autorrenovación, proliferación y de vigilancia antigénica, pero una baja capacidad efectora (24). El tamaño del “pool” de células vírgenes afecta directamente la respuesta primaria a un reto antigénico y el “pool” de células de memoria que resultan de este primer encuentro (29).

	Virgenes	Stem de Memoria	Memoria Central	Memoria Transicional	Efectoras de Memoria	Residentes de Memoria	Terminalmente Diferenciadas
CD45RA	+	+	-	-	-	-	+
CD45RO	-	-	+	+	+	+	-
CCR7	+	+	+	-	-	-	-
CD62L	+	+	+	+/-	-	+/-	-
CD28	+	+	+	+	+/-	-	-
CD27	+	+	+	+	+/-	-	-
IL-7Ra	+	+	+	+/-	+/-	-	-
CXCR3	-	+	+	NA	-	NA	-
CD95	-	+	+	NA	+	+	+
IL-2Rβ	-	+	+	NA	+	NA	+

CD58	-	+	+	NA	+	NA	+
CD57	-	-	-	NA	+/-	NA	+
CD69	-	-	-	NA	-	+	+/-
CD103	-	-	-	NA	-	+	-

Tabla 1. Expresión de marcadores de membrana de las diferentes poblaciones de memoria. (24, 30)

Las células de memoria central, por otro lado, circulan preferencialmente entre órganos linfáticos secundarios por la sangre o la linfa y favorecen la producción de IL-2 en vez de citoquinas linaje-específicas, mientras que las células efectoras de memoria circulan principalmente entre el bazo y los tejidos no linfoides, llegando de los tejidos vía sangre y regresando vía linfa; las Tem expresan programas transcripcionales linaje-específicos y, por lo tanto, secretan las citoquinas correspondientes, pero carecen del potencial proliferativo de las Tcm (24, 31). Finalmente, las células terminalmente diferenciadas (TemRA; CCR7⁻CD45RA⁺), al igual que las Tem, expresan citoquinas linaje dependientes, y aunque su capacidad efectora es considerablemente mayor que el de las subpoblaciones de memoria, su tiempo de circulación se calcula que es de unos pocos días (32).

Estas diferencias funcionales han llevado a que se prefiera la expansión de ciertos fenotipos sobre otros de acuerdo con el objetivo último al que se quiera llegar. Sin embargo, los procesos que subyacen la generación y mantenimiento de memoria no han podido explicarse satisfactoriamente, y actualmente todavía se manejan al menos tres diferentes modelos.

4.2.2. Generación y mantenimiento de la memoria

Es importante destacar que aún no es claro si existe una única vía que lleve a la generación de células de memoria. Los modelos que se han propuesto difieren en términos del momento de generación de memoria en la fase de expansión de la respuesta inmune (Figura 1) (24). El modelo "lineal de diferenciación" celular sostiene que las células de memoria se obtienen después de llegar al pico de expansión de linfocitos; alrededor de un 5% de las células en este momento adquieren un fenotipo de memoria (Tcm, Tem, Trm) y el resto de las células entran

en un programa de apoptosis. Este modelo se soporta en la evidencia experimental que, en el evento de un segundo encuentro antigénico, las células respondedoras pertenecen a una reducida proporción de clonotipos respecto a la gran diversidad de precursores vírgenes (33, 34).

En el contexto de una infección, cáncer o vacunación, un pequeño número de precursores vírgenes antígeno-específicos expanden en grandes magnitudes durante el “*priming*” de las células y adquieren funciones efectoras. Posteriormente, la mayoría de estas células entran en un programa de apoptosis y tan solo una reducida cantidad persiste en el sistema con un fenotipo de memoria (35). Estas últimas permanecen circulantes durante varios años y proveen una defensa robusta en caso de un segundo encuentro antigénico (18).

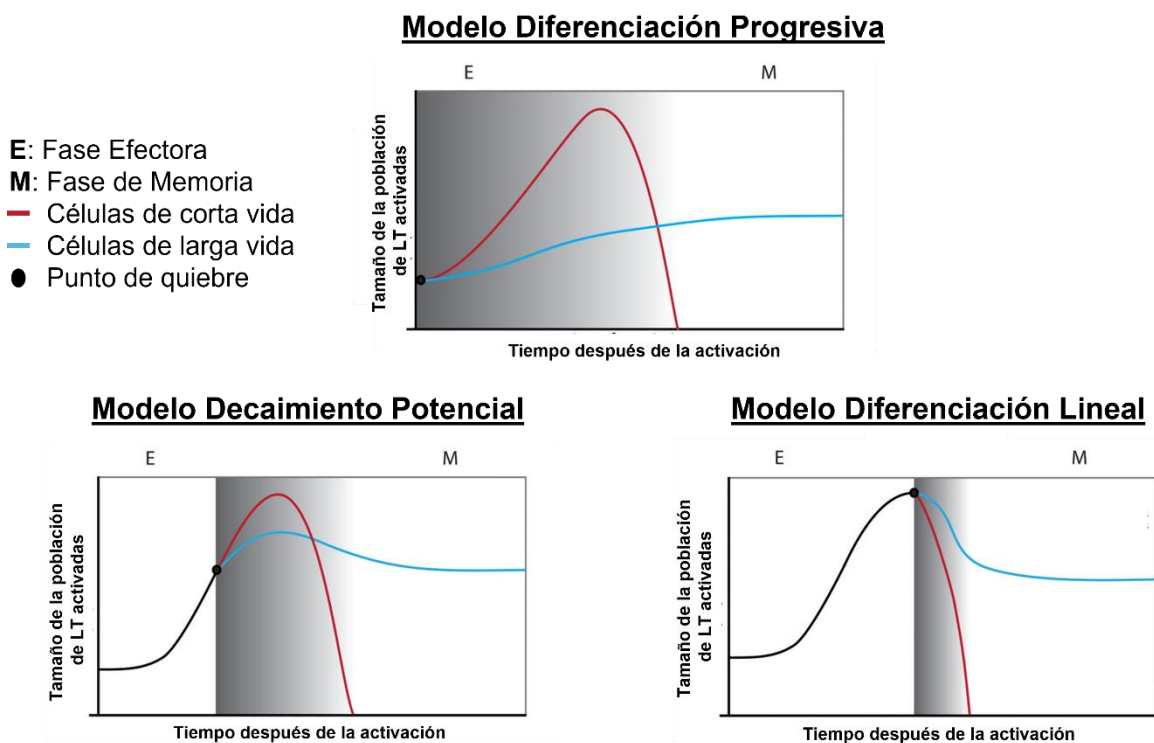


Figura 1. Modelos de generación de memoria de los Linfocitos T. Adaptado de Busch et al., 2016 (24).

Clásicamente, los linfocitos T se han subdividido en cuatro poblaciones: vírgenes (*Naive*), memoria central, memoria efectora y efectoras terminales (25). Sin embargo, en el 2009, Gattinoni y colaboradores teorizaron la existencia de una

población intermedia entre las células vírgenes y las de memoria central con características de células madre, a las que denominaron células *stem-like* de memoria (27). Estas células, cuya existencia se demostró en el 2011 (28), serían capaces de inducir una respuesta antitumoral superior a la de las otras subpoblaciones. Desde entonces se han descrito más poblaciones intermedias y especializadas, demostrando la alta heterogeneidad y complejidad de la memoria inmunológica (36).

Por otro lado, Kaech y colaboradores propusieron el modelo de “disminución del potencial”, en donde en un momento anterior a llegar al pico de expansión, cuando las células efectoras han cursado entre 8 a 10 ciclos de división celular, éstas se diversifican en células efectoras de corta vida (TemRA) y células efectoras precursoras de memoria (Tcm y Tem) (37). Por último, Sallusto y Lanzaveccia teorizaron que la generación de memoria era un evento que ocurría de manera muy temprana en la respuesta inmune; las células vírgenes dan lugar a las Tcm, estas a su vez a las Tem, y por último se diferencian en TemRA. Este modelo de “diferenciación progresiva” sugiere que las divisiones celulares ocurren de manera asimétrica en las células vírgenes y las Tcm, dando lugar a una célula más diferenciada con un mayor potencial efector que seguirá proliferando, y a una célula idéntica a la madre (i.e. autorrenovación) que entrará en quiescencia y se mantendrá en circulación esperando a un segundo encuentro antigénico (38, 39).

Siguiendo el modelo de diferenciación progresiva, Restifo y otros grupos de investigación sugirieron que el mantenimiento de la memoria dependería entonces de un compartimento de linfocitos T de memoria especializado que tuviera características de células madre, y sería el encargado de reabastecer todas las otras poblaciones de memoria (40, 41). Esta hipótesis fue probada por Gattinoni, quien encontró tanto en ratones como en humanos este fenotipo multipotencial intermedio entre células vírgenes y Tcm, comprobando a su vez la capacidad de estas células de secretar citoquinas efectoras y dar lugar a células de memoria central, efectoras de memoria, residentes de memoria y terminalmente diferenciadas (27, 28). De igual manera, estos estudios no sólo contribuyeron a la

identificación de estas nuevas poblaciones de memoria de alto interés en medicina traslacional, sino que también han empezado a configurar las condiciones *in-vitro* necesarias para su generación y producción masiva para su uso en ensayos clínicos.

4.3. Citoquinas de la familia gamma común

La activación de los linfocitos T cursa principalmente con tres señales: (i) la estimulación del TCR por el complejo péptido-MHC, (ii) la interacción de moléculas co-estimuladoras presentes en el linfocito y la célula presentadora de antígeno y (iii) el ambiente de citoquinas. La combinación de citoquinas presentes en el sitio de estimulación afecta de manera profunda la respuesta inmune que se obtiene, además de otros procesos vitales de los linfocitos T como su desarrollo, diferenciación y homeóstasis (42). La IL-2, IL-7, IL-15 y IL-21 pertenecen a la familia de citoquinas, cuyos receptores heteroméricos comparten la misma cadena gamma común y múltiples estudios han demostrado que la presencia de estas citoquinas juega un papel clave en la proliferación, supervivencia y capacidades efectoras de los linfocitos T (42, 43). La señalización y principales procesos asociados a cada una de ellas han sido dilucidados, aunque principalmente en LT CD8 (Figura 1). La IL-2 ha sido la citoquina más estudiada y usada en las estrategias de expansión *in-vitro*, pero su rol en el mantenimiento y expansión de células reguladoras ha generado que se empezara a explorar el uso de otras citoquinas (44).

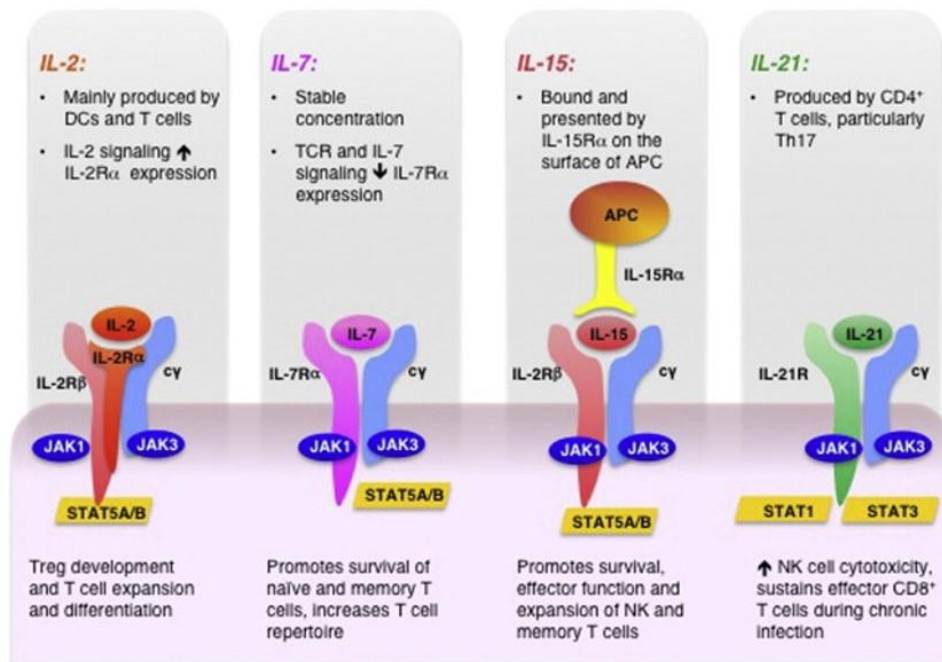


Figura 1. Señalización citoquinas de la familia gamma común. Tomado de Toe, Pellegrini & Wah Mak, 2013 (45).

Las IL-7 y 15 son citoquinas estromales que al igual que IL-2 señalizan principalmente vía STAT5 (46). La IL-7, en particular, media la homeostasis de las células CD4 y CD8 vírgenes y de memoria, al ser un factor de supervivencia que induce la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 (47). Mientras que la IL-15, además de compartir la misma vía JAK-STAT que la IL-2, también comparte su receptor β y es necesaria para el mantenimiento de las células CD8 (48). Siguiendo los trabajos de Restifo y Gattinoni, Cieri logró expandir la población de células Tscm utilizando una combinación de estas dos citoquinas y demostró que tenían una acción sinérgica, estando la IL-7 más relacionada a procesos de autorrenovación y la IL-15 a proliferación (12).

Por su lado, la IL-21 es la citoquina más recientemente identificada perteneciente a esta familia, cuya acción pleiotrópica tiene efecto tanto en LT como en Linfocitos B (LB) y células asesinas naturales (NKs) (49). Descrita inicialmente en un contexto de expansión de células T foliculares Helper (Tfh), involucradas en el apoyo a los LB para la producción de anticuerpos, en los últimos años se ha venido explorando

su capacidad de aumentar la expansión clonal de las células T (49, 50). En contraste a la IL-2, la IL-21 señala a través de STAT1 y STAT3 (45) y tiene un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la memoria central de los linfocitos T, y además las células expandidas utilizando esta citoquina han mostrado una mayor capacidad antitumoral que las resultantes con IL-2 (11, 51). Álvarez-Fernández logró incrementar los números de células obtenidas con fenotipo Tscm partiendo de células vírgenes, agregando IL-21 a los cultivos con IL-7 y 15, lo que sugiere una actividad sinérgica más que redundante de estas citoquinas en la expansión de células (52). Sin embargo, todos los mecanismos de señalización intracelulares de esta citoquina aún no han sido entendidos completamente.

4.4. Subpoblaciones Th

Históricamente, los mayores avances logrados en estudios que abarcan el problema de la memoria inmunológica han tenido lugar en linfocitos T CD8 (35). Probablemente, esto se deba a una relativa facilidad explicada por el limitado rango de fenotipos efectoras de los linfocitos citotóxicos, acompañada por su gran capacidad proliferativa y su clara diferenciación fenotípica entre células efectoras primarias y secundarias. Esto en contraste al amplio rango efector de las CD4 y la alta plasticidad de las poblaciones observada *in-vitro* e *in-vivo* mediada por el ambiente de citoquinas en que se encuentren, así como la evidencia limitada entre respuestas efectoras primarias y secundarias en algunos fenotipos (24).

El compartimento de células T CD4 contiene al menos siete subpoblaciones fenotípicamente distintas y se han clasificado como Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh y Tregs, cada una con diversas funciones efectoras (53). Estas subpoblaciones se diferencian en linajes funcionalmente distintos en términos de los factores de transcripción que están activos en ellas y las citoquinas efectoras que estas producen, los cuales pueden tener acciones redundantes o antagónicas y son reclutadas preferencialmente dependiendo del tipo de reto inmunológico (24).

Además de estas claras diferencias, se han empezado a descubrir ciertos paralelos entre algunas subpoblaciones Th y los fenotipos de memoria o efectoras. En un

modelo de ratones KO para CD25 retados con *Listeria monocytogenes*, se evidenció una memoria Th1 comprometida (54, 55). En el mismo modelo se observó una putativa población precursora de memoria, definida como CD4⁺CD44⁺CCR7⁺CXCR5⁺PD-1⁻. La co-expresión de CXCR5 y PD-1 es característica de un fenotipo folicular *helper*, y la ausencia de PD-1 se propuso como una población de células Tfh en reposo, precursoras de memoria central y capaces de generar diferentes subpoblaciones efectoras en un segundo evento de expansión (35).

4.4.1. Células T Foliculares “Helper”

Los linfocitos T foliculares “*helper*” son una subpoblación de linfocitos T CD4 que se encarga de apoyar a las células B en la producción de anticuerpos. La producción de anticuerpos de alta afinidad y el cambio de clase en los centros germinales se debe a la interacción de células Tfh y linfocitos B (56, 57). Las células Tfh fueron descritas por primera vez en amígdalas humanas basados en la expresión del receptor de quimioquina CXCR5 que les permite migrar a los centros germinales (CG) (58). Su función principal es promover la diferenciación de las células B hacia células plasmáticas efectoras y plasmablastos de memoria a través de la expresión de moléculas co-estimuladores como ICOS y CD40L (59). La ausencia de CXCR5 conlleva a graves errores estructurales de los CG (60, 61) y el bloqueo de la activación de “*helper*” *in-vivo* inhibe la generación de células CXCR5⁺ y el desarrollo de los CG (62). En general, la expresión de CXCR5 se regula al alza transitoriamente cuando los linfocitos T interactúan con APCs y sus moléculas co-estimuladoras (63), pero a diferencia de los otros grupos celulares recientemente activados, los linfocitos Tfh mantienen la expresión de CXCR5 (63).

PD-1 (Programmed cell Death-1) es un receptor inhibitorio altamente expresado en células Tfh (64) que juega un rol clave en la tolerancia de linfocitos T, ya que afecta la formación dinámica de la sinapsis inmunológica entre linfocitos T y B, a través del bloqueo de la señalización del TCR y por ende el intercambio de señales (65). Su expresión en la superficie de células Tfh es justificada como mecanismo de

tolerancia teniendo en cuenta que esta población es estimulada permanentemente dentro de los CG (63). Como ya se mencionó, la IL-21 es un importante estimulador de la proliferación y la diferenciación desde un fenotipo virgen hacia uno de memoria secretor de inmunoglobulinas en LB.

Además de esto, hay nueva evidencia que la señalización por IL-21 y la expresión de Bcl-6, características propias de un programa de diferenciación folicular, también favorecen un fenotipo Tcm (66), mientras que la diferenciación a Tem es inducida por la vía IL-2/STAT5, y converge en muchos factores de transcripción comúnmente asociados a un fenotipo Th1 (e.g. Blimp1, T-bet, Eomes) (35). Mueller y colaboradores (67) resumieron múltiples estudios en donde una rápida remoción del antígeno durante una infección o una única dosis de péptido de vacuna tiende a inducir un fenotipo Tcm, mientras que infecciones múltiples o protocolos “*prime-boost*” llevan a un fenotipo Tem, y estos programas de diferenciación dependen de las acciones de los factores antagónicos Bcl-6 y Blimp1, respectivamente (54).

4.5. Metabolismo y Memoria

La mayoría de los leucocitos que transitan en el organismo tienen un estado quiescente y se activan en respuesta a una infección, un evento de inflamación local o sistémico, o a otras perturbaciones del organismo (68). Durante esta activación, además de la activación de los programas transcripcionales previamente mencionados, es necesario el ajuste de las vías metabólicas, no solo para responder a las necesidades energéticas propias de la proliferación celular y la secreción de citoquinas, sino también para activar cascadas de señalización, generando cambios epigenéticos que puedan modificar la arquitectura cromosómica para responder de manera más robusta a un segundo encuentro antigénico (69).

Debido a esto, en los últimos años se han empezado a estudiar a profundidad las rutas metabólicas que son utilizadas por los linfocitos T, y se han encontrado grandes diferencias entre los programas bioquímicos usados por las células efectoras y las células de memoria. En respuesta a la estimulación del TCR, el

principal cambio metabólico es el aumento de la glucólisis, ya que los linfocitos T en proliferación requieren de una alta producción de ATP, así como de metabolitos intermedios para biosíntesis de ácidos nucleicos, membranas celulares y aminoácidos esenciales (68). Este incremento en la glucólisis es regulado por la vía de señalización TCR-Zap70-PI3K-AKT-mTOR, que activa un metabolismo anabólico, mediante la inducción de factores de transcripción como HIF-1a, 6SK y 4EBP1 (70).

Sin embargo, diferentes trabajos han mostrado que la glucólisis es insuficiente para proporcionar todos los factores necesarios para la proliferación celular (71). La glutaminólisis parece ser una ruta complementaria, al servir para el mantenimiento del ciclo de Krebs, que aumenta durante la activación de los linfocitos T y permite mantener la producción de intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) necesarios en reacciones biosintéticas (72). De igual forma, se ha encontrado que la inhibición de la fosforilación oxidativa es capaz de bloquear la expresión de marcadores de activación después de la estimulación del TCR, sugiriendo que la transición de células vírgenes a efectoras requiere de señales específicas generadas durante la producción de ATP mitocondrial (73).

Por su lado, la generación de memoria va de la mano con una reprogramación metabólica hacia la fosforilación oxidativa, en donde se utiliza principalmente el acetil Co-A producido por la β -oxidación de los ácidos grasos (FAO) en la mitocondria (74, 75). La FAO genera ventajas para la sobrevivencia de las células de memoria y además permite una rápida respuesta en el evento de un segundo encuentro antigénico (69).

De igual forma, estudios realizados sobre el potencial de membrana mitocondrial de linfocitos T CD8 de memoria han identificado que éstos cuentan con una mayor capacidad respiratoria extra mitocondrial (SRC) en comparación a sus contrapartes efectoras o vírgenes (75). La SRC es la capacidad de la mitocondria para seguir produciendo ATP bajo condiciones de estrés y es esencial para mantener la función celular a largo plazo. El aumento de la SRC en células de memoria depende en gran

medida de la capacidad de la mitocondria de oxidar grasas; proceso que es mediado, en parte, por el aumento de la expresión de CPT1a, el transportador de ácidos grasos a la mitocondria (75).

La generación de memoria depende de diferentes mecanismos capaces de controlar la respiración mitocondrial y la respuesta inmune. Modificaciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial, la señalización para mitofagia o biogénesis mitocondrial, así como el potencial de membrana mitocondrial, resultan en la generación de diferentes fenotipos de memoria, haciendo de la mitocondria un organelo celular determinante para el mantenimiento y buena respuesta de las células de memoria.

5. Materiales y Métodos

5.1. Definición de los sujetos de estudio:

Las células con las que se desarrolló el presente estudio se obtuvieron de dos fuentes: las células utilizadas para la expansión *in-vitro* se obtuvieron de unidades de sangre donadas por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) provenientes de diez donantes jóvenes sanas/os entre 18 y 30

años. Por otro lado, las células de las personas inmunizadas con toxoide tetánico se obtuvieron de dos cohortes, cada una compuesta por cinco personas jóvenes (18-30 años) y cinco adultos mayores (>60 años) antes (día 0) y después (día 11 y 21) de la primera dosis de la vacuna antitetánica (Tetavax, Sanofi Pasteur). Este estudio fue aprobado por un comité de ética en el marco de un proyecto de identificación de marcadores de inmunosenescencia desarrollado por el grupo de Inmunología y Medicina Traslacional (Nº 009-092-18 del 12 de mayo, 2018).

5.1.1. Criterios de exclusión:

- Ser paciente con tuberculosis, VIH, o enfermedades autoinmunes, metabólicas, cardiovasculares o renales.
- Tener antecedentes del síndrome del Guillain-Barré o hipersensibilidad a las vacunas.
- Estar en tratamiento con corticosteroides en los últimos 6 meses.
- Tener demencia u otras condiciones cognitivas.
- Abuso de sustancias psicoactivas.
- Haber presentado síntomas de alguna infección viral o bacteriana en las últimas dos semanas.
- Haber sido vacunados para el tétanos en los últimos diez años o cualquier otra vacuna en los últimos seis meses. (Exclusivo para muestras de las personas vacunadas).

5.2. Diseño del estudio

Este protocolo de investigación se compone de un estudio descriptivo experimental y un estudio experimental, que tuvo como objetivo estudiar la expansión y características de los linfocitos Tscm utilizando. El componente descriptivo consistió en evaluar la expansión de estas células utilizando diferentes combinaciones de citoquinas. Por ser un estudio descriptivo, en el cual se plantea la estimulación y expansión de células *in-vitro*, no se intervinieron a las pacientes con tratamientos por fuera de los recomendados por su médico tratante.

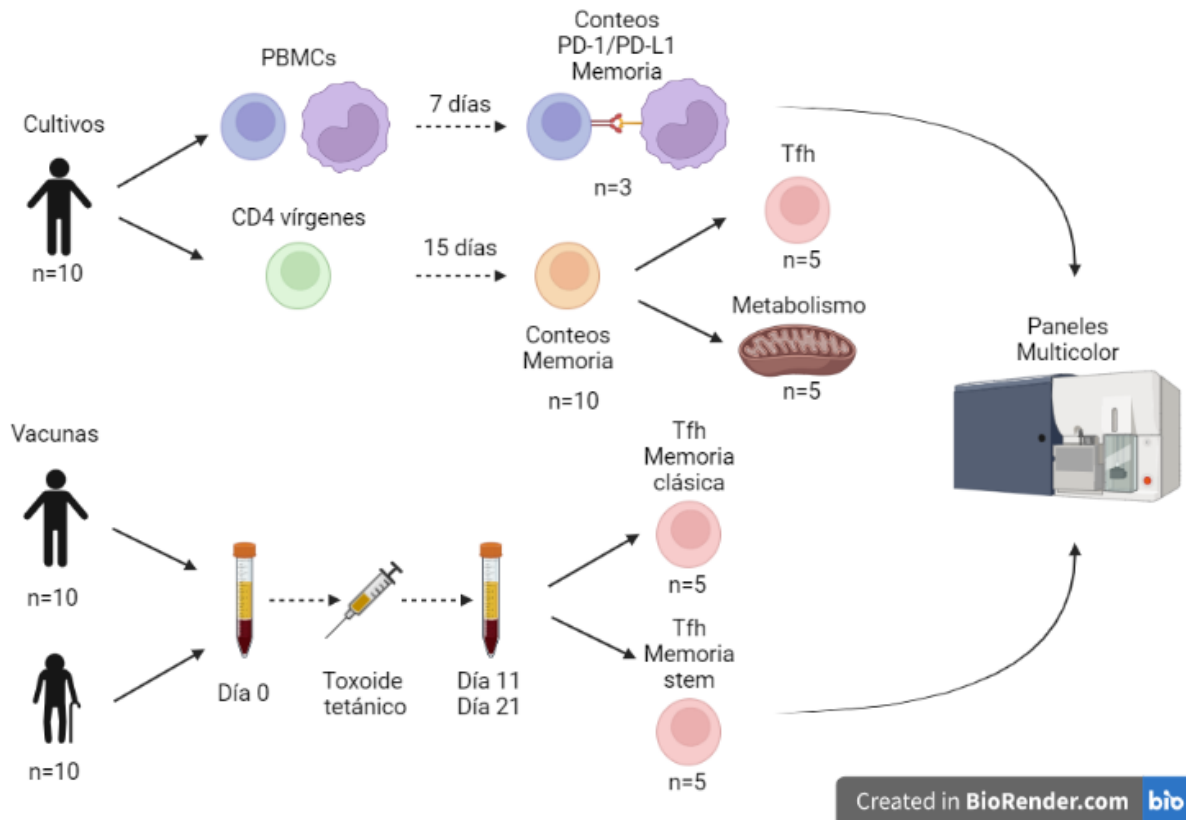
El componente experimental tuvo como intervención la aplicación de la vacuna antitetánica en los donantes sanos. Para ello se contó con la aprobación de un comité de ética y se tomaron muestras de sangre de los donantes para hacer la caracterización de las Tscm *ex-vivo*. El riesgo de la intervención i.e. la vacunación con el Toxoide Tetánico representó un riesgo mínimo para los donantes y ninguno de ellos presentó efectos adversos posterior a la inmunización.

5.2.1. Tamaño muestral

En este estudio se estableció un tamaño de muestra no probabilística por conveniencia de 10 donantes sanos para el desarrollo de cada uno de los sets experimentales. Para los cultivos partiendo de PBMCs se hicieron cinco réplicas iniciales, pero al observar que no había un crecimiento sostenido de las células se hizo la evaluación de la memoria y los receptores inhibitorios en solo tres cultivos a modo descriptivo por restricción de reactivos. Para los cultivos partiendo de las células vírgenes se hicieron 10 réplicas y para todos se hizo un conteo de las células al día 15, así como la medición de la viabilidad y la evaluación de los marcadores de memoria. Por limitaciones de los paneles de anticuerpos en cinco de estos cultivos se hizo la evaluación de las células foliculares, incluida la medición de ICOS y CD40L, y en los otros cinco se hizo la evaluación del potencial de membrana mitocondrial (Esquema 2).

Para la parte correspondiente a la vacunación, se hicieron dos cohortes cada una compuesta por cinco donantes sanos jóvenes (18-30 años) y mayores (>60 años). En la primer cohorte, por limitación del número de anticuerpos, se hizo la evaluación de memoria clásica (CCR7 y CD45RA) y marcadores de activación de las Tfh (CD40L, ICOS e IL-21 intracelular). En la segunda cohorte se incluyó CD95 para evaluar células Tscm y marcadores de células foliculares (CXCR3, Bcl-6).

Los análisis estadísticos serán de comparación de medias (datos pareados pre y posquimioterapia) a partir de los porcentajes de dichos marcadores de cada uno de los tipos celulares.



Esquema 2. Diseño experimental. Esquema del diseño experimental y tamaño muestral de los distintos sets experimentales que comprenden este trabajo.

5.3. Muestras de sangre:

Para las muestras obtenidas por el IDCBS, las unidades fueron recibidas y procesadas en el laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. A partir de las unidades de sangre, se obtuvieron PBMCs. Brevemente, el contenido de la unidad se transfirió a tubos de 50 ml y se hizo una serie de lavados con solución salina para remover el anticoagulante. Posteriormente, mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll® se obtuvieron las PBMCs. Las células fueron contadas y se evaluó su viabilidad por exclusión de azul de tripano. Con las células frescas se iniciaron los cultivos propuestos en el presente trabajo, y las células que sobraron fueron criopreservadas en nitrógeno líquido.

Para las muestras de las/os donantes vacunadas/os, se tomaron 20 mL en tubos heparinizados al día 0, 11 y 21 respecto a la primera dosis de la vacuna antitetánica Tetavax (Sanofi Pasteur). Las PBMCs se obtuvieron por medio de separación por gradiente de Ficoll®, fueron contadas, su viabilidad fue medida por exclusión de azul de tripano y crio preservadas en 50% AIM-V (Gibco, ThermoFisher), SFB (Gibco, ThermoFisher) y 10% DMSO (MP Biomedicals, LLC) en nitrógeno líquido hasta que se captaron todas las muestras de cada cohorte. Los datos demográficos de las/os donantes se encuentran en la Tabla suplementaria 1.

5.4. Hipótesis operativas generales:

- Los cultivos con la combinación de IL-7, 15 y 21 tendrán, al finalizar los 15 días, un mayor número de células con respecto a los cultivos tratados con IL-2 o solo perlas.
- En los cultivos con la combinación de IL-7, 15 y 21 se observará una mayor proporción de células con fenotipo “*stem*” de memoria y/o memoria central, que los cultivos con solo IL-2.
- Proteínas asociadas con los linfocitos T foliculares helper se verán reguladas al alza en los cultivos con la combinación de IL-7, 15 y 21, que en los tratados con IL-2.
- Las células obtenidas en los cultivos con la combinación de IL-7, 15 y 21 tendrán una mayor capacidad mitocondrial (i.e. potencial de membrana), que aquellas obtenidas en los cultivos tratados con IL-2.
- Habrá una expansión de células Tfh y Tscm en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico.
- La expansión de células en respuesta a la vacunación será mayor en adultos jóvenes que en adultos mayores.
- La funcionalidad de las células de los adultos jóvenes será mayor a la de los adultos mayores.

5.5. Resumen ejecutivo de la metodología.

Con el fin de lograr los objetivos propuestos, el diseño experimental tuvo las siguientes seis actividades:

Primera: se obtuvieron PBMCs de las unidades de sangre donadas por el IDCBIS y por medio de citometría de flujo se determinaron los porcentajes de LT CD4, así como de las cuatro subpoblaciones de memoria de estas células: vírgenes (CD45RA⁺CD62L⁺CCR7⁺), memoria central (CD45RA⁻CD62L⁺ CCR7⁺), efectoras de memoria (CD45RA⁻CD62L⁻CCR7⁻), y terminalmente diferenciadas (CD45RA⁺CD62L⁻ CCR7⁻) para los cultivos iniciados con LT vírgenes. Luego, con base en estos porcentajes se extrapoló el número de células necesarias para obtener el número de células vírgenes requeridas para los cultivos. El resto de las células fueron crio preservadas, primero a -70°C y después de dos días, se transfirieron a nitrógeno líquido. Para la separación de las células T CD4 vírgenes, se hizo un enriquecimiento de la fracción negativa por separación magnética. Posterior al enriquecimiento, las células fueron contadas, se medió su viabilidad y se confirmó su fenotipo por citometría de flujo para iniciar los cultivos.

Segunda, las células CD4 vírgenes fueron estimuladas con perlas acopladas a anticuerpos agonistas de CD2, CD3 y CD28, y luego se empezaron los cultivos con las diferentes combinaciones de citoquinas: (i) sin citoquinas; (ii) IL-2 (10 U/ml); (iii) IL-2 (100 U/ml); (iv) IL-2 (300 u/ml); (v) IL-21 (10 ng/ml); IL-7 e IL-15 (10 ng/ml); (vi) IL-7 e IL-21 (10 ng/ml); (vii) IL-15 e IL-21 (10 ng/ml); (viii) IL-7, IL-15 e IL-21 (10 ng/ml). Adicionalmente, se contó con un control con solo citoquinas y células sin estimular. Las células fueron contadas y su viabilidad evaluada a los días 4, 7, 10 y 15 de los cultivos, y en estos puntos también se les cambió el medio, adicionando las citoquinas correspondientes. Al día 0 y 15 de los cultivos se evaluó el fenotipo de memoria (CCR7, CD45RA y CD95), marcadores de células Tfh (CXCR5, PD-1, ICOS) y receptores de citoquinas de la familia gamma común (CD25 y CD127). Al día 15, se detuvieron los cultivos.

Tercera, PBMCs obtenidas de donantes sanas/os vacunados de dos grupos demográficos se obtuvieron al día 0, 11 y 21 respecto a la primera dosis de la vacuna antitetánica. Las células fueron crio preservadas hasta obtener todas las muestras. Para los experimentos, las células fueron descongeladas y su viabilidad fue medida por azul de tripano. Las células fueron estimuladas con TT durante 24 horas, con PMA + Ionominica durante 6 horas o se dejaron sin estimular. Para los tres casos se determinó los LT CD4 (CD3, CD4), memoria (CD45RA, CCR7, CD95) fenotipo folicular (CXCR5, PD-1, ICOS) y grado de activación (IL-21, CD40L, Bcl-6, CXCR3). Asimismo, los títulos de anticuerpos se establecieron por una prueba ELISA en los tres puntos de tiempo. Para el panel de citometría se realizó el control de Fluorescencia menos uno (Figura S1)

Cuarta, a través de análisis *in-silico* del transcriptoma completo de estas subpoblaciones celulares (Tscm, Tcm, Tem y Tfh) disponibles en bases de datos públicas se determinaron vías de señalización relacionadas con la activación de los receptores de citoquinas de la familia gama común (STAT3 y 5), vías asociadas con el fenotipo folicular (Bcl-6 y NFAT) y vías asociadas con la capacidad de autorrenovación de las células (Wnt- β -Catenina y Lef1). La comparación se hizo por análisis de enriquecimiento de genes (GSEA), que permite comparar dos poblaciones, por lo cual fue necesario hacer múltiples comparaciones.

Quinta, bajo la hipótesis que las células de memoria, especialmente las células “*stem*”, tienen un metabolismo basado en fosforilación oxidativa y por ende cuentan con una mayor tasa de respiración mitocondrial que su contraparte efectora, se midió en las células obtenidas al día 15 de los cultivos el potencial de membrana mitocondrial. Esta medición se hizo por medio de citometría de flujo, utilizando MitoTracker para la medición del potencial mitocondrial de estas células. Asimismo, se hizo un análisis GSEA de rutas metabólicas de glicólisis y FAO.

Sexta, teniendo en cuenta que para las muestras se usaron paneles multicolor, se hicieron análisis multiparamétricos no supervisados usando dos Softwares de citometría de flujo: CITRUS y FlowSOM. De igual manera, se realizaron pruebas

estadísticas con el fin de encontrar diferencias significativas de los parámetros medidos.

5.6. Metodología detallada y actividades para alcanzar cada objetivo específico:

5.6.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Establecer condiciones de cultivo *in-vitro*, que permitan una expansión de LTscm a partir de células vírgenes.

ACTIVIDAD 1: Aislamiento de linfocitos T CD4 vírgenes:

Para dar inicio con los cultivos con las distintas combinaciones de citoquinas, primero se necesitó el aislamiento de las células CD4 vírgenes. Para ello, se obtuvieron PBMCs de las unidades del IDCBIS. El contenido de las unidades fue transferido de a 30 ml de sangre a tubos tipo Falcon para centrífuga de 50 ml, y se llevaron hasta 45 ml con solución salina estéril. Se centrifugaron a 700g durante 7 minutos sin freno, para separar el plasma y el anticoagulante de los leucocitos. Se repitió este procedimiento hasta que la fracción del plasma se vio transparente, indicando que ya se había removido todo el anticoagulante de la muestra. Una vez se observó esto, se recuperó la fracción intermedia, correspondiente a los leucocitos y se agregó la misma cantidad de medio incompleto (RPMI1640) del volumen que fue recuperado. Posteriormente, en otro tubo se agregó la misma cantidad de Ficoll® y la sangre fue servida, evitando que se combinaran las distintas fracciones. Se volvió a centrifugar a 700g durante 40 minutos sin freno. Por último, se desechó la primera fracción (plasma y células polimorfonucleares) y se recibió en otro tubo el anillo de PBMCs. Se hizo un último lavado con medio incompleto, y se procedió a contar y evaluar la viabilidad de las células por exclusión de azul de tripano.

Se tomó una alícuota de 5×10^5 células y se marcó con anticuerpos contra CD4, CD62L y CD45RA fluoromarcados. En 50 μ l de volumen, se agregaron los anticuerpos y se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Se hizo un lavado con PBS,

se resuspendieron las células en 200 μ l de PBS y se adquirieron los datos en un FACSAriaIIIu BD. Una vez se conoció el porcentaje de células vírgenes ($CD4^+CD62L^+CD45RA^+$), se extrapolaó el número de PBMCs necesarias para obtener un mínimo de 1×10^7 linfocitos T CD4 vírgenes para los cultivos, y el resto de las PBMCs fueron crio-preservadas en crioviales de 1,8 ml en medio AIM-V (50%), SFB (40%) y DMSO (10%), por dos noches a -70°C y luego en nitrógeno líquido.

Las PBMCs para enriquecimiento de la fracción virgen fueron lavadas y resuspendidas en 1 ml/5 $\times 10^7$ células de Buffer de separación (PBS, 2% SFB y 1mM EDTA) en un tubo de poliestireno de 5 ml de fondo redondo. Se agregaron 50 μ l/5 $\times 10^7$ células del cóctel de aislamiento de células CD4 vírgenes (cóctel de anticuerpos biotinados contra otras poblaciones celulares: CD8, CD56, CD14, CD16, CD20; y marcadores de memoria CD45RO) y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego, se agregaron 50 μ l/5 $\times 10^7$ células de perlas magnéticas acopladas a anti-biotina y se completó un volumen final de 2,5 ml con el buffer de separación, incubando temperatura ambiente durante 5 minutos en el imán de separación. Pasado el tiempo de incubación, se invirtió el contenido del tubo del magneto en otro tubo de 5 ml, el cual fue nuevamente incubado a temperatura ambiente en el imán por otros tres minutos. Luego, se recibió en un tercer tubo de 5 ml, y se obtuvo la fracción enriquecida. Por último, se lavó con medio libre de suero (AIM-V) y se contaron las células obtenidas de la fracción negativa, correspondiente a linfocitos T CD4 vírgenes.

ACTIVIDAD 2: Cultivos de linfocitos T CD4 vírgenes con combinación de diferentes citoquinas y evaluación de su fenotipo a los 15 días de los cultivos:

Para la expansión de las células T “stem” de memoria, las células CD4 T vírgenes aisladas de las/os donantes sanas/os se estimularon con perlas magnéticas acopladas a anti-CD2/CD3 y CD28 en una relación linfocitos:perlas de 2:1, se sembraron en platos de 24 pozos en 500 μ l de medio libre de suero en una

concentración de $2,5 \times 10^5$ células y se les adicionó las siguientes combinaciones de citoquinas:

- IL-2 (10 U/ml)
- IL-2 (100 U/ml)
- IL-2 (300 U/ml)
- IL-21 (10 ng/ml)
- IL-7 + IL-15 (10 ng/ml c/u)
- IL-7 + IL-21 (10 ng/ml c/u)
- IL-15 + IL-21 (10 ng/ml c/u)
- IL-7 + IL-15 + IL-21 (10 ng/ml c/u)

Además de esto, se tuvieron dos tratamientos adicionales que correspondieron a solo las perlas y a solo citoquinas sin estimulación del CD3 y CD28. Para cada uno de los tratamientos propuestos se tuvieron 4 réplicas, y se contó el número de células, así como la viabilidad de los cultivos a los días 4, 7, 10 y 15 por exclusión de azul de tripano. Adicionalmente, al día 15 se hizo la evaluación del fenotipo de memoria (CD45RA, CCR7 y CD95), y de receptores de citoquinas de la familia gamma común (CD25 y CD127).

Para la citometría, se cosecharon 1×10^6 células de los pozos en tubos de 5 ml. Se lavaron las células en 1 ml de PBS, y se resuspendieron en 50 μ l de PBS para agregar el cóctel de anticuerpos. El panel de citometría con sus respectivos fluoróforos para este primer set experimental fue el siguiente:

Anticuerpo	Fluoróforo	Cantidad
CD4	BV510	3 μ l
CCR7	FITC	4 μ l
CD45RA	APC-Cy7	4 μ l
CD95	Alexa 647	4 μ l
CXCR5	PE-Cy7	4 μ l
PD-1	PerCP Cy5.5	4 μ l
ICOS	PE	1 μ l

CD127	eFluor 450	5 μ l
CD25	Alexa 700	4 μ l

Tabla 2. Panel de anticuerpos para la fenotipificación de las células al día 0 y 15 de los cultivos. Las cantidades en la tabla son producto de titulaciones realizadas previamente en el laboratorio.

Los anticuerpos se dejaron incubando a 4°C durante 20 minutos. Se volvieron a lavar las células con PBS, se resuspendieron en 200 μ l de PBS y se adquirieron 100.000 eventos en un citómetro FACSAriaIIIu. Los datos fueron analizados en el Software FlowJo para el análisis de las poblaciones celulares y la expresión de los marcadores evaluados.

5.6.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Evaluar la relación entre el fenotipo T Folicular Helper y la diferenciación de LTscm.

ACTIVIDAD 3: Evaluación de proteínas y vías de señalización asociados comúnmente al fenotipo folicular.

Para esto, las células obtenidas al día 15 de los cultivos también fueron teñidas con anticuerpos para determinar la expresión asociados al fenotipo folicular como CXCR5, PD-1 y ICOS (Tabla 2). La expresión y co-expresión de estos marcadores se comparó entre todas las condiciones de cultivo para poder explorar qué combinación de citoquinas inducía de forma más potente este fenotipo.

Adicionalmente, se obtuvieron muestras de adultos vacunados con TT. Las muestras se obtuvieron en dos cohortes, cada una compuesta por 5 adultos jóvenes (18-30 años) y 5 adultos mayores (>60 años). Los datos demográficos de las personas se encuentran consignadas en la tabla suplementaria 1. Las PBMCs se aislaron de igual forma que en la actividad 1. Todas las células fueron criopreservadas hasta obtener las tres muestras de cada donante para los experimentos consecuentes.

Para ambas cohortes, las PBMCs de cada individuo se descongelaron, y 5×10^5 células por tratamiento fueron estimuladas en platos de 96 pozos de fondo en U durante 24 horas a 37°C con 20 μ g/mL de Toxoide Tetánico (Statens Serum Institute); 25 ng/mL de PMA (Sigma Aldrich) y 1 μ g/mL de Ionomicina (Sigma

Aldrich), o se dejaron sin estimular como control. Pasadas dos horas de la estimulación, 5µg/mL de Brefeldina A (Invitrogen) fueron agregados. La marcación con los anticuerpos de superficie se hizo en el medio de estimulación durante 15 minutos a 4°C, y se procedió a la fijación y permeabilización de las células para la tinción intracelular. Las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences), y para la marcación intracelular se usaron los siguientes anticuerpos: CD154-PE (24-31, eBioscience); e IL-21-Alexa 647 (3A3-N2.1, BD Biosciences).

Anticuerpo	Fluoróforo	Cantidad
CD3	Pacific Blue	4 µl
CD4	BV 510	4 µl
CD45RA	APC-Cy7	4 µl
CCR7	FITC	4 µl
CXCR5	PE-Cy7	4 µl
PD-1	PerCP Cy5.5	4 µl
ICOS	Alexa 700	4 µl
IL-21	Alexa 647	5 µl
CD154	PE	2 µl

Tabla 3. Panel de anticuerpos para la fenotipificación de primera cohorte de donantes vacunadas/os con TT. Las cantidades en la tabla son producto de titulaciones realizadas previamente en el laboratorio.

Para esta cohorte se realizó también la medición de los anticuerpos en suero. Para ello, platos de 96 pozos de fondo plano Maxisorp™ (Sigma Aldrich) fueron cubiertos con 5 µg/mL de TT en 0.1M de Buffer Carbonatado (pH 9) y se dejó incubando por 24 horas a 4°C. Al día siguiente, se bloqueó con SFB al 1% y se dejó incubando a 37°C durante 2 horas. Luego, se agregaron las muestras de suero de los tres días y los anticuerpos fueron detectados con Anti-Human IgG Peroxidase (Sigma).

Para la segunda cohorte, se implementó el mismo diseño experimental que para la primer cohorte, pero los anticuerpos utilizados incluyeron CD95, Bcl-6 y CXCR3 para poder evaluar una mayor cantidad de marcadores asociados al fenotipo folicular (Tabla 4).

Anticuerpo	Fluoróforo	Cantidad
CD3	Pacific Blue	4 µl
CD4	BV 510	4 µl
CD45RA	APC-Cy7	4 µl
CCR7	FITC	4 µl
CXCR5	PE-Cy7	4 µl
PD-1	PerCP Cy5.5	4 µl
ICOS	Alexa 700	4 µl
CD95	Alexa 647	4 µl
CXCR3	BV 650	4 µl
Bcl-6	PE-Dazzle	2 µl

Tabla 4. Panel de anticuerpos para la fenotipificación de segunda cohorte de donantes vacunadas/os con TT. Las cantidades en la tabla son producto de titulaciones realizadas previamente en el laboratorio.

ACTIVIDAD 4: Análisis de enriquecimiento de genes GSEA

Para esto, se buscó el transcriptoma de las poblaciones de interés en la base de GSEA. Para las Tfh se encontró el transcriptoma completo código GSE130793 (76) secuenciado con Illumina NextSeq 500. Para las subpoblaciones de memoria, se encontró el transcriptoma completo con código GSE143215 (77) secuenciado con Illumina HiSeq 2000. Los datos de transcriptoma de las poblaciones fueron descargados y normalizados de acuerdo con el software del GSEA. Posteriormente se descargaron las vías de interés: STAT5 (M5947), STAT3 (M5897), Wnt-β-Catenina (M5895), Lef1 (M3572), Bcl-6 (M29904), NFAT (M2288), FAO (M5935), mTORC1 (M5924), ROS (M5938), Glicólisis (M5937). El transcriptoma normalizado y la vía correspondiente eran lo *inputs* del software, que después del análisis arrojó la gráfica de enriquecimiento, un mapa de calor de los genes enriquecidos y los valores de cada gen (Anexo II).

5.6.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Determinar la actividad mitocondrial a través de la medición del potencial de membrana mitocondrial de las células obtenidas en los diferentes cultivos.

ACTIVIDAD 5: Evaluación del potencial de membrana mitocondrial de los cultivos al día 15 de la expansión.

A partir de las células al día 15 de los cultivos, se guardaron unas células, las cuales fueron teñidas con MitoTracker™ RED CMXRos, y se evaluó la tinción de esta sonda por citometría de flujo. La tinción con MitoTracker™ se basa en los motivos clorometilo reactivos a tioles que éste posee, y su acumulación en la mitocondria depende de la cantidad de grupos tiol, los que están aumentados en mitocondrias con una alta capacidad reductora. La marcación con esta sonda se realizó previo a la marcación con el panel de la Tabla 1. Brevemente, se cosecharon las células en tubos de 5 ml, se lavaron en PBS, se agregó la sonda para lograr una concentración final de 100 nM y se dejó incubando a 37°C durante 20 minutos. Se lavaron y resuspendieron en 50 µl de PBS, se hizo la tinción como ya se describió en la primera actividad y se adquirieron 100.000 eventos por experimento en un citómetro FACSAriaIIIu.

5.7. Colección y análisis de datos:

La información obtenida de citometría de flujo será analizada con la herramienta FlowJo (Trestar). Los resultados fueron organizados en una base de datos conteniendo los porcentajes de las diferentes poblaciones y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de cada marcador. Los datos fueron normalizados basados en los cultivos control.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software Graphpad Prism v7. Las comparaciones entre los diferentes tiempos se hicieron usando la prueba de medidas repetidas de Friedman con el análisis post-hoc de Dunn. Para los análisis entre grupos se usaron las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, según correspondía. Para los análisis de subpoblaciones de memoria entre los cultivos se hicieron pruebas ANOVA de dos vías. Las diferencias significativas se señalan en las gráficas y los valores se consignaron en las leyendas de las figuras y tablas.

5.8. Sitio de investigación y manejo de sustancias o especímenes biológicos:

El sitio de investigación fue el Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Los experimentos propuestos en el desarrollo del trabajo fueron experimentos *in-vitro*. Los reactivos y materiales necesarios para su desarrollo no revisten peligro mayor para la salud humana. El manejo de desechos y residuos tanto químicos como biológicos que se generaron se hizo de acuerdo con los estándares establecidos para la protección del medio ambiente y siguiendo las normativas de bio-seguridad y protección de individuos que participan en actividades de investigación tanto en el Laboratorio de Equipos Comunes ubicado en el tercer piso (Edificio 471) de la Facultad de Medicina en Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia.

6. Resultados

6.1.1. La expansión de linfocitos partiendo de PBMCs decae después del décimo día de cultivo.

Alcanzar grande número de LT antitumorales partiendo de células autólogas de los pacientes es uno de los mayores retos de la TAC como herramienta de inmunoterapia (20). Debido a que el uso de PBMCs para amplificar LT antígeno-específicos ha sido propuesto como una opción rápida y de bajo costo, los primeros

cultivos se hicieron con $2,5 \times 10^5$ PBMCs/pozo en medio AIMV libre de suero y las células fueron estimuladas con perlas acopladas a anticuerpos agonistas de CD2, CD3, y CD28.

Los cultivos fueron suplementados con tres concentraciones de IL-2: alta (300 U/ml), intermedia (100 U/ml) y baja (10 U/ml) (Figura S2) con el fin de monitorear el grado de diferenciación de los LT en las diferentes subpoblaciones de memoria (i.e. EM o EMRA), descritas previamente por otros autores (9, 10). Adicionalmente, una combinación de IL-7, IL-15 e IL-21 (c/u a 10 ng/ml), fue utilizada con el fin de comparar el grado de expansión y el fenotipo de memoria de los LT expandidos al día 15 de cultivo en presencia de estas tres citoquinas.

Como era de esperarse, se observó un punto máximo de expansión al séptimo día del cultivo (Figura 3A), lo que corresponde al pico de respuesta a un estímulo primario (18). Sin embargo, tanto las células que sólo recibieron el estímulo policlonal en ausencia de citoquinas como las que fueron cultivadas en medio suplementado con distintas concentraciones de IL-2, o en presencia de IL-7, IL-15 e IL-21, decayeron en número a partir del décimo día, al punto que al día 15 se registró un número de células menor al de las células cultivadas al día 0. Al evaluar la viabilidad de las células al día 15 de los cultivos (Tabla 5, Figura 3B), se encontró que desde el día 10, alrededor del 20% de las células tenían comprometida la integridad de su membrana celular, y al día 15 todos los cultivos exhibían una viabilidad inferior al 60%. Por este motivo, se decidió realizar el análisis del perfil de memoria de los diferentes cultivos al día 7.

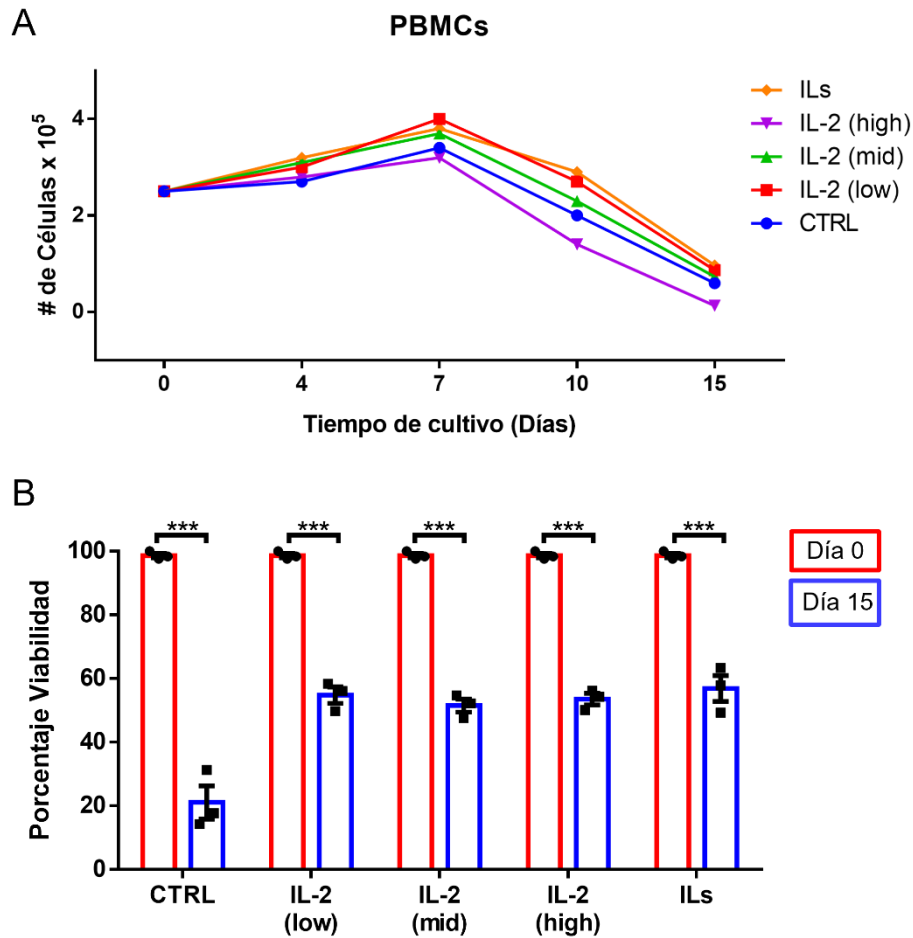


Figura 3. Expansión y viabilidad de PBMCs totales durante 15 días con un estímulo policlonal. 2.5×10^5 PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 15 días en ausencia (CTRL) o presencia de IL-2 en tres diferentes concentraciones (low, 10; mid, 100; o high, 300 u/ml) o de IL-7, IL-15 e IL-21 (c/u a 10 ng/ml). **(A)** Número de células y **(B)** Viabilidad celular medida cada 3-4 días por exclusión de azul de tripano. $n = 3$. Las barras corresponden a promedio + SEM. ANOVA de dos vías. *** <0.0001 .

Para la determinación de la memoria, se comparó el uso de CCR7 y CD62L y se encontró que la expresión de CD62L se retenía por más tiempo (Figura S3), razón por la cual se decidió medir el grado de expresión de los marcadores CD45RA y CCR7 para monitorear la expansión de las cuatro poblaciones de memoria: Vírgenes (*Naive*, CD45RA⁺CCR7⁺), Memoria Central (CM, CD45RA⁻CCR7⁺), Efectoras de Memoria (EM, CD45RA⁻CCR7⁻), Efectoras terminalmente diferenciadas (EMRA, CD45RA⁺CCR7⁻) (Figura S2). Estos análisis revelaron que,

en el pico de expansión, la mayoría de las células, tanto CD4 como CD8, tenían un fenotipo EM, lo que podría estar explicando la corta vida media de las células expandidas (Figura 4).

Tratamiento	Día 0	Día 4	Día 7	Día 10	Día 15
CTRL	98,67 +/- 1,22	92,67 +/- 3,51	84,63 +/- 5,61	59,3 +/- 8,94	21,1 +/- 8,99
IL-2 (<i>low</i>)	98,67 +/- 1,22	95,17 +/- 1,08	88,67 +/- 4,31	76,7 +/- 6	54,77 +/- 4,45
IL-2 (<i>mid</i>)	98,67 +/- 1,22	95,83 +/- 2,25	91,93 +/- 0,46	80,67 +/- 4,35	51,5 +/- 3,6
IL-2 (<i>high</i>)	98,67 +/- 1,22	95,9 +/- 2,64	91,93 +/- 1,68	76,37 +/- 5,49	53,53 +/- 3,12
ILs	98,67 +/- 1,22	96,27 +/- 1,86	91,3 +/- 1,17	80,27 +/- 5,96	56,87 +/- 7,11

Tabla 5. Expansión y viabilidad de LT presentes en PBMCs totales estimuladas con un estímulo policlonal durante 15 días en presencia de citoquinas exógenas. 2,5 x10⁵ PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 15 días en ausencia (CTRL) o presencia de IL-2 (*low*, *mid*, o *high*) o de IL-7, IL-15 e IL-21 (ILs, c/u a 10 ng/ml). La viabilidad se midió por exclusión de azul de tripano. n = 3. Promedio +/- desviación estándar.

En el caso de los LT CD4, el cultivo de las PBMCs con IL-7/15/21 experimentó un aumento en el porcentaje de LT CD4 de memoria central respecto al cultivo control (CTRL) sin citoquinas y al cultivo con una alta concentración de IL-2 (IL-2 *high*) (Tabla 6A). Asimismo, las células cultivadas en presencia de esta combinación de citoquinas también mostraron una disminución de células EM frente a las células cultivadas sin citoquinas (CTR) o células cultivadas con diferentes concentraciones de IL-2 (ver EM en Tabla 6B).

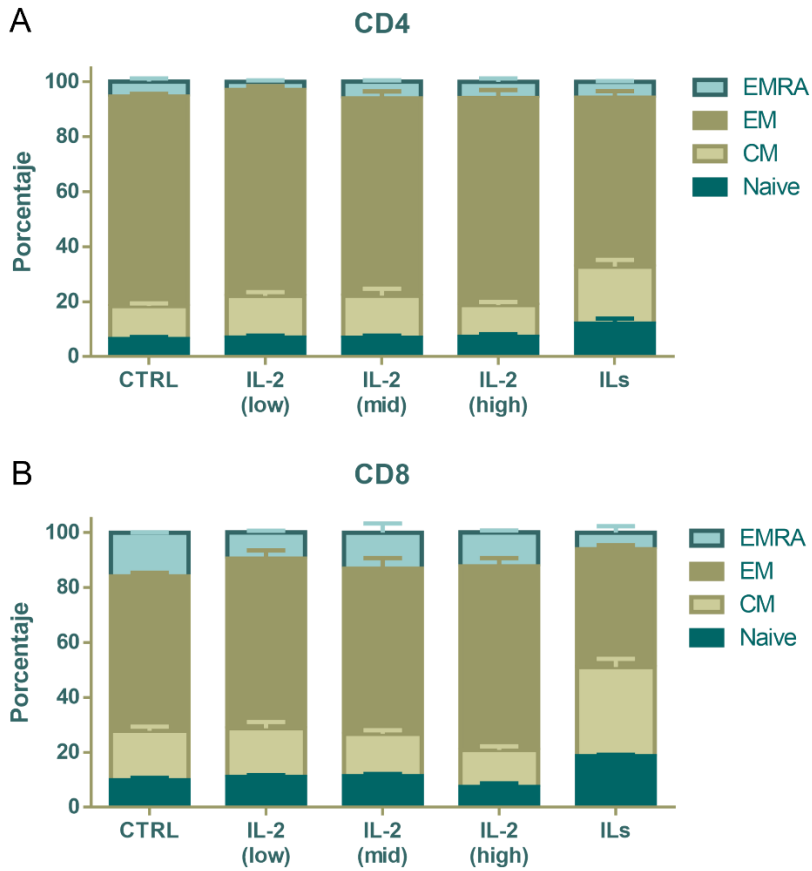


Figura 4. Perfil de memoria de LT al día 7 de los cultivos. $2,5 \times 10^5$ PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 7 días en ausencia (CTRL) o presencia de distintas concentraciones de IL-2 o de IL-7, IL-15 e IL-21. Porcentaje de las 4 subpoblaciones de memoria: Naive ($CD45RA^+CCR7^+$); Memoria Central (CM, $CD45RA^-CCR7^+$); Memoria Efectora (EM, $CD45RA^-CCR7^-$); Efectoras (EMRA, $CD45RA^+CCR7^-$) medido por citometría de flujo en **(A)** LT CD4 y **(B)** LT CD8. $n=3$. Las barras corresponden al promedio + SEM.

A

CM	CTRL	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	ILs
CTRL					
IL-2 (low)	_____				
IL-2 (mid)	_____	_____			
IL-2 (high)	_____	_____	_____		
ILs ↑	**	_____	_____	**	

B

EM	CTRL	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	ILs
CTRL					
IL-2 (low)	_____				
IL-2 (mid)	_____	_____			
IL-2 (high)	_____	_____	_____		
ILs ↓	****	****	***	****	

Tabla 6. Perfil de memoria de LT CD4 al día 7 de los cultivos. ANOVA de dos vías de porcentajes de subpoblaciones en LT CD4 de **(A)** Memoria central (CM) y **(B)** Memoria efectora (EM) entre los distintos tratamientos. $2,5 \times 10^5$ PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 7 días en ausencia (CTRL) o en la presencia de IL-2 (low, mid, o high) o de IL-7, IL-15 e IL-21. n=3. ANOVA de dos vías. *** <0.001; **** <0.0001 Los cambios no significativos se representan con una línea.

Por otro lado, la distribución del fenotipo de LT CD8 fue más heterogénea que la de los LT CD4. En las células cultivadas con IL-7/15/21, el porcentaje de LT CD8 con fenotipo virgen aumentó comparado con el cultivo control y las células cultivadas en una alta concentración de IL-2 (Tabla 7A). Por su parte, la IL-7/15/21 aumentó, con respecto a todos los demás cultivos, el porcentaje de células CM (Tablas 7B) y disminuyó tanto el porcentaje de células EM (Tabla 7C) como el de células

terminalmente diferenciadas, pero sólo con respecto al cultivo control sin citoquinas (Tabla 7D). En conjunto, estos resultados demuestran que la combinación de estas tres citoquinas disminuye el grado de diferenciación tanto de los linfocitos T CD4 como de los CD8.

A						B					
Naive	CTRL	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	ILs	CM	CTRL	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	ILs
CTRL						CTRL					
IL-2 (low)	—					IL-2 (low)	—				
IL-2 (mid)	—	—				IL-2 (mid)	—	—			
IL-2 (high)	—	—	—			IL-2 (high)	—	—	—		
ILs ↑	*	—	—	**		ILs ↑	****	****	****	****	

C						D					
EM	CTRL	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	ILs	EMRA	CTRL	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	ILs
CTRL						CTRL					
IL-2 (low)	—					IL-2 (low)	—				
IL-2 (mid)	—	—				IL-2 (mid)	—	—			
IL-2 (high) ↑	**	—	—			IL-2 (high)	—	—	—		
ILs ↓	***	****	****	****		ILs ↓	**	—	—	—	

Tabla 7. Perfil de memoria de LT CD8 al día 7 de los cultivos. ANOVA de dos vías de porcentajes de subpoblaciones en LT CD8 (A) *Naive*, (B) Memoria central (CM), (C) Memoria efectora (EM) y (D) Efectoras (EMRA) entre los distintos tratamientos. $2,5 \times 10^5$ PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 7 días en ausencia (CTRL) o presencia de diferentes concentraciones de IL-2 o de IL-7, IL-15 e IL-21 (ILs). n=3. ANOVA de dos vías. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001. Los cambios no significativos se representan con una línea.

6.1.2. Una estimulación continua induce la expresión del eje PD-1/PD-L1 tanto en linfocitos T como en células presentadoras de antígeno.

Mientras que la activación de los linfocitos T está mediada por la estimulación del TCR (señal 1) y la activación de CD28 (señal 2) por moléculas co-estimuladoras de la familia B7 expresadas en las APCs (B7.1; B7.2 también llamadas CD80 y CD86,

respectivamente), su inhibición está mediada por moléculas también pertenecientes a la familia B7 (CTLA-4, PD-1 y sus ligandos: PD-L1/2), a las que se les conoce como proteínas de “punto de control” (78). PD-1 se expresa en LTs CD4, CD8, LBs, monocitos, NKs y DCs. En LT, la expresión de PD-1 puede ser inducida por las citoquinas pertenecientes a la familia gamma común y la interacción con sus ligandos, presentes en las células estromales, resulta en la inducción de apoptosis en los LTs, con lo cual se modula la respuesta de activación en estas células (79).

La expresión de PD-1 y PD-L1 en LTs y APCs fue medida al día 10 de los cultivos, con el fin de evaluar si la expresión al alza de estas proteínas posterior a la estimulación de los LT podría explicar la disminución en número de células detectada al décimo día. En el caso de los cultivos que fueron tratados con una alta concentración de IL-2, la baja cantidad de células no permitió hacer la medición de estas proteínas y por eso fueron excluidas de este análisis.

En el caso de PD-1, sin importar el tratamiento, se pudo observar tanto en LT CD4 (Figura 5A) como en CD8 (Figura 5B), un incremento significativo de su expresión asociada a la activación de las células. Es importante notar que la mera adición de las citoquinas no fue suficiente para inducir la expresión de esta proteína. En el caso de los LT CD4, la expresión de esta proteína aumentó, con respecto a los demás cultivos, en células cultivadas en IL-7/IL-15/IL-21.

La medición de PD-1 en APCs reveló en linfocitos B un comportamiento similar, salvo en el cultivo con IL-7, IL-15 e IL-21, en donde la expresión de PD-1 respecto a los demás cultivos estimulados fue significativamente menor (Figura 5C). En monocitos, en todos los cultivos se observó un aumento de la proteína PD-1 con la activación y el tratamiento con citoquinas disminuyó el nivel de expresión de esta proteína en células activadas (Figura 5D). En los cultivos con IL-2, sin estimulación con perlas, se observó un discreto aumento, no significativo, de la expresión de PD-1. Es importante resaltar que un estímulo dirigido a los LT resultó en una mayor expresión de PD-1 en células presentadoras de antígeno (LBs y monocitos) que en los mismos linfocitos T.

La expresión constitutiva de PD-L1 en linfocitos T periféricos murinos ha sido reportada (80) por lo que también se evaluó su expresión en células CD4 y CD8 humanas. La expresión basal previa a la estimulación fue nula en presencia o ausencia de las diferentes citoquinas y la estimulación de las células indujo un aumento significativo, pero en una magnitud menor en los linfocitos CD4 (Figura 6A) y CD8 (Figura 6B) comparado a los niveles observados en APCs (Figura 6C y 6D). En los cultivos con la combinación de IL-7/15/21 se detectó la menor expresión de PD-L1 en LT CD4 y LT CD8, en comparación a los demás cultivos.

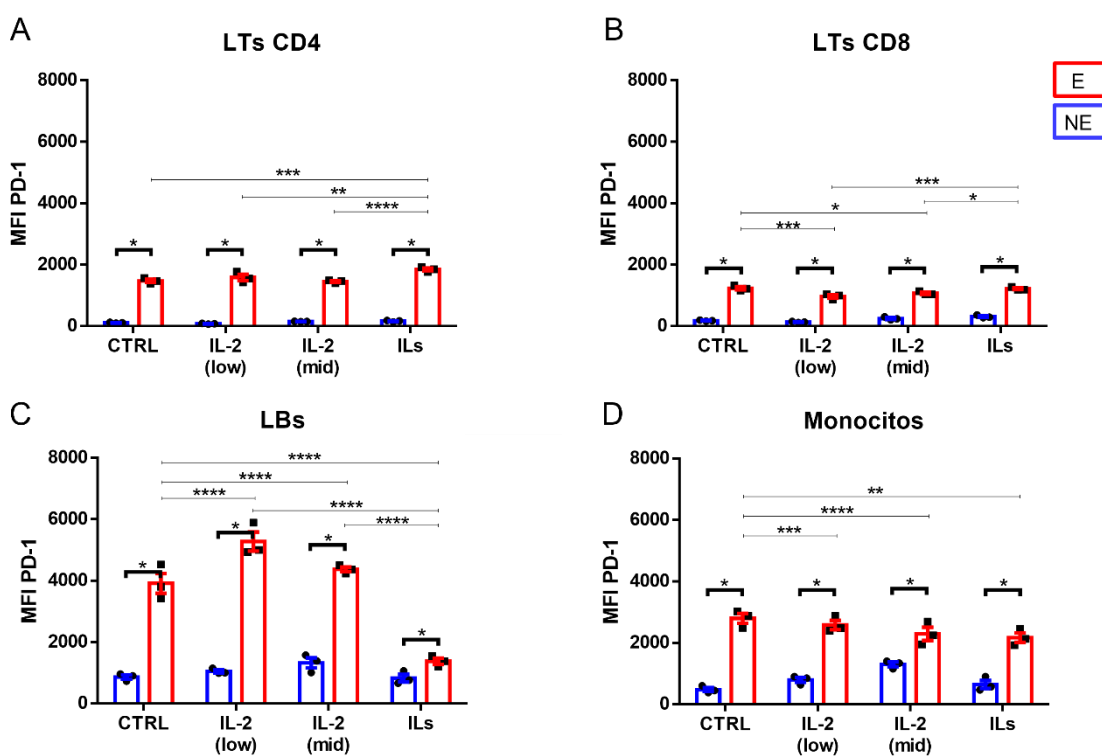


Figura 5. Expresión PD-1 en LT y APCs 10 días después de un estímulo policlonal. $2,5 \times 10^5$ PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con (E) o sin perlas (NE) anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 10 días en ausencia (CTRL) o presencia de IL-2 (low, mid) o de IL-7, IL-15 e IL-21. Expresión de PD-1 por citometría de flujo al día 10 del cultivo, en (A) LT CD4, (B) LT CD8, (C) LBs y (D) Monocitos. $n=3$. ANOVA de dos vías. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001 . Las barras corresponden a promedio + SEM.

En las APCs, la expresión de PD-L1 fue diferente; en linfocitos B la estimulación policlonal generó en todos los tratamientos un incremento importante de la

expresión de PD-L1. Sin embargo, se detectó una expresión basal de esta proteína aún en ausencia de estímulo con perlas anti-CD2/CD3/CD28 la cual tiende a disminuir en presencia de IL-2 o de la combinación de IL-7/15/21, siendo la combinación de estas tres citoquinas el tratamiento que indujo la menor expresión de PD-L1 en LB de los cultivos estimulados (Figura 6C).

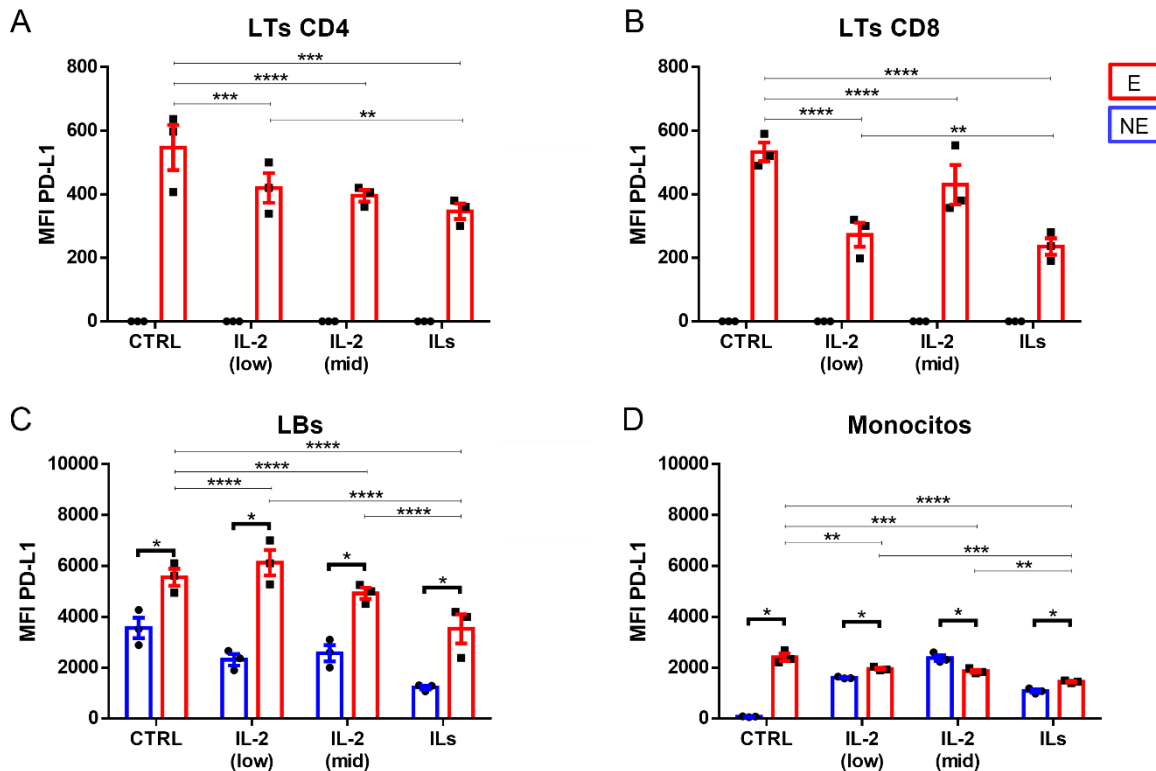


Figura 6. Expresión PD-L1 en LT y APCs 10 días después de un estímulo policlonal. 2.5×10^5 PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con (E) o sin (NE) perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 10 días en ausencia (CTRL) o presencia de IL-2 (low, o mid) o de IL-7, IL-15 e IL-21. La expresión de PD-L1 se midió al día 10 del cultivo, en LT (A) CD4, (B) CD8, (C) LBs y (D) Monocitos. $n=3$. ANOVA de dos vías. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001 . Las barras corresponden a promedio + SEM.

En monocitos, a diferencia de los LBs, se encontró una expresión basal baja de PD-L1, que aumentó significativamente con la mera adición de las citoquinas exógenas (Figura 6D). En los cultivos estimulados en presencia de citoquinas, el incremento de PD-L1 en los monocitos inducido por la estimulación, se vio potenciado por la adición de las citoquinas salvo en el caso de la concentración intermedia de IL-2, en donde se observó una disminución de la expresión de PD-L1 (Figura 6D).

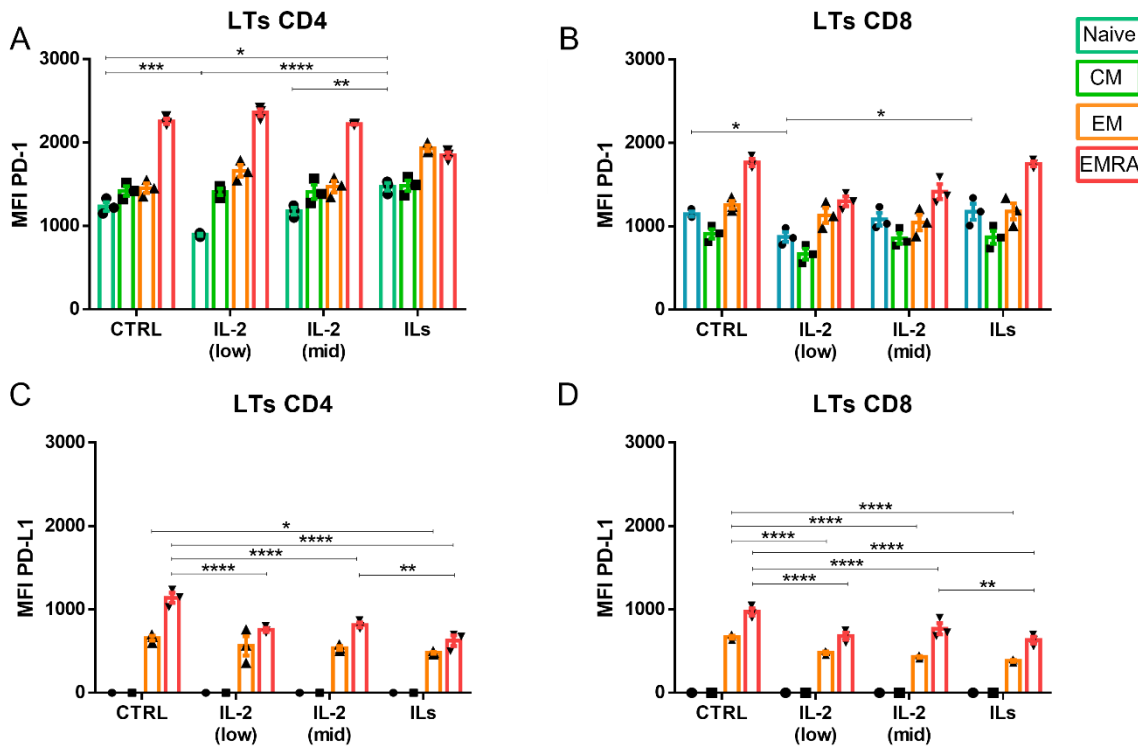


Figura 7. Expresión eje PD-1 en las subpoblaciones de memoria de LT 10 días después de un estímulo policlonal. 2.5×10^5 PBMCs totales de donantes jóvenes fueron estimuladas con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 10 días en ausencia (CTRL) o presencia de IL-2 (low, mid) o de IL-7, IL-15 e IL-21. La expresión de PD-1 y PD-L1 se midió por citometría de flujo en las 4 subpoblaciones de memoria en LT (A, C) CD4, y (B, D) CD8, respectivamente. $n=3$. ANOVA de dos vías. $* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.001$; $**** < 0.0001$. Las barras corresponden a promedio + SEM.

Posteriormente, se quiso ver si las diferentes subpoblaciones de memoria expresaban de manera diferencial PD-1 o PD-L1 en los respectivos cultivos. Como era de esperarse, la población terminalmente diferenciada tanto en CD4 (Figura 7A) como en CD8 (Figura 7B) fue la que más expresó PD-1, mientras que las células con fenotipo virgen y de memoria central fueron las que tuvieron una menor expresión de esta proteína. En cuanto a PD-L1 se encontró que su expresión se restringía a las subpoblaciones efectoras (Figura 7C y D) y aunque esta disminuía con la adición de cualquiera de las citoquinas, se mantenían niveles importantes de esta proteína en todos los cultivos.

Estos resultados en conjunto sugieren que la inducción de la expresión de PD-1 en los linfocitos T, acompañado de una alta expresión de su ligando PD-L1 tanto en LT como en monocitos y LBs podría estar afectando la expansión de las células. Particularmente, la expresión de PD-L1 en poblaciones más diferenciadas (EM y EMRA) podría ser un mecanismo de regulación establecido para inducir apoptosis y regulación de la inflamación después del pico de la respuesta. Debido a esto, se decidió partir de linfocitos vírgenes purificados, evitando así que la activación del eje PD-1, principalmente por la presencia de su ligando en APCs y en LT diferenciados, resulte en una regulación negativa posterior a un estímulo policlonal.

6.1.3. Las IL-7, IL-15 e IL-21 aumentan la expansión de linfocitos T.

La mayoría de los protocolos de expansión de LTscm se han centrado en LT CD8 (77), y se tiene muy poca información sobre esta subpoblación en CD4. Teniendo en cuenta que los linfocitos ayudadores son los responsables de regular la generación y el mantenimiento de la memoria y que, en su ausencia, la respuesta citotóxica se ve profundamente afectada (81), en este trabajo centramos el estudio en factores que determinan la diferenciación de LTscm en CD4. Para eso, células CD4 vírgenes fueron aisladas por separación magnética, y su pureza fue medida posterior al enriquecimiento (Figura S3). La medición por citometría de flujo de la expresión de distintos marcadores en estas células fue utilizada para monitorear la diferenciación de LT CD4 vírgenes en las distintas subpoblaciones de LT CD4 durante el cultivo (Figura S4). Para iniciar los cultivos se estableció un mínimo de 95% de pureza de los LT CD4 vírgenes (Figura 8).

Lo primero que se evaluó fue el efecto que tenían diferentes concentraciones de IL-2 en el número de células obtenidas al día 15 de los cultivos. Utilizando las concentraciones de IL-2 previamente establecidas se encontró que al día 15, en el cultivo al que se le adicionó la concentración intermedia de esta citoquina (100 U/ml) fue donde se obtuvo un mayor número de células totales (Figura 9A).

Posteriormente, basados en los hallazgos reportados tanto por Cieri (12) como por Álvarez-Fernández (52), se comparó la capacidad de expansión de la concentración

intermedia de la IL-2, con la combinación de IL-7, IL-15 e IL-21 (Figura 9B). De acuerdo con lo reportado por estos autores, se encontró que el uso de estas tres citoquinas aumentó significativamente el número de células obtenidas al día 15, pasando de 2×10^5 células a casi 4×10^6 células. Para poder determinar el efecto que cada una de estas citoquinas tenía en la expansión de los LT CD4, diferentes combinaciones de ellas fueron utilizadas (Figura 9C).

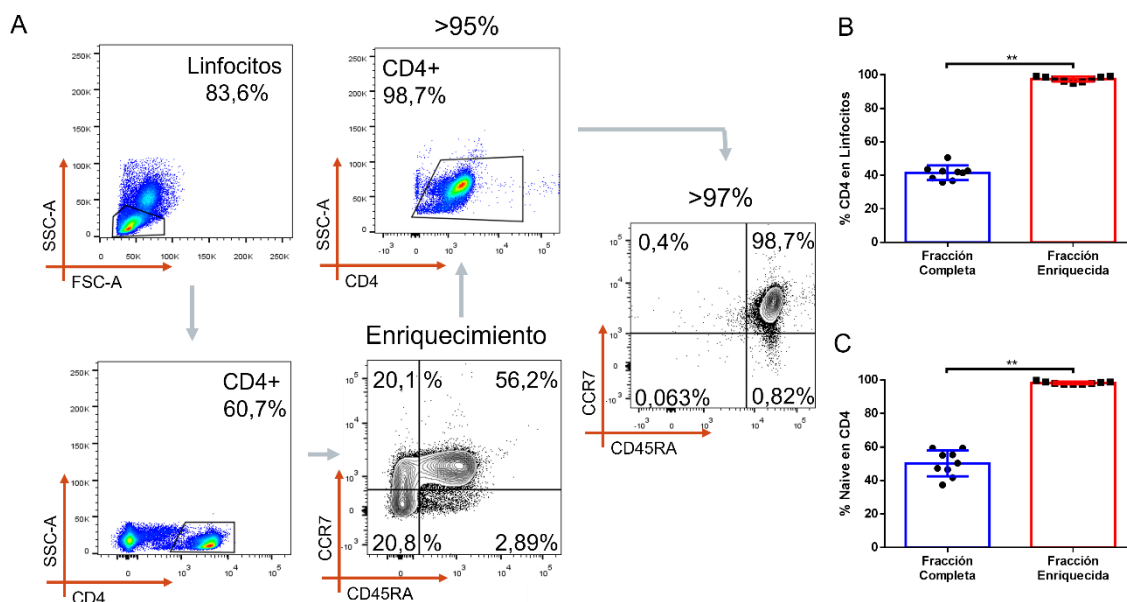


Figura 8. Estrategia de “gating” de enriquecimiento de la fracción naive de LT CD4. La pureza del enriquecimiento de la fracción *naive* se midió antes y después de la separación magnética por selección negativa. En (A) se muestra la estrategia de *gating* para definir el componente *naive*. Se obtuvieron, para todos los cultivos, una pureza >95% para (B) CD4, y >97% para (C) las *naive* (CCR7+CD45RA+). n=10. Test de Wilcoxon. Las barras corresponden al promedio + SEM. **= 0.0039.

En los cultivos con IL-15 se registraron números muy similares a los obtenidos con la combinación de las tres citoquinas (Figura 9B y C), siendo estos en donde se alcanzó el mayor número absoluto de células. Por otro lado, aquellos cultivos en donde se utilizó IL-7 e IL-21 o solo IL-21 no se logró la misma expansión alcanzada con las tres citoquinas, y los números registrados fueron similares a los obtenidos con la concentración de 100 U/ml de IL-2 (Figura 9B y C).

Estos resultados confirman la efectividad de IL-15 para expandir de manera robusta linfocitos T, superando significativamente a la IL-2. De igual manera, se observó

que la combinación de IL-15/IL-7 es suficiente para inducir un alto número de células a los 15 días de cultivo, por lo que la adición de IL-21 aparentemente no tiene un efecto sinérgico que aumente la proliferación de los linfocitos T estimulados en presencia de esta citoquina.

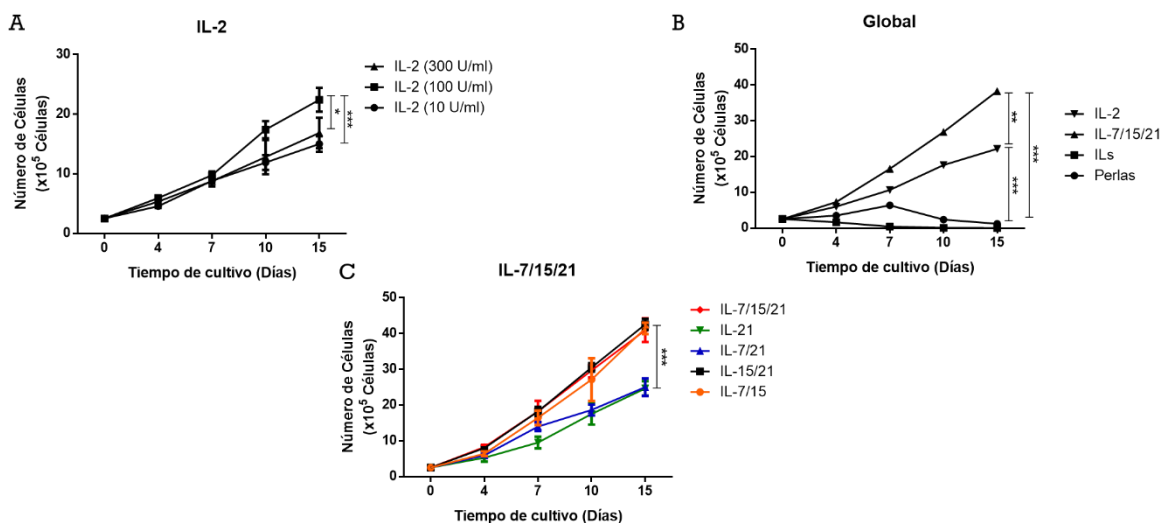


Figura 9. Expansión de LT partiendo de células naive en respuesta a diferentes citoquinas de la familia gamma común. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 y **(A)** Distintas concentraciones de IL-2. **(B)** concentración intermedia de IL-2 (100 u/ml); IL-7,15 y 21; solamente citoquinas sin perlas de estimulación (ILs); y solamente perlas de estimulación sin citoquinas (Perlas). **(C)** Expansión celular en presencia de diferentes combinaciones de citoquinas: IL-7,15 y 21; IL-21; IL-7 y 21; 15; IL-15 y 21; e IL,7 y 15. n=10. ANOVA de dos vías. *<0.05; **<0.01; ***<0.005. Número absoluto de células (promedio + SEM).

6.1.4. La IL-21 promueve la generación de células stem de memoria.

Aunque la IL-21 no promovió la mayor expansión de células totales (Figura 9C), la capacidad que tiene la IL-21 de inducir un fenotipo de memoria poco diferenciado, en contraste con la IL-2 o la IL-15, ha sido descrito (49). Adicionalmente, las células expandidas *in-vitro* utilizando esta citoquina ha demostrado tener una mayor capacidad antitumoral (11, 51). Álvarez-Fernández logró incrementar los números de células obtenidas con fenotipo Tscm partiendo de células vírgenes, agregando IL-21 a los cultivos en combinación con IL-7 y 15, lo que sugiere una actividad

sinérgica de estas citoquinas en la expansión de esta subpoblación de memoria (52). Para comprobar esta hipótesis, el fenotipo de memoria de las células obtenidas al día 15 de los cultivos de cada tratamiento fue medido utilizando citometría de flujo.

La distinción de los cinco fenotipos de células aquí considerados (Figura 10) se hizo de acuerdo con lo establecido por Gatinoni y Álvarez-Fernández (28, 52), quienes definieron marcadores para la determinación de las células *stem* de memoria.

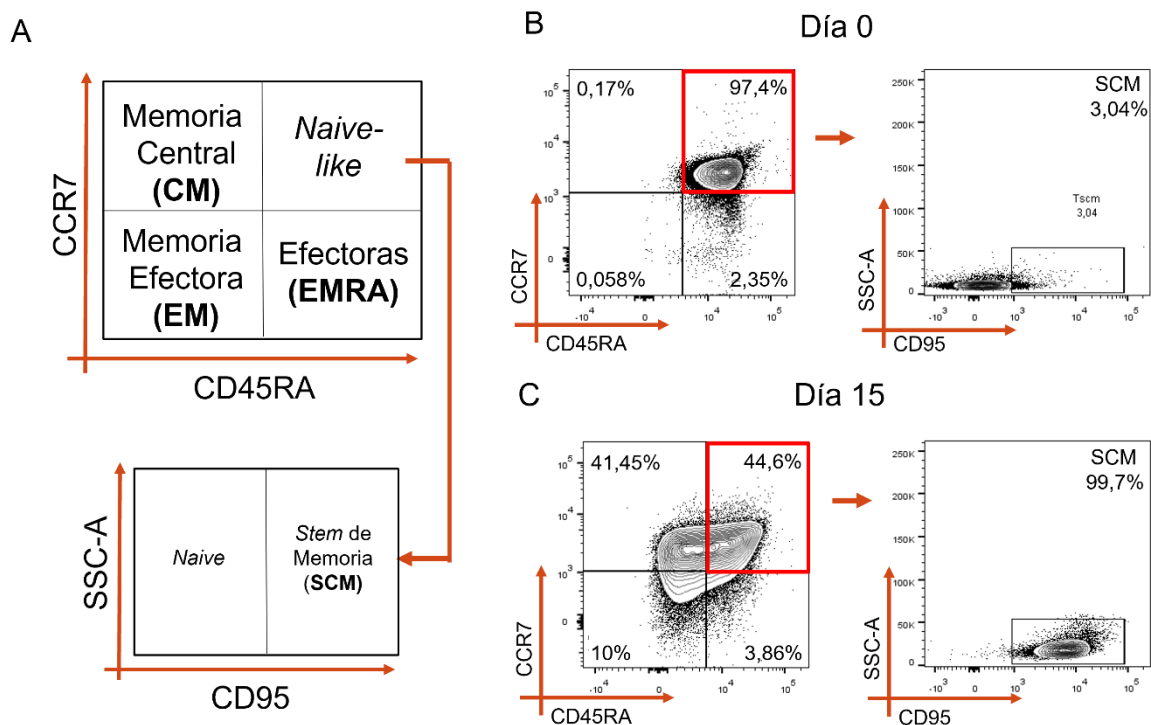


Figura 10. Estrategia de gating de determinación de la población stem de memoria. Para la determinación de la población *stem* de memoria se utilizó la estrategia en **(A)**: de la población *naive* (CCR7⁺CD45RA⁺) se obtienen dos subpoblaciones de acuerdo con su expresión de CD95, una CD95⁻ “verdaderas *naive*”, y una CD95⁺ correspondiente a las *stem* de memoria (SCM). En **(B)** y **(C)** se muestran *plots* representativos de la expresión de CD95 en el componente CCR7⁺CD45RA⁺ al día 0 y al día 15 de los cultivos, respectivamente.

Al día 15 de células cultivadas en diferentes citoquinas, revelaron una clara diversificación del fenotipo de memoria respecto al día 0 (Figura 11A), en donde todas las células eran vírgenes (CCR7⁺CD45RA⁺CD95⁻). Afín a la literatura (9), el cultivo con una alta concentración de IL-2 indujo una mayor diferenciación,

observando una clara predominancia de células efectoras de memoria (Tabla 8C) y (Figura 11A), una discreta población de células terminalmente diferenciadas, tendencia que, aunque no fue significativa, se mantuvo en la concentración intermedia de esta citoquina (100 U/ml).

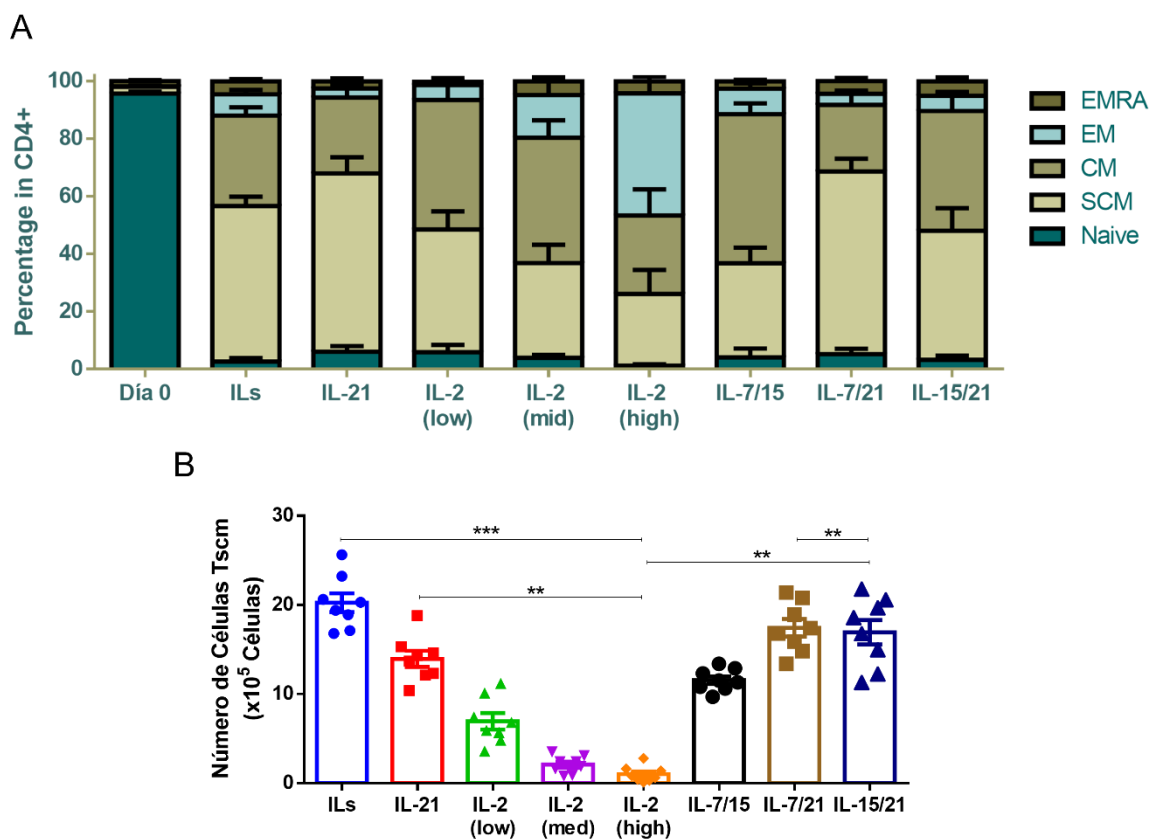


Figura 11. Distribución de las subpoblaciones de memoria al día 15 de los cultivos. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21; IL-21; IL-2 *low*, IL-2 *mid* e IL-2 *high*; IL-7 y 15; IL-7 y 21; IL-15 y 21. **(A)** Distribución de poblaciones de memoria *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM); Efectoras (EMRA). **(B)** Número absoluto de células Tscm. $n=8$. Test de Friedman con corrección de Dunn. ** <0.01 ; *** <0.001 . Las barras corresponden al promedio +SEM.

En los cultivos donde hubo una mayor frecuencia de células de memoria central, con una reducida presencia de células efectoras de memoria, fueron los cultivos de IL-7/15 y de IL-15/21 (Figura 11A), mientras que la combinación con IL-7/15/21, solo IL-21 y IL-7/21, tuvieron una clara predominancia de LTscm. Particularmente, el

cultivo con IL-7/21 fue el que mayor expansión de células con este fenotipo, sugiriendo un efecto sinérgico entre estas dos citoquinas (Figura 11).

A	SCM	ILs	IL-21	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	IL-7/15	IL-7/21
	ILs							
	IL-21	_____						
	IL-2 (low)	_____	_____					
	IL-2 (mid) ↓	**	****	_____				
	IL-2 (high) ↓	***	****	_____	_____			
	IL-7/15 ↓	*	***	_____	_____	_____		
	IL-7/21 ↑	_____	_____	*	****	****	***	
	IL-15/21	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

B	CM	ILs	IL-21	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	IL-7/15	IL-7/21
	ILs							
	IL-21	_____						
	IL-2 (low)	_____	_____					
	IL-2 (mid)	_____	_____	_____				
	IL-2 (high)	_____	_____	_____	_____			
	IL-7/15 ↑	*	**	_____	_____	**		
	IL-7/21 ↓	_____	_____	*	*	_____	***	
	IL-15/21	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

C	EM	ILs	IL-21	IL-2 (low)	IL-2 (mid)	IL-2 (high)	IL-7/15	IL-7/21
	ILs							
	IL-21	_____						
	IL-2 (low)	_____	_____					
	IL-2 (mid)	_____	_____	_____				
	IL-2 (high) ↑	****	****	****	***			
	IL-7/15 ↓	_____	_____	_____	_____	****		
	IL-7/21 ↓	_____	_____	_____	_____	****	_____	
	IL-15/21 ↓	_____	_____	_____	_____	****	_____	_____

Tabla 8. Perfil de memoria al día 15 de los cultivos. ANOVA de dos vías de porcentajes de subpoblaciones al día 15 **(A)** Stem de memoria (SCM), **(B)** Memoria central (CM) y **(C)** Memoria efectora (EM) entre los distintos

tratamientos. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naïve* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21; IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid*e e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. n= 8. Los cambios no significativos se representan con una línea.

Ahora, considerando que uno de los factores más importantes para el éxito de la terapia adoptiva de células es poder obtener un alto número de células que tengan un fenotipo de memoria poco diferenciado, debido a que los porcentajes al ser relativos al número de células totales no representan una medida confiable, el número absoluto de células *stem* de memoria se calculó. Si bien los cultivos en donde se agregó IL-21 o IL-7 e IL-21 fueron los que mayor porcentaje de LTscm expandieron (Figura 11), el cultivo de la combinación de IL-7, IL-15 e IL-21 demostró ser la combinación con la cual se obtuvo un mayor número tanto de células totales como de LTscm, confirmando que el uso de las tres citoquinas en conjunto es necesario para expandir este fenotipo en grandes cantidades, partiendo de células vírgenes.

6.1.5. La expresión de receptores de citoquinas de la familia gamma común no se ve afectada por los distintos tratamientos.

Las citoquinas de la familia gamma común tienen un papel muy importante en el desarrollo, la homeóstasis y la diferenciación de los linfocitos T (42). Particularmente, la IL-7 es conocida por su potente función como factor de supervivencia de los LT (42) y la expresión de su receptor, compuesto por el receptor gamma común y CD127 (cadena alfa), se ha asociado a poblaciones vírgenes o poco diferenciadas (47). Por su parte la expresión del receptor de alta afinidad de IL-2, compuesto por la cadena gamma común, CD122 (cadena beta) y CD25 cadena alfa), es predominantemente expresado por LT efectores (48). Con el fin de evaluar la expresión de componentes del receptor de IL-2 y de IL-7, del cual la cadena gamma común hace parte, la medición tanto CD25 (cadena alfa) como CD127 respectivamente, fueron incluidos en el panel de citometría.

Aunque se pudo observar un leve aumento de CD25 en los cultivos con concentración media y alta de IL-2 (Figura 12A), y de CD127 en el cultivo con IL-7

y 21 (Figura 12B), estos cambios no fueron estadísticamente significativos, por lo que concluimos que la adición exógena de las citoquinas no tiene un impacto importante en la regulación al alza de estos receptores en LT vírgenes diferenciados *in-vitro* a diferentes subpoblaciones luego del estímulo.

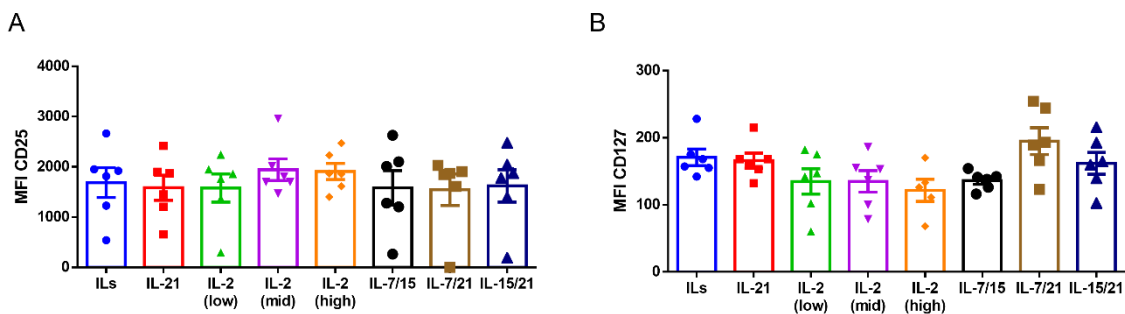


Figura 12. Expresión de receptores de citoquinas de la familia gamma común. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid* e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. MFI de la expresión de (A) CD25 y (B) CD127. $n=6$. Test de Friedman con corrección de Dunn. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Teniendo en cuenta que las subpoblaciones de memoria tienen una expresión diferencial de estos marcadores, se midió el MFI de ambas proteínas en cada una para cada condición de cultivo. En cuanto a CD25, en todos los cultivos se observó un patrón de expresión más alta en LT EM y EMRA, aunque este sólo fue significativo en el cultivo de una alta concentración de IL-2 y la combinación de IL-7 e IL-21 (Figura 13A). Para CD127 (Figura 13B) se encontró una distribución relativamente homogénea entre las subpoblaciones de memoria sin importar las condiciones de cultivo. De manera interesante, en el cultivo con una alta concentración de IL-2, la expresión de CD25 también fue alta en los LTscm, sugiriendo una alteración del programa de diferenciación de esta subpoblación inducido por una alta concentración de esta citoquina.

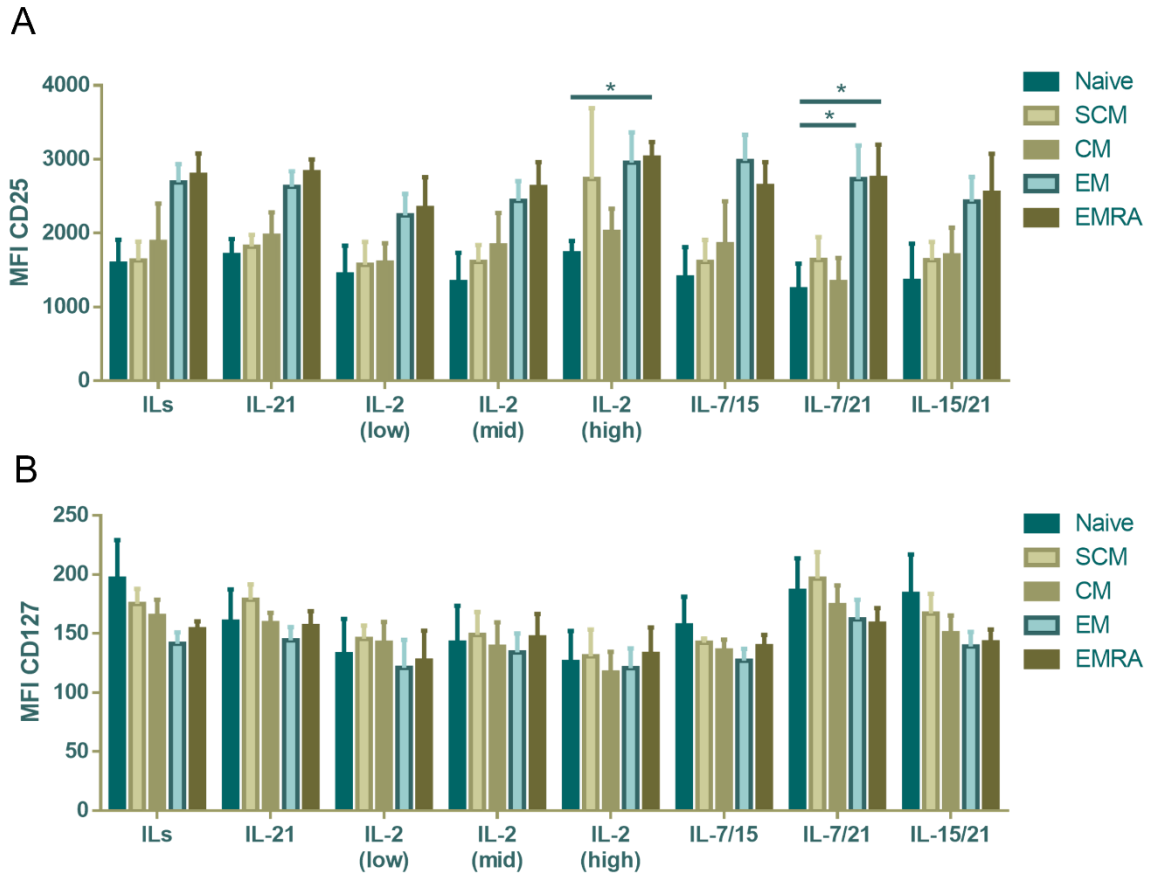


Figura 13. Expresión de receptores de citoquinas de la familia gamma común de las subpoblaciones de memoria. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid* e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. MFI de la expresión de **(A)** CD25 y **(B)** CD127 en las poblaciones de memoria *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM); Efectoras (EMRA). $n=6$. ANOVA de dos vías. $* < 0.05$. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Tomando estos resultados en conjunto, se puede concluir que la mejor forma de expandir LT CD4 scm *in vitro*, dentro de las condiciones evaluadas partiendo de células vírgenes ($CCR7^+CD45RA^+CD95^-$) es la combinación de IL-7, IL-15 e IL-21. Bajo estas condiciones, en respuesta a un estímulo policlonal, es donde se obtuvo el mayor número de LT CD4 totales (16x del número inicial), cuyo fenotipo de memoria fue predominantemente de memoria *stem-like* (aproximadamente 50%) seguido por un fenotipo de memoria central (Figura 11).

6.2. Memoria y diferenciación Tfh

6.2.1. La IL-21 induce el fenotipo folicular helper

Como se mencionó en el apartado anterior, en contraste a los cultivos que tan sólo contaban con IL-7 e IL-15, la adición de la IL-21 tuvo un efecto importante en prevenir la diferenciación a estados EMRA y EM de los LT, manteniendo el fenotipo Tscm, (Figura 11A y B). La IL-21, citoquina de la familia gamma común, actualmente se considera una citoquina pleiotrópica (82). Esta citoquina es producida por las células Tfh, las cuales apoyan la producción de anticuerpos por parte de los LB (83). El efecto observado del rol de la IL-21 en la diferenciación de LT, nos motivó a explorar la inducción del fenotipo Tfh en las condiciones de cultivo de LT CD4 establecidas en este trabajo. Para ello, los LTfh se definieron como LT CD4 CXCR5⁺PD-1⁺ (57) (Figura S5), y su porcentaje fue medido al día 15 en todos los cultivos.

Confirmando nuestra hipótesis, los cultivos con IL-21 fueron los que mayor porcentaje de LTfh tuvieron al día 15, sin embargo, el cultivo con solo IL-21 y la combinación de IL-7 e IL-21 fueron los únicos que tuvieron significancia estadística, respecto al porcentaje al día 0 de estos cultivos (Figura 14A). De manera interesante, el porcentaje de estas células fue considerable (aproximadamente 60%) en estos dos tratamientos, mostrando la estrecha relación entre la IL-21 y esta subpoblación Th. Adicionalmente, resulta llamativo que en los cultivos en donde también estuvo presente la IL-15, la capacidad de inducir el fenotipo Tfh de la IL-21 se vio reducida (Figura 14).

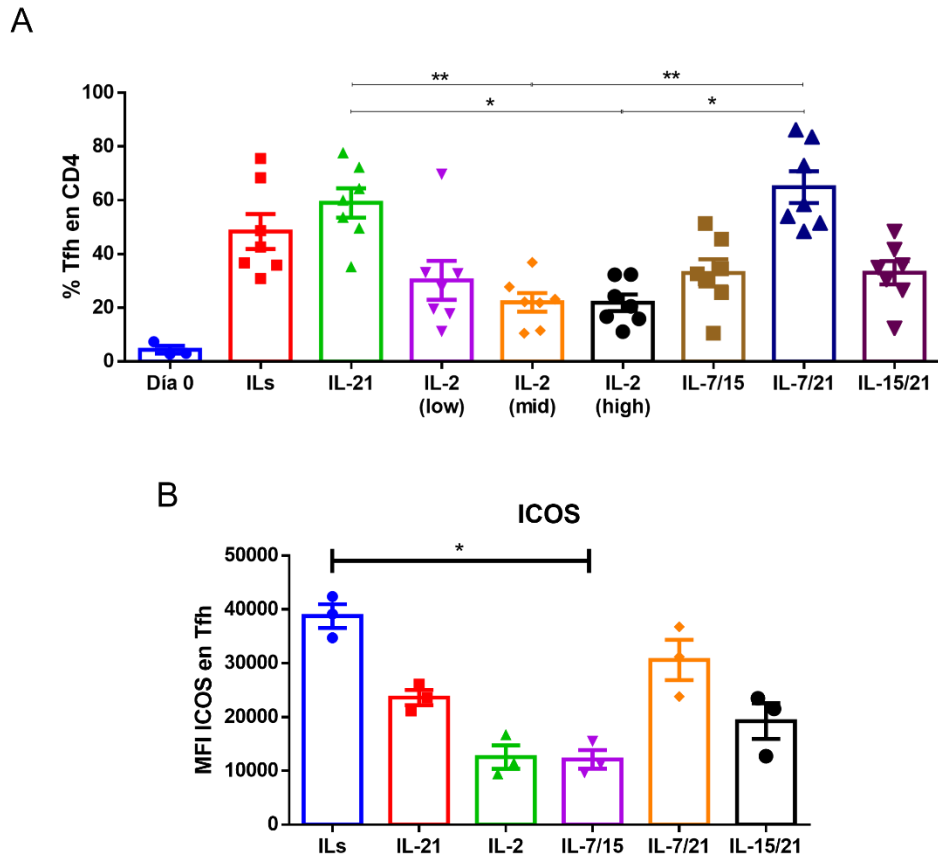


Figura 14. Expansión de LT CD4 foliculares helper al día 15 de los cultivos. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid* e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. **(A)** Porcentaje de células Tfh (CXCR5⁺PD-1⁺) en los diferentes cultivos al día 15. n=8. **(B)** Expresión de ICOS en células Tfh. n=3. Test de Friedman con corrección de Dunn. * <0.05 ; ** <0.01 . Las barras corresponden al promedio +SEM.

ICOS es otra proteína que se ha asociado con el fenotipo Tfh, y su expresión refleja el estado de activación de estas células (57). De manera interesante, la mayor expresión de ICOS se observó en el cultivo con IL-7/15/21, mientras que el cultivo al que únicamente se le adicionó IL-21 contó con una expresión intermedia de esta proteína (Figura 14B). Lo anterior sugiere que, aunque la IL-21 es inductora del fenotipo Tfh, las células que se diferencian parecen estar en un estado de quiescencia, que se ve activado por la presencia de IL-7 y/o IL-15.

El alto porcentaje de células Tfh en los cultivos en donde también hubo un porcentaje importante de linfocitos Tscm sugirió que puede haber una asociación

entre estos dos programas de diferenciación, probablemente causado por el efecto de la IL-21 y la IL-7. Para confirmar esta hipótesis, se realizó una correlación entre el porcentaje de ambas poblaciones al día 15 de todos los cultivos (Figura 15) y se encontró que efectivamente existe una asociación positiva ($r= 0,6614$) significativa entre estos dos fenotipos de linfocitos CD4.

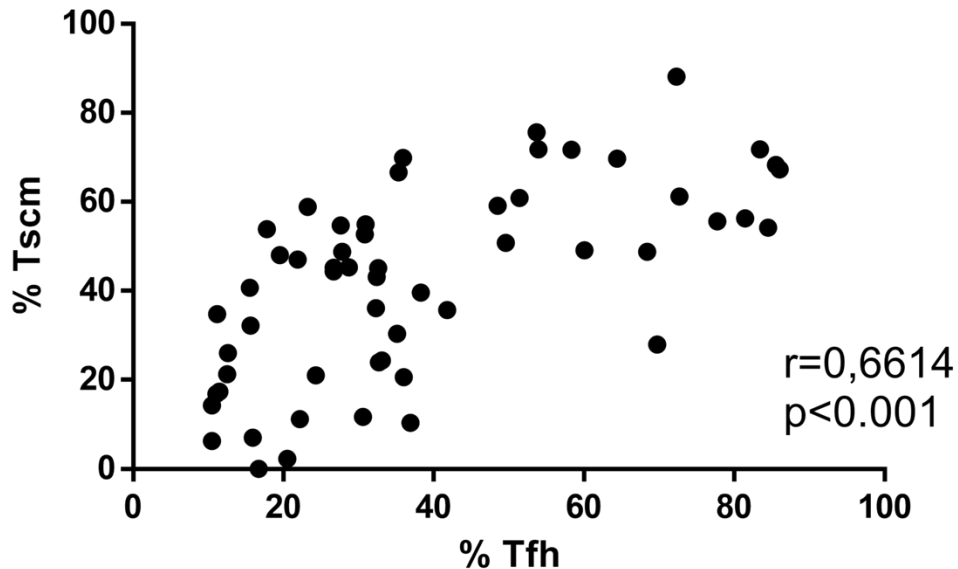


Figura 15. Correlación del fenotipo LTscm y el fenotipo folicular helper al día 15 de los cultivos. Correlación de Spearman's y valor p entre porcentaje de LTfh y LTscm al día 15 de los cultivos. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid*e e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. Cada punto corresponde al porcentaje observado de Tfh y Tscm en cada réplica en cada uno de los tratamientos mencionados.

6.2.2. El programa de diferenciación de los LTscm converge con el de los LTfh.

Los análisis anteriores sugieren una ontogenia cercana de los LTscm con los LTfh, con el fin de establecer más claramente su relación, se decidió evaluar la expresión de dos proteínas clave de la diferenciación folicular: CXCR5 y PD-1, en linfocitos Tscm en aras de comprobar una potencial convergencia entre los programas de

señalización inducidos por la IL-21 en estas dos poblaciones de células LT CD4 y su comportamiento en los distintos cultivos. Aunque no se encontraron diferencias significativas, la presencia de IL-21 e IL-7 y la ausencia de IL-15 promovió la expresión de CXCR5 (Figura 16A), receptor de quimioquina clave para la migración de los LTfh a los centros germinales. Por otro lado, la expresión de PD-1 fue relativamente alta en todos los cultivos (Figura 16B), pero como se mencionó en los primeros apartados de este trabajo, en la literatura ya se ha documentado la capacidad que tienen las citoquinas de la familia gamma común de inducir la expresión de esta proteína.

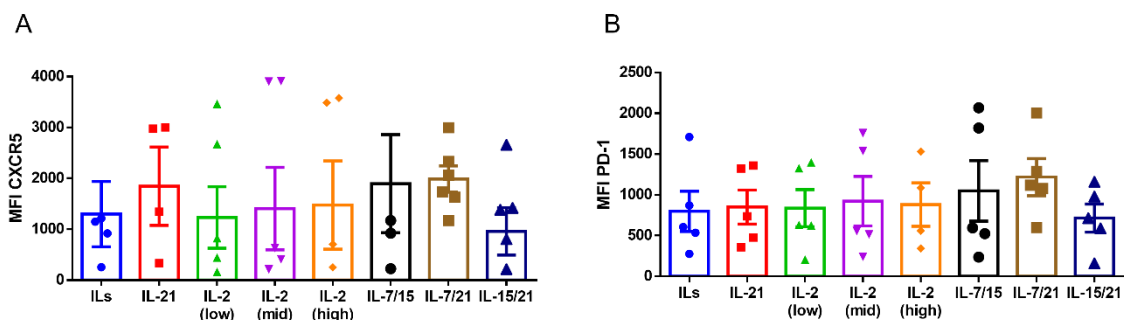


Figura 16. Expresión de CXCR5 y PD-1 en LT CD4 Totales al día 15. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid* e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. MFI de la expresión de (A) CXCR5 y (B) PD-1 en los LT CD4 totales. $n=6$. Test de Friedman con corrección de Dunn. Las barras corresponden al promedio +SEM.

En los cultivos que recibieron IL-2 se observó que conforme se aumentó la concentración de IL-2 también lo hizo la expresión de PD-1 en los LT CD4 totales, pero que aún con la concentración más alta de IL-2, los valores promedio de expresión de PD-1 fueron mayores en los cultivos a los que se le adicionaron IL-7/15/21 en cualquier combinación, sugiriendo que estas citoquinas tienen un mayor impacto en la regulación al alza de este receptor de membrana. Posteriormente, la expresión de estas proteínas se comparó en las distintas subpoblaciones de memoria (Figura S6), para ver si había una expresión diferencial dependiendo del grado de diferenciación de las células. Estos análisis revelaron que mientras CXCR5 parece tener una mayor expresión en las poblaciones de memoria, especialmente,

SCM y CM (Figura S6 y 17A), en ausencia de IL-15 este se expresa principalmente en SCM, y en los cultivos donde se adicionó IL-15, este se expresa en CM. En los cultivos de IL-2, la expresión de esta proteína en las células vírgenes fue virtualmente inexistente. Por su parte, se encontró una distribución bastante homogénea de PD-1 en las cinco poblaciones de memoria (Figura S6 y 17B), aún en las células vírgenes (CCR7⁺CD45RA⁺CD95⁻).

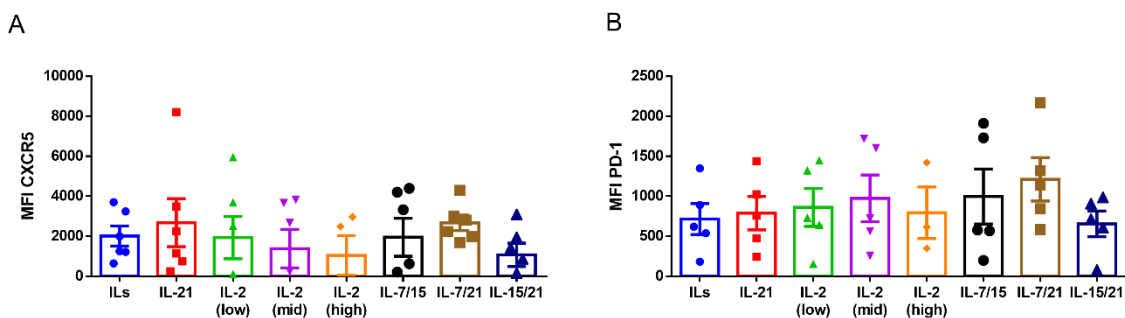


Figura 17. Expresión de CXCR5 y PD-1 en LTscm. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naïve* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid* e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. MFI de la expresión de (A) CXCR5 y (B) PD-1 en los LTscm (CD4⁺CCR7⁺CD45RA⁺CD95⁺). n=6. Test de Friedman con corrección de Dunn. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Por su parte, los linfocitos Tfh se definen por su doble expresión de CXCR5 y PD-1, por lo que para verificar el porcentaje de estas células en las subpoblaciones de memoria se hizo el análisis de las células doble positivas dentro de las diferentes ventanas de análisis de memoria. En contraste a la expresión individual de cada proteína medida en términos de MFI, sí se encontraron diferencias entre los porcentajes de las Tfh en memoria y entre los distintos tratamientos. Lo primero que se pudo observar es que en los cultivos que recibieron IL-2, las células con mayor porcentaje de células Tfh fueron las de memoria central, mientras que en los cultivos que recibieron las otras citoquinas también tuvieron un porcentaje importante de Tfh en las Tscm (Figura 18A).

Coherente con el patrón que se ha observado hasta el momento, la IL-15 parece tener un efecto negativo en la expresión de marcadores foliculares en las Tscm, aunque este sea mucho menor que el observado con la IL-2. En cuanto a las

diferencias entre tratamientos, se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de las Tfh dentro de las Tscm entre el cultivo con una alta concentración de IL-2 y el cultivo con IL-7 y 21, siendo estos dos los extremos de porcentajes hallados (Figura 18B). Nuevamente, los cultivos con IL-15 muestran un valor similar al de los de IL-2, salvo cuando está en combinación con IL-7 y 21.

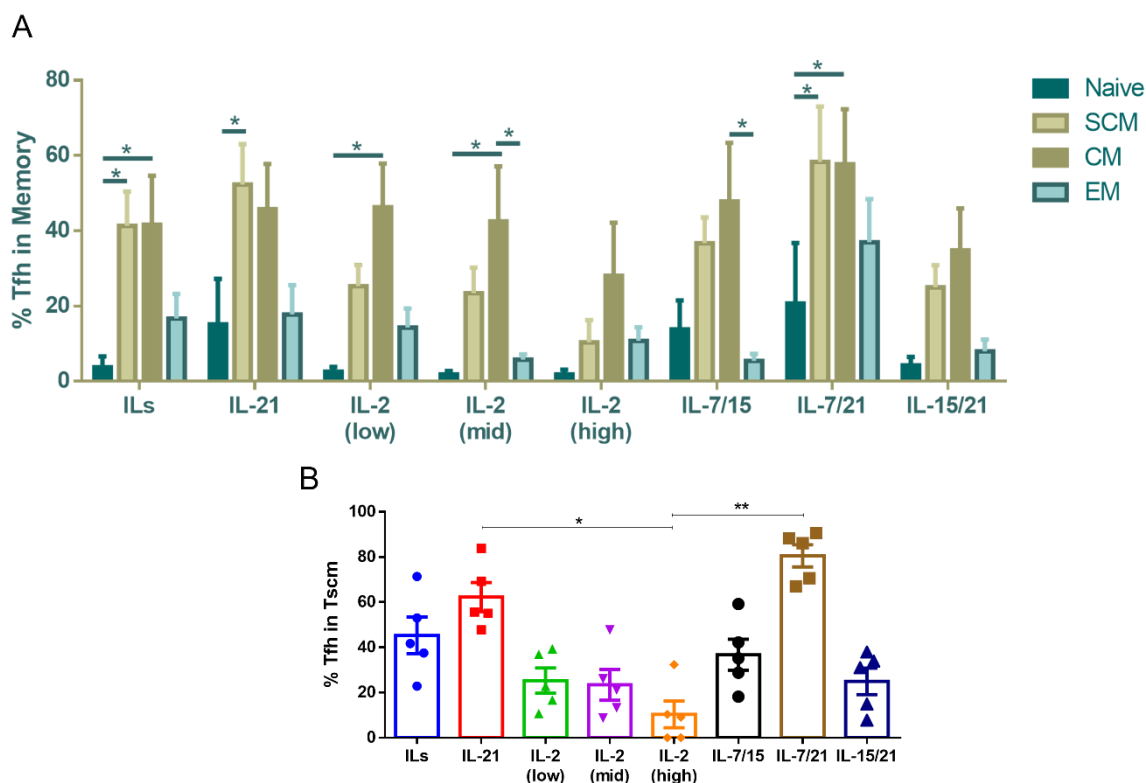


Figura 18. Porcentaje de Tfh en subpoblaciones de memoria. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *low*; IL-2 *mid* e IL-2 *high*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. **(A)** Porcentaje de LTfh (CXCR5+PD-1+CD4+) en las poblaciones de memoria *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM). ANOVA de dos vías; y **(B)** Comparación en LTscm. n=5. Test de Friedman con corrección de Dunn. *<0.05; **<0.01. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Una vez se determinaron marcadores del fenotipo folicular dentro de las poblaciones de memoria, el siguiente paso fue evaluar el fenotipo de memoria en los LTfh. De manera interesante, en casi todos los cultivos, las Tfh tuvieron predominantemente un fenotipo de memoria central, salvo en el cultivo con IL-2, en donde tuvieron un

fenotipo de memoria efectora, demostrando ser células más diferenciadas (Figura 19).

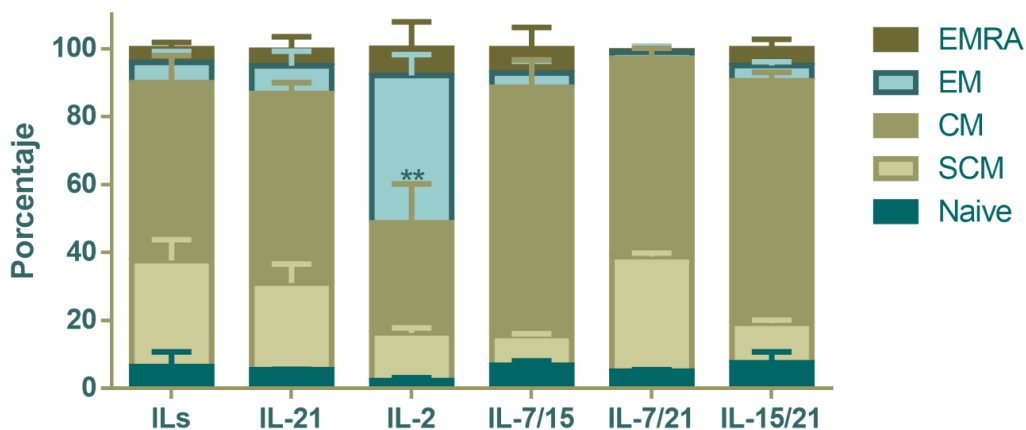


Figura 19. Perfil de memoria de los LT CD4 foliculares helper. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 (100 U/ml); IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. Dentro de los LT CD4 foliculares *helper* (CXCR5⁺PD-1⁺) se observó la expresión de CD45RA, CCR7 y CD95 para definir las 5 subpoblaciones de memoria; *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM); Efectoras (EMRA). n=10. Las barras corresponden a promedio + SEM.

6.2.3. Los LTscm expandidos *in-vitro* se asemejan a los expandidos *in-vivo* en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico.

El descubrimiento de los Tscm en el contexto de la TAC abrió la puerta para que estas células fueran estudiadas en otros campos de la inmunología en donde la generación de células de memoria duraderas también es de vital importancia, i.e. la vacunología (84). Un trabajo reciente demostró que la vacuna de la fiebre amarilla genera linfocitos T CD8 de memoria con un fenotipo Tscm que sobreviven al menos 35 años en circulación, explicando así la larga protección de esta vacuna (85). En este sentido, quisimos evaluar el grado de expansión de células LTscm inducida por una vacuna y así comparar el fenotipo de estas células producidas *in-vivo* en respuesta a vacunación con el fenotipo de los LTscm expandidos *in-vitro* en nuestro trabajo. Para ello se utilizó como antígeno modelo el Toxoide Tetánico (TT).

Particularmente, el TT es un excelente modelo para el estudio de la generación de memoria puesto que contiene epítopes universales y ha sido ampliamente usado como inductor de respuesta de LT CD4 (86).

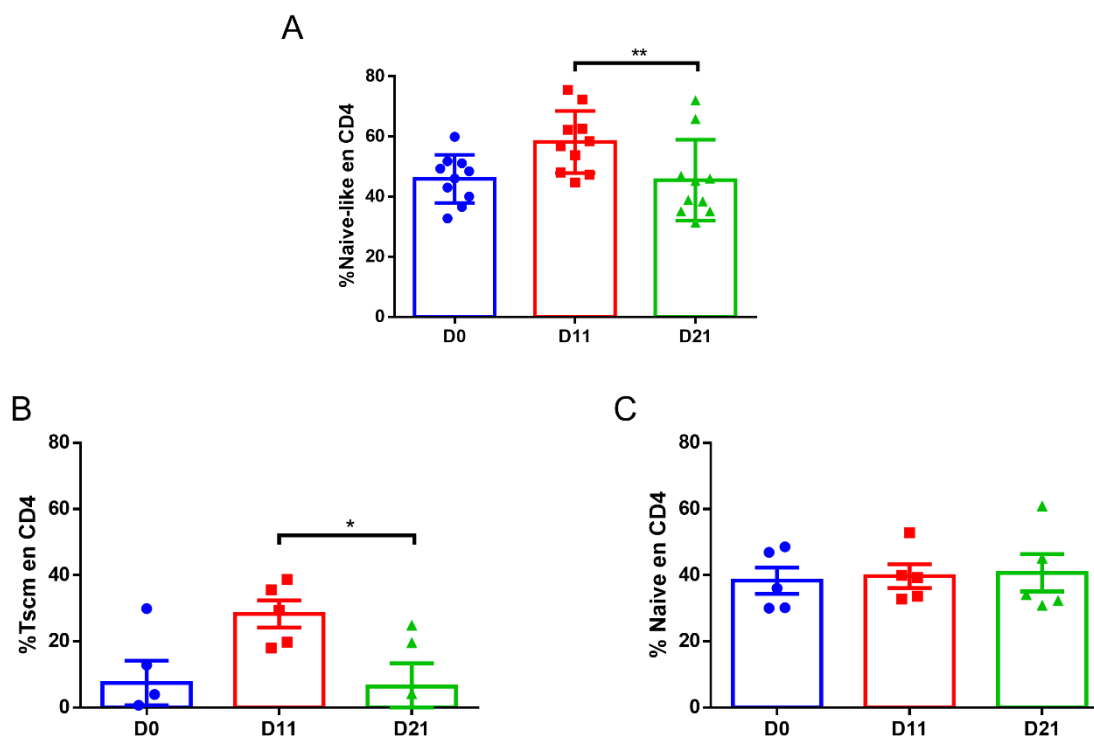


Figura 20. LTscm en respuesta a vacunación con Toxoide Tetánico. Adultos jóvenes (18-30 años) fueron vacunados con Toxoide Tetánico (TT) y se obtuvieron PBMCs al día 0, 11 y 21 post-vacunación. El porcentaje de **(A)** LT CD4 “Naive-like” (CD45RA⁺CCR7⁺) **(B)** Tscm (CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺) y **(C)** Naive (CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁻). n = 5. Test de Friedman con corrección de Dunn. *<0.05; **<0.01. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Para esto, diez adultos jóvenes fueron vacunados con TT y se aislaron PBMCs al día 0 previo a la vacunación y a los días 11 y 21 post-vacunación (Figura S7A), los cuales representan los días del pico y la caída de la respuesta a esta vacuna, respectivamente (87). En estos tres puntos se midió el porcentaje de células con un fenotipo virgen (CCR7⁺CD45RA⁺) y se encontró un aumento al día 11 post-vacunación, el cual se redujo al día 21 (Figura 20A). Este incremento del componente virgen fue bastante llamativo por lo que se decidió determinar cuáles de estas células eran efectivamente vírgenes (Figura 20C) y en qué proporción estas células eran LTscm (Figura 20B). Como era de esperarse, al incluir CD95

como marcador, el porcentaje global de las células vírgenes no se vio afectado, y la expansión observada en la Figura 20A correspondió a un aumento de los LTscm, demostrando que esta población expandió en respuesta a la vacunación.

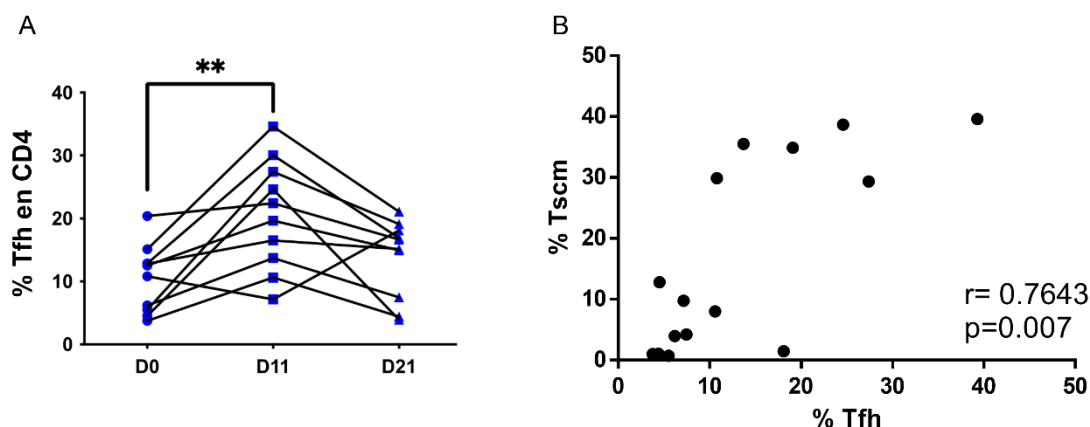


Figura 21. Expansión Tfh en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico y relación con las Tscm. Adultos jóvenes (18-30 años) fueron vacunados con Toxoide Tetánico y PBMCs fueron aisladas al día 0, 11 y 21 respecto a la vacuna. **(A)** Se cuantificó el porcentaje de células Tfh (CD4+CXCR5+PD-1+) en los tres puntos tiempo. $n = 5$. **(B)** Se hizo una Correlación de Spearman's y valor p entre porcentaje de LTscm y LTfh en los tres puntos tiempo en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico. $n = 5$. $** < 0.01$.

En los jóvenes vacunados se cuantificó el porcentaje de los LTfh en circulación en los tres puntos tiempo respecto a la vacunación y se encontró un incremento de esta población en respuesta a la vacuna al día 11, el cual decayó al día 21 post-vacunación (Figura 21A). La inducción de LTfh es deseable en el contexto de la vacunación puesto que esta subpoblación apoya a los LB en los procesos de diferenciación a células plasmáticas, cambio de isotipo, y generación de LB de memoria (57).

Teniendo en cuenta el incremento tanto de los LTscm como de las Tfh en el pico de la respuesta de la vacuna, se quiso establecer el grado de correlación observada *in-vitro* entre estos dos fenotipos de CD4, pero ahora en un contexto *in-vivo*. Para ello, se realizó una correlación de Spearman entre el porcentaje de ambas poblaciones en los tres puntos tiempo en una cohorte de adultos jóvenes vacunados con TT (Figura 21B). Como se puede observar en esta figura, también este caso evidenció una correlación que fue más marcada en las muestras de los donantes

vacunados ($r=0.7643$) (Figura 21B) con respecto a la establecida en los cultivos *in-vitro* ($r=0.6614$) (Figura 15), sugiriendo que ambos programas de diferenciación tanto *in-vivo* como *in-vitro* se encuentran relacionados.

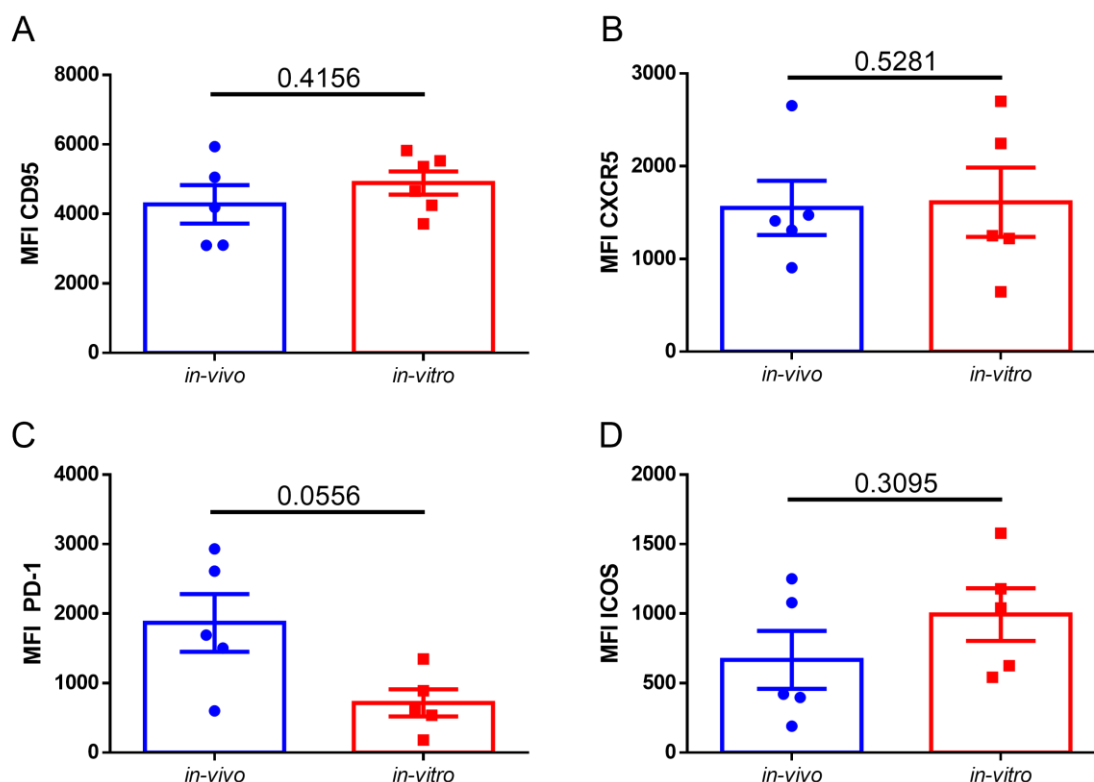


Figura 22. Fenotipo LTscm expandidas *in-vitro* vs *in-vivo*. Comparación del MFI de (A) CD95, (B) CXCR5 (C) PD-1 y (D) ICOS de LTscm CD4 expandidos con IL-7/15/21 (10 ng/ml c/u) al día 15 del cultivo (*in-vitro*) y de LTscm CD4 provenientes de adultos jóvenes vacunados con TT al día 11 post-vacunación. Las células Tscm se definen como CCR7⁺CD45RA⁺CD95⁺. n=5. Test de Mann-Whitney. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Como una forma adicional de cotejar el fenotipo de LTscm generado en condiciones de cultivo *in-vitro* con el fenotipo de LTscm generado *in-vivo*, se comparó el fenotipo de los LTscm que expandieron en el pico de la respuesta a la vacuna con los LTscm obtenidos *in-vitro*. Para ello se comparó la expresión de CD95, CXCR5, PD-1 y ICOS en estas células (Figura 22). No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las proteínas, sugiriendo que el grado de expresión de estos marcadores evaluados en células LTscm/LTfh expandidas *in-vitro* guardan relación con las

LTscm/LTfh que se generan *in-vivo*. Aunque la diferencia observada en ICOS no tuvo significancia estadística, el cambio de magnitud sí fue notorio, en contraste con las otras proteínas, lo que podría sugerir que células expandidas *in-vitro* tienden a estar más diferenciadas que su contraparte *in-vivo* (Figura 22D).

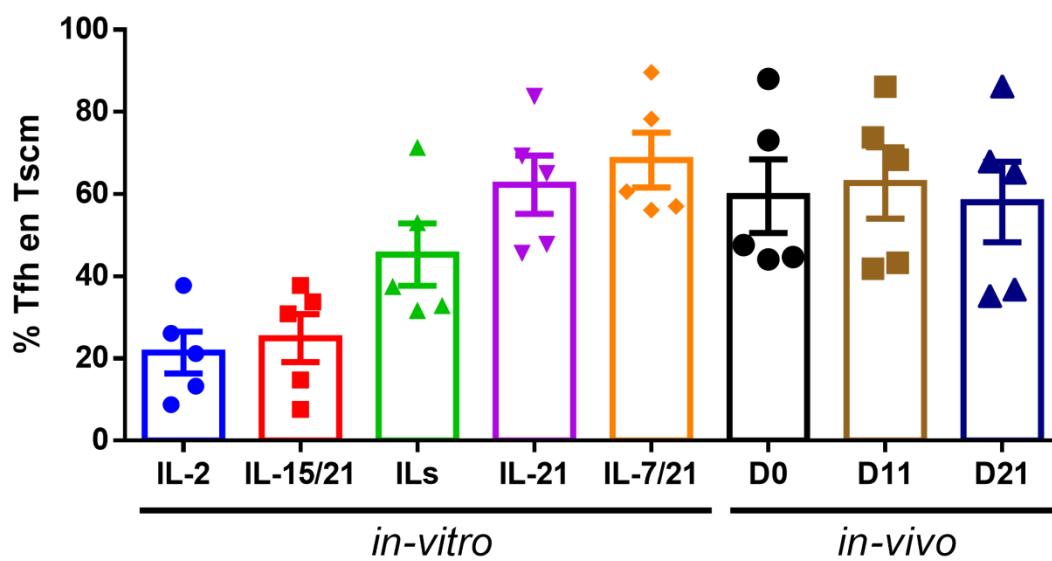


Figura 23. Porcentaje de Tfh en Tscm expandidas *in-vitro* vs *in-vivo*. Porcentaje de LTfh (CXCR5+PD-1+) dentro de los LTscm (CD45RA+CCR7+CD95+) en los cultivos con IL-2 (100 U/ml), IL-15 y 21, IL-7, 15 y 21, IL-21 (10 ng/ml) o IL-7 y 21 al día 15 y de las PBMCs de adultos jóvenes vacunados con TT al día 0, 11 y 21 post-vacunación. n=5. Test de Kruskal-Wallis. Las barras corresponden al promedio +SEM.

La variación observada en el porcentaje de LTscm con un fenotipo folicular (CXCR5+PD-1+) producida por las diferentes condiciones de cultivos (Figura 18B), se comparó en los de LTscm analizados en los tres puntos tiempo de la vacunación (Figura 23). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, sí se pudo observar que el porcentaje de LTscm con fenotipo folicular en los cultivos con IL-21 e IL-7/21 se acercó al de los LTscm expandidos *in-vivo* en respuesta a la inmunización con TT (Figura 23), sugiriendo que estas dos citoquinas inducen un fenotipo Tscm cercano al experimentado por estas células en respuesta al reestímulo *in-vivo*.

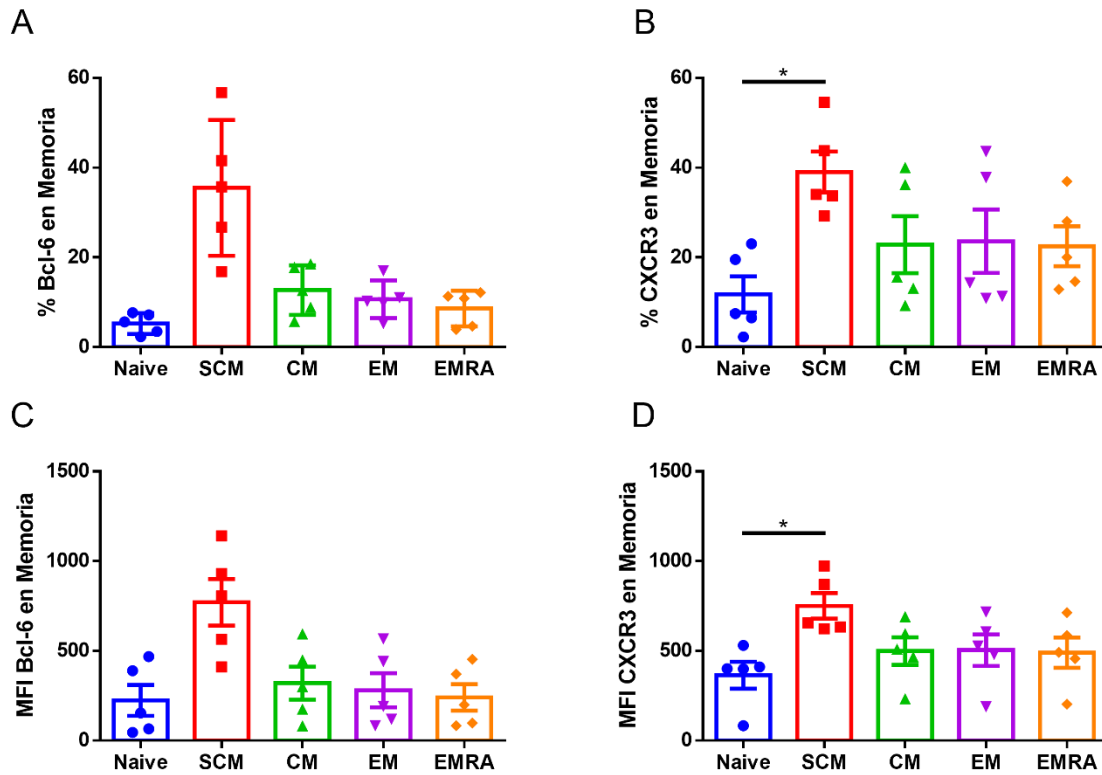


Figura 24. Marcadores Tfh en Memoria. Adultos jóvenes (18-30 años) fueron vacunados con Toxoide Tetánico (TT) y se obtuvieron PBMCs al día 0, 11 y 21 post-vacunación. El porcentaje de (A) Bcl-6, (B) CXCR3 y el MFI de (C) Bcl-6, (D) CXCR3 se comparó entre las subpoblaciones de memoria de LT CD4. *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM) y terminalmente diferenciadas (EMRA); n=5. Test de Friedman con corrección de Dunn. *<0.05. Las barras corresponden al promedio +SEM.

El factor de transcripción Bcl-6 y el receptor de quimioquinas CXCR3 son claves en la diferenciación de células Tfh, especialmente en los centros germinales (57), pero también se pueden encontrar en las Tfh circulantes (64). Por este motivo, se evaluó la expresión de estas proteínas en las Tscm generadas en respuesta a la vacunación con TT. Ambas proteínas se encuentran en niveles muy bajos en células vírgenes, pero al ser estimuladas y diferenciarse en Tscm se observó un aumento significativo de su expresión, el cual se fue perdiendo conforme la célula se diferencia en las otras subpoblaciones de memoria (Figura 24).

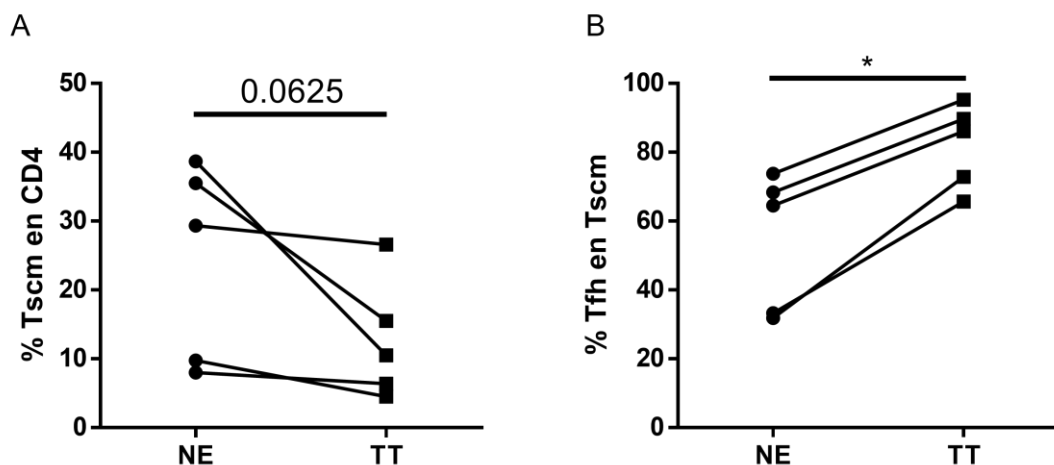


Figura 25. LTscm en respuesta a la re-estimulación con TT. PBMCs aislados al día 11 post-vacunación con Toxoide Tetánico (TT) fueron estimulados con TT por 24 horas (TT) o dejados sin estimular (NE) y se midió el (A) porcentaje de LTscm en CD4 totales y (B) porcentaje de Tfh en Tscm. n = 5. Test de Wilcoxon. *<math><0.05</math>.

Para intentar emular la infección natural y ver la respuesta de las Tscm frente a un segundo encuentro antigénico, y de esta forma evaluar su funcionalidad, las PBMCs de individuos vacunados aisladas al día 11 se estimularon con Toxoide Tetánico durante 24 horas, y se volvió a evaluar el fenotipo de estas células. Debido a la alta variabilidad observada en las cinco personas vacunadas el comportamiento de los LTscm en respuesta a la estimulación con TT no fue claro, sin embargo, se alcanzó a notar una tendencia a disminuir, lo que es de esperar puesto que probablemente las células de memoria empiezan a diferenciarse en células efectoras por la estimulación del TCR (Figura 25A). Asimismo, se encontró que al estimular las células con TT (Figura 25B), los LTscm con fenotipo folicular aumentaron de manera significativa, lo que sugiere que este hace parte de su programa de diferenciación.

6.2.4. La expansión de LTscm en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico se ve afectada por el envejecimiento.

Como ya se ha mostrado en los apartados anteriores, las condiciones en que las células crecen determinan en gran medida su grado de diferenciación y vías de señalización que se activan en ellas concomitantemente con dicha diferenciación.

Un modelo en el que este fenómeno se ha podido estudiar es en el de la inmunosenescencia. El envejecimiento fisiológico se acompaña de una reducida capacidad de generar nuevas células de memoria y una defectiva respuesta a las vacunas, entre otras cosas, y se ha encontrado que esto se debe a un aumento sistémico de citoquinas proinflamatorias, que lleva a las células a un estado de agotamiento y mayor diferenciación (88-90).

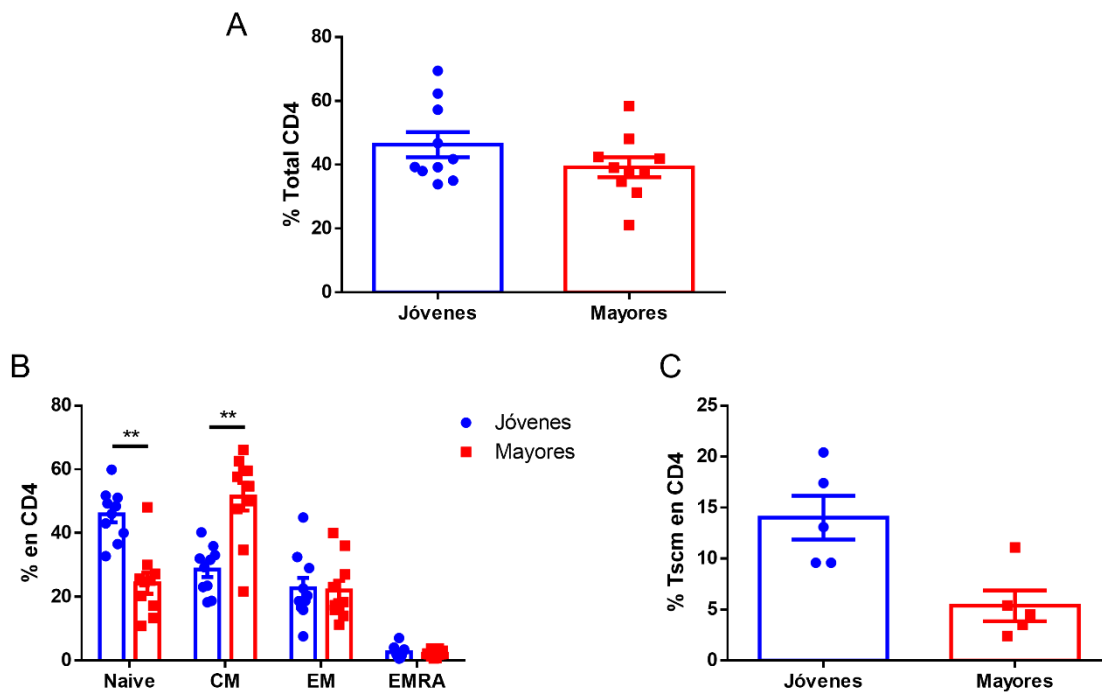


Figura 26. Subpoblaciones de Memoria en CD4 en adultos jóvenes y adultos mayores. PBMCs de adultos jóvenes (18-30 años) y adultos mayores (>60 años) fueron aisladas previo a la vacunación (día 0) y se compararon porcentaje de **(A)** CD4 totales, **(B)** poblaciones de memoria *Naive*; Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM) y terminalmente diferenciadas (EMRA). n=10. y **(C)** *Stem* de Memoria (Tscm). n=5. Test de Mann-Whitney. Las barras corresponden al promedio +SEM. **<0.01.

Con el fin de evaluar si el envejecimiento altera la expansión de Tscm y Tfh en respuesta a la vacunación, se inmunizaron adultos mayores de 60 años con el TT y se comparó el estado de estas dos poblaciones celulares con las observadas en jóvenes (Figura S7B). Lo primero que se comparó fue el estado basal (día 0) de los LT CD4 totales entre estas dos poblaciones etarias, encontrando que el porcentaje de estas células no varía con la edad (Figura 26A), sin embargo, si se vieron

marcadas diferencias entre las subpoblaciones de memoria; en general se pudo observar una disminución de las células vírgenes y un aumento concomitante de las células de memoria central (Figura 26B). Dentro de estas células con fenotipo virgen se midió CD95 para determinar las verdaderas vírgenes y las LTscm, y se encontró también una disminución de estas últimas en los adultos mayores (Figura 26C), sugiriendo una alteración de la generación de células Tscm asociada con la edad.

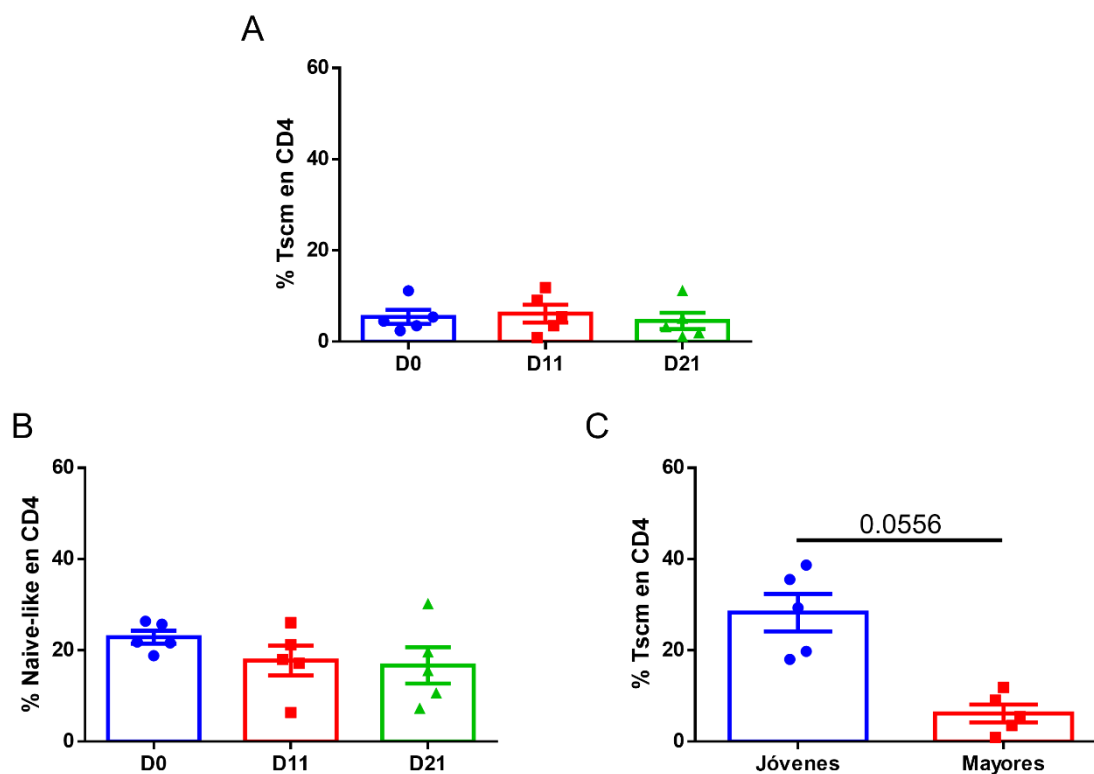


Figura 27. LTscm de adultos mayores en respuesta a vacunación con Toxoide Tetánico. Adultos Mayores (>60 años) fueron vacunados con Toxoide Tetánico (TT) y se obtuvieron PBMCs al día 0, 11 y 21 post-vacunación y se estableció en estos tres puntos tiempos en LT CD4 totales, **(A)** el porcentaje de Tscm (CD45RA+CCR7+CD95+) y **(B)** de células “Naive-like” (CD45RA+CCR7+). **(C)** Comparación de porcentaje de LTscm (CD45RA+CCR7+CD95+) en CD4 al día 11 entre adultos jóvenes y adultos mayores. n=5. Test de Mann-Whitney. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Para ver la capacidad que tenían los LTscm de adultos mayores de expandir en respuesta a la vacunación, se comparó el porcentaje de estas células en los tres tiempos relativos a la vacuna y se encontró que, a diferencia de los adultos jóvenes, estas células no expandían en el pico de respuesta a la vacuna (Figura 20 y 27A-

B), y que estas células estaban disminuidas en el adulto mayor respecto al adulto joven al día 11 post-vacunación (Figura 27C), lo que sugiere una alteración de la capacidad que tienen las células vírgenes de los adultos mayores de mantener el fenotipo Tscm.

Al igual que en los adultos jóvenes (Figura 21), también se evaluó el porcentaje de LTfh en los tres puntos tiempos respecto a la vacuna y se encontró que si bien hubo un incremento de esta población al día 11 (Figura 28A), este aumento fue menor en los adultos mayores comparado a sus contrapartes jóvenes (Figura 28B), lo que sugiere que las personas mayores a 60 años en respuesta a la vacunación tienen una disminución de células Tscm y Tfh.

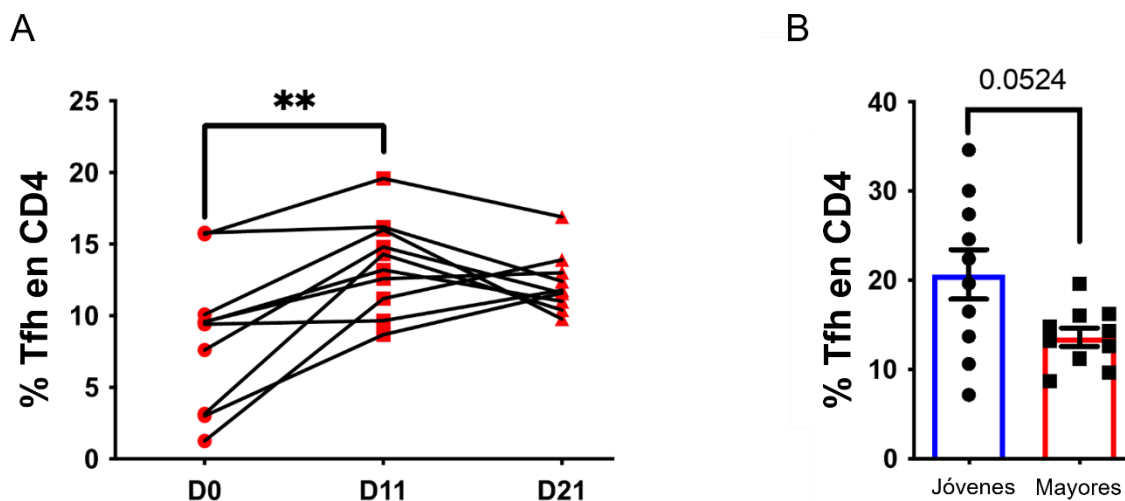


Figura 28. Expansión Tfh en adultos mayores en respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico. Adultos mayores (>60 años) fueron vacunados con Toxoide Tetánico y sus PBMCs fueron aisladas al día 0, 11 y 21 respecto a la vacuna. **(A)** Se cuantificó el porcentaje de células Tfh (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺) en los tres puntos tiempo. Test de Friedman con corrección de Dunn. **<0.01, y **(B)** se hizo una comparación de las Tfh en adultos jóvenes y adultos mayores al día pico de respuesta a la vacunación con TT (día 11). n=10. Test de Mann-Whitney.

Teniendo en cuenta la relación que se ha establecido a lo largo de este trabajo entre los LTscm y los LTfh, y la disminución de ambas poblaciones en respuesta a la vacuna con TT en los adultos mayores, se evaluó el porcentaje de células Tfh en los LTscm de los adultos mayores en el pico de la respuesta, así como los

marcadores Bcl-6 y CXCR3. De manera interesante, no se encontraron diferencias entre el porcentaje de Tfh en los LTscm (Figura 29A), ni entre las proteínas evaluadas (Figura 29B y C).

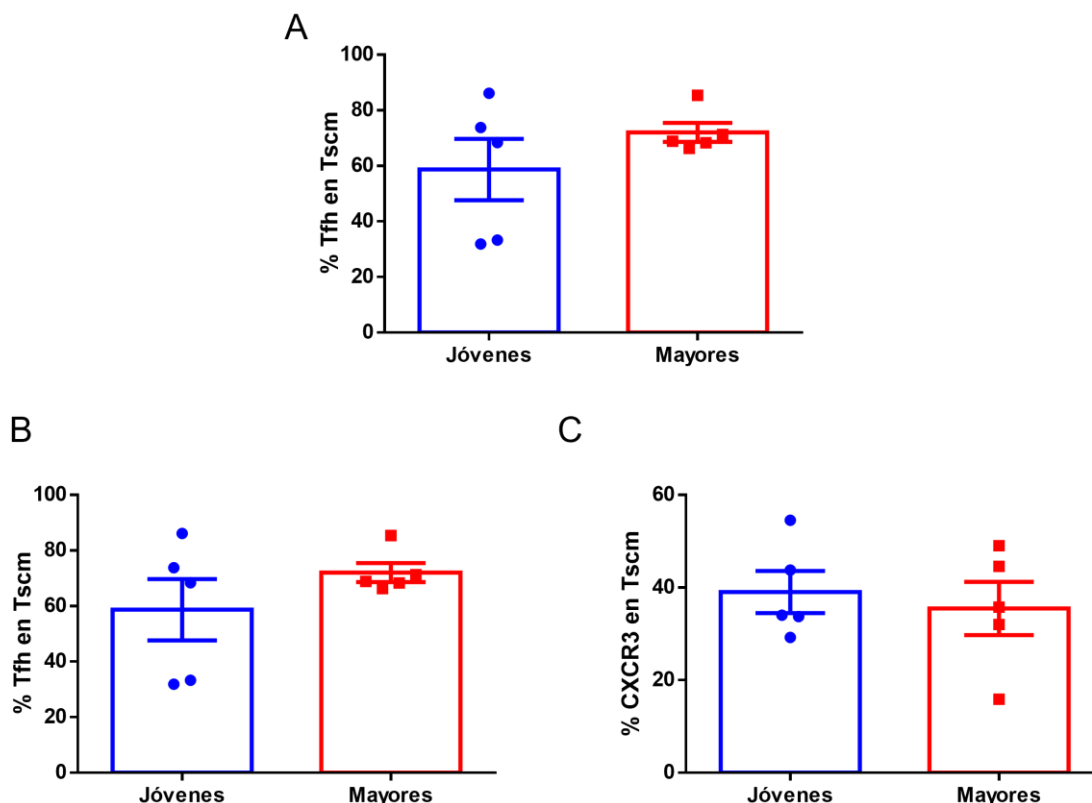


Figura 29. Marcadores Tfh en Tscm se mantienen con la edad. Adultos jóvenes (18-30 años) y mayores (>60 años) fueron vacunados con Toxoide Tetánico (TT) y se obtuvieron PBMCs al día 0, 11 y 21 post-vacunación. El porcentaje de (A) Tfh (CXCR5⁺PD-1⁺), (B) Bcl-6 y (C) CXCR3 en Tscm del día 11. n=5. Test de Mann-Whitney. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Sin embargo, al estimular estas células *in-vitro* con el TT sí se encontraron diferencias marcadas entre los adultos jóvenes y los adultos mayores. Primero, no se observó una disminución de los LTscm en los adultos mayores posterior a la estimulación de las células en el día 11 (Figura 30A), ni tampoco un incremento del porcentaje de LTscm con fenotipo Tfh (Figura 30B).

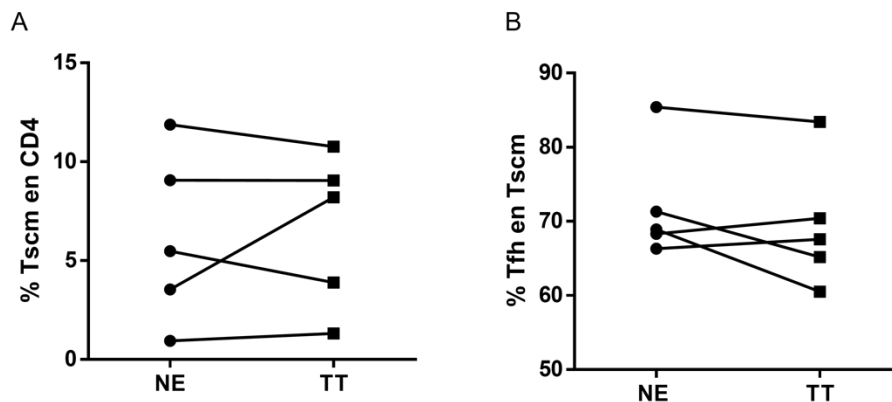


Figura 30. LTscm de adultos mayores en respuesta a la re-estimulación con TT. PBMCs aislados al día 11 post-vacunación con Toxoide Tetánico (TT) fueron estimulados con TT por 24 horas (TT) o dejados sin estimular (NE) y se midió el (A) porcentaje de LTscm en CD4 totales y (B) porcentaje de Tfh en Tscm. n=5. Test de Wilcoxon.

Lo anterior contrasta con lo observado en los adultos jóvenes (Figura 25), por lo que se comparó el cambio observado entre ambos grupos etarios. Al comparar el delta del porcentaje tanto de los Tscm totales como los LTscm con fenotipo folicular de los adultos jóvenes y los adultos mayores se encontró que en los adultos jóvenes la re-estimulación con TT inducía una disminución de los LTscm, mientras que en los adultos mayores el porcentaje de estas células se mantuvo (Figura 31A). Por otro lado, el delta del porcentaje de los LTscm con fenotipo Tfh en respuesta al reestímulo es positivo en los adultos jóvenes, a diferencia de los adultos mayores, en donde este delta es negativo (Figura 31B).

Esto sugiere que los LTscm de los adultos mayores no tienen la misma capacidad de diferenciarse y generar una respuesta adecuada después de un segundo encuentro antigénico, lo que podría explicar su deficiencia en la respuesta a vacunas y la disminución de producción de títulos de anticuerpos contra el TT (Figura S8). Contribuyendo a esta hipótesis, al evaluar las proteínas asociadas a un fenotipo Tfh y su activación al momento de re-estimular, se encontró que en los adultos jóvenes había un aumento importante de Bcl-6, CXCR3 y CD40L respecto a las células de los adultos mayores (Figura 32).

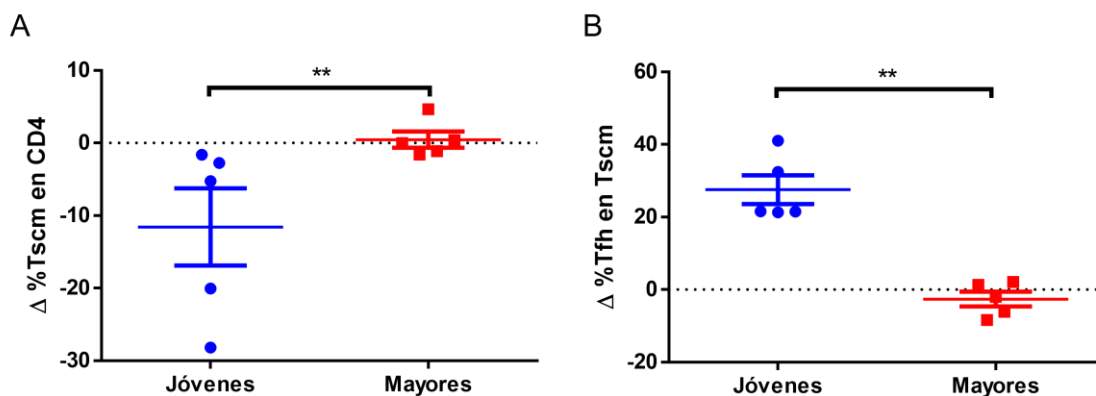


Figura 31. Delta de LTscm y Tfh de adultos jóvenes vs adultos mayores en respuesta a la re-estimulación con TT. PBMCs aislados al día 11 post-vacunación con Toxoide Tetánico (TT) fueron estimulados con TT por 24 horas o dejados sin estimular. Se comparó el delta (Δ) del porcentaje entre el estimulado y no estimulado de los (A) LTscm en CD4 totales y (B) Tfh en Tscm entre adultos jóvenes y adultos mayores. n=5. Test de Mann-Whitney. Las diferencias corresponden al promedio +SEM. ** < 0.01.

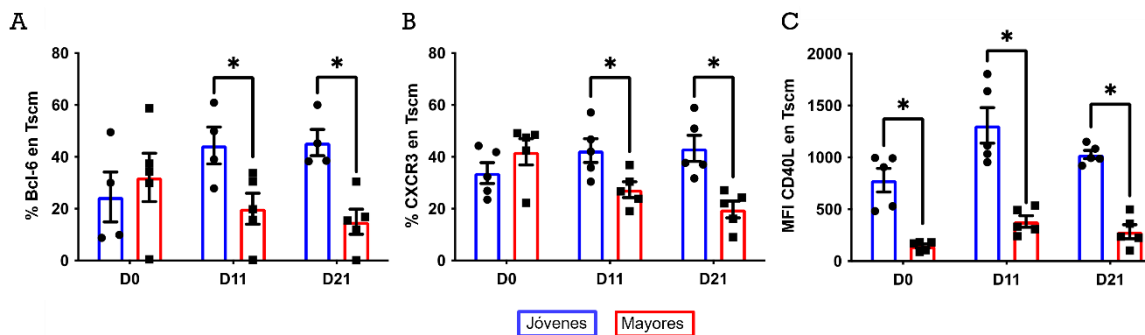


Figura 32. LTscm de adultos mayores en respuesta a la re-estimulación con TT. Proteínas asociadas con un fenotipo Tfh se midieron e Tscm de adultos jóvenes y mayores al día 0, 11 y 21 post-vacunación con Toxoide Tetánico (TT) después de ser estimuladas con TT por 24 horas. (A) Porcentaje de Bcl-6 en LTscm. (B) Porcentaje de CXCR3 en Tscm. (C) MFI de CD40L en LTscm. n=5. Las barras corresponden al promedio +SEM. * < 0.05.

Tomando estos resultados en conjunto, se puede pensar que en los adultos mayores hay una deficiencia en la generación de memoria a nuevas exposiciones antigénicas y que, a pesar de expresar marcadores similares a los de los adultos jóvenes, estas células parecen ser menos funcionales con la edad. Asimismo, no parece que haya un desacoplamiento entre el fenotipo Tfh y el Tscm con la edad, puesto que los marcadores evaluados se expresan de manera similar entre ambas poblaciones, pero la falta de capacidad de diferenciarse en otras células y la falta

de regulación al alza de proteínas de diferenciación y activación en las células de memoria sugiere un estado de agotamiento en el componente Tscm de los adultos mayores.

6.2.5. Análisis automatizado confirma el enriquecimiento de LT con fenotipo Tfh/Tscm en respuesta a la vacunación.

Paneles complejos de citometría, como los que se usaron en este trabajo, pueden ser realizados con distintos softwares especializados que han sido desarrollados para análisis no supervisados, reduciendo considerablemente el sesgo que ejerce el investigador sobre sus datos (91). El primer análisis automatizado se hizo con el software CITRUS sobre las muestras de la primer cohorte de los donantes vacunados. Aquí se encontró que al día 11 post-vacunación, los adultos jóvenes mostraron un incremento significativo de unos LTfh en reposo (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ICOS⁺IL-21⁻CD40L⁺) con fenotipo CM (CCR7^{int}CD45RA⁻) (Figura 33A y Figura S9A). Este hallazgo confirmó lo que fue observado a través del análisis manual en el que, hacia el día 11, hubo una mayor frecuencia de LTfh en la sangre periférica de adultos jóvenes (Figura 28B).

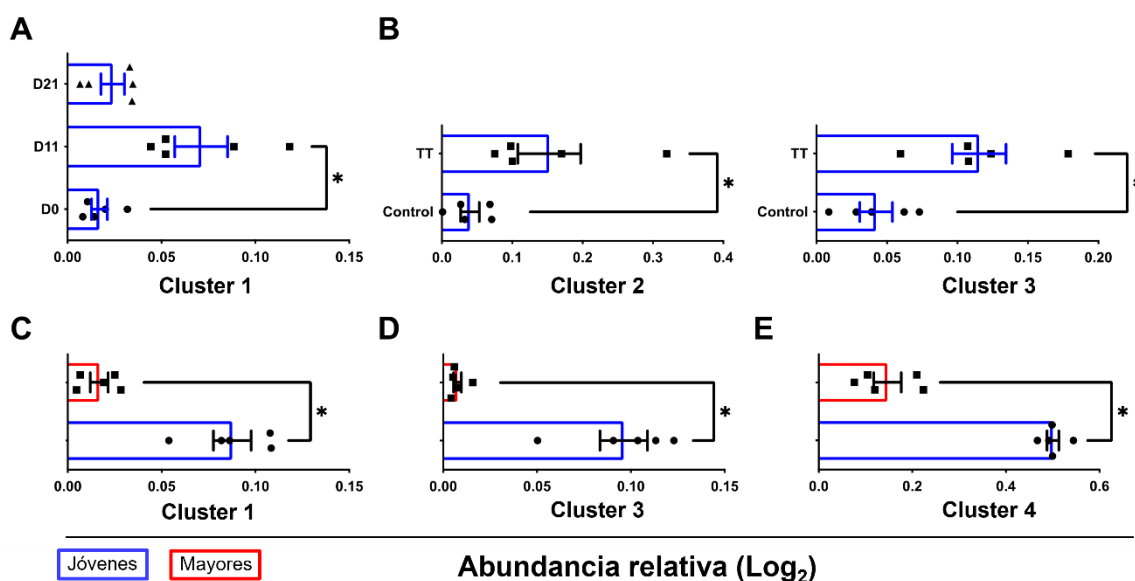


Figura 33. Poblaciones diferenciales entre adultos jóvenes y adultos mayores encontradas mediante el agrupamiento de células automatizado utilizando el software Citrus. La activación y el análisis estadístico se realizaron con el software CITRUS. Cada corrida de Citrus se realizó con 10.000 eventos por individuo, el número mínimo de células para considerar un cluster fue de 2.500 células. Los diagramas de caja y bigotes representan la abundancia de un grupo en términos de porcentaje de eventos totales (**p=0.0079, *p= 0.0239). Aquí se presentan algunos de los grupos de células T CD4⁺ que diferencian los siguientes grupos: **(A)** Tres puntos de tiempo de muestreo en el grupo joven *ex-vivo*. **(B)** Respuesta a la estimulación con TT al día 11 en adultos jóvenes. **(C)** Día 0 previo a la vacunación entre adultos jóvenes y mayores *ex-vivo*. **(D)** Día 11 después de la vacunación sin estimulación y **(E)** estimulada con TT. **Cluster 1:** CXCR5⁺PD-1⁺/CCR7^{int}CD45RA⁻/ICOS⁺CD40L⁺IL-21⁻; **Cluster 2:** CXCR5⁺PD-1⁺/CCR7⁻CD45RA⁻/ICOS⁺CD40L⁺IL-21⁻; **Cluster 3:** CXCR5⁺PD-1⁺/CCR7⁺CD45RA⁺/ICOS⁺CD40L⁺IL-21⁺; **Cluster 4:** CXCR5⁺PD-1^{int}/CCR7⁺CD45RA⁺/ICOS⁺CD40L⁺IL-21⁺.

Luego, al evaluar la respuesta *in-vitro* de los adultos jóvenes a la estimulación con TT (día 11 después de la vacunación), el análisis automático mostró que dos grupos de LTfh aumentaron su frecuencia cuando se estimularon, en comparación con los controles. Mientras que el clúster 2 (Figura 33B y Figura S9B) no expresó IL-21 y tenía un fenotipo EM, el clúster 3 tuvo un fenotipo “*Naïve-like*” (CCR7⁺CD45RA⁺), expresaba CD40L y producía IL-21.

Al comparar las muestras de los adultos jóvenes y mayores para identificar grupos cuya expresión fuera diferente entre ambos grupos, se encontró que al día 0 (Figura 33C y S9C) y al día 11 (Figura 33D y S9D), la abundancia de LTfh en adultos jóvenes fue diferente en los dos grupos. En el día 0, un mayor porcentaje de subconjunto de LTfh en reposo con un fenotipo CM (Cluster 1), y en el día 11, un subconjunto de células con fenotipo virgen (Cluster 3) diferenció claramente a los adultos jóvenes de los adultos mayores. Finalmente, al día 11, la estimulación *in-vitro* indujo una mayor frecuencia de LTfh CCR7⁺CD45RA⁺ con altos niveles de expresión de CD40L y producción de IL-21 en adultos jóvenes (Figura 33E y S9E), lo que demuestra la importancia de esta nueva población celular en respuesta a TT.

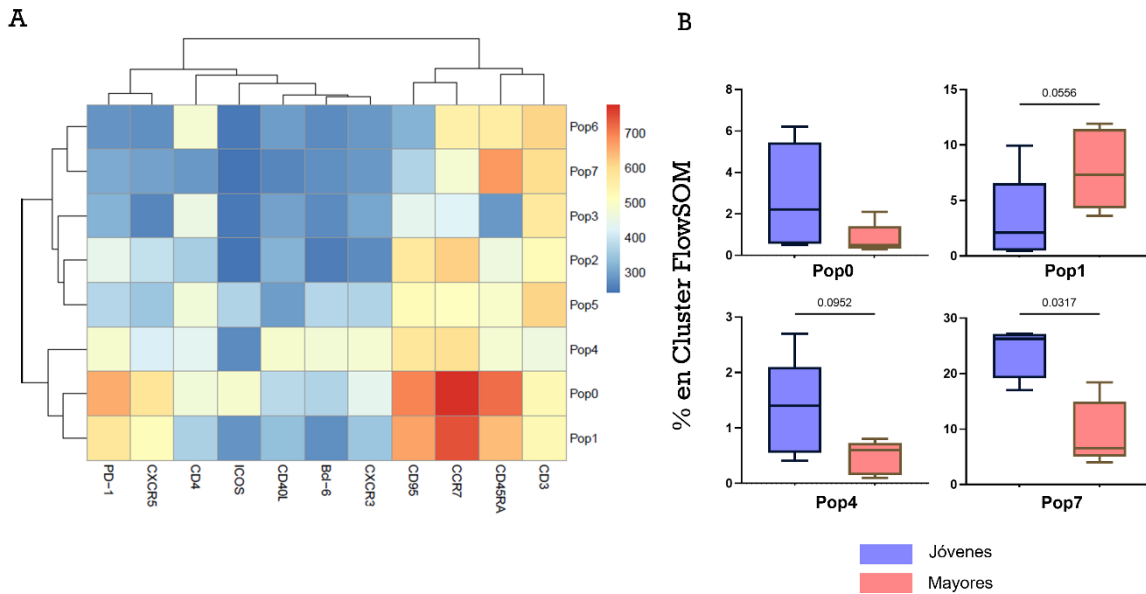


Figura 34. Poblaciones diferenciales entre los adultos jóvenes y mayores en respuesta a la vacunación con TT mediante el agrupamiento de células automatizado utilizando el software FlowSOM. (A) Mapa de calor que muestra el perfil de expresión de cada marcador en los 8 grupos identificados en el archivo concatenado de las muestras. **(B)** Diagrama de caja y bigotes que muestra el porcentaje de LT de cada grupo en los principales grupos identificados en FlowSOM. n = 5. Datos presentados como medias \pm SEM. * <0,05.

Las muestras de la segunda cohorte de donantes vacunados, en donde sí se incluyó a CD95 como marcador para distinguir entre células vírgenes y Tscm, se analizaron con FlowSOM, otro software automatizado con el que se pudo confirmar el hallazgo de que la subpoblación CD4 con fenotipo *stem* y Tfh (POP0) fue mayor en los adultos jóvenes, pero no en los adultos mayores (Figura 34). Una segunda población (POP4) con un fenotipo similar a LTfh, que expresa CXCR3, ICOS y Bcl-6 también aumentó en adultos más jóvenes. Finalmente, un grupo (POP1) con fenotipo citotóxico (CD3+CD4-) y de tipo folicular que no fue encontrado en el análisis manual ni por Citrus se incrementó en adultos mayores (Figura 34).

6.3. Análisis de Enriquecimiento de Genes

6.3.1. Las células Tfh tienen una menor capacidad de autorrenovación que los linfocitos Tscm y Tcm.

La capacidad de autorrenovación de las células es una de las características esenciales de los LTscm y conforme se diferencian en Tcm o Tem esta capacidad se reduce (67). Lef-1 y Tcf-1 son factores de transcripción que están involucrados con el potencial pluripotente de las Tscm, y ambas proteínas se encuentran corriente debajo de la vía Wnt- β -Catenina (27, 30). Teniendo en cuenta que las Tfh demostraron predominantemente un fenotipo de memoria central, se decidió comparar la actividad las vías de Wnt- β - Catenina y Lef1 entre las Tscm y las Tfh.

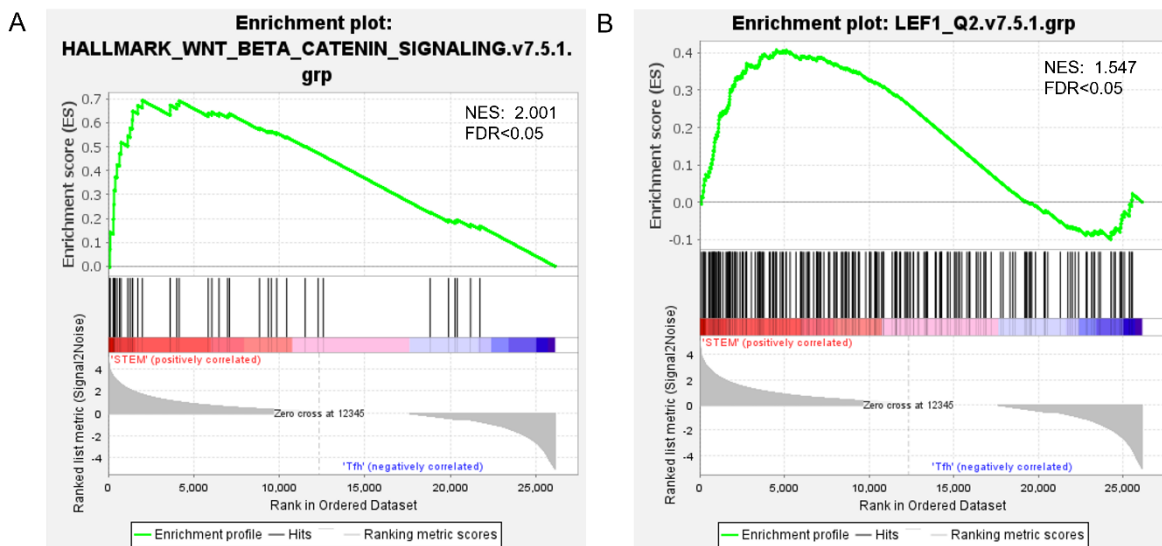


Figura 35. Análisis Enriquecimiento de genes de vías de autorrenovación celular. RNA-seq de células Tscm (GSE143215) y Tfh (GSE130793) se obtuvieron de bases de datos públicas. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA de rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA de (A) Wnt- β -catenina (M5895) y (B) Lef1 (M3572) entre Tscm (rojo) y Tfh (azul). El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

Partiendo del transcriptoma disponible en bases públicas de estas subpoblaciones (Tscm, Tcm, Tem: GSE143215; y Tfh GSE130793) (76, 77) se hizo un análisis de

enriquecimiento de genes (GSEA) de estas dos vías de señalización intracelular (Figura 35). Como se puede observar, la gran mayoría de genes asociados a ambas vías se encontró en la parte izquierda de las gráficas, mostrando una curva positiva (NES>1.5), lo que indica un enriquecimiento significativo (FDR<0.05) de ambas vías de señalización en los LTscm (Figura 35B). Particularmente, se encontraron enriquecidos genes de proteínas asociados con longevidad y autorrenovación como Tcf7, Lef1, Notch1, Tp53, AMPD3 y PAK1 (Figura S10 y Tabla S2), mostrando que las células Tscm tienen un potencial pluripotente mucho mayor al de las Tfh.

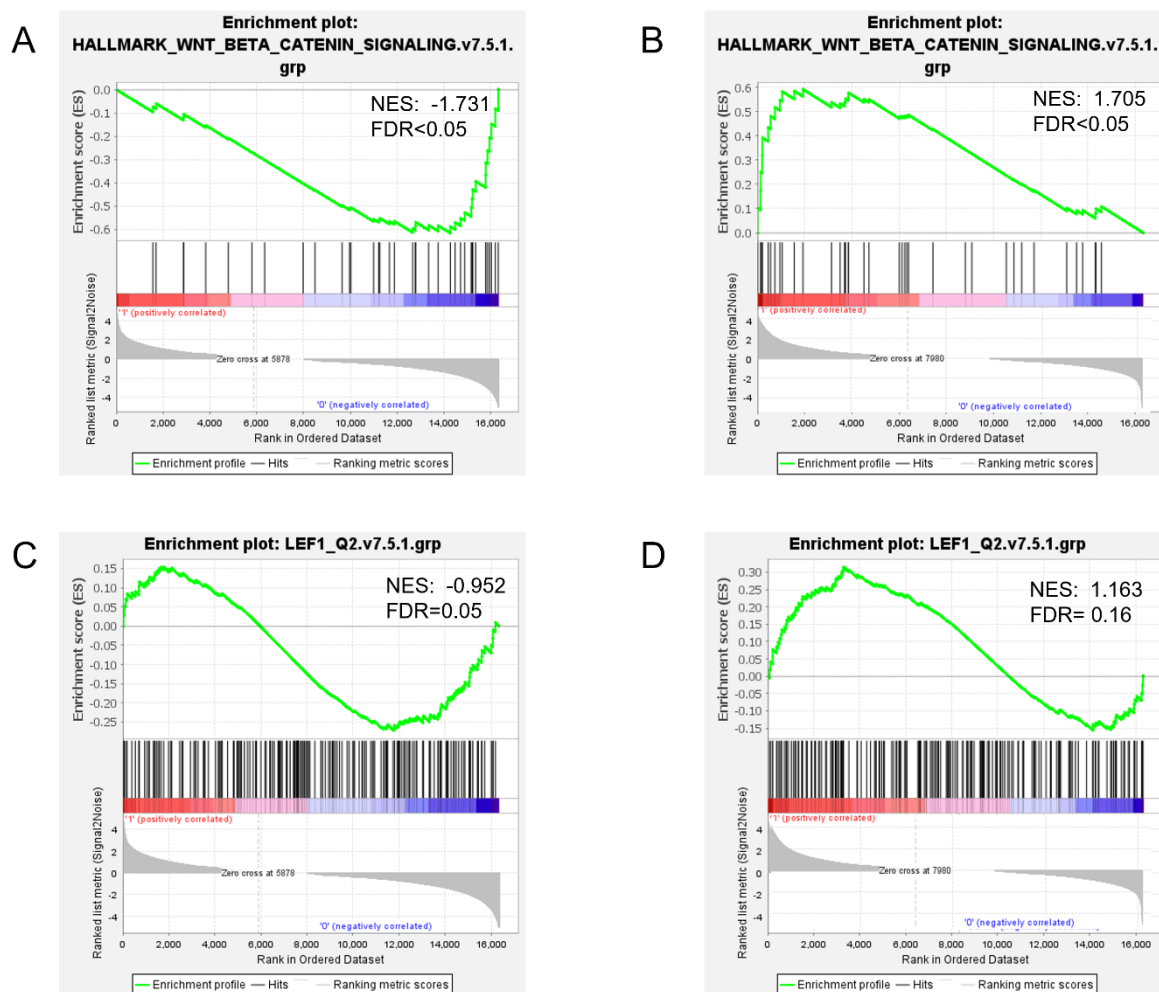


Figura 36. Análisis Enriquecimiento de genes asociados a autorrenovación RNA-seq de células Tscm (GSE143215), Tfh (GSE130793) y Tem (GSE97863) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA para Wnt-β-catenina (M5895) entre **(A)** Tfh (rojo) vs Tcm (azul) y **(B)** Tfh (rojo) vs Tem (azul), y para Lef1 (M3572) entre **(C)**

Tfh (rojo) vs Tcm (azul) y **(D)** Tfh (rojo) vs Tem (azul). El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

En este sentido, se procedió a comparar ambas vías entre las Tfh y las otras dos poblaciones de memoria: Tcm y Tem (Figura 36). Las Tcm mostraron un enriquecimiento tanto para Wnt- β -Catenina como para Lef1 (Figura 36 A y C), en genes como Notch1, Lef1, Tp53, Tcf7 y Wnt1, entre otros (Anexo I). En contraste, se observó que las Tfh tuvieron un mayor enriquecimiento de estas vías que las Tem (Figura 36 B y D), lo que sugiere que las Tfh, en lo que se refiere a capacidad de autorrenovación, se posicionan entre las Tcm y las Tem.

Se ha propuesto que las células Tcm aún no se han comprometido con ningún linaje y secretan predominantemente IL-2, y al diferenciarse en Tem empiezan a expresar los factores de transcripción maestros de los distintos tipos Th (Th1, Th2, Tfh, etc), dependiendo de las citoquinas que se encuentren en el ambiente (53). La señalización corriente abajo de muchos de los receptores de las citoquinas, incluyendo los de la familia gamma común, se hace a través de las proteínas JAK/STAT (11, 82). Por este motivo, se decidió también estudiar dos vías JAK/STAT que se han asociado con un fenotipo muy diferenciado y uno poco diferenciado: STAT5 y STAT3, respectivamente, en las Tscm y las Tfh (Figura 37).

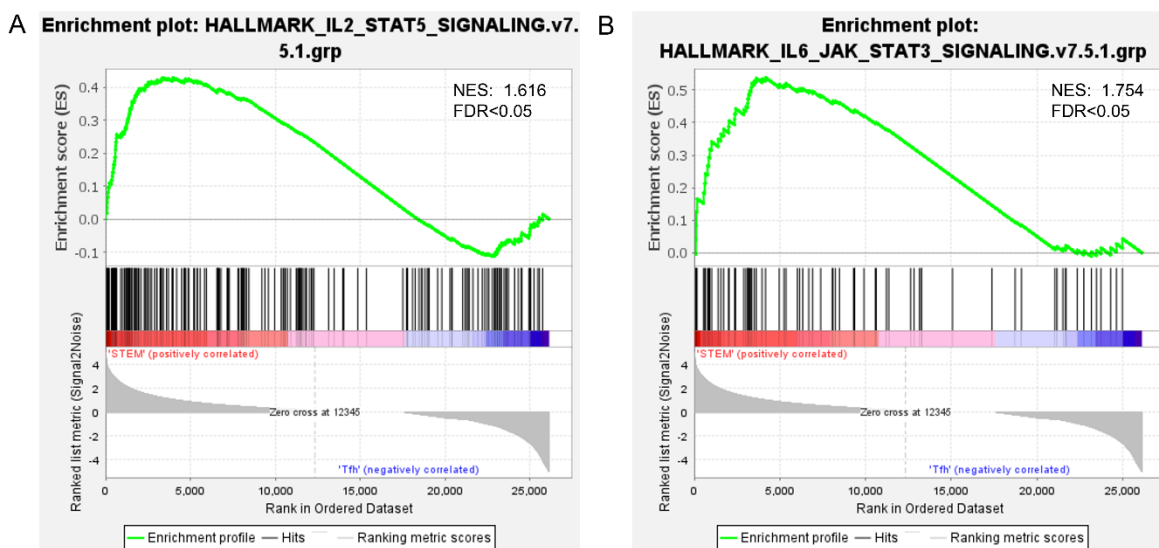


Figura 37. Análisis Enriquecimiento de genes de vías JAK/STAT. RNA-seq de células Tscm (GSE143215) y Tfh (GSE130793) se obtuvieron de bases de datos públicas. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA de **(A)** STAT5 (M5947) y **(B)** STAT3 (M5897). El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

Para ambas vías se encontró un enriquecimiento de genes en las Tscm respecto a las Tfh (Figura 37A y B). Dentro de los genes enriquecidos pertenecientes a la vía STAT5 (Figura S11A, Tabla S3), se encontraron las subunidades alfa y beta de la IL-2 (IL2RA e IL2RB), confirmando los hallazgos con citometría de flujo de CD25 (Figura 11A) y lo reportado por Gattinoni sobre CD122 en esta población de memoria (27). Asimismo, también estuvieron enriquecidos los genes de receptores de citoquinas como la IL-4 (IL4R) y la IL-10 (IL10RA) y de la proteína IRF4, los cuales se han asociado a la acción de la IL-21 (82), sugiriendo la importancia de esta citoquina en las Tscm. Por su lado, en la vía de STAT3 (Figura S11B, Tabla S3), se encontraron enriquecidos los receptores de la IL-12 (IL12RB1) y la IL-15 (IL15RA), lo que podría estar explicando en parte porqué las Tscm y no las Tfh expanden en respuesta a la IL-15 en nuestro modelo de cultivo *in-vitro*. No obstante, el enriquecimiento de STAT1, STAT3, TGF β e IL-17 (IL17RA e IL17RB) también sugiere que estas células son más dependientes de la acción de IL-7 e IL-21 (47, 82).

Como referencia, también se comparó el enriquecimiento de estas dos vías en células EM, que representan una población altamente diferenciada. Efectivamente, tanto las Tscm como las Tfh mostraron una regulación a la baja de la vía de STAT5 respecto a las TEM (Figura S12A y B) en genes como el receptor de IL-2, IFN γ y EOMES (Anexo I), los cuales se han asociado con un fenotipo Th1 (92). En contraste, genes de la vía STAT3 estuvieron enriquecidos en Tscm y Tfh (Figura S12C y D), lo que sugiere que la acción de STAT5 lleva a una mayor diferenciación, mientras que la activación de la vía STAT3 es deseable para mantener un grado de diferenciación menor.

Como se mencionó previamente, Bcl-6 es un factor de transcripción clave en la diferenciación de las Tfh y se encuentra corriente debajo del receptor de IL-21 (57, 93). Asimismo, NFAT es otro factor de transcripción que se ha asociado con las Tfh, siendo el responsable del perfil secretorio de estas células respecto a otros subtipos Th (94). Por este motivo, se decidió evaluar el enriquecimiento de estos dos factores de transcripción en células Tscm respecto a las Tfh (Figura 38).

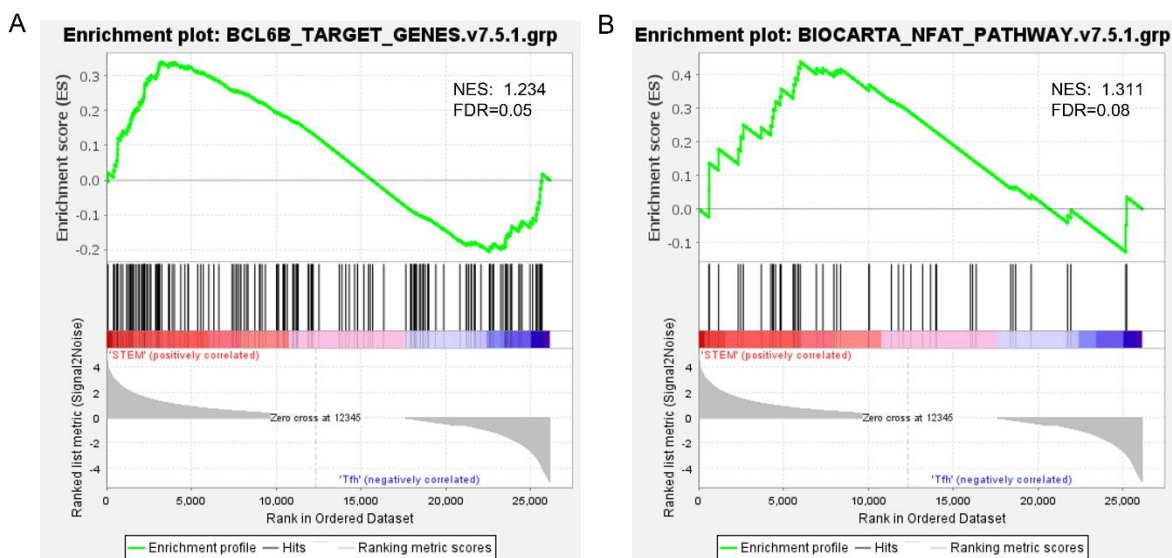


Figura 38. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas con fenotipo Tfh. RNA-seq de células Tscm (GSE143215) y Tfh (GSE130793) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA de **(A)** Bcl-6 (M29904) y **(B)** NFAT (M2288). El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

Similar a lo observado con STAT3 y las vías de autorrenovación, las Tscm mostraron un enriquecimiento de genes asociados con Bcl-6 y NFAT (Figura 38). De la vía de Bcl-6, de los genes enriquecidos se destacan STAT1, SOCS2 en las Tscm, los cuales se han asociado al efecto de la IL-21, así como varios genes asociados al metabolismo de lípidos como LDLR y CISH (Figura S13A y Tabla S4). En cuanto a NFAT, varios genes relacionados a esta vía (NFATc, PI3K y ligandos) y quinasas dependiente de AMPc se encontraron enriquecidos en las Tscm (Figura S13B y Tabla S4). Al comparar estas vías entre Tfh y Tcm/Tem se encontró que

tanto Bcl-6 como NFAT estaban más enriquecidos en las foliculares (Figura S14, Anexo I), lo que sugiere que estas dos vías que se han asociado históricamente con el fenotipo Tfh también juegan un papel importante en la diferenciación y acción de las Tscm.

6.4. Memoria y actividad mitocondrial

6.4.1. Los LTscm tienen un mayor potencial de memoria que las otras subpoblaciones de memoria.

La generación de memoria es un fenómeno multifactorial que incluye una mayor longevidad celular (32), la regulación al alza de ciertos factores transcripción (95) y la reprogramación epigenética de las células (96). En la última década, adicional a los factores mencionados, se ha sumado la importancia que tiene el metabolismo en el modelamiento de la respuesta y la diferenciación de las células inmunes (97). Los linfocitos de memoria deben ser capaces de pasar rápidamente de un estado de patrullaje quiescente a uno altamente proliferativo y efector, lo que le requiere a estas células una alta demanda energética (98). En este sentido, las células de memoria deben contar con una biomasa mitocondrial elevada capaz de suplir los requerimientos de ATP para la producción de proteínas y división celular (99).

Además de una mayor biomasa mitocondrial, es necesario que las mitocondrias puedan producir altos niveles de ATP, por lo que se esperaría que las células de memoria cuenten con un alto potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m). Para poder determinar el estado basal del Ψ_m y su cambio en respuesta a la estimulación, se tomaron PBMCs y estas fueron activadas con un agente policlonal. Tanto para CD4 (Figura S15A) como para CD8 (Figura S15B) se encontró un aumento significativo del Ψ_m en respuesta a la estimulación. Esto refleja que para cumplir las demandas energéticas de la activación celular se requiere un aumento del Ψ_m , que de manera indirecta muestra la producción de ATP en las mitocondrias.

Posteriormente, se hizo la medición del Ψ_m en las subpoblaciones de memoria en PBMCs no estimuladas para ver el estado basal del potencial en estas células. El comportamiento del Ψ_m varió entre las poblaciones, observando que el valor más bajo lo tuvieron las células vírgenes, seguidas por las células de memoria central y efectora (Figura 39A). En contraste, las células con mayor potencial de membrana fueron los LTscm y las terminalmente diferenciadas. Resulta interesante que estas poblaciones, que representan los dos puntos extremos de diferenciación de la memoria converjan en esta característica. Al estimular las células, independientemente de su fenotipo, todas aumentaron su Ψ_m , aunque este cambio no fue significativo en las EMRA (Figura 39B). Los LT CD4 vírgenes tuvieron el aumento más dramático (3X) de su potencial de membrana, pero reteniendo el fenotipo virgen (CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁻), sugiriendo que los cambios mitocondriales preceden la expresión de CD95 y el cambio de isoforma de RA o R0. En las tres poblaciones de memoria, el incremento del Ψ_m fue cercano a 2x, demostrando su capacidad de suplir los requerimientos energéticos necesarios para una segunda respuesta.

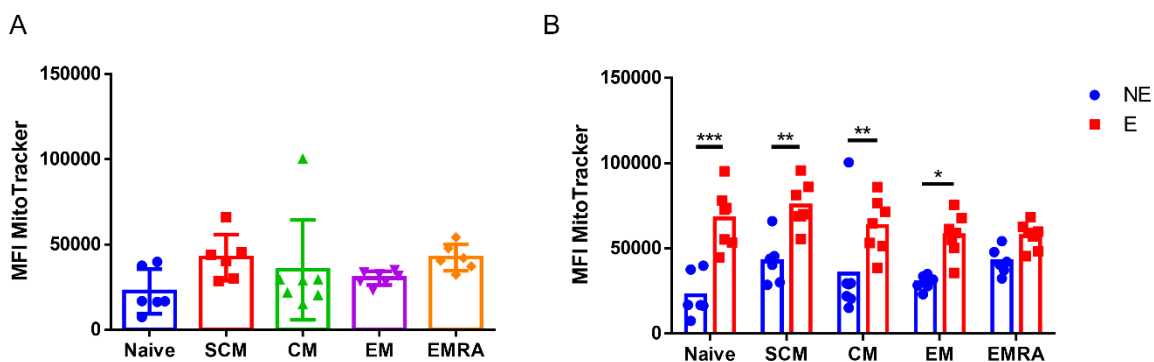


Figura 39. Potencial de membrana mitocondrial de las poblaciones de memoria en linfocitos T CD4. Linfocitos CD4 estimulados con perlas anti-CD3/28/2 durante 48 h en una proporción 2:1 fueron cosechados y teñidos con MitoTracker (100 nM) y marcadores de memoria para determinar diferentes subpoblaciones LT CD4. *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM) y terminalmente diferenciadas (EMRA). En (A) el MFI de MT en las poblaciones de memoria y (B) al ser estimuladas. n=10. ANOVA de dos vías. * <0.05 ; ** < 0.01 ; *** <0.001 . Las barras corresponden al promedio +SEM.

Para ver el efecto de las citoquinas sobre el Ψ_m , se comparó en CD4 totales (Figura 40A) y en los LTscm (Figura 40B) después de los 15 días del cultivo bajo las distintas

condiciones establecidas. En general, no se pudo observar ningún patrón claro entre los distintos tratamientos ni en CD4 totales, ni en las subpoblaciones de memoria. Sin embargo, al ver los histogramas de la sonda de MitroTracker, se encontró que en la gran mayoría de tratamientos se veían al menos dos picos de intensidad (Figura S16), por lo que se decidió no hacer solamente la comparación entre la media de intensidad de la sonda sino caracterizar una población de bajo potencial y otra de alto potencial mitocondrial.

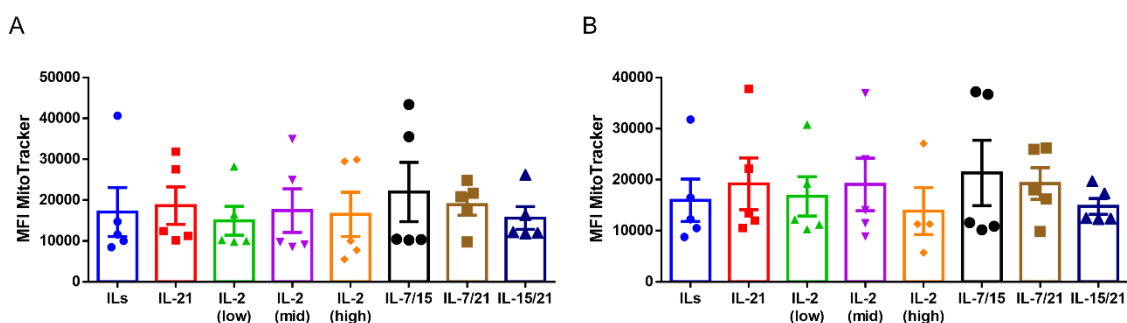


Figura 40. Efecto de las citoquinas en el potencial de membrana mitocondrial. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs), IL-21, IL-2 *high*, IL-2 *mid*, IL-2 *low*, IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. MFI de MitoTracker en **(A)** LT CD4 totales y **(B)** LTscm. $n=5$. Test de Friedman con corrección de Dunn. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Con este nuevo acercamiento se persiguió buscar si había una distribución diferencial de estas poblaciones de bajo y alto potencial, y si bien no se pudieron establecer diferencias significativas entre las distintas condiciones de cultivo (Figura 41A), se confirmó que los LTscm en su mayoría cuentan con un alto potencial de membrana mitocondrial, pero que este se ve ligeramente reducido en presencia de IL-2 (Figura 41B), sugiriendo un antagonismo entre el potencial mitocondrial de esta subpoblación de memoria y esta citoquina.

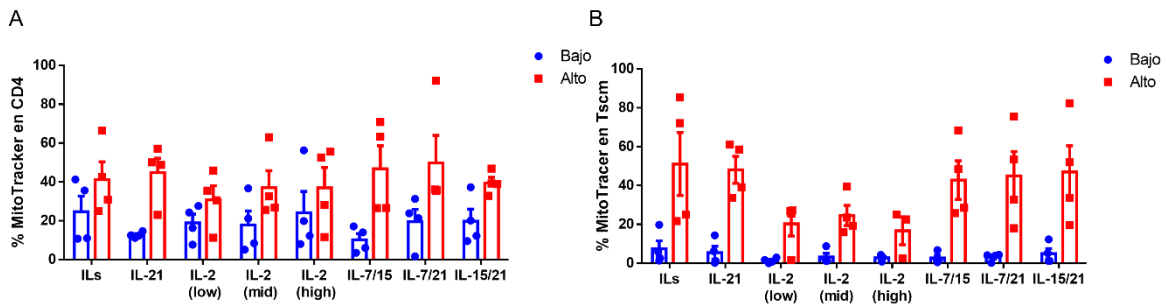


Figura 41. Distribución potencial de membrana mitocondrial. Al día 15 de los cultivos respectivos, las células fueron cosechadas y teñidas con la sonda de MitoTracker CMX ROS. En el gate de citometría se determinó la población de bajo potencial de membrana y la de alto potencial de membrana en **(A)** LT CD4 totales y **(B)** LTscm. n=5. ANOVA de dos vías. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Haciendo el análisis reverso, se empezó seleccionando la población de alto y bajo potencial de membrana en LT CD4 totales y se determinó el fenotipo de memoria dentro de ellas en los distintos cultivos (Figura 42). Fue de particular interés el cultivo de IL-7, 15 y 21, puesto que este fue el cultivo en donde se obtuvo la mayor cantidad de células con fenotipo Tscm, y se encontró que las células con un bajo potencial mitocondrial tuvieron un alto porcentaje de células vírgenes (38,9%), seguido por células EM (25,6%) y que el resto de las poblaciones se distribuían de manera similar (aproximadamente 12%). En contraste, las células con un alto potencial correspondieron a los estados menos diferenciados de la memoria: SCM y CM (Figura 42A).

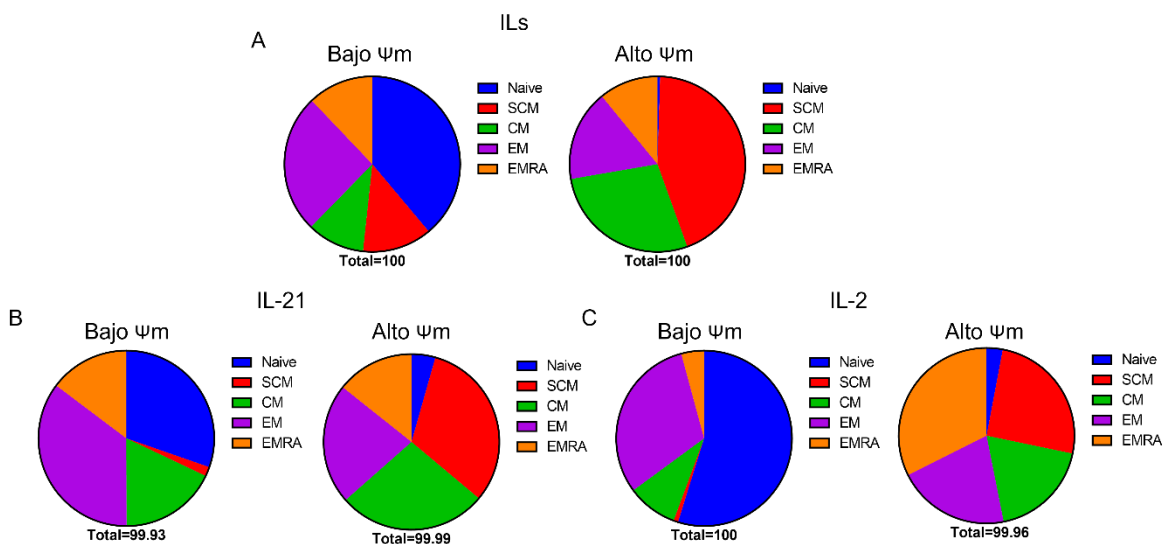


Figura 42. Fenotipo de memoria de acuerdo con el potencial de membrana mitocondrial. Al día 15 de los cultivos respectivos, las células fueron cosechadas y teñidas con la sonda de MitoTracker CMX ROS. En el gate de citometría se determinó la población de bajo potencial de membrana y la de alto potencial de membrana en LT CD4 totales y dentro de estos gates se evaluó el fenotipo de memoria *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM) y terminalmente diferenciadas (EMRA) en los cultivos suplementados con **(A)** IL-7, 15 y 21 (ILs), **(B)** IL-21 y **(C)** IL-2 *mid* (100 U/ml). n = 5.

Adicionalmente, este análisis también se hizo en los cultivos con IL-21 e IL-2. Se escogieron estos dos cultivos, ya que se ha reportado el efecto inverso que tienen estas dos citoquinas sobre aspectos metabólicos de las células (51). Para la IL-21, se vio una distribución bastante similar de las subpoblaciones de memoria respecto a la combinación de IL-7, 15 y 21, aunque se pudo apreciar una mayor representación de memoria efectora tanto en bajo como alto potencial (Figura 42B). Por su lado, en la IL-2 el patrón del fenotipo de memoria en las células con un bajo potencial de membrana se mantuvo, la distribución de las subpoblaciones cambió bastante en las células con alto potencial (Figura 42C). El fenotipo con mayor representación fue el de las células terminalmente diferenciadas, seguidas por las SCM y EM. Estos datos en conjunto sugieren que la IL-7, 15 y 21 inducen cambios metabólicos en las células de memoria que les permite tener alto potencial de membrana mitocondrial, mientras que la IL-2 parece generar células mucho más diferenciadas, con una alta capacidad de producción de ATP.

6.4.2. Los LTfh son las células con mayor capacidad energética.

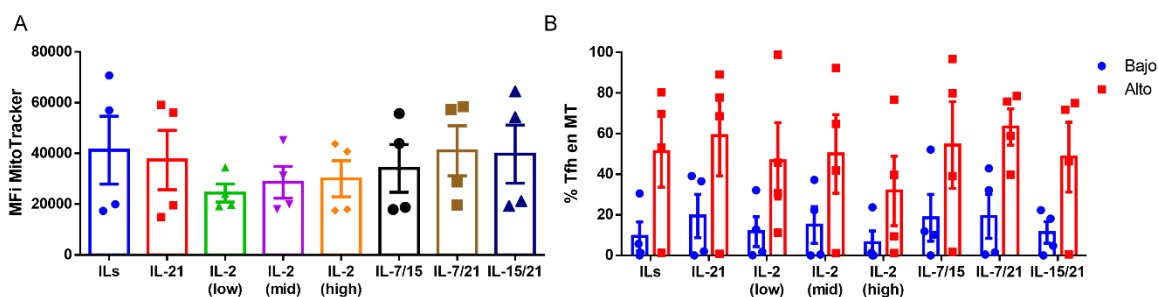


Figura 43. Potencial de membrana mitocondrial en LTfh. Al día 15 de los cultivos respectivos, las células fueron cosechadas y teñidas con la sonda de MitoTracker CMX ROS. En **(A)** dentro de la población Tfh (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺) se midió el MFI de MitoTracker y en **(B)** se determinó la población de bajo potencial de

membrana y la de alto potencial de membrana en en LT CD4 totales y luego se evaluó el porcentaje de células Tfh. n=5. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Habiendo relacionado el fenotipo *stem* con el folicular, se procedió a evaluar también el potencial de membrana de estas células. Para ello, se utilizó tanto el MFI, como la estrategia de los picos de intensidad de la onda (Figura 43). En general se encontró que estas células cuentan con un alto potencial mitocondrial, especialmente en los cultivos con IL-21 y en menor proporción en los de IL-2. Al comparar los porcentajes de alto y bajo potencial (Figura 43B) se asemejan al comportamiento observado en los LTscm, contribuyendo la hipótesis de la convergencia de estos dos fenotipos CD4.

Por este motivo se comparó en los cultivos con la combinación de IL-7, 15 y 21, y en la concentración intermedia de IL-2 el potencial de membrana de las poblaciones de memoria y las Tfh. Se tomó como ejemplo estas dos condiciones, al representar el esquema convencional que se usa para expandir LT y el que se propone como alternativa, tanto en estudios recientes (52), como en esta tesis. En el cultivo con la combinación de citoquinas, en general, los LTscm y CM tuvieron un mayor potencial de membrana, que sólo fue superado por los Tfh (Figura 44A), mientras que con IL-2 todas las poblaciones parecieron tener un potencial de membrana parecido, salvo por los Tfh quienes se mantiene como la población con mayor potencial de membrana mitocondrial (Figura 44B).

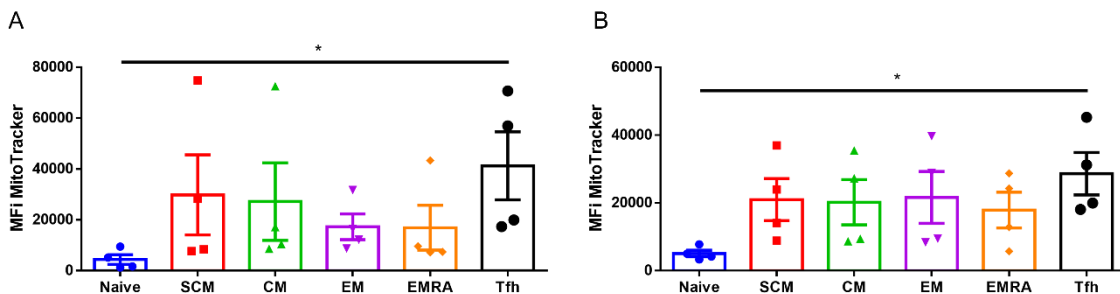


Figura 44. Potencial de membrana en memoria y Tfh en cultivos. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con (A) IL-7,

15 y 21 (ILs) o **(B)** IL-2 (100 U/ml). MFI de MitoTracker n=5. Test de Friedman con corrección de Dunn. *<0.05. Las barras corresponden al promedio +SEM.

Como el Ψ_m observado para las Tscm y Tfh fue bastante similar, contrastando con el de células de CM y EM, se hizo un análisis por GSEA de diferentes rutas metabólicas. Canónicamente las poblaciones de memoria tienen regulada a la baja las vías asociadas a la glicólisis y, por ende, su consumo de glucosa es muy bajo (69). Al comparar genes relacionados con la glicólisis y mTORC1, un maestro regulador de esta ruta metabólica se encontró que ambas rutas estaban enriquecidas en las Tfh, sugiriendo que estas células tienen un perfil más efector y requieren de una mayor cantidad de energía (Figura 45A y B). Congruente con esto, las células Tfh también mostraron un enriquecimiento significativo de producción de ROS y genes asociados a esto (Figura 45C), reafirmando que estas células son más diferenciadas y acumulan una mayor cantidad de subproductos de la glicólisis. No obstante, las Tfh también mostraron una regulación al alza de genes asociados con la FAO (Figura 45D), lo que sugiere que esta población celular utiliza ambas rutas para sus requerimientos energéticos.

Si bien las Tfh tuvieron un enriquecimiento de los genes asociados a la glicólisis respecto a las Tscm, se encontró una asociación negativa de estas rutas, así como de la producción de ROS en las Tfh en comparación con las CM y EM (Figura S17), sugiriendo que estas células no consumen tanta glucosa como estas subpoblaciones de memoria y de esta forma previenen entrar en un mayor grado de diferenciación. De igual forma que con las Tscm, las Tfh también mostraron un enriquecimiento de genes asociados con la FAO respecto a las otras subpoblaciones de memoria (Anexo I).

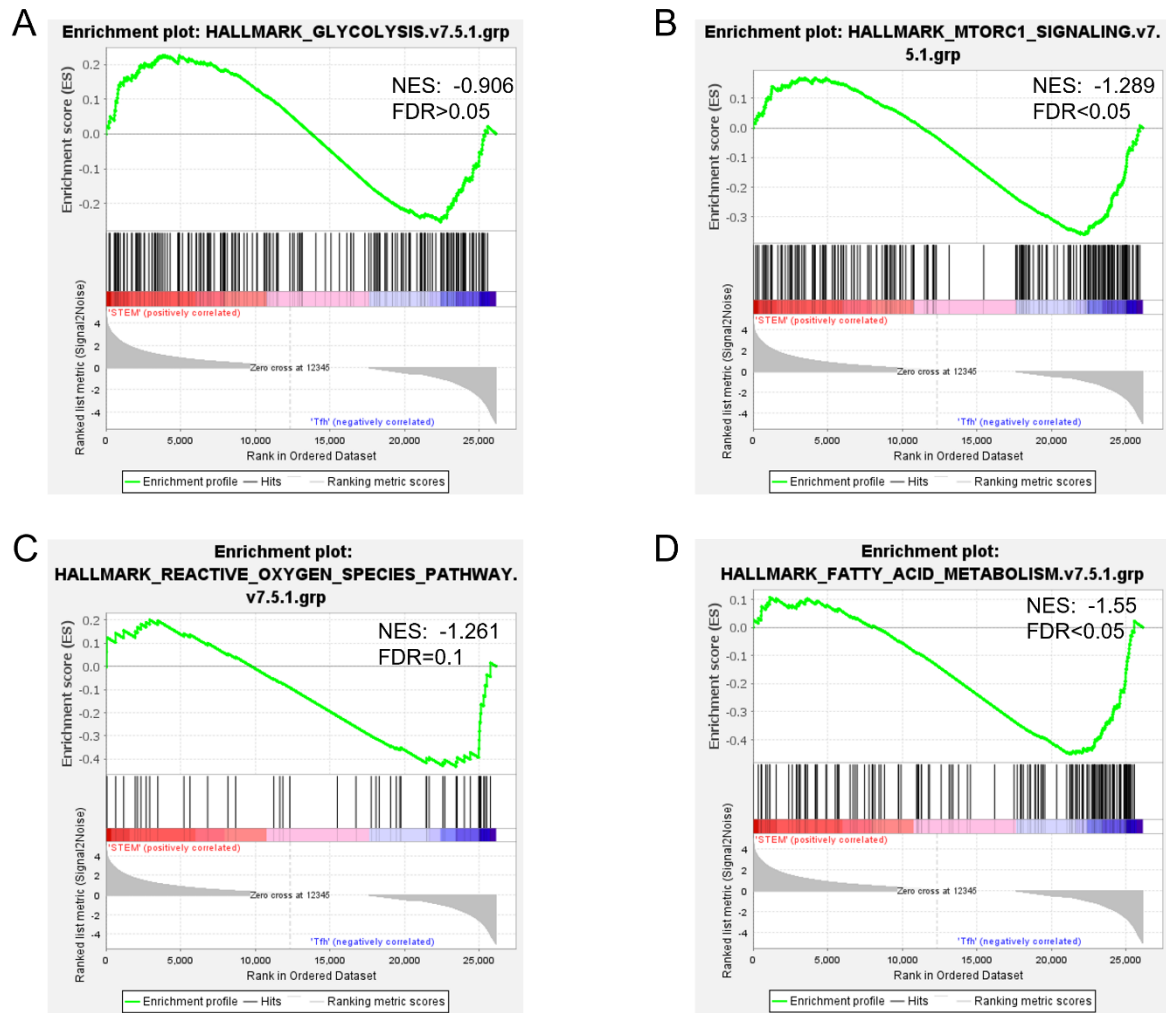


Figura 45. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas a metabolismo. RNA-seq de células Tscm (GSE143215) y Tfh (GSE130793) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA de **(A)** mTORC1 (M5924), **(B)** glicólisis (M5937), **(C)** ROS (M5938) y **(D)** FAO (M5935). El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

De este último set de experimentos se puede concluir entonces que la combinación de IL-7, 15 y 21 induce no sólo un fenotipo poco diferenciado de memoria, sino que además promueve células con un mayor potencial de membrana mitocondrial, característica que también comparten con los linfocitos Tfh, lo que sugiere su alta capacidad de suplir altas demandas energéticas en caso de activarse. En contraste, las estrategias convencionales de expansión disminuyen el potencial de membrana

en las poblaciones de memoria, favoreciendo más a los LT terminalmente diferenciados, que si bien tienen una alta capacidad efectora son células que tienen sobrevividas muy cortas y por ende no son buenos candidatos para la TAC

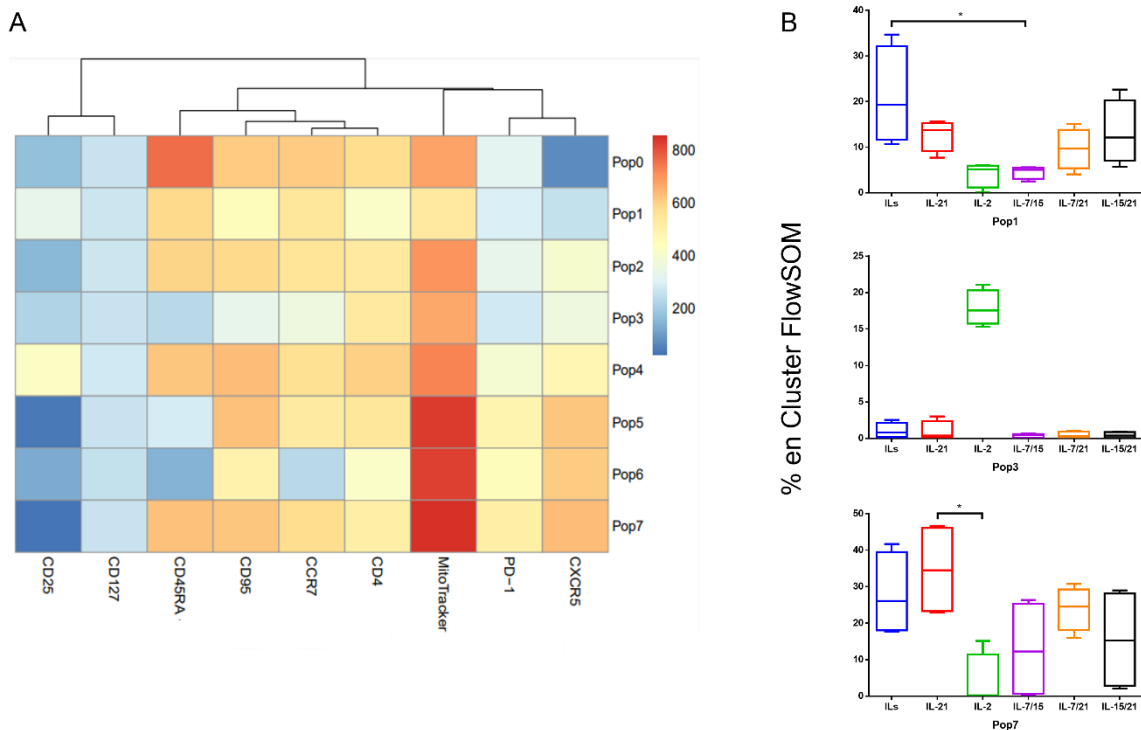


Figura 46. Poblaciones diferenciales entre los distintos cultivos encontradas mediante el agrupamiento de células automatizado utilizando el software FlowSOM. (A) Mapa de calor que muestra el perfil de expresión de cada marcador en los 8 grupos identificados en el archivo concatenado de las muestras. **(B)** Diagrama de caja y bigotes que muestra el porcentaje de LT de cada grupo en los principales grupos identificados en FlowSOM. n = 5. Datos presentados como medias \pm SEM. * <0,05.

De igual forma, las muestras de las células expandidas utilizando las distintas combinaciones de citoquinas también fueron analizadas con el Software FlowSOM, y se encontraron diferencias principalmente en tres de las ocho subpoblaciones arrojadas por el programa (Figura 46). La primera de ellas (Pop1) correspondió a una población *stem* (CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺) no folicular (CXCR5⁻PD-1⁻) con un Ψ m intermedio y una expresión intermedia de CD25 y se encontró favorecida principalmente en el cultivo con IL-7/15/21, y los cultivos con menor presencia de esta población fueron los de IL-2 y el de IL-7 y 15.

Similar a esta población, la Pop7 también se vio bastante disminuida en los cultivos de IL-2 e IL-7 y 15, aunque en esta última se vio bastante variabilidad. Este cluster era una población de LTscm con fenotipo Tfh y de alto potencial mitocondrial. Por último, la Pop3, que a diferencia de las otras dos se vio favorecida en los cultivos con IL-2 fue una población con fenotipo de EM. Estos resultados obtenidos con los análisis automatizados confirman los hallazgos hechos de forma manual con nuestra estrategia de *gating*, lo que aumenta la robustez de las conclusiones a las que se llegaron en esta tesis.

7. Discusión

La TAC es una de las modalidades de inmunoterapia más prometedoras para el tratamiento del cáncer gracias a las respuestas clínicas reportadas en diferentes ensayos clínicos realizados en Estados Unidos, Europa y China (3). Para lograr una respuesta antitumoral efectiva y duradera, las células transferidas deben ser capaces de expandir inmediatamente después de la transfusión y persistir en circulación posterior al control inicial del tumor (16). Ambas características pueden lograrse enriqueciendo células de memoria poco diferenciadas i.e., SCM y CM, al tener estas una sobrevivencia y actividad antitumoral mayor que sus contrapartes efectoras (17). Por este motivo, la búsqueda de estrategias *in-vitro* que permitan obtener altos número de estas células han sido objeto de exhaustiva investigación durante las últimas décadas.

Con este trabajo se persiguió identificar condiciones de cultivo que permitieran la expansión de LTscm. Para ello, se probaron ocho condiciones de cultivo distintas y se evaluó cuál combinación y concentración de citoquinas era la más adecuada para obtener un gran número de esta subpoblación de memoria. Originalmente, los cultivos se iniciaron partiendo de PBMCs totales, las cuales fueron estimuladas con un agente policlonal y suplementadas con las citoquinas correspondientes. Independientemente del tratamiento, no fue posible mantener una expansión sostenida de las células (Figura 3), observando que la gran mayoría tenían un fenotipo de memoria efectora (Figura 4), el cual estuvo acompañado por un decaimiento de la viabilidad (Tabla 5) después del séptimo día de los cultivos.

Los LT EM secretan altos niveles de citoquinas efectoras, pero tienen una capacidad proliferativa y vida media limitada (100). Estas células, luego de ser activadas, entran rápidamente en un programa de apoptosis inducido principalmente por receptores de muerte como los de la familia TNFR o PD-1 (101). Considerando que las citoquinas de la familia gamma común aumentan la expresión de PD-1 y sus ligandos en PBMCs (78), se evaluó si la regulación positiva del eje PD-1/PD-L1 podría estar explicando en parte la disminución de la viabilidad observada.

En respuesta a la estimulación se encontró un aumento generalizado de PD-1 (Figura 5), pero la expresión de PD-L1 se restringió a las APCs (Figura 6) y las poblaciones de memoria más diferenciadas (Figura 7), sugiriendo que estas células son las responsables de favorecer la inducción probablemente de apoptosis y por ende su presencia en los cultivos no es deseable. Por este motivo se decidió enriquecer la fracción virgen para iniciar los próximos cultivos, ya que estas células no expresaron los ligandos de PD-1 y son capaces de diferenciarse en todas las otras subpoblaciones de memoria (34).

Bajo estas nuevas condiciones de partida, en todos los cultivos se pudo observar un crecimiento progresivo de las células estimuladas, manteniendo una viabilidad mínima del 80% durante los 15 días de cultivo. Confirmando lo reportado en la literatura (12, 52), los cócteles de IL-7/15, IL-15/21 o IL-7/15/21 superaron significativamente lo observado con cualquiera de las otras cinco condiciones de cultivo (Figura 9). En ausencia de IL-15, la IL-7 y 21 indujeron un incremento muy similar al observado con la IL-2, lo que sugiere la alta capacidad que tiene la IL-15 de promover la proliferación de linfocitos respecto a otras citoquinas de la familia gamma común.

Clásicamente, la IL-2 ha sido la citoquina que más se ha asociado con la proliferación celular (48), pero como se pudo observar, la IL-15 generó un aumento 1.6 veces mayor que el de esta citoquina. Además de compartir el receptor gamma común, los receptores de la IL-2 y la IL-15 tienen en común la subunidad beta (CD122), por lo que es de suponerse que la expansión diferencial causada por estas citoquinas es dependiente de la señalización a través de la subunidad alfa de sus receptores (48). La subunidad alfa del receptor de IL-15 comúnmente no se encuentra en los LT sino en las APCs (11), lo que sugiere que la señalización corriente abajo de CD25 trunca la capacidad proliferativa de los LT, en comparación a la acción de CD122 y CD132.

El objetivo principal de este trabajo no se limitó a la expansión en grandes magnitudes de las células iniciales, sino que también se persiguió lograr la inducción

de un fenotipo de memoria poco diferenciado i.e. LTscm. Por esta razón, después del conteo y la medición de su viabilidad, se evaluó el fenotipo de memoria de los linfocitos T por citometría de flujo al día 15 de los cultivos. Los marcadores que comúnmente se utilizan para la determinación de las poblaciones de memoria son alguna de las isoformas de CD45 (CD45RA o R0) en conjunto con proteínas de *homing* a nódulos linfáticos (CCR7 o CD62L) (25). Adicionalmente, la adición de CD95 dentro de los paneles de memoria permite diferenciar las células Tscm de las células vírgenes (28), por lo que también se incluyó dentro del panel de citometría del presente trabajo.

Distintos trabajos han reportado que la expresión de CD62L tarda más tiempo en perderse posterior a la estimulación, generando una sobreestimación de las células EM sobre las CM (102). Esto se pudo confirmar en este trabajo (Figura S4), al evidenciar que posterior a la estimulación, en ausencia de citoquinas, las células al día 10 retenían el fenotipo CM cuando se hacía la marcación con CD62L, pero al hacerlo con CCR7 se observaba que el fenotipo CM que estaba al día 7 se diferenciaba en células EM al día 10, lo que es consistente con una respuesta inmune clásica (100). Por este motivo se consideró que los mejores marcadores para poder diferenciar las cinco poblaciones de memoria (vírgenes, SCM, CM, EM y EMRA) son CD45RA, CCR7 y CD95.

Usando estos tres marcadores, se encontró que tanto en porcentaje como en número absoluto los cultivos que más LTscm expandieron fueron lo de IL-7/15/21, IL-7 y 21 y sólo IL-21 (Figura 11). Similar al efecto que se vio con la IL-15 en términos de expansión, la IL-21 fue la citoquina que más promovió el fenotipo *stem*, puesto que en su ausencia el porcentaje de estas células se vio limitado. El cultivo de IL-15 y 21 llamó la atención, ya que en este cultivo el fenotipo más frecuente fue el CM, reduciendo considerablemente el porcentaje de SCM. En números absolutos esta diferencia no es tan clara por una alta variabilidad entre las réplicas, pero también se puede explicar por la alta expansión promovida por la IL-15. En este sentido se podría hipotetizar que la IL-15 es más parecida a la IL-2, encargándose principalmente de promover una alta proliferación de los linfocitos, mientras que la

IL-7 y 21 estaría más relacionadas con mantener un fenotipo de memoria poco diferenciado, aunque este efecto es más claro para la IL-21 que para la IL-7.

Basados en estos resultados es posible concluir que el tratamiento más adecuado para los protocolos de expansión de LT es la combinación de IL-7, 15 y 21, ya que resulta en un aumento considerable de las células iniciales (16x), de las cuales aproximadamente un 50% tienen un fenotipo SCM, y el porcentaje restante corresponde principalmente a células CM, que si bien son un poco más diferenciadas, siguen teniendo una buena actividad antitumoral y sobreviven mucho más larga que las células efectoras (36). Otra alternativa es la combinación de IL-7 y 21, con la que se obtuvo un número absoluto bastante cercano de LTscm, aunque menor de células totales. Se propone este tratamiento como alternativa porque se ha observado que entre menos diferenciadas son las células transferidas, se necesita también un menor número de células para obtener una respuesta clínica favorable (28), y el uso de dos citoquinas disminuye costos, lo que es un factor que debe tenerse en cuenta al momento de proponer estrategias experimentales de uso clínico.

La presencia de los receptores de distintas citoquinas se ha asociado con la diferenciación de las subpoblaciones de memoria; la expresión de la subunidad alfa del receptor de IL-7 (CD127) es mayor en las células vírgenes y CM, mientras que en las células efectoras se empieza a ver una regulación al alza del receptor alfa de la IL-2 (CD25) (42). Para ver el efecto que tenían los distintos tratamientos sobre las células, se evaluó la presencia de estas dos proteínas al día 15 de los cultivos. En general, no se observaron cambios entre los cultivos (Figura 12) y, aunque la expresión de CD25 sí fue mayor en las células efectoras, los niveles de CD127 no mostraron ningún patrón claro (Figura 13) por lo que no se pudo concluir nada sobre el efecto que tenían las citoquinas sobre estas proteínas.

Los LT CD4 son células sumamente plásticas y dependiendo de su firma de citoquinas se clasifican en Th1, Th2, Tregs, Tfh, etc (53). Por ejemplo, la IL-2 originalmente se pensaba como una citoquina Th1, pero ahora se considera que es

secretada por los LT antes de que estos se comprometan con alguno de los linajes (32). Por su lado, la IL-21 es la citoquina que se ha relacionado con el fenotipo Tfh y su función originalmente se describió sobre células NK y LB (83). Según nuestros resultados, la IL-21 es capaz de inducir la generación de células de memoria poco diferenciadas. Al estar involucrada en estos dos fenotipos de la respuesta *helper*, se quiso explorar la relación que tenían ambos programas de diferenciación para así poder entender mejor los mecanismos de generación y mantenimiento de memoria.

De forma similar a los porcentajes de LTscm, en los cultivos con IL-21, salvo en el de IL-15 y 21, fue en donde mayor frecuencia hubo de LTfh y se pudo establecer una correlación positiva entre estas dos poblaciones (Figura 14 y 15), mostrando que existe una relación estrecha entre estos dos fenotipos. Para ver si se trataba de una sola población, se evaluó la expresión de las proteínas que se usan para definir a las células Tfh (CXCR5, PD-1) en las subpoblaciones de memoria, así como los marcadores de memoria que tenían las Tfh.

En general, se encontró que las células SCM y CM fueron las poblaciones con mayor representación del fenotipo Tfh, fluctuando entre el 20 y 60%. En los cultivos con IL-2, especialmente a una alta concentración, la co-expresión de CXCR5 y PD-1 no fue tan alta y se restringió a las células de memoria central. El cultivo con el porcentaje más alto de Tfh en SCM y CM fue el de la combinación de IL-7 y 21, seguido por el de sólo IL-21 (Figura 18). Esta observación sigue el patrón que se ha identificado hasta el momento, donde la IL-7 y 21 parecen tener una acción sinérgica promoviendo un fenotipo de memoria SCM y ahora un fenotipo Tfh, sugiriendo vías de señalización muy similares.

En contraste, la IL-15 si bien no parece antagonizar en la misma magnitud que la IL-2 el programa de diferenciación folicular, si parece separarse de la IL-7 y 21. En este sentido, se hizo un análisis de enriquecimiento de genes de dos vías corriente abajo de los receptores de las citoquinas de la familia gama común: STAT3 y STAT5. Se encontró un patrón en donde las células Tfh y Tscm mostraron un

enriquecimiento de STAT3, mientras que las Tem favorecían a STAT5 (Figura 36, Figura S11). En la literatura ya se ha documentado que STAT5 antagoniza el programa Tfh y favorece a las células Th1 (103), por lo que se puede pensar que tanto la IL-2 como la IL-15 señalizan preferencialmente a través de STAT5, induciendo un fenotipo más diferenciado, mientras que la IL-7 y la IL-21 promueven un fenotipo Tscm/Tfh por medio de la activación de STAT3 y en menor medida STAT1 (Tabla S3 y Anexo I).

Por otro lado, cuando se determinó el fenotipo de memoria de las células Tfh, se pudo observar que en su mayoría eran células de memoria central, salvo con IL-2 en donde fueron predominantemente EM (Figura 19). No obstante, en los cultivos de IL-21, un porcentaje importante correspondió a LTscm. Nos parece importante enfatizar dentro de nuestros hallazgos este porcentaje de células Tfh que mantiene la expresión de CD45RA y CCR7, puesto que en varios trabajos que han estudiado este compartimento CD4, en sus estrategias de *gating* excluyen las células “vírgenes” basados sólo en estos dos marcadores (56, 57, 64).

La predominancia de un fenotipo CM en el grueso de las Tfh sugiere que estas células se encuentran en un mayor grado de diferenciación que las Tscm. Para evaluar esta hipótesis, se hizo un análisis GSEA de vías asociadas a la autorrenovación, una característica esencial de las células madre. Efectivamente, las células Tscm mostraron un mayor enriquecimiento de las vías de Wnt- β -Catenina y Lef1 que las Tfh (Figura 35). Asimismo, las Tcm también tuvieron un mayor enriquecimiento de estas vías que las Tfh, quienes sólo mostraron un valor NES positivo en comparación con las Tem (Figura 36, Anexo I). Lo anterior posiciona entonces a las Tfh entre las CM y las EM, por lo que se podría deducir que los marcadores de foliculares observados en las Tscm se mantienen hasta que las células adquieren un fenotipo de memoria efectora.

Otro contexto en donde la generación y mantenimiento de la memoria ha sido de principal interés es en el desarrollo de vacunas, esperando inducir una protección robusta y duradera (97). Coincidentemente, los LTfh también han sido una población

altamente estudiada en este contexto debido a su rol en la producción de anticuerpos. Teniendo en cuenta que los LTscm son las células con mayor vida media dentro de las subpoblaciones de memoria, excluirlas en los análisis de respuesta a vacunación supone un gran error en estos estudios. Su presencia o ausencia podría ser uno de los factores determinantes del tiempo de protección que tienen las vacunas; como se pudo evidencia en el caso de la vacuna de fiebre amarilla, en donde se comprobó la inducción de LT CD8 con fenotipo SCM, los cuales duraban más de 25 años en circulación (85).

En este sentido, se exploró la presencia de células Tscm/Tfh en el contexto de una vacunación, estudio que hasta nuestro conocimiento no se ha hecho hasta el momento y que fue publicado por nosotros en el desarrollo de este trabajo de grado (Anexo II) (104). Utilizando como modelo el toxoide tetánico, se observó en adultos jóvenes (18-30 años) inmunizados con TT la expansión de células *stem* de memoria en el pico de respuesta de la primera dosis (Figura 21). De igual manera, también se evidenció una expansión de LTfh en este momento y se encontró una correlación entre ambos fenotipos CD4 a lo largo del estudio (Figura 21). Al comparar las células expandidas *in-vitro* e *in-vivo*, se encontró que expresaban niveles similares de CD95, CXCR5 y PD-1 (Figura 22), sugiriendo que nuestra estrategia de expansión emula lo que sucede de forma natural, siendo estas células cercanas a las Tfh.

Una vez se estableció que las células Tscm eran inducidas principalmente por IL-21 e IL-7, que favorecían la vía de STAT3 y que una gran mayoría de ellas co-expresaba CXCR5 y PD-1, se decidió evaluar en ellas las vías de factores de transcripción asociados con el fenotipo folicular. Bcl-6 es el factor de transcripción maestro de la diferenciación de las Tfh (53, 57), y NFAT es el factor de transcripción que más utilizan estas células para cumplir sus funciones efectoras (94). Interesantemente, ambos se encontraron enriquecidos en las células Tscm respecto a las Tfh, y a diferencia de los observado con las vías de autorrenovación, las Tcm mostraron una asociación negativa con estos dos factores de transcripción en comparación a las Tfh (Figura S13).

Para confirmar estos hallazgos, la expresión de Bcl-6 a nivel de proteína se midió en las muestras de las personas inmunizadas con TT y se encontró un aumento considerable en las Tscm, respecto a las células vírgenes y las CM (Figura 24). El modelo de inmunización con TT nos permitió, además de validar nuestro modelo de expansión y la relación entre los LT SCM y Tfh *in-vivo*, evaluar la capacidad funcional de las células Tscm. Las células aisladas al día 11 después de la vacuna fueron estimuladas *in-vitro* con TT por 24 horas y se encontró que las células SCM disminuían en porcentaje y aumentaban el porcentaje de células con fenotipo Tfh, siendo casi que en su totalidad células doble positivas para CXCR5 y PD-1 (Figura 25).

Lo anterior sugiere que las células vírgenes, al ser activadas expresan rápidamente niveles de Bcl-6 y NFAT, quienes a su vez inducen la expresión de proteínas asociadas al fenotipo Tfh como CXCR5, CXCR3, ICOS e IL-21 (57, 93). No obstante, nuestros hallazgos plantean una disyuntiva entre la diferenciación de memoria y la de linaje; según la primera, se podría sugerir una diferenciación Naive>Tscm>Tcm>Tfh>Tem de acuerdo con su capacidad de autorrenovación, mientras que por la segunda se podría pensar el orden Naive>Tscm>Tfh>Tcm>Tem por la activación de Bcl-6 y NFAT.

La disminución de la efectividad de las vacunas reportada ampliamente en los adultos mayores (>60 años) (88) nos llevó a preguntarnos si los linfocitos Tscm estaban afectados en esta población. En los adultos mayores se pudo observar que había una disminución significativa de las células vírgenes, así como un menor porcentaje de células Tscm (Figura 26) previo al inicio de la vacunación, lo que es congruente con lo encontrado en una revisión sistemática realizada y publicada por nuestro grupo de investigación (Anexo III) (90).

En respuesta a la vacunación con el TT, a diferencia de los adultos jóvenes, en los adultos mayores no se pudo observar una expansión de los LTscm (Figura 27), y aunque hubo una expansión de LTfh esta fue significativamente menor a la de los adultos jóvenes (Figura 28). Si bien las Tscm de los adultos mayores mantuvieron

el fenotipo Tfh (Figura 29), sugiriendo que la edad no provoca un desacoplamiento entre estos fenotipos, al ser estimuladas no se vio la activación ni la inducción hacia el fenotipo Tfh observado en los adultos jóvenes (Figura 30 y 31). Esto podría explicarse en cuanto a que estas células presentan un estado basal más diferenciado, lo que la hace menos responsiva a nuevos estímulos, lo que se soporta en su mayor expresión de marcadores de activación como ICOS y CD40L (104).

Además de lo evaluado hasta el momento, el estado metabólico de las células es otro factor que debe ser tenido en consideración al evaluar las estrategias de expansión *in-vitro*, puesto que este también es determinante de la generación de la memoria y su estado de agotamiento (13, 98). El potencial de membrana mitocondrial es un buen indicador de la capacidad que tiene las células de producir ATP para poder cumplir sus funciones efectoras (99). Los LTscm han demostrado tener un alto potencial de membrana en comparación a las células vírgenes, lo que contribuye la capacidad de estas células de responder de manera rápida frente un estímulo. Las células vírgenes, en contraste, requieren de una reestructuración de su citosol, necesitando de la biogénesis mitocondrial para poder suplir los requerimientos energéticos para la proliferación y producción de citoquinas (105).

Bajo nuestras condiciones de cultivo, encontramos que con IL-2, las células que mayor potencial de membrana tenían eran las células EMRA, que en estas células más que hablar de su capacidad de producir grandes cantidades de ATP se ha relacionado con un desacoplamiento de la función mitocondrial con las necesidades energéticas de la célula, que se asocia con una inducción de apoptosis vía intrínseca (Figura 39-41). Esto, en conjunto con la alta expresión del eje PD-1/PD-L1 demuestra que las células EM y EMRA no son buenos candidatos para la TAC al ser células muy próximas a la apoptosis.

Por otro lado, los cultivos con IL-7, 15 y 21 y con sólo 21, que son los tratamientos con un mayor porcentaje de LTscm también fueron los cultivos en donde mayor potencial mitocondrial tuvieron estas células (Figura 42). Esto muestra la estrecha

relación que existe entre las características metabólicas i.e. estado mitocondrial y la generación de células de memoria poco diferenciadas. De igual forma, también se evaluó el potencial mitocondrial de las Tfh de manera independiente y se encontró que, al igual que las Tscm, estas células cuentan con un alto potencial de membrana mitocondrial, superando con creces a las células vírgenes (Figura 43 y 44).

Canónicamente, los estudios de inmunometabolismo han planteado una dicotomía entre células de memoria y células efectoras, en donde las primeras utilizan predominantemente un metabolismo catabólico basado en la oxidación de ácidos grasos, y las segundas un metabolismo anabólico basado en glicólisis aeróbica (69). Siguiendo esta teoría, se comparó el enriquecimiento de genes asociados a la glicólisis y la FAO entre las Tfh con las Tscm y de manera interesante se encontró que tanto una como la otra estaban reguladas al alza en las Tfh (Figura 45). Al comparar las Tfh con las otras dos subpoblaciones de memoria, se encontró que las Tfh tienen enriquecida las vías asociadas con la FAO, mientras que las CM y EM tienen una asociación positiva con la glicólisis y producción de ROS comparados con las Tfh (Figura S17).

El alto potencial mitocondrial de las Tfh, así como su mayor capacidad de FAO, podría relacionarse con una alta necesidad energética, la cual no se puede suplir únicamente por el consumo de glucosa, puesto que al encontrarse en centros germinales, los LBs que se encuentran proliferando crean una limitación de recursos, haciendo que estas células prefieran un metabolismo basado en el catabolismo de ácidos grasos, el cual podría estar siendo inducido por la señalización a través de PD-1, el cual es uno de los marcadores insignia de esta población celular y está corriente debajo de NFAT (106), otro factor de transcripción relacionado con las Tfh que también se encontró enriquecido en esta población. Los resultados encontrados sobre el metabolismo de las Tfh en relación con las subpoblaciones de memoria favorecen la hipótesis que estas son más cercanas a las Tscm que las Tcm, al favorecer la FAO sobre la glicólisis.

Los hallazgos manuales usando estrategias convencionales de *gating* fueron corroborados usando dos software automatizados capaces de clasificar las muestras en clústeres de forma no supervisada para poder disminuir la subjetividad de los análisis (91, 107). Tanto en las muestras de los donantes vacunados como en los cultivos *in-vitro* se pudo confirmar la expansión de células Tscm con un fenotipo Tfh (Figura 34 y 46, respectivamente), con lo que se puede afirmar que estas dos poblaciones efectivamente tienen una estrecha relación y las vías que han sido establecidos para la inducción de las foliculares deben ser tenidas en cuenta en nuevas estrategias de expansión de las Tscm.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo nos permite concluir que, de las condiciones evaluadas, la combinación de IL-7, 15 y 21 o de sólo IL-7 y 21 constituyen los mejores tratamientos para la expansión de LTscm. Asimismo, que las células que logramos expandir *in-vitro* se asemejan a las células que se inducen naturalmente en respuesta a la vacunación con TT, y que estas células en los adultos mayores tienen una capacidad de proliferación limitada, probablemente porque se encuentran en un estado de agotamiento.

Adicionalmente, usando múltiples acercamientos se pudo establecer una relación, tanto *in-vitro* como *in-vivo*, entre los LTscm y los Tfh. La asociación entre estos dos fenotipos CD4, permitió reconocer un patrón, con el que se podría proponer que existe una agrupación entre la IL-15 con la IL-2, y otra entre la IL-7 con la IL-21. Aunque todas pertenecen a la familia gamma común puesto que comparten el receptor gamma CD132, las otras subunidades que componen los receptores de estas citoquinas tienen diferentes vías de señalización intracelular (42).

La IL-2 y la IL-15 promueven una proliferación robusta de los LT, pero lo hacen induciendo un mayor grado de diferenciación en las células, aunque este efecto sea menos marcado con la IL-15. Estas dos citoquinas comparten CD132 y CD122 en sus receptores (42), los cuales posiblemente señalizan predominantemente a través de un eje STAT5/mTORC1 y favorecen células CM y EM. Coherente con nuestros resultados, otros estudios han encontrado que STAT5 antagoniza el fenotipo Tfh al

inhibir a Bcl-6 (103), y por ende, también estarían inhibiendo el mantenimiento de los LTscm.

Por otro lado, la IL-7 y 21 favorecieron de manera sinérgica la generación de los LTscm, con un fenotipo Tfh y un alto potencial de membrana mitocondrial. Los receptores de estas dos citoquinas también pueden señalizar vía STAT1, STAT3 y STAT5 (42). Según nuestros hallazgos, lo más probable es que estas citoquinas activen un eje STAT1,3/Bcl-6/NFAT y favorezcan las células Tscm y Tfh. Debido al estado de memoria de las Tfh y la diferenciación en los genes asociados a la autorrenovación, se puede pensar que estas células y las SCM son independientes entre sí, siendo las foliculares un poco más diferenciadas. Basados en los resultados aquí presentados es posible proponer que las Tfh comprenden una población intermedia entre las LTscm y las CM y más que representar un análogo a los otros subtipos Th, se podrían pensar a las células foliculares como un estado de diferenciación de memoria, el cual puede diferenciarse en cualquier otro fenotipo (53), lo que podría explicar la altísima plasticidad y capacidad de producir citoquinas asociados a los otros subtipos Th que tiene esta población CD4 (108). No obstante, es importante seguir generando más evidencia experimental que soporte esta teoría, ya que las Tfh podrían ser células un poco más diferenciadas que las CM en cuanto a lo observado en las vías de Lef1.

Por último, destacamos también de este trabajo el estudio de los LTscm en células CD4, ya que la gran mayoría de trabajos sobre esta subpoblación de memoria se han centrado en CD8 (77). En el contexto de la TAC, el estudio de los LT CD8 han sido favorecidos puesto que son células citotóxicas capaces de atacar directamente el tumor. Sin embargo, los LT CD4 además de poder tener una alta capacidad citotóxica, también son responsables de modular toda la respuesta inmune, incluyendo LT CD8, LB y macrófagos, por lo que su potencial antitumoral puede resultar mucho más beneficioso. Adicionalmente, estas células son las responsables de la generación de memoria en los LT CD8 (109).

En conclusión, consideramos que nuestros resultados constituyen una estrategia robusta de expansión de LTscm, demuestran la importancia de la inclusión de marcadores como CD95, CXCR5 y PD-1 en los estudios de células de memoria y respuesta a vacunación, y contribuyen a un mejor entendimiento de los mecanismos celulares que están involucrados en la generación y mantenimiento de memoria.

8. Perspectivas

Con la realización de este trabajo consideramos que los resultados obtenidos contribuyen a un mejor entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la generación de la memoria y basados en ellos recomendamos se tengan en cuenta en fases futuras del proyecto los siguientes aspectos:

- 1. Expansión de Linfocitos T antígeno-específicos:** Con la determinación de un esquema *in-vitro* que permitió la expansión global de células Tscm, en el contexto de la TAC este mismo esquema debe ser probado para la expansión de células antígeno específicas utilizando péptidos de interés para cáncer o enfermedades infecciosas para reemplazar el estímulo policlonal utilizado en este trabajo.
- 2. Transcriptoma de células cultivadas con las distintas citoquinas:** Los análisis de enriquecimiento de genes se hicieron con bases de datos públicas de las distintas poblaciones de memoria, sin embargo, consideramos importante hacer estos análisis del transcriptoma de las células obtenidas después de los 15 días de cultivos para poder explorar las diferencias que las distintas citoquinas de la familia gamma común inducen en las células, lo que podría contribuir al entendimiento de cómo estas citoquinas modulan la memoria y la capacidad efectora de las células.
- 3. Capacidad mitocondrial de las células cultivadas:** En este trabajo se midió el potencial de membrana mitocondrial de las células resultantes de los cultivos. Igualmente, con los análisis de enriquecimientos de genes se pudo explorar las rutas metabólicas que preferencialmente eran usadas por las diferentes células de memoria. Siguiendo con esta línea de trabajo, es importante revisar otros aspectos metabólicos relevantes como la biomasa

mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno y poder hacer ensayos finos de caracterización metabólica (i.e. SeaHorse o Zenith).

- 4. Optimización de condiciones de cultivo:** Con la estrecha relación observada entre el fenotipo folicular y el fenotipo SCM, creemos importante adicionar citoquinas y otras moléculas cuya capacidad de inducir el fenotipo folicular ya ha sido probada (IL-6 o inhibidores de IFN γ) bajo la premisa que se podía estar favoreciendo las poblaciones de memoria. Asimismo, la evaluación a nivel de proteína de factores de transcripción asociados al fenotipo folicular en las poblaciones *stem* (e.g. NFAT, Bcl-6) podría esclarecer aún más la relación entre estos dos fenotipos de linfocitos CD4.

9. Consideraciones Éticas

De acuerdo con la resolución N° 008430 de 1993, que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos, Artículo 11, este proyecto se clasifica como investigación con riesgo mínimo. Las muestras obtenidas en el presente estudio solo serán utilizadas para los experimentos aquí establecidos o que complementen el presente proyecto de tesis, y por ningún motivo serán compartidos ni empleados en otros proyectos. Adicionalmente, las muestras congeladas que al finalizar los proyectos incluidos en esta propuesta no sean empleadas, serán descartadas y, por lo tanto, no se generará un banco de células ni muestras biológicas de las participantes.

Este proyecto de investigación incluyó células obtenidas de donantes sanos en el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) de la ciudad de Bogotá y procesadas en el laboratorio del grupo de investigación en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia bajo los lineamientos de la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud bajo la cual se adoptan normas para la investigación en Salud.

El tratamiento de los datos ha sido y permanecerá confidencial desde el momento de la recolección de las muestras. El laboratorio del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional cuenta con las instalaciones y equipos necesarios para la realización de los experimentos y los reactivos y biológicos a utilizar representan riesgos mínimos para la salud humana del personal involucrado en la investigación. Se realizó una adecuada disposición de los desechos químicos y biológicos generados durante el desarrollo del presente trabajo y bajo los lineamientos ambientales de la Universidad Nacional de Colombia.

10. Apropiación Social del Conocimiento

En el marco del desarrollo de este trabajo de grado, se realizaron múltiples actividades de apropiación social del conocimiento referentes a los resultados obtenidos en esta tesis y al estado de la medicina traslacional y terapias médicas avanzadas en el país que consideramos importantes resaltar en este documento:

- 1. Documentos de recomendaciones concernientes al terapias médicas avanzadas:** En conjunto con otros miembros del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional se construyeron dos documentos de recomendaciones a personal clínico y entes regulatorios con el objetivo de dinamizar la implementación de la medicina traslacional en el país. En el contexto de este trabajo, la obtención de antígenos tumorales o el reconocimiento de neo-antígenos propios de los tumores correctamente extraídos y preservados de los pacientes permitiría la expansión de células Tscm antígeno-específicos con las citoquinas establecidas (Anexos IV y V).
- 2. Infografías para personal clínico y adultos mayores:** Basados en la búsqueda bibliográfica y los resultados obtenidos de este trabajo en conjunto con otros trabajo de grado de integrantes del grupo de Inmunología, se construyeron dos documentos infográficos sobre la importancia de los tumores como fuentes de antígeno para terapias médicas avanzadas - incluida la TAC- (Anexo VI) y sobre inmunosenescencia (Anexo VII).
- 3. Eventos de difusión del conocimiento:** Se realizaron varias participaciones en distintas plataformas que tuvieron como objetivo principal socializar los resultados de este trabajo y de los avances en términos de inmunoterapia logrados por el grupo. Primero, se hizo una participación en programas radiales de radio UN sobre inmunoterapia, en donde se incluyó la importancia de la TAC (Anexo VIII). Segundo, se organizó un foro titulado “El futuro de la Medicina Traslacional en Colombia: Avances internacionales y

nacionales” en donde se abordó desde una perspectiva investigativa y regulatoria el estado de la Medicina Traslacional en el país y a nivel regional e internacional (Anexo IX). Tercero, se hizo la presentación de resultados de este trabajo en el XIII Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología (ACAAI) y el V Encuentro de la Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI) en modalidad oral (Objetivo 2) y poster (Objetivo 1) (Anexo X).

11. Bibliografía

1. Perica K, Varela JC, Oelke M, Schneck J. Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides medical journal*. 2015;6(1):e0004.
2. Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen J. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2019;474(4):449-61.
3. Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Omata-Mise S, Ando M, et al. Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy. *Cancer science*. 2018;109(7):2130-40.
4. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH, Jr. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Current oncology*. 2020;27(Suppl 2):S87-S97.
5. Morotti M, Albukhari A, Alsaadi A, Artibani M, Brenton JD, Curbishley SM, et al. Promises and challenges of adoptive T-cell therapies for solid tumours. *British journal of cancer*. 2021;124(11):1759-76.
6. Dafni U, Michielin O, Lluesma SM, Tsourti Z, Polydoropoulou V, Karlis D, et al. Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(12):1902-13.
7. June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(6):1466-76.
8. Met O, Jensen KM, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Seminars in immunopathology*. 2019;41(1):49-58.
9. Crompton JG, Sukumar M, Restifo NP. Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunological reviews*. 2014;257(1):264-76.
10. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(6):1616-26.
11. Spolski R, Gromer D, Leonard WJ. The gamma c family of cytokines: fine-tuning signals from IL-2 and IL-21 in the regulation of the immune response. *F1000Research*. 2017;6:1872.
12. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provasi E, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*. 2013;121(4):573-84.
13. Pietrobon V, Todd LA, Goswami A, Stefanson O, Yang Z, Marincola F. Improving CAR T-Cell Persistence. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(19).
14. Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity*. 2020;52(1):17-35.
15. Taefehshokr S, Parhizkar A, Hayati S, Mousapour M, Mahmoudpour A, Eleid L, et al. Cancer immunotherapy: Challenges and limitations. *Pathology, research and practice*. 2022;229:153723.
16. Arcangeli S, Falcone L, Camisa B, De Girardi F, Biondi M, Giglio F, et al. Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1217.
17. Majzner RG, Mackall CL. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nature medicine*. 2019;25(9):1341-55.
18. Li Y, Wu D, Yang X, Zhou S. Immunotherapeutic Potential of T Memory Stem Cells. *Frontiers in oncology*. 2021;11:723888.

19. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(4):251-62.
20. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-8.
21. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*. 1986;233(4770):1318-21.
22. Belldegrun A, Muul LM, Rosenberg SA. Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity. *Cancer research*. 1988;48(1):206-14.
23. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(32):5233-9.
24. Busch DH, Frassle SP, Sommermeyer D, Buchholz VR, Riddell SR. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Seminars in immunology*. 2016;28(1):28-34.
25. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
26. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Bergstresser PR, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *Journal of immunology*. 1993;150(3):1122-36.
27. Gattinoni L, Zhong XS, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nature medicine*. 2009;15(7):808-13.
28. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine*. 2011;17(10):1290-7.
29. Kwok WW, Tan V, Gillette L, Littell CT, Soltis MA, LaFond RB, et al. Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. *Journal of immunology*. 2012;188(6):2537-44.
30. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nature medicine*. 2017;23(1):18-27.
31. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001;291(5512):2413-7.
32. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *European journal of immunology*. 2013;43(11):2797-809.
33. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature immunology*. 2003;4(3):225-34.
34. Ahmed R, Bevan MJ, Reiner SL, Fearon DT. The precursors of memory: models and controversies. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(9):662-8.
35. Gasper DJ, Tejera MM, Suresh M. CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Critical reviews in immunology*. 2014;34(2):121-46.
36. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *Journal of immunotherapy*. 2012;35(9):651-60.
37. Joshi NS, Kaech SM. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *Journal of immunology*. 2008;180(3):1309-15.

38. Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(12):982-7.
39. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*. 2007;315(5819):1687-91.
40. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(10):671-84.
41. Simons BD, Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*. 2011;145(6):851-62.
42. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(7):480-90.
43. Jicha DL, Mule JJ, Rosenberg SA. Interleukin 7 generates antitumor cytotoxic T lymphocytes against murine sarcomas with efficacy in cellular adoptive immunotherapy. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(6):1511-5.
44. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30(5):636-45.
45. Toe JG, Pellegrini M, Mak TW. Promoting immunity during chronic infection--the therapeutic potential of common gamma-chain cytokines. *Molecular immunology*. 2013;56(1-2):38-47.
46. Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*. 1995;2(4):331-9.
47. Rathmell JC, Farkash EA, Gao W, Thompson CB. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *Journal of immunology*. 2001;167(12):6869-76.
48. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(8):595-601.
49. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *Journal of immunology*. 2005;175(12):7867-79.
50. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Bcl-6. *Journal of immunology*. 2004;173(9):5361-71.
51. Chen Y, Yu F, Jiang Y, Chen J, Wu K, Chen X, et al. Adoptive Transfer of Interleukin-21-stimulated Human CD8+ T Memory Stem Cells Efficiently Inhibits Tumor Growth. *Journal of immunotherapy*. 2018;41(6):274-83.
52. Alvarez-Fernandez C, Escriba-Garcia L, Vidal S, Sierra J, Briones J. A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):214.
53. Nakayama S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Current opinion in immunology*. 2012;24(3):297-302.
54. Pepper M, Pagan AJ, Igyarto BZ, Taylor JJ, Jenkins MK. Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity*. 2011;35(4):583-95.
55. Pepper M, Jenkins MK. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nature immunology*. 2011;12(6):467-71.

56. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*. 2013;39(4):770-81.
57. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular Helper T Cells. *Annual review of immunology*. 2016;34:335-68.
58. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(11):1545-52.
59. Bowen MB, Butch AW, Parvin CA, Levine A, Nahm MH. Germinal center T cells are distinct helper-inducer T cells. *Human immunology*. 1991;31(1):67-75.
60. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Forster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 2000;406(6793):309-14.
61. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*. 1996;87(6):1037-47.
62. Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Brocker T, Raykundalia C, Goodall M, et al. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(8):1115-22.
63. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*. 2008;26:741-66.
64. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-69.
65. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 2008;26:677-704.
66. Jeza VT, Li X, Chen J, Liang Z, Aggrey AO, Wu X. IL-21 Augments Rapamycin in Expansion of Alpha Fetoprotein Antigen Specific Stem-Cell-like Memory T Cells in vitro. *The Pan African medical journal*. 2017;27:163.
67. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual review of immunology*. 2013;31:137-61.
68. Olenchock BA, Rathmell JC, Vander Heiden MG. Biochemical Underpinnings of Immune Cell Metabolic Phenotypes. *Immunity*. 2017;46(5):703-13.
69. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*. 2013;38(4):633-43.
70. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(9):1345-60.
71. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, et al. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*. 2013;38(2):225-36.
72. Araujo L, Khim P, Mkhikian H, Mortales CL, Demetriou M. Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation. *eLife*. 2017;6.
73. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 2013;342(6155):1242454.
74. O'Sullivan D, van der Windt GJ, Huang SC, Curtis JD, Chang CH, Buck MD, et al. Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development. *Immunity*. 2014;41(1):75-88.

75. van der Windt GJ, Everts B, Chang CH, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8⁺ T cell memory development. *Immunity*. 2012;36(1):68-78.
76. Vella LA, Buggert M, Manne S, Herati RS, Sayin I, Kuri-Cervantes L, et al. T follicular helper cells in human efferent lymph retain lymphoid characteristics. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(8):3185-200.
77. Kared H, Tan SW, Lau MC, Chevrier M, Tan C, How W, et al. Immunological history governs human stem cell memory CD4 heterogeneity via the Wnt signaling pathway. *Nature communications*. 2020;11(1):821.
78. Bai J, Gao Z, Li X, Dong L, Han W, Nie J. Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1 blockade. *Oncotarget*. 2017;8(66):110693-707.
79. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology*. 1996;8(5):765-72.
80. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of immunology*. 2002;169(10):5538-45.
81. DiPiazza A, Richards KA, Knowlden ZA, Nayak JL, Sant AJ. The Role of CD4 T Cell Memory in Generating Protective Immunity to Novel and Potentially Pandemic Strains of Influenza. *Frontiers in immunology*. 2016;7:10.
82. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(5):379-95.
83. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000;408(6808):57-63.
84. Bugya Z, Prechl J, Szenasi T, Nemes E, Bacsi A, Koncz G. Multiple Levels of Immunological Memory and Their Association with Vaccination. *Vaccines*. 2021;9(2).
85. Fuertes Marraco SA, Sonesson C, Cagnon L, Gannon PO, Allard M, Abed Maillard S, et al. Long-lasting stem cell-like memory CD8⁺ T cells with a naive-like profile upon yellow fever vaccination. *Science translational medicine*. 2015;7(282):282ra48.
86. da Silva Antunes R, Paul S, Sidney J, Weiskopf D, Dan JM, Phillips E, et al. Definition of Human Epitopes Recognized in Tetanus Toxoid and Development of an Assay Strategy to Detect Ex Vivo Tetanus CD4⁺ T Cell Responses. *PloS one*. 2017;12(1):e0169086.
87. Mayer S, Laumer M, Mackensen A, Andreesen R, Krause SW. Analysis of the immune response against tetanus toxoid: enumeration of specific T helper cells by the Elispot assay. *Immunobiology*. 2002;205(3):282-9.
88. Crooke SN, Ovsyannikova IG, Poland GA, Kennedy RB. Immunosenescence and human vaccine immune responses. *Immunity & ageing : I & A*. 2019;16:25.
89. Pereira B, Xu XN, Akbar AN. Targeting Inflammation and Immunosenescence to Improve Vaccine Responses in the Elderly. *Frontiers in immunology*. 2020;11:583019.
90. Rodriguez IJ, Lalinde Ruiz N, Llano Leon M, Martinez Enriquez L, Montilla Velasquez MDP, Ortiz Aguirre JP, et al. Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review. *Frontiers in immunology*. 2020;11:604591.
91. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(26):E2770-7.

92. Ding ZC, Shi H, Aboeella NS, Fesenkova K, Park EJ, Liu Z, et al. Persistent STAT5 activation reprograms the epigenetic landscape in CD4(+) T cells to drive polyfunctionality and antitumor immunity. *Science immunology*. 2020;5(52).
93. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009;325(5943):1006-10.
94. Martinez GJ, Hu JK, Pereira RM, Crampton JS, Togher S, Bild N, et al. Cutting Edge: NFAT Transcription Factors Promote the Generation of Follicular Helper T Cells in Response to Acute Viral Infection. *Journal of immunology*. 2016;196(5):2015-9.
95. Salerno F, Turner M, Wolkers MC. Dynamic Post-Transcriptional Events Governing CD8(+) T Cell Homeostasis and Effector Function. *Trends in immunology*. 2020;41(3):240-54.
96. Tough DF, Rioja I, Modis LK, Prinjha RK. Epigenetic Regulation of T Cell Memory: Recalling Therapeutic Implications. *Trends in immunology*. 2020;41(1):29-45.
97. Corrado M, Pearce EL. Targeting memory T cell metabolism to improve immunity. *The Journal of clinical investigation*. 2022;132(1).
98. Li W, Zhang L. Rewiring Mitochondrial Metabolism for CD8(+) T Cell Memory Formation and Effective Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1834.
99. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*. 2018;552:50-9.
100. McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. Regulation of CD4+ T-cell contraction during pathogen challenge. *Immunological reviews*. 2010;236:110-24.
101. Zhan Y, Carrington EM, Zhang Y, Heinzl S, Lew AM. Life and Death of Activated T Cells: How Are They Different from Naive T Cells? *Frontiers in immunology*. 2017;8:1809.
102. Jameson SC, Masopust D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*. 2018;48(2):214-26.
103. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(2):243-50.
104. Lalinde-Ruiz N, Rodriguez IJ, Bernal-Estevez DA, Parra-Lopez CA. Young but not older adults exhibit an expansion of CD45RA(+)CCR7(+)CD95(+) T follicular helper cells in response to tetanus vaccine. *Experimental gerontology*. 2021;156:111599.
105. Rovini A, Heslop K, Hunt EG, Morris ME, Fang D, Gooz M, et al. Quantitative analysis of mitochondrial membrane potential heterogeneity in unsynchronized and synchronized cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2021;35(1):e21148.
106. Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *Journal of immunology*. 2008;181(7):4832-9.
107. Quintelier K, Couckuyt A, Emmaneel A, Aerts J, Saeys Y, Van Gassen S. Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM. *Nature protocols*. 2021;16(8):3775-801.
108. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends in immunology*. 2014;35(9):436-42.
109. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(2):102-11.

12. Figuras Suplementarias

Datos Demográficos	Jóvenes	Mayores
Edad (años)	23 ± 3,1 (20 - 28)	69,4 ± 5,6 (65 -79)
Mujeres	6	6
Hombres	4	4
Índice de masa corporal (kg/m ²)	20.9 (2,7)	24.1 (3,5)
Fumadores	0	0
Educación (% universitario o mayor)	100%	60%
Actividad física diaria	40%	60%

Tabla S1. Datos demográficos de los participantes. Las/os donantes que participaron en el estudio se encontraban con un buen estado de salud. Se excluyeron sujetos siguiendo los siguientes criterios de exclusión: (i) consumo de medicamentos que puedan alterar la respuesta inmune; (ii) Diabetes; (iii) insuficiencia cardíaca congestiva; (iv) enfermedad cardiovascular; (v) insuficiencia renal crónica; (vi) Neoplasias malignas, (vii) Enfermedades renales o hepáticas; (viii) Enfermedades Autoinmunes; (ix) enfermedad infecciosa reciente (<3 meses), o (x) abuso de sustancias y alcohol documentado.



Figura S1. Control de Fluorescencia Menos Uno (FMO). Tinción con el panel de anticuerpos de PBMCs para corregir cualquier traslape entre los diferentes fluoróforos utilizados.

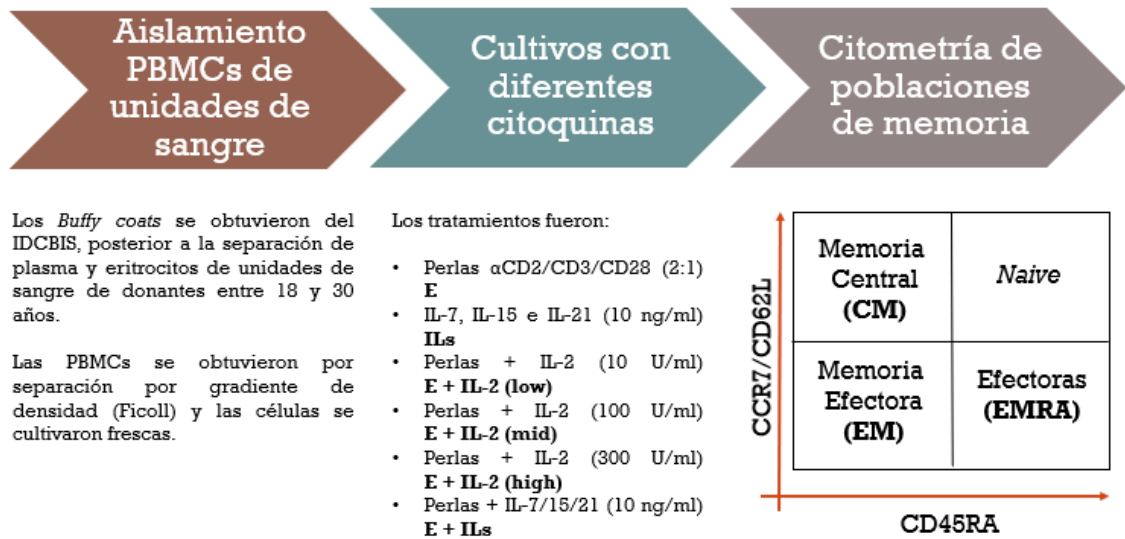


Figura S2. Estrategia de expansión de LTscm partiendo de PBMCs totales. Organigrama de la metodología implementada para los cultivos celulares y evaluación del fenotipo de memoria al final de los cultivos.

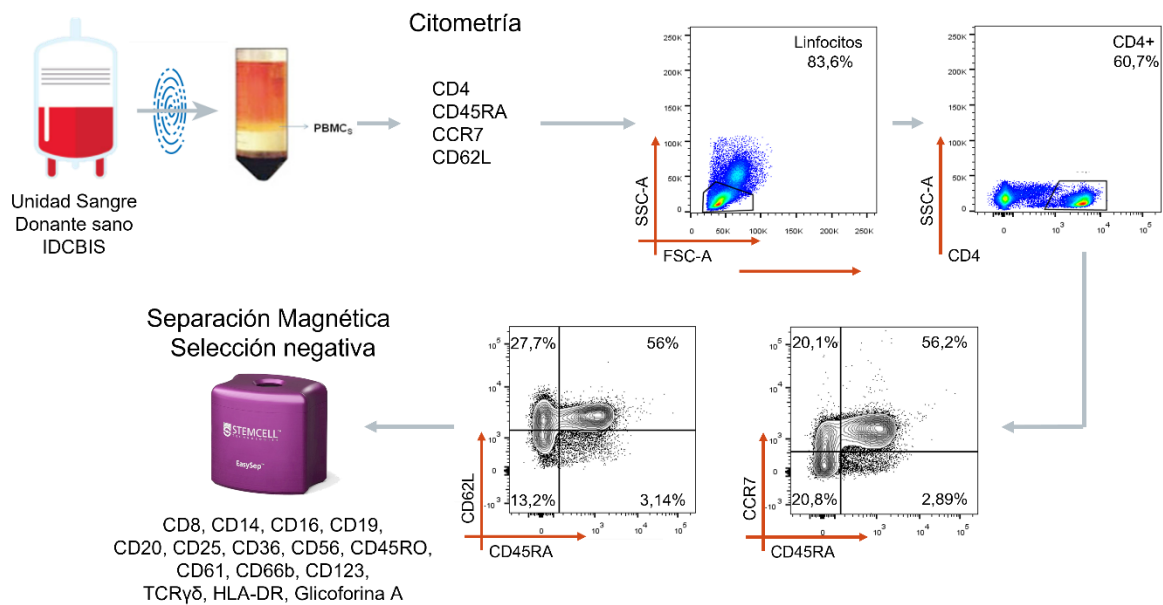


Figura S3. Estrategia de enriquecimiento de la fracción naive de LT CD4. Se aislaron PBMCs de *Buffy Coats* de donantes jóvenes por gradiente de densidad (Ficoll). Partiendo de 8×10^7 PBMCs, se enriqueció la fracción *naive* (CD45RA+CCR7+/CD62L+) por selección negativa, usando el kit de aislamiento de CD4 naive (StemCell). Por citometría de flujo se confirmó la pureza, previo al inicio de los cultivos.

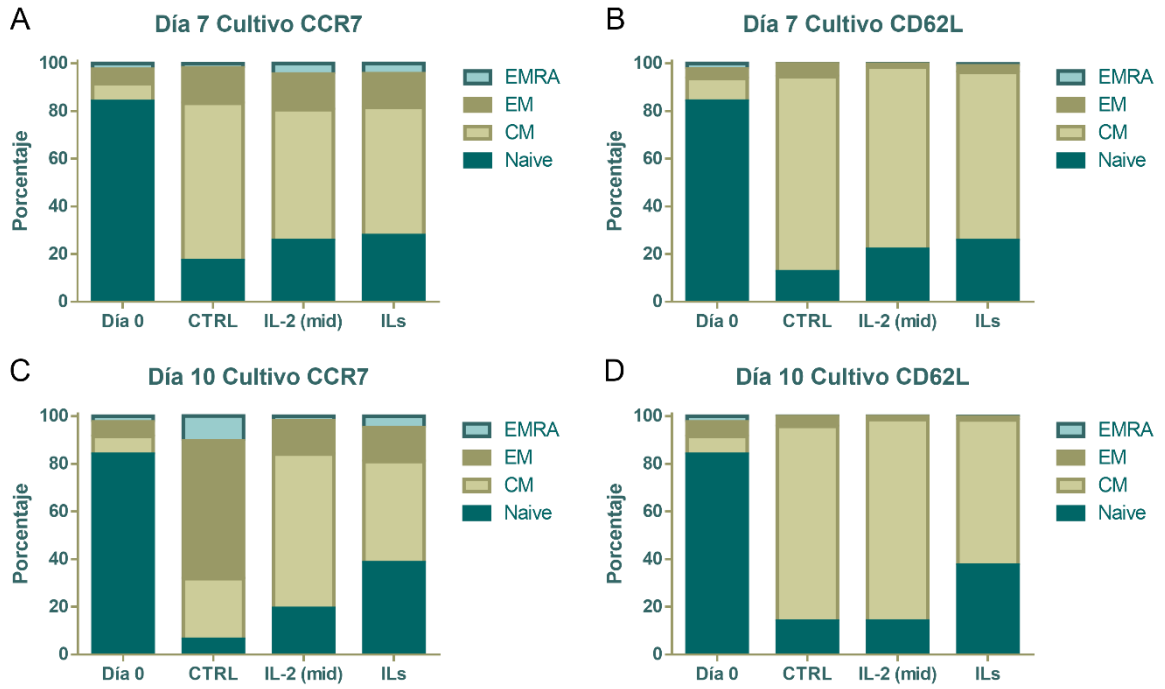


Figura S4. Expresión diferencial de CCR7 y CD62L para definición de las poblaciones de memoria.

2,5 x10⁵ LT CD4 *naive* fueron estimulados con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 durante 10 días en ausencia (CTRL) o presencia de IL-2 (mid, 100 u/ml) o de IL-7, IL-15 e IL-21 (10 ng/ml c/u). Por citometría de flujo se midieron los porcentajes de las 4 subpoblaciones de memoria usando (A, C) CCR7 o (B, D) CD62L a los días 7 y 10 de cultivo, respectivamente.

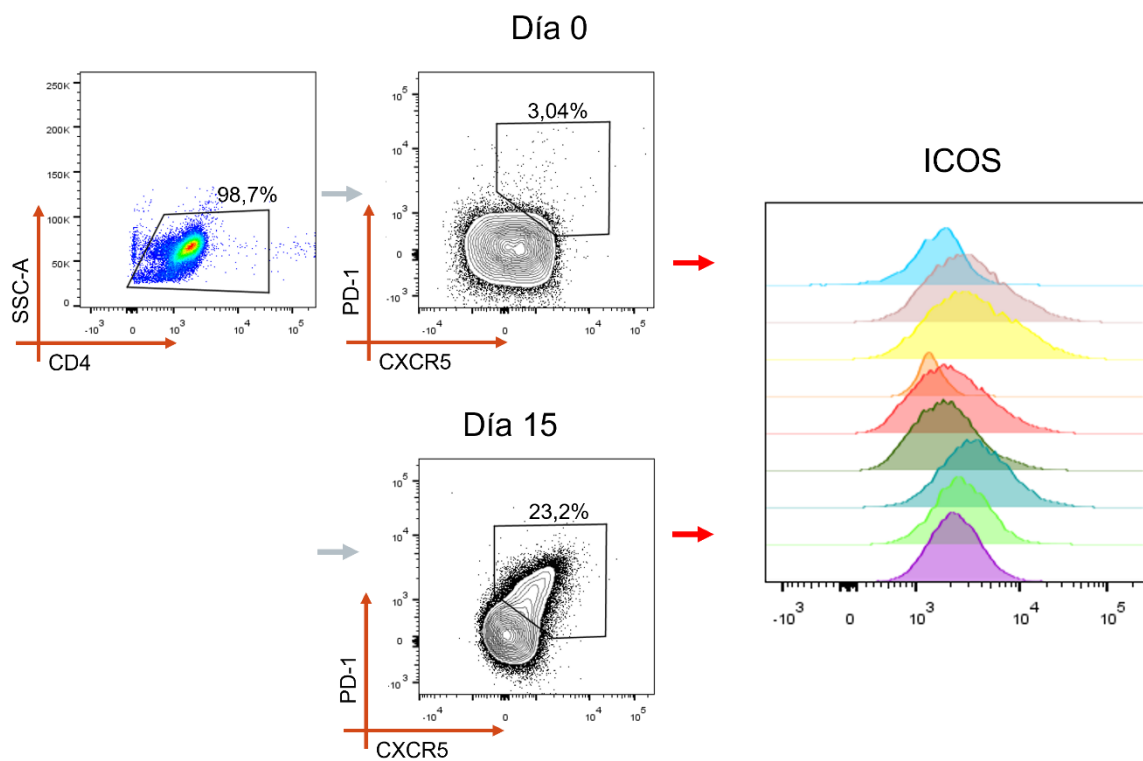


Figura S5. Estrategia del gating de la población T folicular helper. Para la determinación de la población folicular *helper* se seleccionaron las células CD4⁺ y de allí se seleccionaron las CXCR5⁺PD-1⁺, como se muestra en los plots representativos al día 0 y 15 de los cultivos. Adicionalmente, en esta población se midió la expresión de ICOS por MFI.

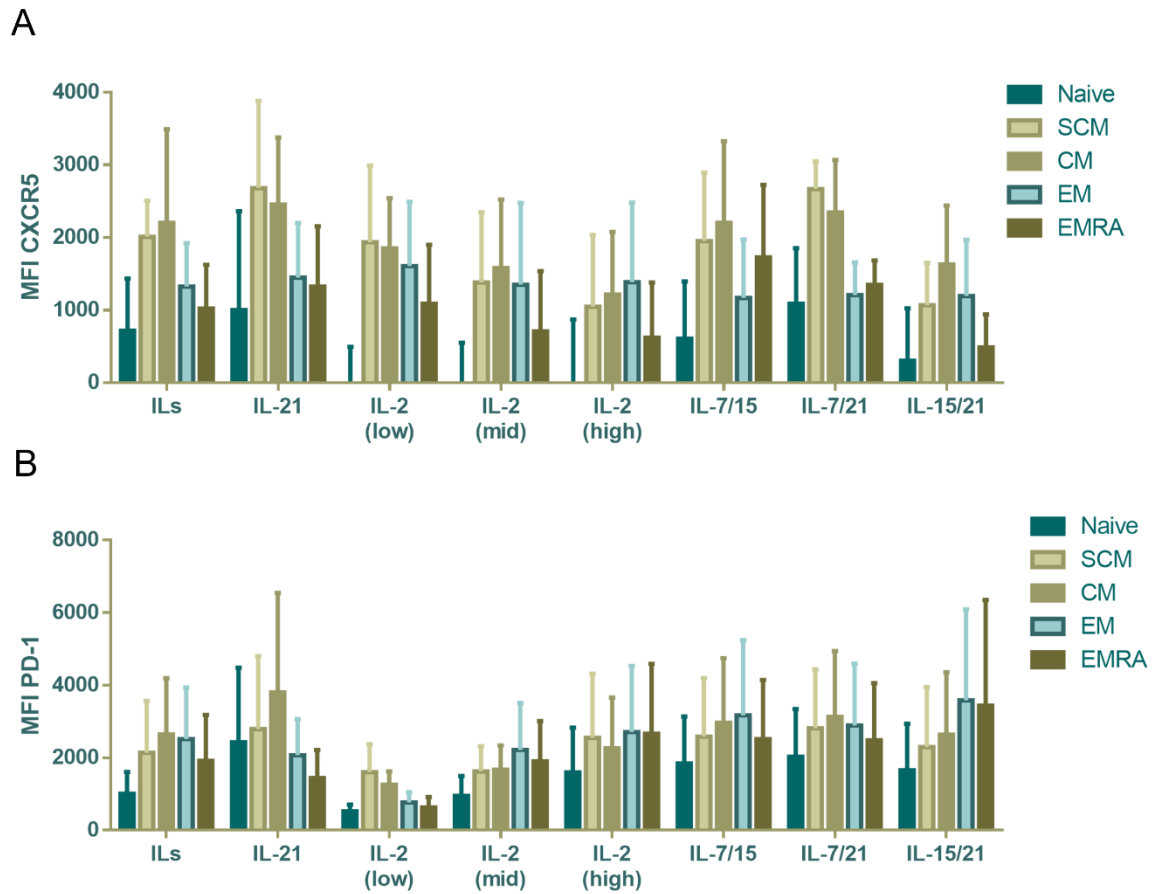


Figura S6. Expresión de proteínas asociadas a fenotipo Tfh en LTscm. $2,5 \times 10^5$ LT CD4 *naive* fueron estimulados por 15 días con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (ILs); IL-21; IL-2 *high*, IL-2 *mid* e IL-2 *low*; IL-7 y 15, IL-7 y 21, IL-15 y 21. MFI de la expresión de **(A)** CXCR5 y **(B)** PD-1 en las poblaciones de memoria *Naive*; *Stem* de Memoria (SCM); Memoria central (CM); Efectoras de memoria (EM); Efectoras (EMRA). $n =$ mínimo 6. Las barras corresponden al promedio + SEM.

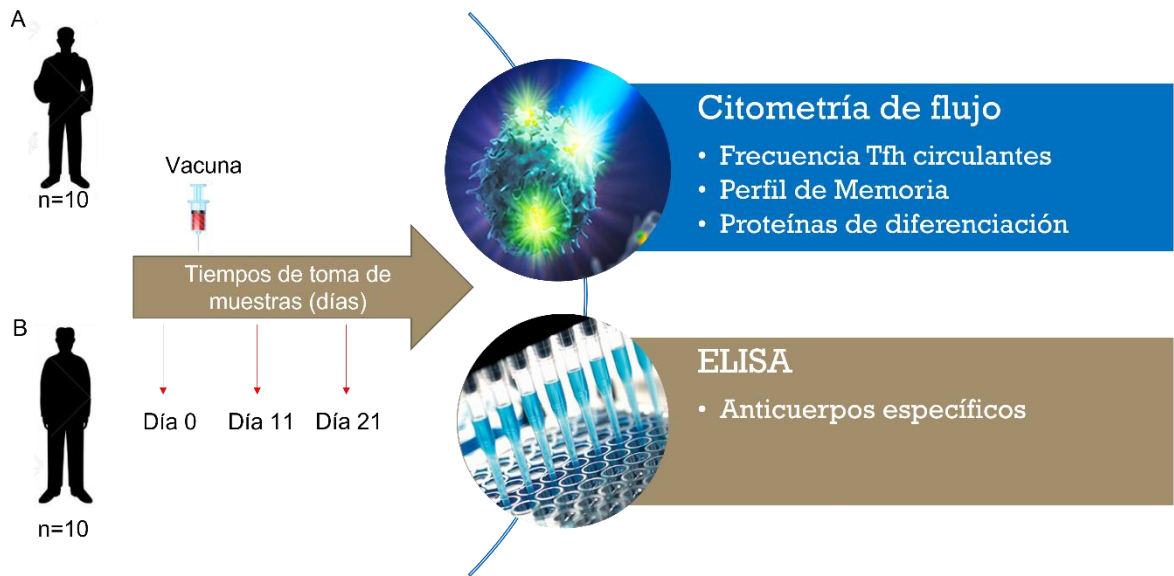


Figura S7. Estrategia de vacunación con Toxoide Tetánico. Para la medición de la respuesta a la vacunación con Toxoide Tetánico dos cohortes, cada una con **(A)** cinco adultos jóvenes (18-30 años) y **(B)** cinco adultos mayores (>60 años) fueron inmunizados con TT y sus PBMCs se aislaron al día 0, 11 y 21 respecto a la vacunación. Estas células fueron inmunofenotipificadas a través de citometría de flujo y los títulos de anticuerpos en respuesta a la vacunación fueron cuantificados por medio de una prueba ELISA.

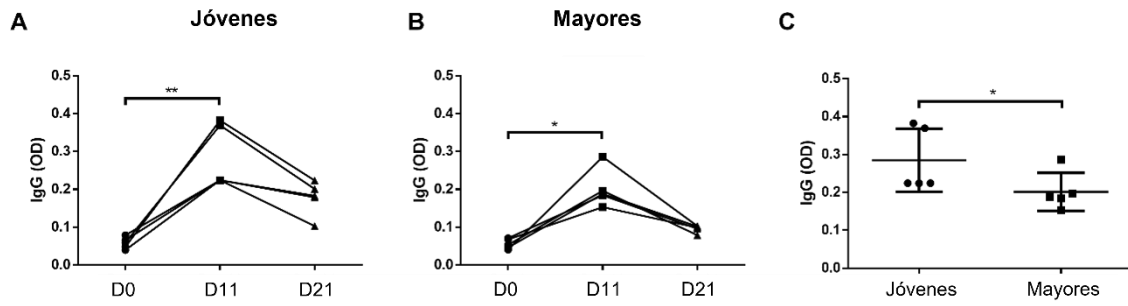


Figura S8. Producción de anticuerpos IgG contra TT en respuesta a la vacuna antitetánica. La producción de anticuerpos IgG específicos en suero se midió mediante pruebas ELISA en **(A)** adultos jóvenes y **(B)** adultos mayores. **(C)** Se muestran las diferencias de títulos de anticuerpos entre jóvenes y viejos en el día 11. n=5. * < 0.05, ** < 0.01.

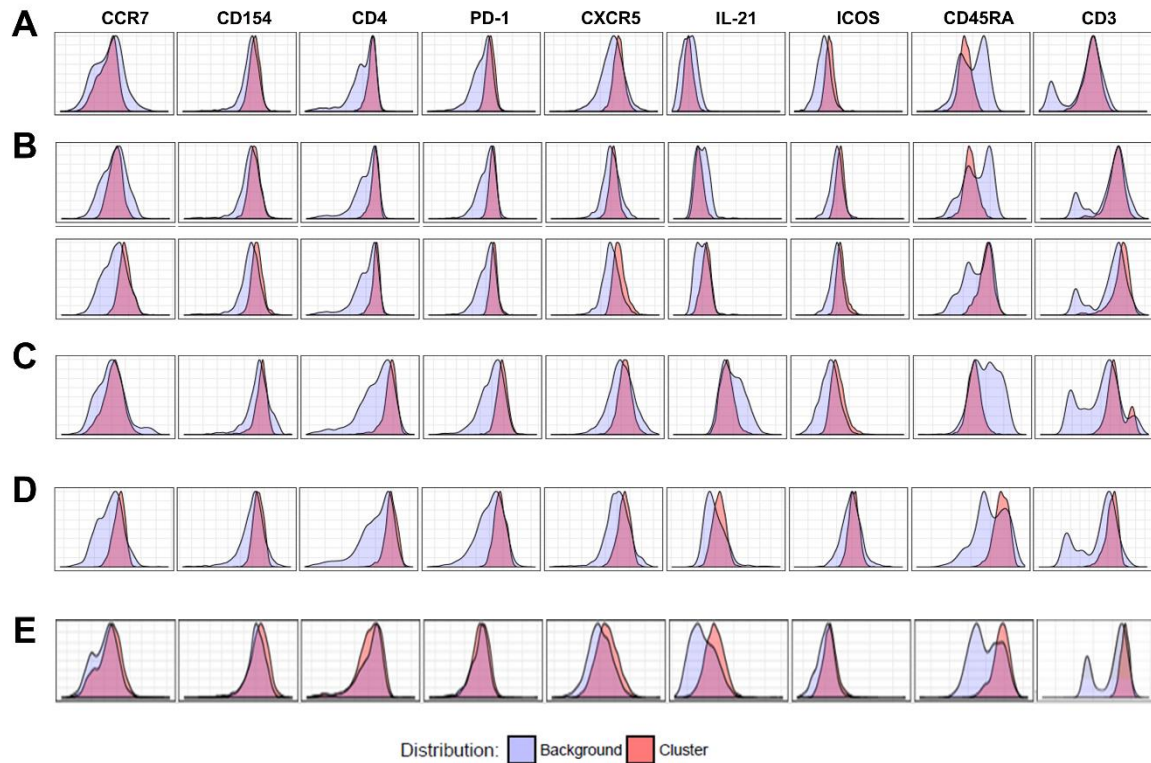


Figura S9. Expresión de los marcadores de las poblaciones diferenciales entre adultos jóvenes y mayores encontradas mediante agrupamiento de células automatizado utilizando el software Citrus. Caracterización fenotípica de las subpoblaciones que distinguieron entre adultos jóvenes y adultos mayores. La activación y el análisis estadístico se realizaron con el software CITRUS. Cada corrida de Citrus se realizó con 10.000 eventos por individuo, el número mínimo de células para considerar un cluster fue de 2.500 células. Los histogramas muestran la expresión de los marcadores de células indicados (azul: fondo, rojo: expresión de grupo). Aquí se presentan algunos de los conglomerados que diferencian **(A)** los tres puntos de tiempo de muestreo en el grupo joven; **(B)** respuesta a la estimulación TT en el día 11 en adultos jóvenes; **(C)** día 0 previo a la vacunación entre adultos jóvenes y mayores; **(D)** día 11 después de la vacunación y sin estimulación, y **(E)** estimulada con TT.

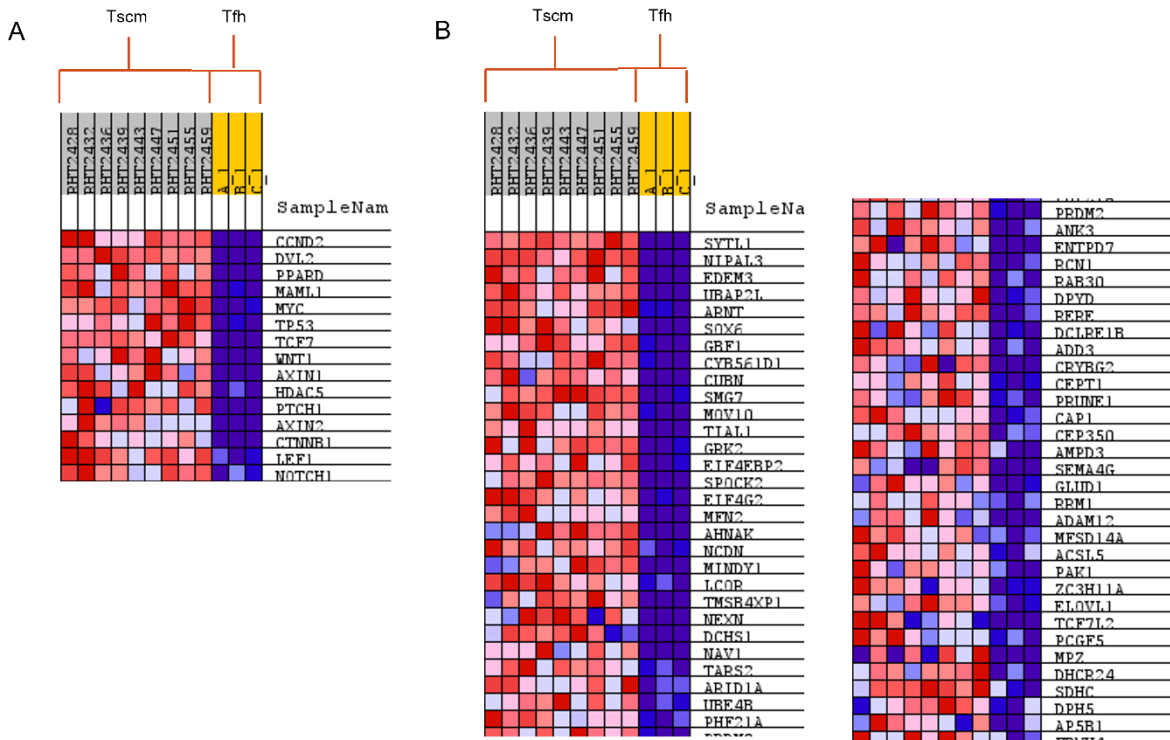


Figura S10. Mapa de calor genes vías autorrenovación enriquecidos en Tscm. RNA-seq de células Tscm (GSE143215) y Tfh (GSE130793) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Mapas de calor de los genes enriquecidos de las vías **(A)** Wnt- β -catenina (M5895) y **(B)** Lef1 (M3572). Los genes que se muestran son los genes enriquecidos en las Tscm respecto a las Tfh. n= mínimo 3.

Wnt-B-Catenina

SYMBOL	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
PPARD	303	3.297	0.1979	Yes
TP53	416	3.085	0.3738	Yes
TCF7	515	2.899	0.4250	Yes
WNT1	662	2.726	0.4712	Yes
LEF1	1732	1.811	0.6720	Yes
NOTCH1	2000	1.679	0.6936	Yes

Lef1

SYMBOL	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
AMPD3	2780	1.362	0.3718	Yes
GLUD1	3283	1.205	0.3650	Yes
PAK1	3566	1.126	0.3832	Yes
TCF7L2	3720	1.094	0.3942	Yes

Tabla S2. Enriquecimiento de genes vías autorrenovación Tscm vs Tfh. Lista de genes enriquecidos en células Tscm respecto a LTfh de vías Wnt- β -Catenina STAT3 y Lef1 según análisis de GSEA.

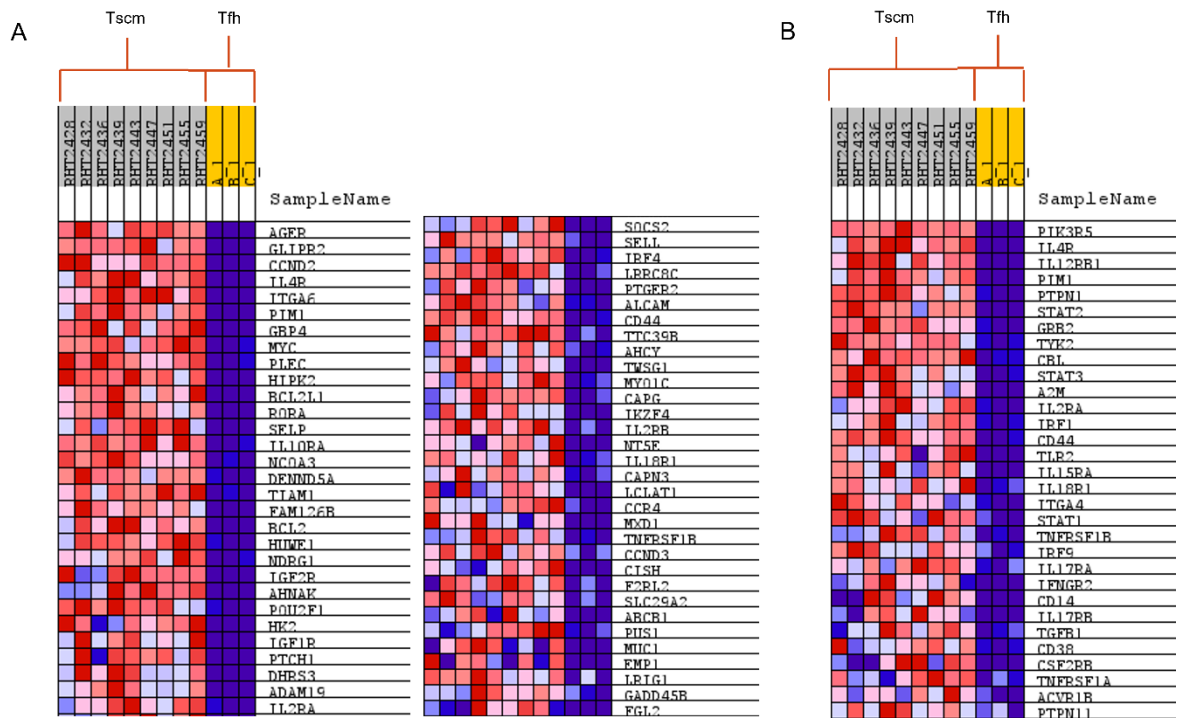


Figura S11. Mapa de calor genes vías JAK/STAT enriquecidos en Tscm. RNA-seq de células Tscm (GSE143215) y Tfh (GSE130793) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Mapas de calor de los genes enriquecidos de las vías **(A)** STAT5 (M5947) y **(B)** STAT3 (M5897). Los genes que se muestran son los genes enriquecidos en las Tscm respecto a las Tfh. n= mínimo 3.

STAT5

SYMBOL	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
IL4R	114	3.833	0.0676	Yes
MYC	345	3.179	0.1190	Yes
BCL2L1	460	2.985	0.1542	Yes
IL10RA	557	2.857	0.1880	Yes
BCL2	637	2.756	0.2454	Yes
IL2RA	1399	2.025	0.3214	Yes
IRF4	1530	1.932	0.3420	Yes
IL2RB	2288	1.541	0.3965	Yes
IL18R1	2360	1.510	0.4068	Yes
CCR4	2616	1.420	0.4158	Yes

STAT3

SYMBOL	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
IL4R	114	3.833	0.0835	Yes
IL12RB1	128	3.780	0.1262	Yes
STAT2	617	2.778	0.2133	Yes
STAT3	915	2.415	0.3186	Yes
IL2RA	1399	2.025	0.3496	Yes
IRF1	1563	1.907	0.3651	Yes
IL15RA	2033	1.662	0.4060	Yes
IL18R1	2360	1.510	0.4107	Yes
STAT1	2418	1.487	0.4427	Yes
IRF9	3023	1.282	0.4493	Yes
IL17RA	3125	1.249	0.4597	Yes
IL17RB	3246	1.216	0.4973	Yes
TGFB1	3325	1.194	0.5080	Yes

Tabla S3. Enriquecimiento de genes vías JAK/STAT Tscm vs Tfh. Lista de genes enriquecidos en células Tscm respecto a LTfh de vías STAT3 y STAT5 según análisis de GSEA.

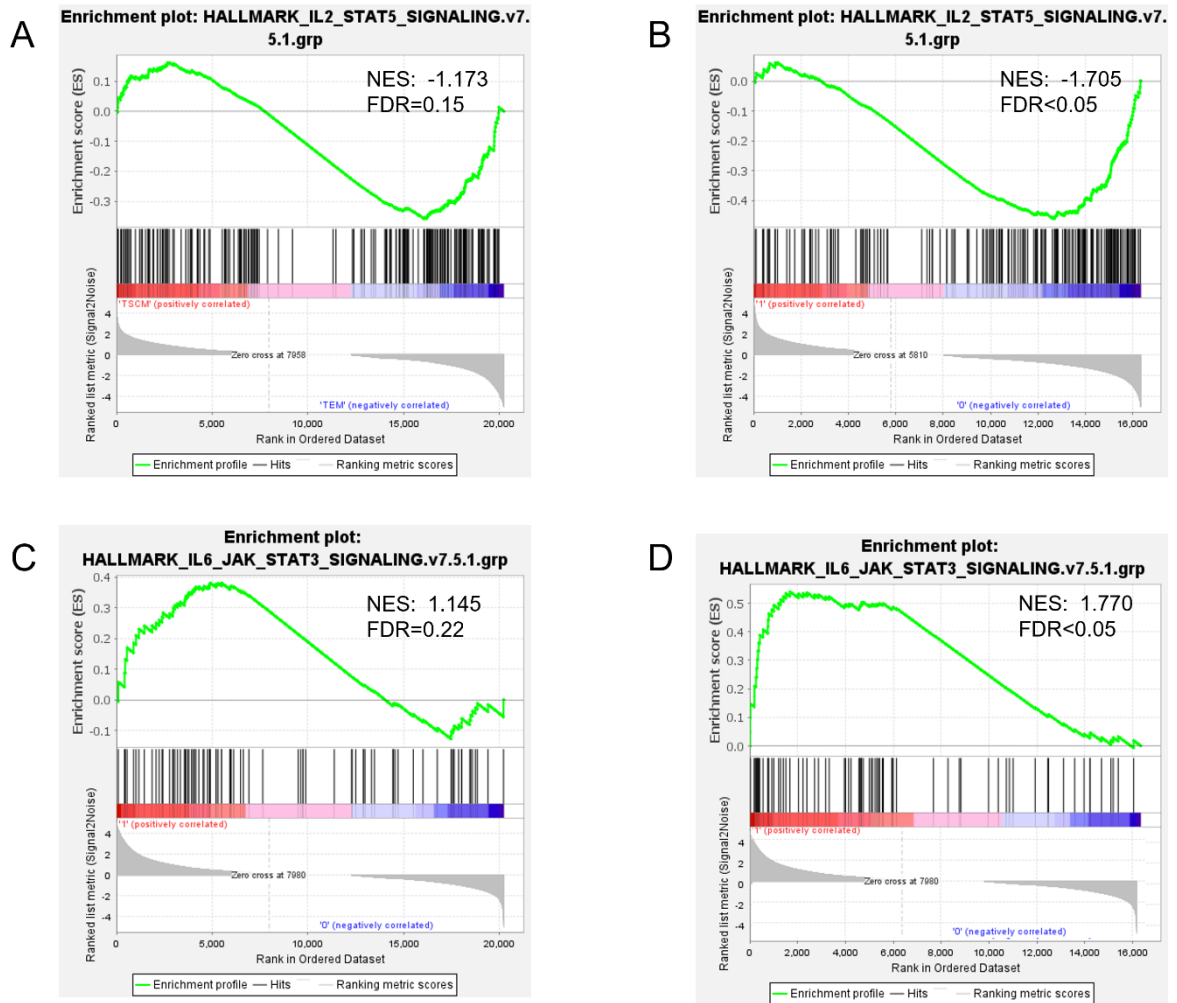


Figura S12. Análisis Enriquecimiento de genes de vías JAK/STAT. RNA-seq de células Tscm (GSE143215), Tfh (GSE130793) y Tem (GSE97863) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA para STAT5 (M5947) entre **(A)** Tscm vs Tem y **(B)** Tfh vs Tem, y para STAT3 (M5897) entre **(C)** Tscm vs Tem y **(D)** Tfh vs Tem. El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

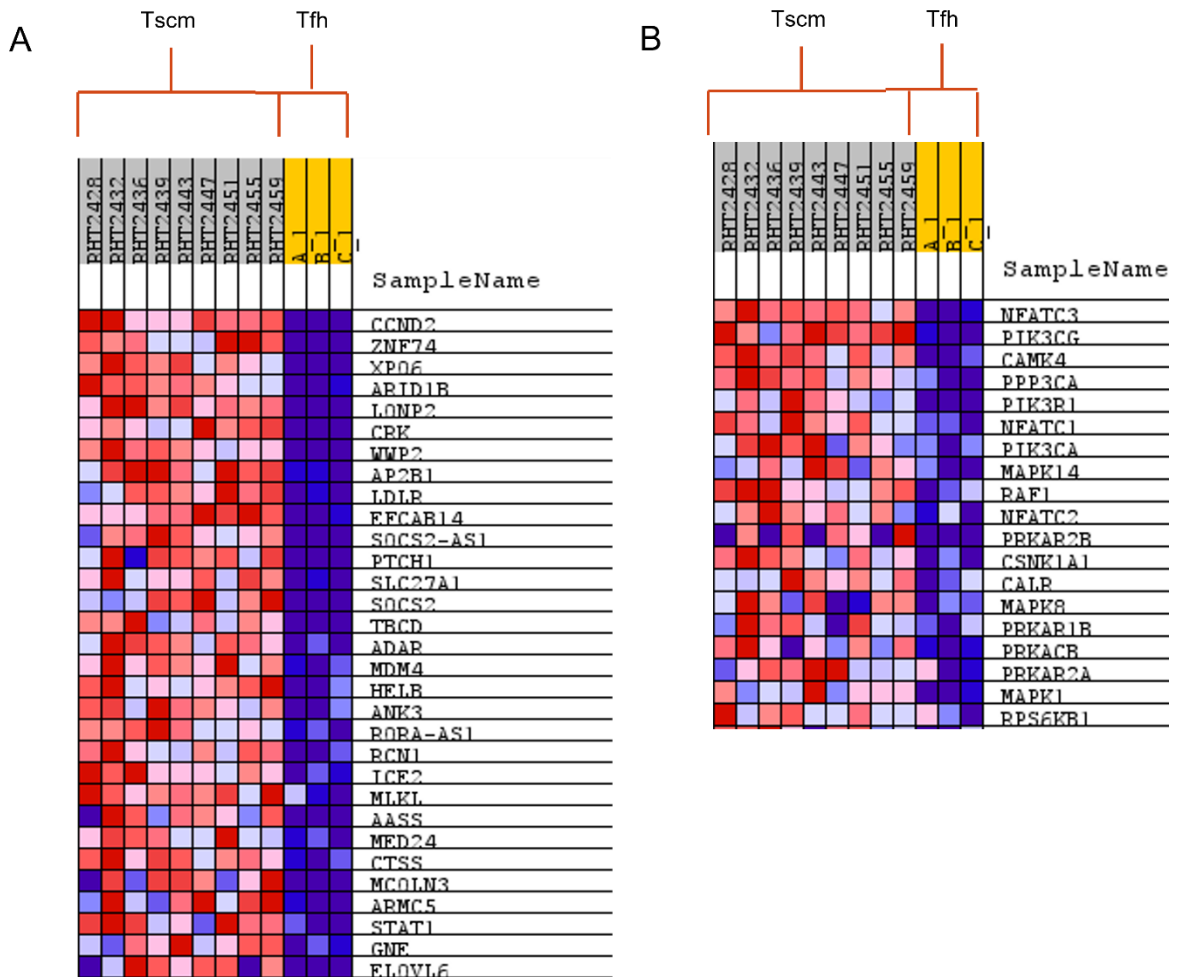


Figura S13. Mapa de calor genes vías asociadas a fenotipo Tfh. RNA-seq de células Tscm (GSE143215) y Tfh (GSE130793) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Mapas de calor de los genes enriquecidos de las vías **(A)** Bcl-6 (M29904) y **(B)** NFAT (M2288). Los genes que se muestran son los genes enriquecidos en las Tscm respecto a las Tfh. n= mínimo 3.

Bcl-6

SYMBOL	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
LDLR	834	2.506	0.1307	Yes
SOCS2-AS1	1198	2.161	0.1449	Yes
SOCS2	1434	2.002	0.1740	Yes
STAT1	2418	1.487	0.2921	Yes
ELOVL6	2615	1.420	0.3023	Yes
CISH	3038	1.277	0.3104	Yes

NFAT

SYMBOL	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
NFATC3	624	2.770	0.0565	Yes
PIK3R1	2489	1.465	0.2149	Yes
NFATC1	2644	1.410	0.2499	Yes
PIK3CA	3699	1.098	0.2414	Yes
MAPK14	4261	0.976	0.2482	Yes
NFATC2	4416	0.943	0.2975	Yes
PRKAR2B	4536	0.917	0.3196	Yes
PRKAR1B	5612	0.736	0.3714	Yes
PRKACB	5710	0.723	0.3886	Yes

Tabla S4. Enriquecimiento de genes vías asociadas a fenotipo Tfh. Lista de genes enriquecidos en células Tscm respecto a LTfh de vías Bcl-6 y NFAT según análisis de GSEA.

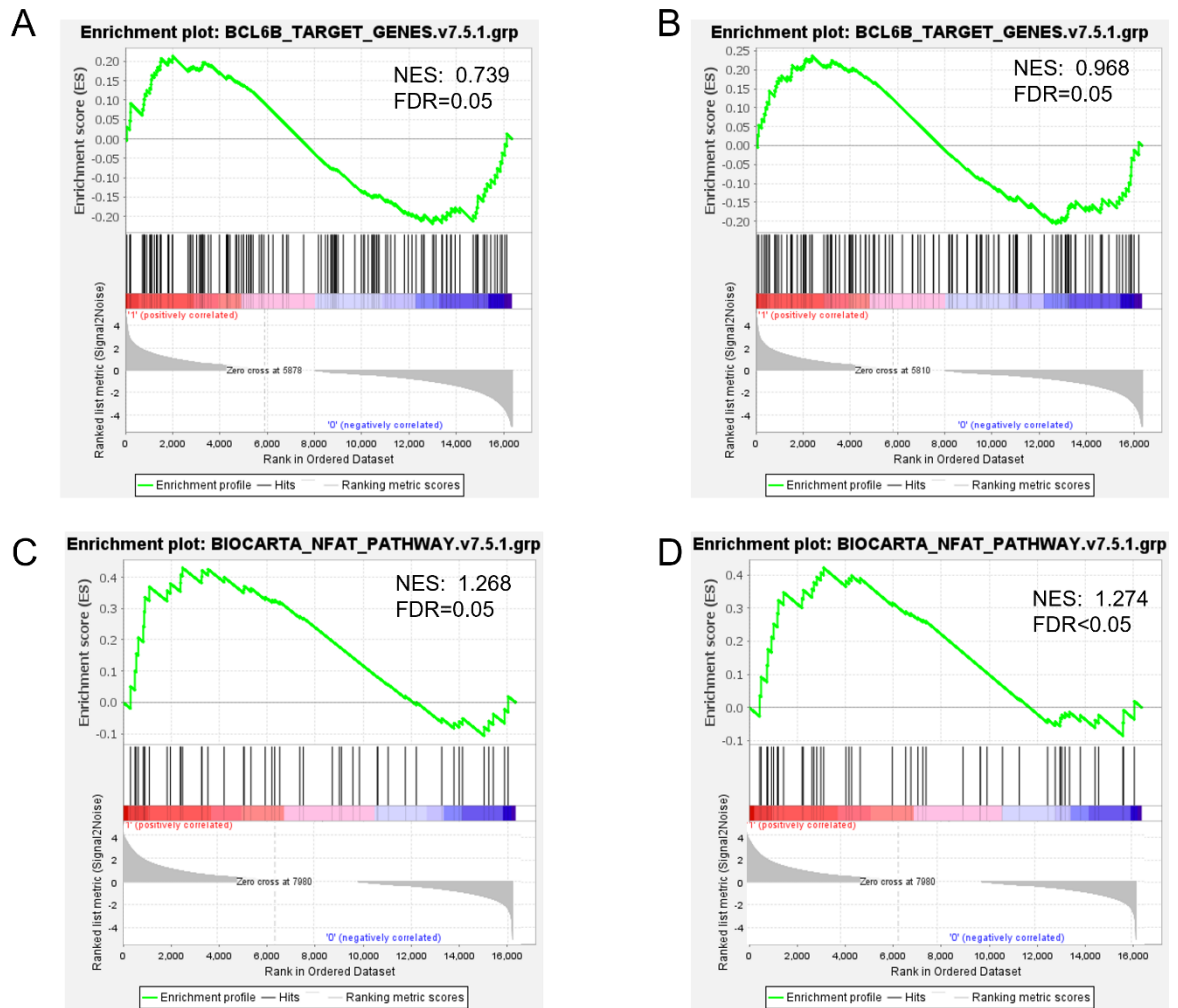


Figura S14. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas a fenotipo Tfh. RNA-seq de células Tscm (GSE143215), Tfh (GSE130793) y Tem (GSE97863) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA para Bcl-6 (M29904) entre **(A)** Tfh vs Tcm y **(B)** Tfh vs Tem, y para NFAT (M2288) entre **(C)** Tfh vs Tcm y **(D)** Tfh vs Tem. El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

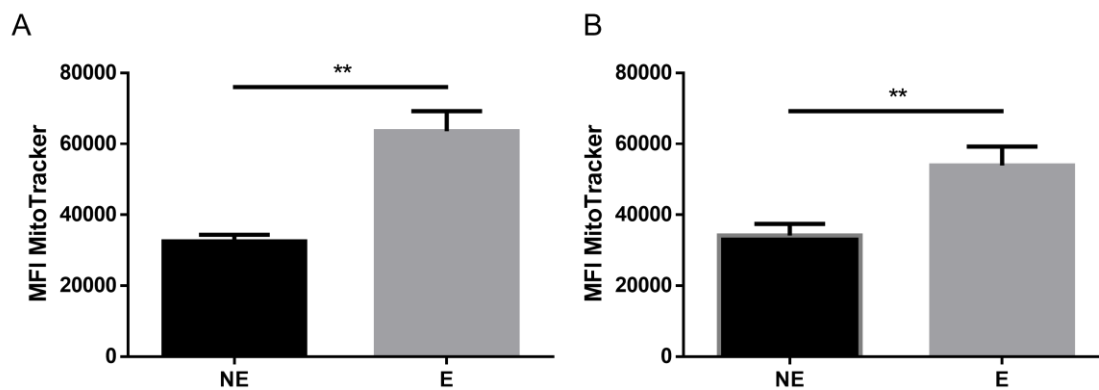


Figura S15. Potencial de membrana mitocondrial de linfocitos T CD4 y CD8 en respuesta a la estimulación. Linfocitos **(A)** CD4 y **(B)** CD8 estimulados con perlas anti-CD3/28/2 durante 48 h en una proporción 2:1 fueron cosechados y teñidos con MitoTracker (100 nM). n=10. Las barras corresponden al promedio +SEM. ** < 0.01

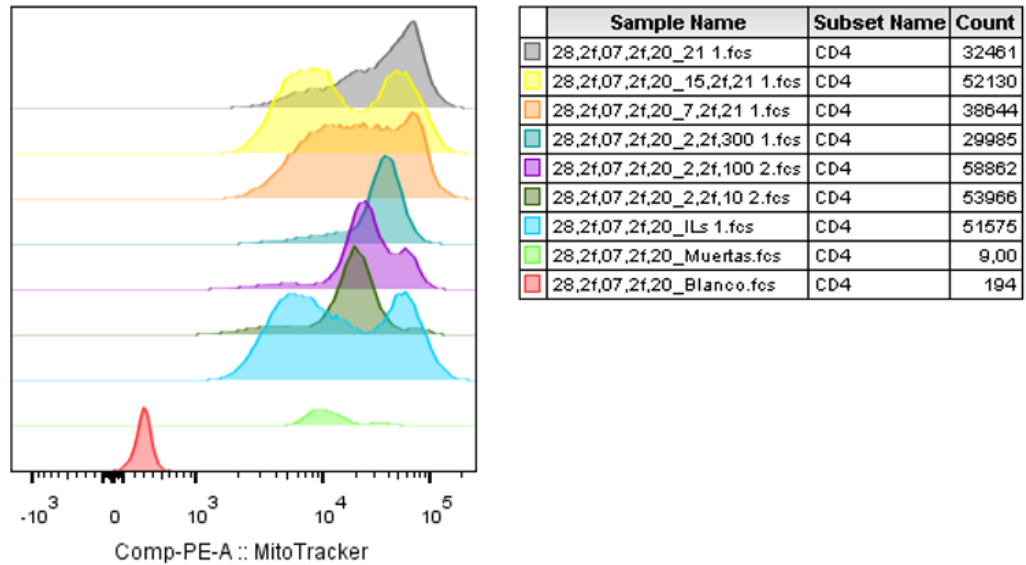


Figura S16. Histogramas de fluorescencia de MitoTracker día 15 de los cultivos. Plot representativo del MFI de MitoTracker de las células en cultivo durante 15 días en las diferentes condiciones: estimuladas con perlas anti-CD2/CD3/CD28 en una proporción linfocitos-perlas 2:1 acompañadas con IL-7, 15 y 21 (10 ng/ml c/u; ILs); IL-21 (10 ng/ml); IL-2 low (10 U/ml), IL-2 mid (100 U/ml) e IL-2 high (300 U/ml); IL-7 y 15 (10 ng/ml c/u), IL-7 y 21 (10 ng/ml c/u), IL-15 y 21 (10 ng/ml c/u). Las citoquinas y el medio se cambiaron cada 3-4 días.

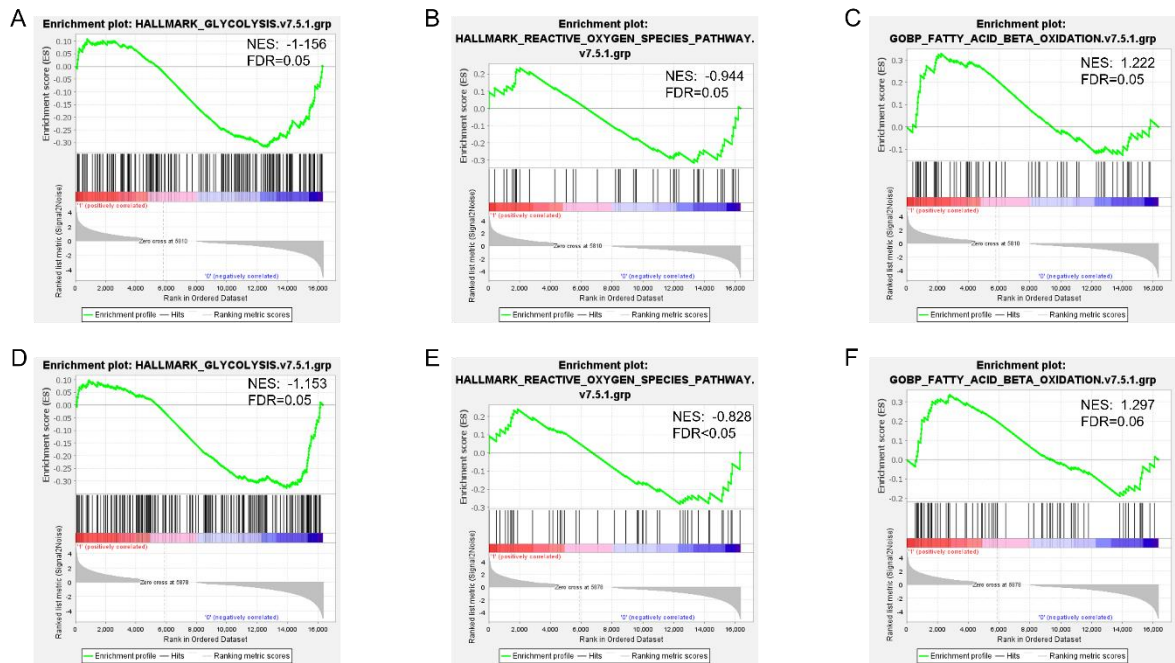


Figura S17. Análisis Enriquecimiento de genes de vías asociadas a metabolismo. RNA-seq de células Tscm (GSE143215), Tfh (GSE130793) y Tem (GSE97863) se obtuvieron de bases de datos públicas y fueron normalizados para análisis por GSEA. Las rutas de genes se obtuvieron de la página de GSEA sobre rutas previamente publicadas. Gráficas de enriquecimiento del conjunto de genes informado por GSEA entre Tfh y Tem para **(A)** Glicólisis y **(B)** ROS, y **(C)** FAO y entre Tfh vs Tcm para **(D)** Glicólisis y **(E)** ROS, y **(F)** FAO. El perfil muestra el puntaje de enriquecimiento continuo (curva verde) y las posiciones de los miembros del conjunto de genes (barras verticales negras) en la lista ordenada por rango de expresión genética diferencial. n= mínimo 3.

