

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto de Servicio Social:

Estandarización de los anticuerpos dirigidos hacia las proteínas/cinasas AKT, AKTp, STAT1, STAT1p, ERK, ERKp, PPAR γ y PPAR α presentes en linfocitos T CD4+ en personas sanas

Alumno: Carrillo Sosa Dylan Caleb Matrícula: 2192029479

Asesor: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez No. Eco. 37622

Asesor ext.: Dr. Hindra Mariana Patlán Vázquez Responsable del CORELAB del Instituto Nacional de Cardiología, Subdirección de investigación Básica y Tecnológica

Cédula Profesional: 13115372

Fecha de inicio y termino: 24 de Noviembre del 2022 al 24 de Noviembre del 2023

Índice

1.	NOMBRE DEL PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL	3
2.	NOMBRE DEL PROYECTO EXTERNO.....	3
3.	JUSTIFICACIÓN DE LA ETAPA EN QUE SE PARTICIPA.....	3
4.	OBJETIVOS:.....	4
	OBJETIVO DE PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL	4
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
5.	METODOLOGÍA	4
5.1	Revisión bibliográfica	4
5.2	Reclutamiento de pacientes y muestras	4
5.3	Separación, marcaje y análisis de muestras.....	5
6.	MARCO TEÓRICO	7
7.	RESULTADOS	16
8.	DISCUSIÓN	36
9.	CONCLUSIONES	38
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO

1. Nombre del proyecto de servicio social:

Estandarización de los anticuerpos dirigidos hacia las proteínas/cinasas AKT, AKTp, STAT1, STAT1p, ERK, ERKp, PPAR γ y PPAR α presentes en linfocitos T CD4+ en personas sanas.

2. Nombre del proyecto externo:

Identificación de diferentes vías de señalización de los linfocitos CD4+ CD28null en pacientes con Síndrome Coronario Agudo (SICA).

3. Justificación de la etapa en que se participa

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel global en la actualidad, de ellas se deriva el síndrome coronario agudo (SICA), el cual es un conjunto de enfermedades clínicas secundarias en las que existe una obstrucción del flujo coronario debido a la presencia de una placa ateromatosa. La presencia de esta placa implica la interacción con diferentes células, y en el caso de una ruptura se da la generación de un trombo y el riesgo de la aparición de un infarto agudo al miocardio, por esta razón, resulta importante conocer los procesos correspondientes en las células involucradas. En el caso de SICA se ha observado que los linfocitos CD4+ CD28null juegan un papel muy importante debido a sus características citotóxicas anormales, llegando a ocasionar enfermedades cardiovasculares y un proceso constante de inflamación. La presencia de linfocitos CD4+ CD28null aumenta con el paso de la edad, aumentando de 1% durante la adolescencia hasta cerca de un 50% en adultos mayores de 65 años, pero en años recientes se ha reportado la presencia de un mayor porcentaje de linfocitos CD4+ CD28null en poblaciones determinadas como enfermedades inflamatorias crónicas, inmunodeficiencias, infecciones y enfermedades cardiovasculares, considerados factores de riesgo. La ausencia del correceptor CD28 ha demostrado ocasionar inmunosenescencia y lisis de diferentes células al poseer citotoxinas.

Se requiere la estandarización de los anticuerpos a determinar en el proyecto, necesario para identificar y utilizar cantidades adecuadas de los anticuerpos al trabajar con linfocitos CD4+.

En el proyecto externo se identificarán los linfocitos T CD4+ CD28null y se caracterizarán las diferentes vías de señalización implicadas en su activación, al identificar las proteínas: RHO, ROCK1, ROCK2, AKT, AKTp, Stat1, Stat1p, ERK, ERKp, pKCa, PKC β I, PKC β II, PPAR γ , PPAR α y NFkb (p65), previamente estandarizados; mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Descripción del vínculo de las actividades a desarrollar con los objetivos de formación del plan de estudios:

Las actividades realizadas en el Servicio social se aborda un objetivo de investigación básica, construyendo conocimientos y desarrollando habilidades en el ámbito hospitalario, aplicando los conceptos obtenidos durante la licenciatura en química farmacéutica biológica.

Palabras clave: *síndrome coronario agudo, SICA, linfocitos T CD4+ , vías de señalización y estandarización.*

4. Objetivos:

Objetivo de proyecto de servicio social

- Identificar la dilución óptima de los anticuerpos AKT, AKTp, STAT1, STAT1p, ERK, ERKp, PPAR γ y PPAR α en linfocitos T CD4+ de personas sanas.

Objetivos específicos:

- Identificación de linfocitos T CD4+ CD28null en pacientes con SICA.
- Estandarización de las proteínas y cinasas RHO, ROCK1, ROCK2, AKT, AKTp, Stat1, Stat1p, ERK, ERKp pKC α , PKC β I, PKC β II, PPAR γ , PPAR α y NFkb (p65) en personas sanas.
- Identificación de las proteínas RHO, ROCK1, ROCK2, AKT, AKTp, Stat1, Stat1p, ERK, ERKp pKC α , PKC β I, PKC β II, PPAR γ , PPAR α y NFkb (p65) como vías de señalización en linfocitos CD4+ CD28null.

5. Metodología

5.1 Revisión bibliográfica

Se realizará una investigación bibliográfica de las enfermedades cardiovasculares, su relevancia a nivel mundial y en México, la importancia del sistema inmune en las enfermedades cardiovasculares, la presencia y función de los linfocitos T CD4+ CD28null en SICA y las vías de señalización involucradas en la activación de estos linfocitos.

5.2 Reclutamiento de pacientes y muestras

Se obtendrán muestras de sangre en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de 5 donadores sanos, de acuerdo con los criterios descritos en la “tabla 1”; este proyecto forma parte de un proyecto que se encuentra próximo a registrarse en el Instituto Nacional de Cardiología - Ignacio Chávez.

Tabla 1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
Adultos menores de 65 años	Mujeres embarazadas	Pérdida de muestras
Hemodinámicamente estables	Personas con una infección activa	Personas que decidan retirarse del protocolo
	Antecedentes de Hepatitis B, Hepatitis C o VIH	
	Vacunación reciente en un periodo de 3 meses	

	Uso de glucocorticoides o inmunosupresores en un periodo de 3 meses	
	Pacientes con enfermedades autoinmunes	
	Realización de tatuajes reciente en un periodo de 1 año	

5.3 Separación, marcaje y análisis de muestras

Se realizará la toma de muestra sanguínea de personas sanas en ayuno, se obtendrán dos tubos con anticoagulante – EDTA (BD, USA) con capacidad de 4 mL de muestra, se agitarán por inversión de 6-9 inversiones, para su próxima separación, conteo y análisis. Las muestras obtenidas se centrifugarán a 1500rpm en la Centrifuga marca Heraeus (Baxter, USA) durante 10 minutos para extraer el plasma, posteriormente, se procesarán mediante la técnica de gradiente de densidad para obtener las células mononucleares de sangre periférica. Se realizará una dilución de las muestras sanguíneas con 5 mL de PBS/Heparina con muestra 1:1; se coloca lentamente la sangre en un tubo Falcon (CORNING, México) que contenga Histopaque®-1077 (SIGMA, Inglaterra, Reino Unido). Centrifugar a 1,500 rpm durante 20 minutos sin freno, se aislará el anillo de PMBC (Peripheral Mononuclear Blood Cells) y se resuspenderá en PBS/Heparina (SIGMA, Inglaterra) (PiSA, México).

Una vez aisladas y resuspendidas las PBMC en 5 mL de PBS/Heparina, se centrifugan a 1,500 rpm por 10 minutos y se contarán los linfocitos viables para trabajar.

Para llevar a cabo la tinción extracelular se ajustan las células a un número de 200,000 células por tubo. Se centrifugarán a 14,000 rpm durante 30 segundos, se descarta el sobrenadante para después agregarán los anticuerpos extracelulares y se incuban durante media hora a temperatura ambiente cubiertos de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizarán dos lavados con PBS/Heparina. Las células se fijarán con paraformaldehído al 4% presente en el kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) y se dejarán incubando 30 minutos a 4°C cubiertos de la luz. Al terminar el tiempo de incubación se realizan dos lavados con PBS/Heparina.

La permeabilización de la membrana de los linfocitos T se llevará a cabo con el Buffer de permeabilización presente en el kit comercial kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, USA).

Después, se retirará el sobrenadante y se colocarán las diferentes concentraciones de anticuerpos primarios (Santa Cruz, Abcam) a investigar para la determinación, se colocarán los anticuerpos secundarios en la concentración previamente estandarizada; se realizarán dos lavados con PBS/Heparina, se resuspenderán en PBS/Heparina y se procede a la adquisición de células en el citómetro de flujo FACSAria™ Fusion Cell Sorter (BD, Biosciences). Se establecerán las condiciones de adquisición utilizando el tubo control (Sin/Tinción).

El análisis se llevará a cabo en el software FlowJo versión 10.8.5 (FlowJo, BD, USA, New Jersey). En este software se realizaron 4 distintos análisis para identificar la condición ideal para el uso de los anticuerpos estandarizados, como primer análisis estadístico la intensidad de fluorescencia para detectar que porcentaje de células teñidas resultaba mayor en las diferentes condiciones, el segundo método es la identificación de los respectivos histogramas para determinar el espectro más cercano a la emisión así como cantidad de células, para el tercer análisis se realizó una comparativa entre el porcentaje de intensidad de fluorescencia contra la intensidad media de fluorescencia (IMF) la cual es una medida que indica el promedio de la intensidad de fluorescencia en el histograma donde esta comparación indica la relación entre número de células teñidas contra el número de receptores presentes por célula y por ultimo en dado caso de requerir el cuarto análisis es la ecuación del índice de tinción el cuál es otro método estadístico utilizado para la estandarización de anticuerpos.

Ecuación 1. Índice de tinción

$$\text{Índice de tinción} = \frac{[MFI_1 - MFI_2]}{2 \times SD}$$

A continuación, se enlistan los materiales y/o equipos a utilizar en cada uno de los pasos del proceso, desde la toma de la muestra hasta el último momento de la

Toma de muestra:

- Vacutainer (BD, USA)
- Agujas (BD, USA)
- Torundas con etanol al 70%
- Ligadura
- Tubos para muestras con anticoagulante EDTA (BD, USA)

Separación mediante técnica de gradiente de densidad:

- Muestras sanguíneas
- Histopaque®-1077 (SIGMA, Inglaterra, Reino Unido)
- Tubos Falcon (CORNING, México)
- PBS/Heparina (SIGMA, Inglaterra) (PiSA, México)
- Micropipeta (CORNING, USA)
- Centrifuga (Baxter, USA)
- Pipetor "Stripettor Ultra" (CORNING, México)

Tinción extracelular:

- Tubos eppendorf de 1.5 mL (Cellpro, China)
- Centrifuga para tubos de 1.5 mL (Eppendorf, Alemania)
- Micropipeta (CORNING, USA)
- Anticuerpos extracelulares (BD)
- PBS/Heparina (SIGMA, Inglaterra) (PiSA, México)
- Kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, USA)
- Anticuerpos intracelulares (Santa Cruz, Abcam)

Adquisición en el citómetro de flujo y análisis:

- Citómetro de flujo marca FACSAria™ Fusion Cell Sorter (BD USA)

Validación de resultados:

- Computadora y Software FlowJo

6. Marco Teórico

Las enfermedades cardiovasculares por sus siglas en inglés “Cardiovascular Diseases” (CVD) son una variedad de afecciones o trastornos los cuales afectan al corazón, son la principal causa de muerte a nivel global, cerca del 31% de las muertes globales se asocian a enfermedades cardiovasculares (OMS,2012). En México, en el año 2015, el 25.5% de defunciones se atribuyeron a enfermedades cardiovasculares, un total de 655,688 muertes, y dentro de ellas, la cardiopatía isquémica fue la que generó mayor impacto con un 52.8% (Palcia-López, 2022). Existe el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias a partir de los 40 años, un 49% en hombres y cerca del 32% en mujeres (Becerra, 2020), son ocasionadas por situaciones naturales como edad, sexo, herencia o también por factores variables como malos hábitos o enfermedades (Vergallo, 2020). Aunado a esto, existen factores de riesgo como tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, obesidad mórbida, sedentarismo, bajo consumo de frutas/vegetales, consumo problemático de alcohol, entre otros (Cassiani, 2009).

Las enfermedades cardiovasculares, son consecuencia del daño ocasionado a células del corazón y vasos sanguíneos, estas se pueden clasificar en: enfermedad de las arterias coronarias (EAC), enfermedad cerebrovascular (ECV), enfermedad arterial periférica (EAP) y aterosclerosis aórtica; de las cuales la enfermedad de arterias coronarias resulta la más recurrente e investigada, aproximadamente el 33% - 50% de los casos de enfermedades cardiovasculares pertenecen a EAC. Las EAC son consecuencia de la disminución de perfusión miocárdica ocasionando el Síndrome Coronario Agudo (SICA), las enfermedades cerebrovasculares son asociadas a accidentes cerebrovasculares también llamados ataques isquémicos transitorios, la enfermedad arterial periférica se refiere al daño de las extremidades lo que puede desembocar en claudicación y la aterosclerosis aórtica refiere a los aneurismas torácicos y abdominales (Olvera, 2022). En estas enfermedades, las células del corazón son sometidas a diferentes situaciones o procedimientos como apoptosis, inflamación, cambios estructurales/funcionales, acumulaciones de lípidos/colesterol y cambios de expresión génica, por lo que el número de células funcionales se ve reducido (Boyle, 2011). La enfermedad coronaria también llamada cardiopatía isquémica se refiere a la aterosclerosis o obstrucción de las arterias coronarias por la placa ateromatosa, donde se encuentra la clasificación del síndrome coronario agudo (SICA); se denomina SICA a un conjunto específico de enfermedades clínicas secundarias, las cuales generan una obstrucción del flujocoronario, formación de coágulos, agregación plaquetaria, inflamación, muerte celular, vasoconstricción, entre otros, debido a la formación de un trombo intracoronario a partir de la rotura, desestabilización o erosión de una placa de ateroma. La placa ateromatosa esta conformada por partículas extracelulares de lípidos, células espumosas y desechos, los cuales se acumulan en la capa íntima de la pared arterial, estas forman un núcleo lipídico o necrótico, el cual se rodea por una capa de matriz rica en colágeno y células de músculo liso o endoteliales llamada capa fibrosa; esta placa está presente en la íntima y crece hacia el lumen donde se encuentra el flujo sanguíneo. Cuando esta placa se rompe se forma un trombo sobresaliente del núcleo lipídico, en el trombo existe la presencia de plaquetas y fibrina. Dependiendo de la estabilidad de la placa, aumenta o disminuye el riesgo de desarrollar SICA, la “*ilustración 1*” representa la presencia de la placa ateromatosa presente en una arteria, donde se puede observar el núcleo lipídico y su interacción con las células endoteliales (Vergallo, 2020).

El crecimiento de la placa ocasiona un desequilibrio aporte-demanda de oxígeno, y dependiendo el daño ocasionado se clasifican en: Angina inestable (AI), Angina estable (AE), infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) e infarto agudo al miocardio sin elevación

del segmento ST (IAMSEST); la detección de la elevación del segmento ST se confirma mediante un electrocardiograma (Cassiani, 2009).

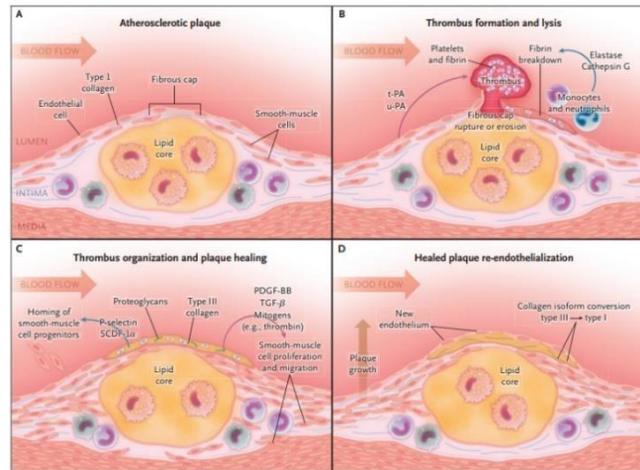


Ilustración 1. Placa ateromatosa en arteria, formación/ruptura de trombo, organización de trombo y placa restaurada. A) Representa la conformación de la placa aterosclerótica en estado basal, B) Ruptura de la placa/formación de un trombo debido a la presencia de plaquetas y fibrina lo cual ocasiona la obstrucción del flujo sanguíneo, C) Representa la organización del trombo y el proceso de restablecimiento de la placa mediante proteoglicanos y colágeno, D) Placa reestablecida con una nueva capa de células endoteliales (Vergallo, 2020).

La angina de pecho se define como la obstrucción anatómica de una o varias arterias coronarias, es una consecuencia del desequilibrio de la demanda de oxígeno con su aporte coronario, al someterse a situaciones que aumenten esta demanda como actividad física, o la disminución del aporte de oxígeno, pueden provocar isquemia y por lo tanto angina de pecho, la cual se manifiesta como una opresión precordial o un “dolor en el pecho”. En una angina de pecho estable, la placa ateromatosa ocupa cerca del 70% de la luz del vaso coronario, al estar en reposo el paciente el flujo coronario es estable y el necesario para los requerimientos metabólicos necesarios, pero al realizar alguna actividad o esfuerzo físico aparece la angina, la cual, en un periodo de tiempo corto desaparece gracias a la acción rápida de vasodilatadores, por lo que el paciente vuelve al flujo habitual. Por otro lado, la angina inestable se caracteriza por la aparición de la angina en estado de reposo, con una intensidad progresiva, esta ocurre cuando existen placas ateroscleróticas vulnerables dentro de las arterias coronarias, la degradación o ruptura de esta placa genera la trombosis coronaria oclusiva lo que ocasiona una fibrinólisis interna, aquí comienza una lucha entre la trombosis coronaria (angina) y la fibrinólisis (desaparición de la angina) lo que explica la inestabilidad clínica; este tipo de angina aparece dos semanas después en pacientes post-infartados (Zambrano, 2022) (Pedrozo- Pupo & Celemin-Güerte, 2018).

Se denomina infarto agudo al miocardio (IAM) a una isquemia miocárdica aguda con modificaciones anormales, en niveles de troponina donde existe un daño miocárdico agudo, en este caso, la placa ateromatosa es mayor a comparación con angina y la formación del trombo es tan grande que impide el flujo sanguíneo del vaso hacia el miocardio (Sebastian, 2021).

La clasificación del infarto agudo al miocardio varía en la elevación del elemento ST al visualizar en el electrocardiograma, esta elevación o no del segmento ST radica en el nivel de obstrucción coronaria presente en el vaso. Existe el infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST (IAMCST), debido a una obstrucción aguda o total de la arteria coronaria lo que provoca isquemia del miocardio por lo que la arteria se irriga (Thygesen, 2018).

Por otro lado, el infarto agudo al miocardio sin elevación del segmento ST (IAMSST) se produce cuando la obstrucción del flujo de la arteria coronaria es parcial, lo que provoca una isquemia menos intensa y prologada, pero con un efecto más intenso que el ocasionado por las anginas (Borrayo, 2018).

Existe el riesgo de sufrir una lesión hepática ocasionada por la reperfusión isquémica, esto ocurre cuando se reestablece el flujo sanguíneo posterior a un infarto, lo cual puede generar a largo plazo un restablecimiento, pero también puede inducir lesiones o muerte celular debido a mecanismos específicos como estrés oxidativo debido a una mitocondria dañada por radicales libres, la sobrecarga de Ca⁺ ocasiona la apertura del poro de transición permeable mitocondrial, inflamación asociado a neutrófilos así como TNF- α y activación de sistema de complemento (Ildefonso, 2010).

Existe la presencia de linfocitos T en la lesión aterosclerótica, principalmente CD4⁺ estos resultan implicados desde el comienzo de la enfermedad, y debido a la presencia de constante inflamación contribuyen a la desestabilización que da lugar a SICA (Manteca, 2010).

En el caso de SICA, se ha demostrado que los linfocitos CD4⁺ CD28^{null} se almacenan en las placas ateroscleróticas inestables, esto, sumado con la presencia de las enzimas citotóxicas y una alta secreción de IFN- γ (activación de macrófagos \rightarrow Metaloproteasas), pueden provocar la desestabilización o ruptura de la placa. Las metaloproteasas y las citocinas inflamatorias tienen un papel importante en la ruptura de la placa ateromatosa al afectar su estabilidad, las metaloproteínas son enzimas que degradan las proteínas de la matriz extracelular que forman parte de la placa ateromatosa, como el colágeno y la elastina; estas enzimas producen células inflamatorias como macrófagos, los cuales se encuentran presentes en la placa ateromatosa; las citocinas inflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) pueden aumentar la producción de metaloproteasas, y también activar células endoteliales cercanas a la placa lo que podría permitir la infiltración de más células inflamatorias, desembocando en una inflamación crónica y progreso de la enfermedad (Dumitriu, 2014).

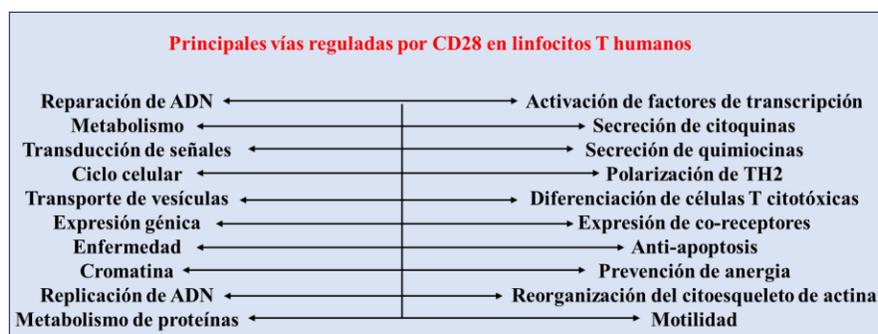
Los linfocitos o glóbulos blancos son células pertenecientes al sistema inmune adaptativo las cuales participan en proceso de infección o inflamatorios, generando una respuesta ante patógenos o irregularidades en el sistema a través de procesos como detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), producción de anticuerpos, eliminación de células infectadas y una autorregulación. Tanto las células inmunitarias adaptativas y los linfocitos tienen origen de una célula madre hematopoyética multipotencial, de la cual una derivación de naturaleza linfoide los convierte en linfocitos, existen dos clasificaciones de linfocitos: linfocitos B (LB) los cuales son responsables de la producción y liberación de anticuerpos, por otro lado, los linfocitos T (LT) encargados de brindar una respuesta más específica. Los linfocitos T, se caracterizan por la presencia del receptor (TCR) y se dividen en dos grupos dependiendo de su correceptor: linfocitos CD4⁺ o CD8⁺; los CD8⁺ se denominan citotóxicos los cuales utilizando granzimas/perforinas eliminan a las células infectadas, mientras que los CD4⁺ tienen diversas funciones siendo la principal interactuar mediante el mecanismo de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) con células presentadoras de antígenos y de este modo generar una respuesta efectiva al brindar mayor especificidad de los anticuerpos generados por los linfocitos B (Zhu, 2008).

Además de los linfocitos, también existen los Natural Killers dentro del mismo origen linfoide, pero en este caso se considera dentro de ambas inmunidades tanto innata como adaptativa, reciben este nombre ya que tienen la capacidad de eliminar células sin la necesidad de una interacción previa

con el antígeno, son linfocitos citotóxicos los cuales detectan malformaciones ocasionadas por sustancias ajenas al cuerpo o infecciones por algún patógeno. Mediante desgranulación y la unión de receptor de muerte, por otro lado, tienen la capacidad de liberar citocinas inflamatorias mediante la estimulación de receptores, a través de estos mecanismos los Natural Killers son capaces de enfrentar la presencia de una infección y así disminuir la propagación (Abel, 2018).

Los LT CD4+ regulan distintas situaciones, como la activación de células inmunitarias, regulación de la reacción inmunitaria, liberación de citocinas, y su principal función, es la activación de linfocitos B para la producción de anticuerpos de alta especificidad gracias al MHC – II. Los LT cuentan en su membrana con una glicoproteína estructural denominada CD28, la cual actúa como coestimulador, generando una interacción con las células presentadoras de antígenos la cual es importante para una eficiente funcionalidad del mecanismo de defensa (Esensten, 2016).

La sinapsis inmunológica entre linfocitos T y células presentadoras, se refiere al reconocimiento del complejo TCR con un péptido asociado a una célula presentadora de antígenos, el cual tiene funciones como una respuesta/recepción de información y una sinapsis dinámica, donde existen diversas proteínas de membrana las cuales permiten la presentación de antígeno, existen tres pasos para la sinapsis inmunológica: en una primera instancia existe la interacción entre el TCR y el PAMP expresado por la célula presentadora, en linfocitos la presencia de CD28 es necesaria como segunda señal al actuar como coestimulador, y finalmente la tercera señal resulta de la liberación de IL-2 con los receptores correspondientes. Esta interacción permite la proliferación de las células T y prevención de la anergia; anergia se define como “estado de falta de respuesta parcial o total del sistema inducido por activación parcial”, inhibiendo y limitando las funciones de las células afectadas (Lechler, 2001). La unión de CD28 con B7-1 o B7-2 genera la activación de los linfocitos T, vitales para la respuesta inmune; por otro lado, la ausencia del coestimulador CD28, incapacita a las células de llevar a cabo funciones como: proliferación, secreción de citocinas, diferenciación celular, expresión génica, entre otras; en la “*ilustración 2*” se muestran las respuestas o vías con las que el coestimulador CD28 interacciona o regula (Jadav, 2022).



*Ilustración 2. Vías de señalización reguladas por CD28 en linfocitos T de humanos
La segunda interacción de señalamiento para la sinapsis de los linfocitos T la cual regula diferentes vías de señalización enlistadas en la ilustración. Modificado de Jadav, 2022.*

En la presente década, se han identificado y estudiado un subgrupo de linfocitos T tanto en CD4+ como CD8+, carentes del coestimulador CD28. Las células CD4+ CD28null tienen presencia de enzimas citotóxicas (perforinas y granzimas), con capacidad de lisar diferentes tipos de células (endoteliales, células del musculo liso, cardiomiocitos, entre otras) dañando el endotelio y si existe un alto porcentaje de linfocitos CD4+ CD28null, puede aumentar el riesgo de muerte debido a un constante estado de inflamación sumado al desequilibrio aporte-demanda de oxígeno (Téo, 2013). Los linfocitos CD4+ CD28null, producen altos niveles de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL-2 las cuales mantienen constante la inflamación; la acumulación de ellas reside en la regulación de la proteína apoptótica Bcl-2 por que a pesar de tener receptores inductores de muerte como CD59fas resisten esta inducción a apoptosis. Otra de las funciones limitadas en estas células es la presencia del ligando CD40 el cual es requerido como señal auxiliar para promover la producción de anticuerpos mediante las células B (Dumitriu,2009).

Con el paso de los años investigadores han identificado irregularidades estructurales en los linfocitos CD4+ CD28null, han encontrado receptores, citocinas y citotoxinas asociados a otras células como se muestra en la “ilustración 3”; por ejemplo, cuentan con los receptores de quimiocinas CCR7, CCR5, CX3CR1. Por otro lado, también se expresan receptores tipo Toll TLR4, TLR2; de todos los receptores no pertenecientes, los más sobresalientes se considera son los pertenecientes a los Natural Killers dentro de los que se encuentran KIR2DS2, NKG2D, CD11b y CD161 (Maly, 2015).

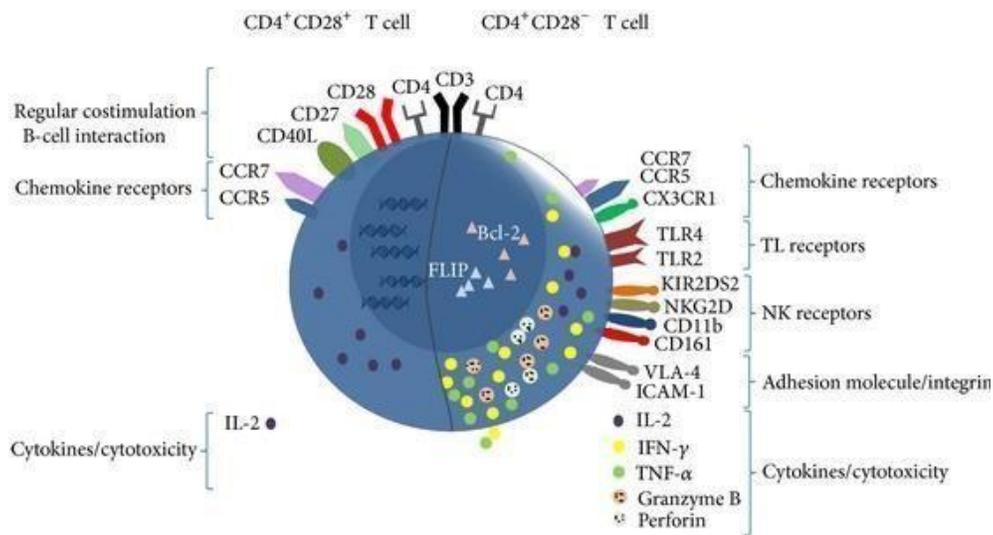


Ilustración 3. Características fenotípicas de linfocitos CD4+ CD28+ versus CD4+ CD28null. Representación de las diferentes características de los linfocitos CD4+, del lado izquierdo del esquema se muestran las características asociadas a CD4+ CD28+, y por el lado derecho se muestran las asociadas a CD4+ CD28null. En los linfocitos de interés observan receptores tipo Toll, Receptores de NK, moléculas de adhesión y citocinas diferentes a las presentes en su comparativa de CD28+ (Maly, 2015).

En años recientes se han registrado porcentajes de CD4+ CD28null en diferentes situaciones, en personas sanas la cantidad es mínima, pero existen circunstancias donde existe CD28null aumenta. Liuzzo y colaboradores, en 2007 fueron de los primeros investigadores en detectar un alto porcentaje de CD28null en personas con síndrome coronario agudo, obteniendo resultados similares a los reportados en artritis reumatoide en ese año, dividieron su población en 4 grupos dependiendo el número eventos coronarios registrados de 1 a 3, obteniendo porcentajes de CD4+ CD28null 2.3% en un primer evento, 5.1% para un segundo evento y 9.5% cuando existió un tercer evento. Estos datos resultaron alarmantes, debido a la escases de información sobre la presencia de linfocitos carentes del coestimulador CD28, posteriormente, investigadores comenzaron a obtener resultados similares en pacientes con SICA (Liuzzo, 2007). En años posteriores Dumitriu con colaboradores identificaron de igual manera porcentajes de linfocitos CD4+ CD28null, donde sus controles resultaron bastante bajos ~0.04 % resultando los más bajos en la revisión y en contra parte en los pacientes con SICA identificaron ~14 % lo cual resulta bastante alto, similar a lo reportado por Liuzzo en tu tercer categoría (Dumitriu, 2012). Por otro lado, Tuttolomondo y colaboradores investigaron los niveles en pacientes con derrame isquémico donde identificaron un porcentaje de 2.8 ± 0.9 % de CD28null en sus controles y una elevación en pacientes de 5.7 ± 2.4 % similar a lo reportado con Liuzzo (Tuttolomondo, 2015). Sayed reporto en el mismo año niveles cercanos en pacientes con Infarto Agudo al Miocardio, para los donadores sanos encontró 0.8 ± 0.7 % mientras que para el caso de IAMCST obtuvieron 4.6 ± 3.1 % resultado menor al comparar con IAMSST ya que para este caso se reporta 7.3 ± 4.1 % de células carentes del coestimulador CD28; los resultados indican una mayor cantidad al no existir una elevación del segmento ST (Sayed, 2015). Se ha registrado una presencia mínima de células CD4+ CD28null en jóvenes sanos, entre 15-24 años (OMS, 2018), donde el porcentaje se encuentra entre el 0.1% hasta 2.5% del número total de CD4+ son CD28null, pero, por otro lado, en adultos mayores de 65 años, existe un mayor porcentaje hasta un 50% de los CD4+ presentes son CD28null.

El rango para controles se encuentra entre 0.1 % hasta el 2.8 %, pero como se menciona anteriormente existen situaciones como: elevar en gran medida los niveles de las células, sobre todo cuando los pacientes son mayores de 60 años. Por otro lado, se observan variaciones en diferente escala para cada una de las enfermedades desde 2.3 % hasta un 17.4 %, de igual modo los factores mencionados anteriormente aumentan la presencia de los CD28null.

Esto resulta preocupante, ya que un alto porcentaje de linfocitos CD4+ CD28null, aumenta el riesgo de desarrollar fenómenos vasculíticos, manifestaciones extraarticulares, formación de nódulos subcutáneos y vasculitis reumatoide e inclusive Artritis Reumatoide (Yen, 2001 & Martens, 1997 & Dumitriu, 2009), debido a que los linfocitos CD28null poseen capacidades citotóxicas, pueden atacar tejidos propios del cuerpo, lo que desencadena una respuesta autoinmunitaria, de igual modo los linfocitos CD28null tienen una mayor capacidad de producción de citocinas inflamatorias las cuales mantienen una inflamación crónica, y en caso de existir una sincronía con enfermedades autoinmunes diagnosticadas, pueden aumentar la susceptibilidad a infecciones debido a una limitante de LT (Maly, 2015).

fisiológicos y patológicos. Existen tres isoformas AKT, AKT1, AKT2 y AKT. La activación se genera por la actividad de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) al acercar AKT a sus quinasas activadoras.; algunos PAMPs, receptores de factores de crecimiento y receptores de citoquinas pueden activar PI3K por ende AKT. En linfocitos predomina PI3K α la cual es activada por el TCR, correceptores, receptores de citoquinas lo que termina activando AKT (Zhang, 2013) (Manning, 2017). Por esta vía de señalización se activa la cascada de señalización de CD28 en linfocitos T, en específico PI3K, por lo que una ausencia de AKT es un resultado de interés (Esensten, 2016).

STAT

La familia de proteínas STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), realizan la transducción de señales y regulación de la expresión génica, estas pueden ser activadas por señales extracelulares, citoquinas y factores de crecimiento. Al unirse una citocina con su receptor de superficie celular, se dimeriza el receptor y activa la tirosina cinasa JAK; los residuos de tirosina son fosforilados por JAK y sirven como sitios de acoplamiento para la familia de factores de transcripción citoplasmáticos “STAT”. STAT es fosforilado por JAK, se dimerizan y abandonan el receptor para trasladarse al núcleo donde se activa la transcripción génica. STAT1 se fosforila en Ser727, señalamiento de interferones no pareados, susceptibilidad a infecciones virales. En la “ilustración 5” se muestra la estructura e interacción entre JACK-STAT, así como los dominios estructurales correspondientes (Shuai, 2003).

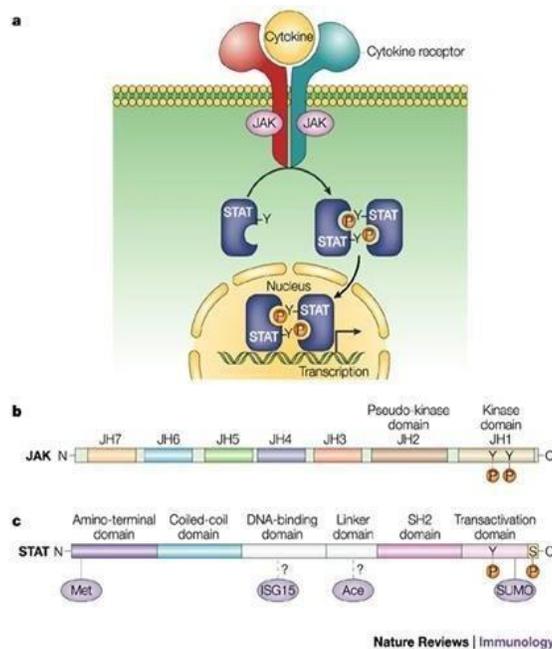


Ilustración 5. Vía JACK-STAT y estructuras.

A) Representa la quinasa Janus (JAK) activador y transductor de señal del factor de transcripción STAT, B) Dominio estructural de las JAK y en la figura C se observa el dominio estructural de las STAT el cual puede ser regulado por una modificación proteica (Shuai, 2003).

ERK

Quinasa extracelular de regulación de señales (ERK), es una proteína quinasa la cual participa en la transcripción de señales intracelulares. ERK es parte de la familia de quinasas MAPK, cuyo mecanismo es una señalización dependiente de una cascada de fosforilación activadora, donde se requieren dos quinasas denominadas MAPK quinasas (MAPKK) y MAPKK quinasas (MAPKKKs). Las señales que genera ERK son señales inducidas por factores de crecimiento e inducidas por mitógenos, que son transducidas por GTPasas RAS y transmiten su actividad al desencadenar la cascada de fosforilación hasta ERK. Al interactuar los TCR con las células presentadoras, se produce la activación de la vía de señalización de MAPK lo que incluye laproteína ERK (Lavoie, 2020).

PPAR

Son receptores activado por proliferadorres de peroxisomas (PPAR), es una familia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción y regulan la expresión génica en respuesta a ácidos grasos. Proteína receptora nuclear dependiente de ligando, presente en linfocitos T y otra células, participa en la regulación de la expresión génica y la función celular. Forman heterodímeros con receptores retinoicos X (RXR) los cuales se unen a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a PPAR (PPRE), se unen al ligando, lo que regula la expresión génica de los genes dianas; regulando proliferación, diferenciación y supervivencia celular; en la “*ilustración 6*” se representa el dominio funcional del grupo de PPAR y la interacción de los diferentes PPAR para la expresión génica (Sanjay, 2021 & Wagner, 2020).

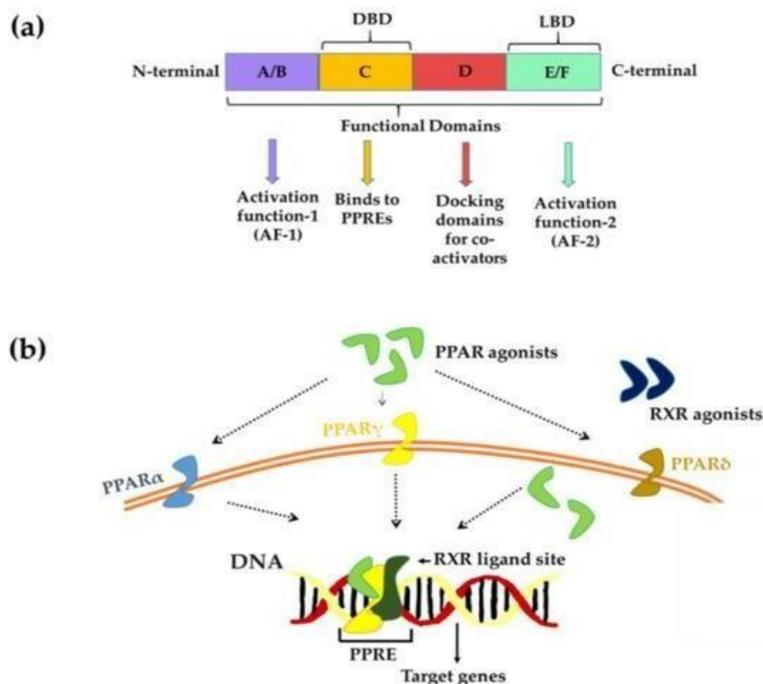


Ilustración 6. Estructura y mecanismo de acción de PPAR.

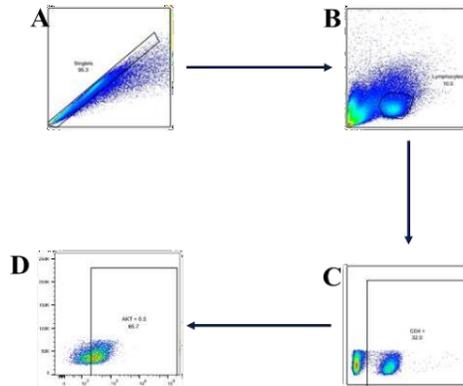
A) Estructura de PPAR el cual esta compuesto por 4 dominios con diferentes funciones y B) Representación esquemática de los ligando específicos para los diferentes receptores PPAR los cuales desembocan en cambios estructurales los cuales se unen a las secuencias específicas de genoma para la activación/represión (Sanjay, 2021).

7. Resultados

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de la adquisición de células en el citómetro de flujo BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter y del análisis realizado con el software FlowJo v10.8.5 (FlowJo, BD, USA, New Jersey) donde se establecen los límites de detección de fluorescencia de manera estricta para cada uno de los anticuerpos correspondientes a las fosfatasa/cinasas como posibles candidatas para la determinación de la vía de señalización de los linfocitos CD4+ CD28null.

Para un fácil entendimiento de los resultados, se ejemplifica mediante la estrategia de Gating en la “ilustración 7”. La estrategia consiste en la identificación de células para confirmar patrones de tinción, de este modo analizar un “gate” visualizado en un diagrama de puntos con diferentes parámetros y así determinar patrones de expresión en los tipos celulares. El primer paso consiste en identificar los singletes, ya que los dobletes y tripletes pueden afectar el análisis de los datos, excluirlos resulta fundamental para un buen análisis, ya que se puede confundir en identificación como clasificación de células, ciclo celular u otro tipo de análisis, esto podría ocasionar falsos positivos. El segundo paso de la estrategia es la distinción de poblaciones con base en la dispersión frontal y lateral, la cual permite una estimación del tamaño, así como granularidad de las células, de las cuales se han identificado previamente el tamaño y complejidad. El tercer paso en este análisis es el uso de un marcador, al hacer esto se utilizan dos parámetros de medición, en este caso el fluorocromo correspondiente a CD4 versus SSC, de este modo identificar con certeza los linfocitos CD4+ y a partir de ellos realizar el análisis correspondiente al proyecto.

El análisis obtenido por el citómetro de flujo está dividido en poblaciones, de las cuales se seleccionan otras poblaciones específicas generando así antecesores, obteniendo así poblaciones selectivas de otras poblaciones $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$ para obtener el resultado principal “D”; en la sección “A” se muestra el aislamiento de los singletes (FSC-H v FSC-A) o las células que atravesaron de manera individual la Nozzle Assy 70 μm (BD, USA) resultando entre el 90 – 99 % del total de células adquiridas. En la parte “B” se muestran los singlets aislados, aquí se enfrentan los ejes SSC-H v FSC-A, a partir de la morfología, tamaño y área conocido de los linfocitos se aísla la población específica. En la sección “C” se muestran todos los linfocitos aislados por las secciones anteriores, a partir de ello, se selecciona el fluorocromo CD4+ para así realizar las determinaciones correspondientes solo a los linfocitos T CD4+, se establecen los límites negativos con la muestra “Sin Teñir” para así con las demás muestras “All Colors” asegurar el aislamiento de CD4+. Y finalmente en la parte “D”, se muestra el aislamiento de solo los linfocitos T CD4+, donde se delimitan de manera estricta los límites de fluorescencia de los anticuerpos monoclonales, con base en el tubo “Sin Teñir” se determina el límite negativo y a partir de los tubos “All Colors” se determina el porcentaje de fluorescencia para cada una de las condiciones establecidas (El valor máximo para los límites negativos se estableció menor al 0.1%). Se grabaron 20,000 eventos por para cada una de las muestras adquiridas, las cuales se consideran el 100% de los eventos o células. Para los volúmenes o diluciones de los anticuerpos colocados, se estableció como volumen final 50 μL y ahí se coloraron los microlitros con base en el modelo, con un rango desde 0.2 μL hasta 2 μL ; resultando las equivalencias de volumen / dilución como se muestra en la “tabla 2”.



*Ilustración 7. Estrategia de Gating.
En la figura se muestran las diferentes poblaciones y orden.
A) Singlets, B) Linfocitos, C) CD4+ y D) Población de interés (Flowjo, 2023).*

Tabla 2. Equivalencia de microlitros con dilución (VF = 50 uL)

Microlitros	Dilución
0.2 uL	1:250
0.5 uL	1:100
1 uL	1:50
1.5 uL	1:33
2 uL	1:25

- AKT

Para la determinación de AKT, se realizaron 3 diferentes análisis con diferentes condiciones: una primera comparación de la presencia de AKT v AKTp en linfocitos CD4+ CD28null, la determinación de diferentes diluciones de AKT con base en lo establecido por el proveedor 1:50 / 1:100 / 1:250 y una ultima determinación con diluciones cercanas con base en el número de microlitros utilizados 0.5 uL / 1 uL / 1.5 uL.

D) Comparación de la presencia de AKT v AKTp en linfocitos CD4+ CD28null

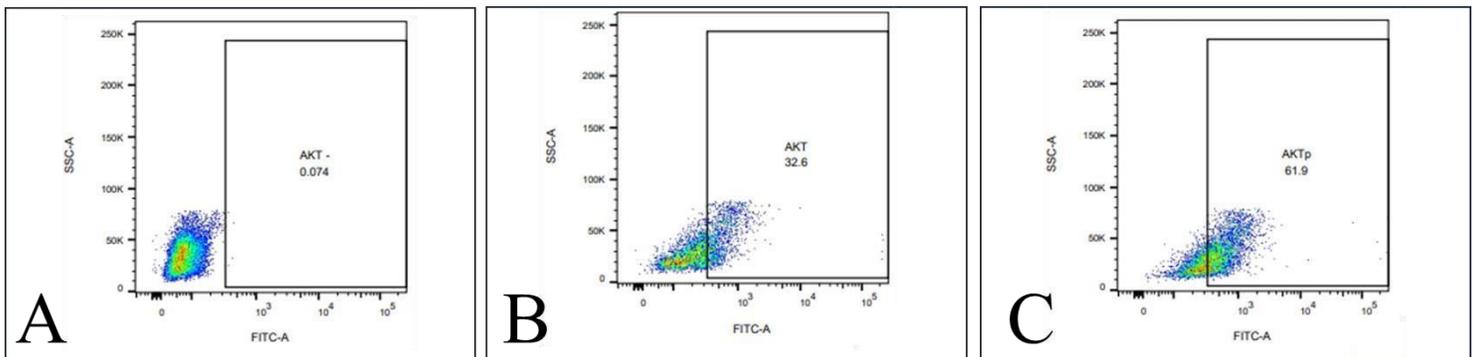


Ilustración 8. Adquisición de la comparación de presencia de AKT y AKTp en CD4+ CD28null.

A) Resultado obtenido para el tubo sin marca (control), B) Resultado de presencia de AKT en linfocitos CD28null y C) Resultado de activación de AKTp en CD28null.

De la muestra sanguínea de una persona sana de 53 años, se identificaron en promedio 74% de linfocitos de los eventos adquiridos, resultando de estos cerca de 50.55% linfocitos T CD4+ (APC Mouse). A partir de ello, se obtuvieron 3.99% de linfocitos CD28null (BV-711) con los cuales se trabajaron las condiciones de 1 uL de los anticuerpos AKT (Rabbit) y AKTp (Rabbit) utilizando como anticuerpo secundario AF-488 (Rabbit) para su detección. El análisis correspondiente permitió comparar y así determinar que existe una mayor actividad de AKTp un 66.8% de presencia de los linfocitos totales contra una menor activación de 32.7% de AKT en un momento aleatorio en el ciclo de vida de los linfocitos CD4+ CD28null y ambos forman parte secuencial en la misma vía de señalización, existe una alta presencia de esta fosforilación al interaccionar CD28 con B7-1/B7- 2, pero existen diferentes formas de activación para AKT.

II) Determinación de diluciones de AKT con base en proveedor

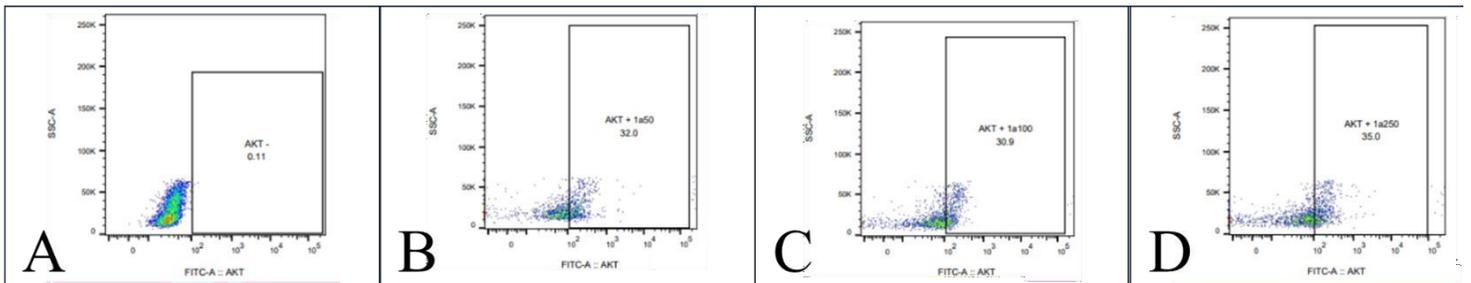


Ilustración 9. Adquisición de la primera estandarización del anticuerpo anti-AKT Rabbit(ab-8805) en linfocitos CD4+.

A) Resultado obtenido para el tubo sin marca (control), B) Resultado obtenido para la dilución 1 a 50, C) Resultado para la dilución 1 a 100 y D) Resultado para la dilución 1 a 250.

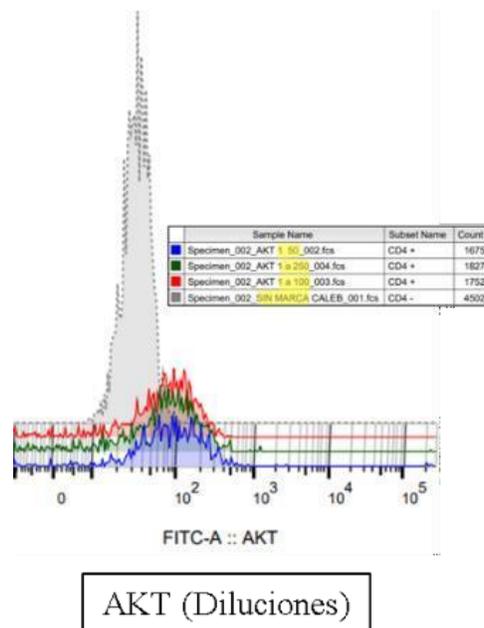


Ilustración 10. Histograma de fluorescencia de diluciones AKT

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes diluciones de AKT, de color gris de muestra el correspondiente al control, de color azul se muestra el correspondiente a la dilución 1:50, de color rojo 1:100 y de color verde 1:250.

Muestra sanguínea de una persona sana de 38 años, se identificaron en promedio 62.25% de linfocitos de los eventos adquiridos, resultando de estos 42.2% linfocitos T CD4+ (APC). A partir de ello, se trabajaron las condiciones recomendadas por el proveedor de los anticuerpos, resultando esta sugerencia diluciones del anticuerpo primario de 1:50, 1:100 y 1:250. Por lo mencionado, se colocaron 0.2 uL, 0.5 uL y 1 uL del anticuerpo AKT (FITC-A) en 50 uL de líquido para obtener dichas diluciones. Se obtuvieron los siguientes resultados para el porcentaje de fluorescencia: 1:50 → 32% de activación, 1:100 → 30.9% y 1:250 → 35% los datos resultaron muy cercanos entre ellos, por lo que requiere diferentes análisis para determinar la dilución ideal, pero se puede estimar mediante el porcentaje la condición 1:250 (0.2 uL) como ideal. El histograma de fluorescencia representa la intensidad de expresión de receptores contra el número de células capturadas, el espectro que tenga un mayor desplazamiento hacia el rango de detección (10^3) será la condición adecuada, esto indica una mayor cantidad de células con fluorescencia; para el presente caso se observa un ligero pero mayor desplazamiento para la condición 1:50 (1 uL) lo cual la identifica como mejor condición. Al comparar con la IMF se observan ambos valores en el mismo punto para la condición de 1:100 (0.5 uL) lo que indica que existe una alta presencia de células con AKT y que expresan estas células una cantidad similar de receptores asociados; indica que la mejor dilución es 1 a 100.

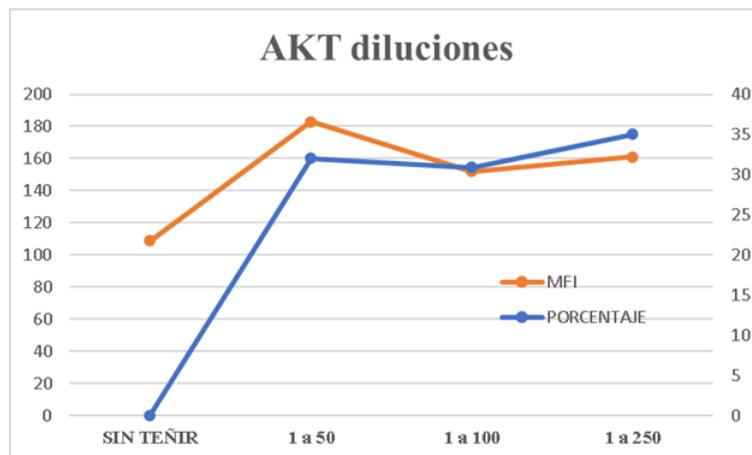


Ilustración 11. Gráfico de fluorescencia con base en diluciones de AKT (Primer análisis).

Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes diluciones y se compara con el resultado obtenido por la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja.

Tabla 3. Índice de tinción para "AKT diluciones".

Dilución	Índice de tinción
1 a 50	2.2424
1 a 100	1.3030
1 a 250	1.5758

Al momento de hacer la adquisición de las células se observaron porcentajes cercanos, por lo cual, se identificó realizar un segundo análisis con condiciones similares y así determinar de manera correcta la condición ideal.

Se comienza con el análisis de AKT, donde se realizó un experimento con diferentes diluciones indicadas en el inserto obtenido de la página del proveedor, se utilizaron las diluciones 1 a 50, 1 a 100 y 1 a 250; se realizaron diferentes análisis con diferentes resultados.

Para el porcentaje de fluorescencia se obtuvo como mejor dilución 1 a 250 (0.2 uL) obteniendo el 35% de activación, para el caso del histograma de fluorescencia se determino como mejor condición 1 a 50 (1 uL), en el análisis de comparativa de porcentaje de fluorescencia con la IMF se identifica como mejor condición 1 a 100 (0.5 uL) por esta situación se realiza un análisis diferente.

El valor más alto de índice de tinción indica que la intensidad de fluorescencia, así como la unión del anticuerpo al antígeno objetivo, se incrementa en comparación con los valores menores; al tener un índice menor indica una concentración insuficiente para detectar fluorescencia. Se obtuvieron los resultados mostrados en la “*tabla 3*”, sorpresivamente para el presente análisis la dilución 1:50 resulta mejor a diferencia de las demás, por lo que se concluye en este caso como dilución ideal **1 a 50 (1 uL)**.

III) Determinación de diluciones con base en microlitros utilizados (0.5 uL / 1 uL / 1.5 uL)

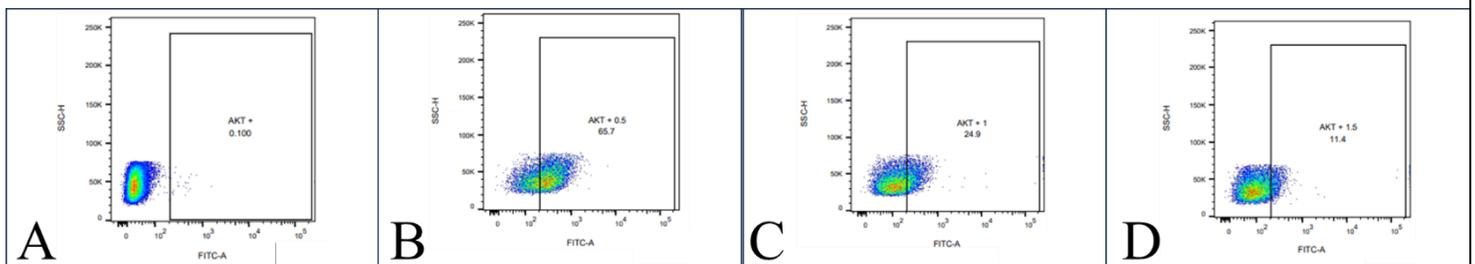


Ilustración 12. Adquisición de la segunda estandarización del anticuerpo anti-AKT Rabbit(ab-8805) en linfocitos CD4+ a partir de análisis previo.

A) Resultado obtenido para el tubo sin marca (control), B) Resultado obtenido al agregar 0.5 uL en un volumen de 50 uL, C) se observa el resultado al agregar 1 uL con un volumen final de 50 uL y D) Resultado al agregar 1.5 uL en 50 uL.

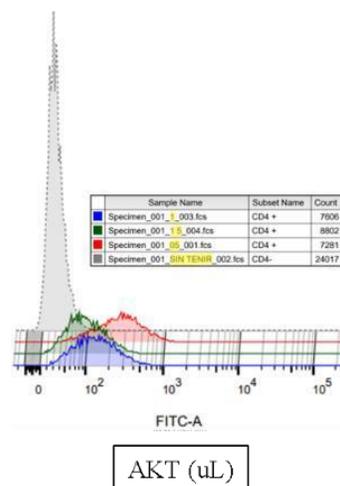


Ilustración 13. Histograma de fluorescencia del experimento microlitros de AKT

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de AKT, de color gris de muestra el correspondiente al control, de color rojo se muestra el correspondiente a la adición de 0.5 uL, de color azul 1 uL y de color verde 1.5 uL. En este caso el valor más cercano a 103 resulta ser 0.5 uL de color rojo, lo cuál indica como mejor condición.

Muestra sanguínea de una persona sana de 29 años, se identificaron en promedio 9.41% de linfocitos, en este caso el número de linfocitos resulta más bajo lo cual puede ser consecuencia de una mala recuperación de anillo de PBMC, pero aún con una baja cantidad se puede realizar el análisis, a partir de estos el 36.4% fueron linfocitos T CD4+ (APC). Con base en el análisis previo y gracias a una revisión bibliográfica se determinaron las cantidades/diluciones a utilizar con los anticuerpos. Resultando estos, intervalos entre 0.5 uL hasta 2 uL, para este experimento de AKT se coloraron 0.5 uL, 1 uL y 1.5 uL en 50 uL como volumen final, lo cual arrojó los siguientes valores 65.7%, 24.9% y 11.4% respectivamente; donde este primer análisis de intensidad de fluorescencia se identifica un mejor rendimiento al agregar 0.5 uL. Respectivamente el análisis de la IMF indica congruencia con la mejor condición 0.5 uL.

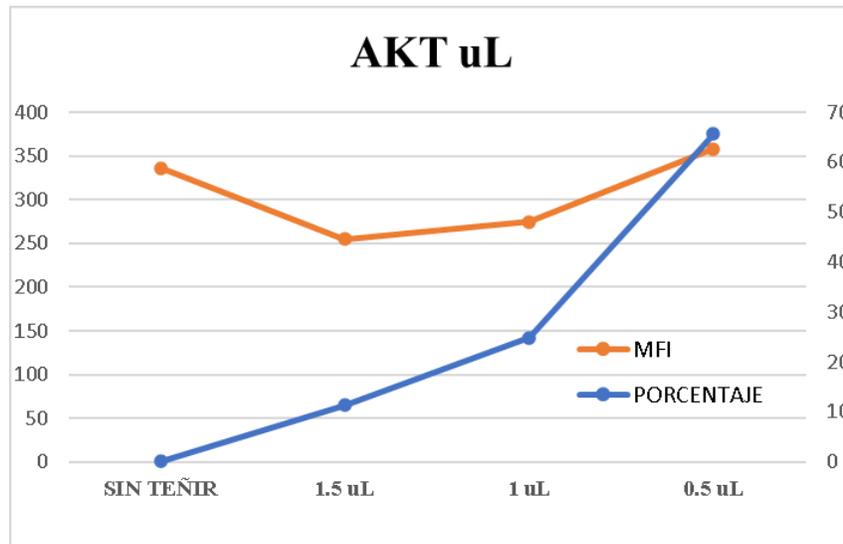


Ilustración 14. Gráfico de fluorescencia con base en microlitros de AKT (Segundo análisis). Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones de microlitros agregados y se compara con el resultado obtenido por la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja.

Tabla 4. Índice de tinción para "AKT uL"

Dilución	Índice de tinción
1.5 uL	-0.2700
1 uL	-0.2033
0.5 uL	0.0733

A pesar de existir la deficiencia de células en la recolecta, el hecho de tener los eventos grabados (20,000 evt/s) indica la presencia de las células necesarias para realizar el análisis, por lo que, al tener una incongruencia en los métodos analíticos del primer experimento, pero en el segundo experimento al trabajar esta muestra y concordar cada uno de los análisis, se puede determinar que de estas condiciones la ideal para AKT es **0.5 uL (1:100)**.

En el segundo experimento, se aproximaron los valores a la condición con mejor rendimiento en el análisis previo utilizando así 0.5 uL, 1 uL y 1.5 uL; obteniendo en cuanto a porcentaje de fluorescencia como mejor condición 0.5 uL (1:100) correspondiente obteniendo 65 % de activación, valor mucho mayor que en el de otras condiciones, este resultado concuerda con el histograma respectivo el cual demuestra un gran desplazamiento del espectro hacia el rango de detección obteniendo de igual modo como idónea la condición 0.5 uL (1:100), finalmente con el análisis comparativo de porcentaje contra IMF se identifica fácilmente una sobreposición de ambos valores opuntos en la condición 0.5 (1:100).

De igual modo, se realizo el calculo del índice de tinción donde se identifico como mejor dilución **0.5 uL (1:100)** “Tabla 4”; se observa una congruencia en los 4 análisis realizados, por lo que podemos determinar que la mejor condición es 1:100 a pesar de existir una deficiente extracción del anillo de PBMC, se adquirieron de igual modo con 200,000 PBMC por lo que no se ve afectada la adquisición final, solamente se limita el número de experimentos a realizar con la muestra.

- AKTp

I) Determinación de diluciones ideal con base en microlitros utilizados (1 uL / 1.5 uL / 2 uL)

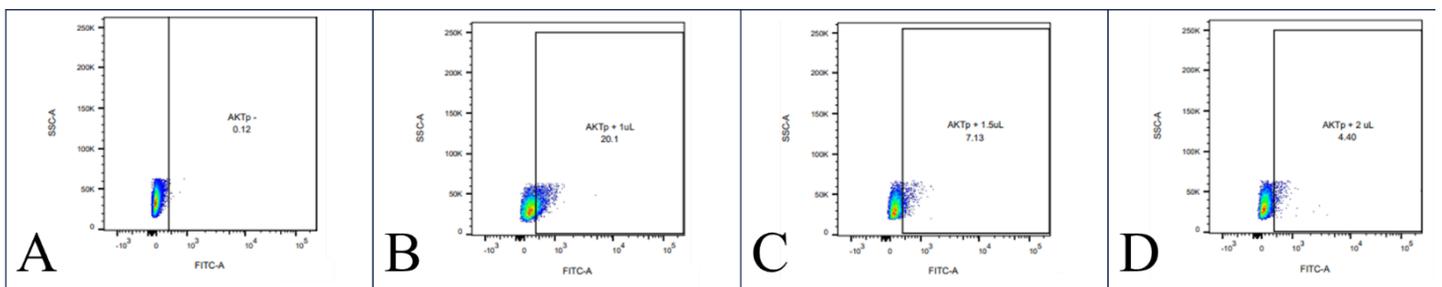


Ilustración 15. Adquisición de la estandarización del anticuerpo anti-AKTp Rabbit(ab-81283) en linfocitos CD4+.

A) Resultado obtenido para el control, B) Resultado obtenido al agregar 1 uL en un volumen final de 50 uL, C) Resultado al agregar 1.5 uL en un volumen final de 50 uL y D) Resultado al agregar 2 uL en 50 uL.

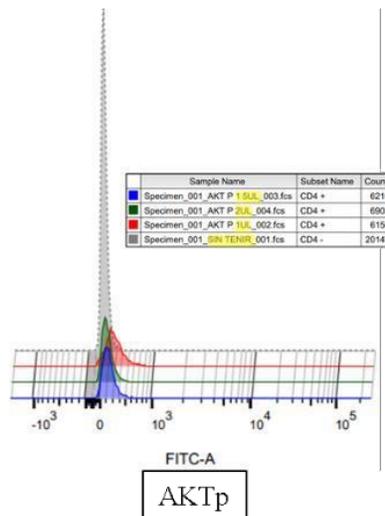


Ilustración 16. Histograma de fluorescencia del experimento de AKTp

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de AKTp, de color gris de muestra el correspondiente al control, de color rojo se muestra el correspondiente a la adición de 1 uL, de color azul 1.5 uL y de color verde 2 uL. En este caso el espectro más desplazado a 10^3 resulta ser 1 uL de color rojo, la mejor condición.

Muestra sanguínea de una persona sana de 22 años, se identificaron en promedio 54.32% de linfocitos de los cuales el 34.63% fueron linfocitos T CD4+ (APC-CY7). Se manejaron las condiciones 1 uL, 1.5 uL y 2 uL para este modelo experimental, fundamentado a partir de los análisis previos y artículos relacionados. Se obtuvieron los siguientes resultados 20.1% con 1 uL, 7.13% para 1.5 uL y 4.40% para 2 uL. Resaltando el valor mas alto de 20.1% para la adición de 1uL de AKTp tanto para el porcentaje como para la IMF, ya que ambos valores están prácticamente sobrepuestos en la ilustración 14 indicando una condición ideal.

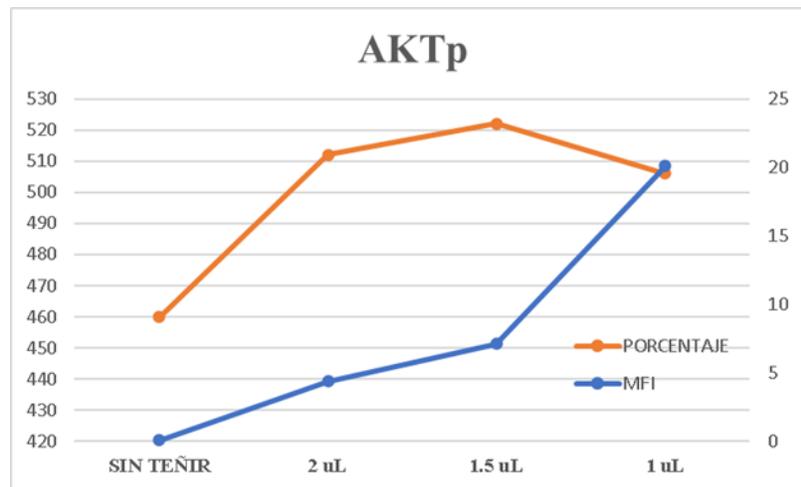


Ilustración 17. Gráfico de fluorescencia con base en diferentes diluciones del anticuerpo AKTp. Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones de la estandarización de AKTp y se compara con el resultado obtenido por la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja.

A partir de este punto, en los experimentos posteriores se utilizó otro rango de diluciones con base en los registros previos de estandarización de anticuerpos de investigadores presentes en el Instituto Nacional de Cardiología los cuales trabajan con PBMC, siendo las condiciones 1 uL, 1.5 uL y 2 uL; también desde este punto se comenzó a utilizar la misma muestra sanguínea de un adulto joven de 22 años hasta el final del proyecto para reducir las variaciones.

Para el análisis de AKTp se utiliza las diluciones establecidas 1uL/1.5uL/2uL, para el porcentaje de fluorescencia se observa un comportamiento de descenso conforme más anticuerpo es agregado resultando optima 1 uL (1:50) observando un 20.1 % de activación, de igual modo el espectro con mayor desplazamiento hacia 10^3 con gran diferencia resulta 1 uL (1:50), el comportamiento al comparar el porcentaje con la IMF resulta similar al estar prácticamente sobrepuestos los valores en 1 uL (1:50) esto indica que existe una cantidad adecuada tanto de anticuerpos acoplados como de receptores presentes. En este caso concuerdan los 3 análisis realizados, identificando como mejor dilución **1 uL (1:50)** por lo cual se puede utilizar para la investigación presente.

- STAT1
- I) Determinación de diluciones ideal con base en microlitros utilizados (1 uL / 1.5 uL / 2 uL)

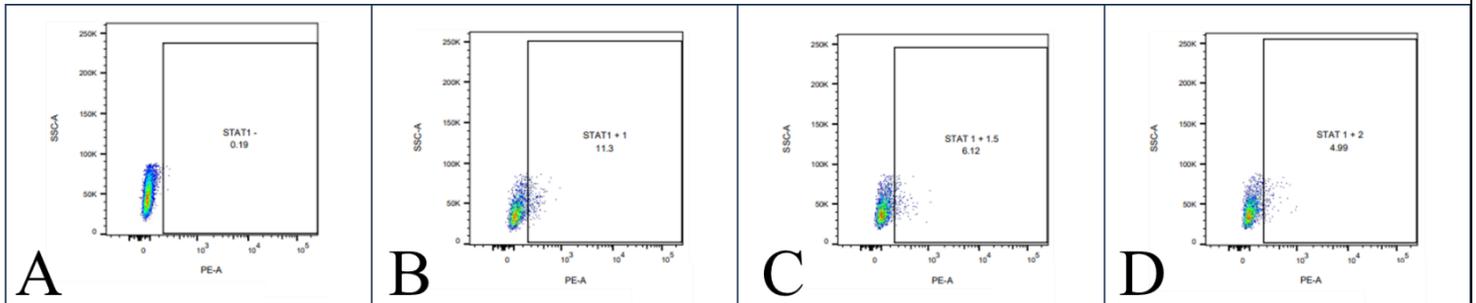


Ilustración 18. Adquisición de la estandarización del anticuerpo anti-STAT1 Mouse (SC-464) en linfocitos CD4+.
 A) Resultado obtenido en el control sin marcaje de anticuerpo, B) Resultado obtenido al agregar 1 uL del anticuerpo dirigido a STAT1 en un volumen final de 50 uL, C) Resultado al agregar 1.5 uL en un volumen final de 50 uL y D) Resultado al agregar 2 uL.

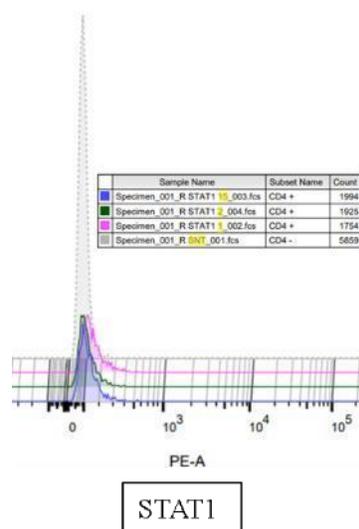


Ilustración 19. Histograma de fluorescencia del experimento de STAT1

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de STAT1, de color gris de muestra el correspondiente al control, de color rosa se muestra el correspondiente a la adición de 1 uL, de color azul 1.5 uL y de color verde 2 uL. En este caso el

En el caso del experimento para STAT1 se utiliza la misma muestra sanguínea que STAT1p la cual corresponde a un joven sano de 22 años, se detectaron en promedio 35% de linfocitos a partir de los cuales el 28.23% fueron linfocitos T CD4+ (APC-CY7). Las condiciones establecidas fueron dentro del rango establecido siendo estas 1 uL, 1.5 uL y 2 uL de las cuales arrojaron los siguientes porcentajes de manera secuencial 11.3%, 6.12% y finalmente el valor más bajo 4.99%. De donde se identifican valores más cercanos, pero con una diferencia significativa al comparar las demás diluciones con 1 uL, con un valor de 11.3%; por otro lado, el análisis comparativo entre ambos métodos concuerda con el resultado obtenido teniendo valores cercanos en la misma condición.

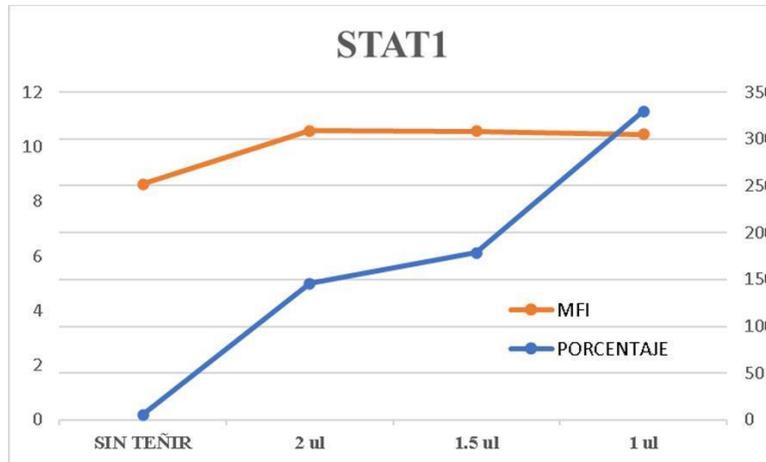


Ilustración 20. Gráfico de fluorescencia a partir de las condiciones establecidas de volumen de anticuerpo STAT1. Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones y se compara con la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja, ambos resultados correspondientes al análisis de STAT1.

En el experimento para STAT1 se identifica el mayor porcentaje de fluorescencia reportado en la dilución 1:50 (1 uL), en el caso del espectro del histograma se observa un ligero desplazamiento para la condición 1 uL (1:50) mientras que los demás espectros se encuentran en el rango del control cerca de 0 y por ultimo al realizar la comparación en la gráfica correspondiente, se identifica que las condiciones de 2 uL así como 4 uL se encuentran muy lejos lo que indica que existen pocas células pero con alta presencia de receptores en comparación con ellas la condición **1 uL (1:50)** resulta el mejor comportamiento con cercanía lo que indica una alta presencia de células como de receptores.

- STAT1p
 - I) Determinación de diluciones ideal con base en microlitros utilizados (1 uL / 1.5 uL / 2 uL)

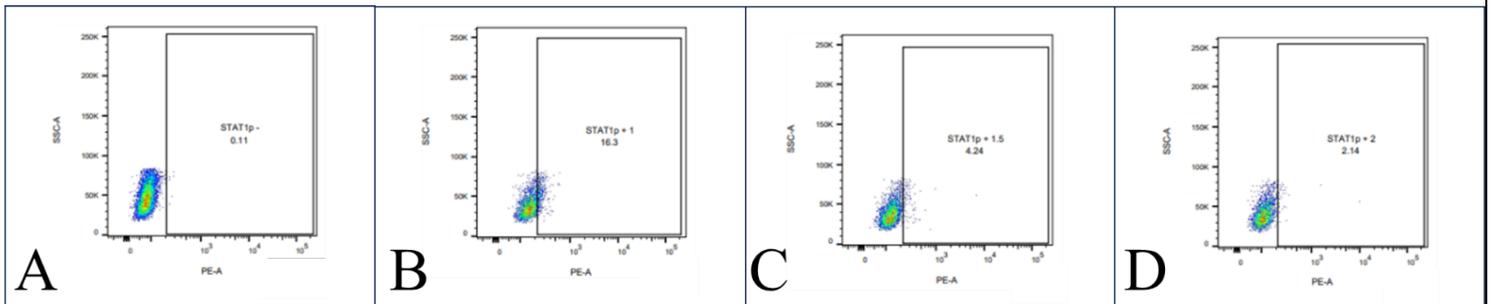


Ilustración 21. Adquisición de la estandarización del anticuerpo anti-STAT1p Mouse (SC-8394) en linfocitos CD4+. A) Resultado obtenido para el control, B) Resultado obtenido al agregar 1 uL del anticuerpo dirigido a STAT1p en un volumen final de 50 uL, C) Resultado al agregar 1.5 uL en un volumen final de 50 uL y D) Resultado al agregar 2 uL en 50 uL.

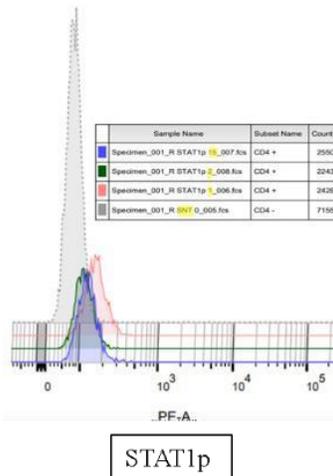


Ilustración 22. Histograma de fluorescencia del experimento de AKTp. Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de AKTp, de color gris de muestra el correspondiente al control, de color rojo se muestra el correspondiente a la adición de 1 uL, de color azul 1.5 uL y de color verde 2 uL. En este caso el espectro más desplazado a 10^3 resulta ser 1 uL de color rojo, la mejor condición.

Para el experimento correspondiente a STAT1p, la muestra sanguínea corresponde a un joven sano de 22 años, se aislaron en promedio 41.12% de linfocitos de los cuales el 30.9% fueron linfocitos T CD4+ (APC-CY7). Para este caso, se sometieron las condiciones de 1 uL, 1.5 uL y 2 uL, fundamentado a partir de los análisis previos y artículos relacionados. Se obtuvo lo siguiente: 16.3% en el caso de 1 uL, 4.24% para 1.5 uL y 2.14% finalmente para 2 uL. Con el valor más alto al añadir 1 uL del anticuerpo correspondiente, teniendo diferencias entre las demás diluciones de más del cuádruple, por lo que es un posible candidato al comparar el porcentaje de fluorescencia, por otro lado, al analizar ambos valores se identifica como mejor condición es 1 uL al sobreponer ambos comportamientos se observa la cercanía correspondiente a una unión y presencia equitativa de receptores.



Ilustración 23. Gráfico de fluorescencia a partir de las condiciones establecidas de volumen de anticuerpo STAT1p. Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones de la estandarización y se compara con el resultado obtenido por la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja, ambos resultados obtenidos de la adición del anticuerpo STAT1p.

STAT1p resulta con un comportamiento similar, el porcentaje de fluorescencia es mayor que el cuádruple de presencia para la condición 1 uL (1:50) en comparación con los demás valores, en este caso el histograma resulta sencillo de determinar ya que el desplazamiento del espectro es notorio y correspondiente a 1 uL (1:50) y el ultimo análisis comparativo entre MFI – porcentaje indica una cercanía en dos condiciones (2 uL y 1 uL), en contraste la condición 1.5 uL tiene una lejanía al realizar la comparativa pero se determina como mejor dilución **1 uL (1:50)**, ya que existe el respaldo de los análisis previos.

- ERK

I) Determinación de diluciones ideal con base en microlitros utilizados (1 uL / 1.5 uL / 2 uL)

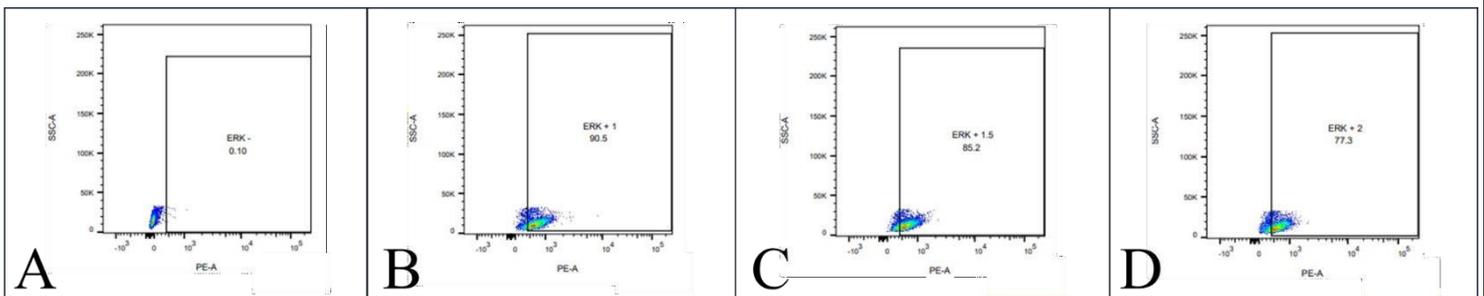


Ilustración 24. Adquisición para la estandarización del anticuerpo anti-ERK Mouse (SC-514302) en linfocitos CD4+.

A) Resultado obtenido en el control sin marcaje de anticuerpo, B) Resultado obtenido al agregar 1 uL del anticuerpo ERK en 50 uL, C) Resultado al agregar 1.5 uL en 50 uL y D) Resultado al agregar 2 uL de volumen del anticuerpo.

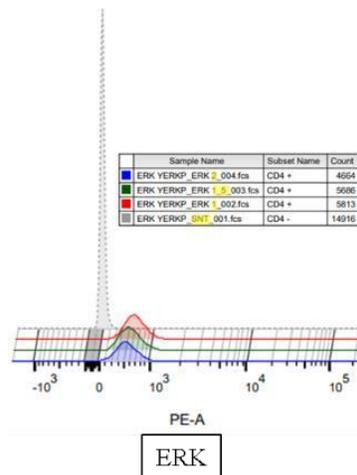


Ilustración 25. Histograma de fluorescencia del experimento de AKTp

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de AKTp, de color gris de muestra el correspondiente al control, de color rojo se muestra el correspondiente a la adición de 1 uL, de color azul 1.5 uL y de color verde 2 uL. En este caso el espectro más desplazado a 10^3 resulta ser 1 uL de color rojo, la mejor condición.

Para ERK la muestra corresponde a un joven sano de 22 años, donde se encontró una presencia en promedio 76.47% de linfocitos el cual es un alto porcentaje lo que representa un buen desempeño durante la recuperación del anillo de PMBC, de estos el 38.16% fueron linfocitos T CD4+ (APC-CY7) a partir de las cuales se realizaron las determinaciones. Las condiciones fueron las establecidas dentro del rango 1 uL, 1.5 uL y 2 uL de los cuales los resultados fueron los siguientes 90.5% para 1 uL, 85.2% y finalmente el valor más bajo 77.3%. En este particular caso, las tres condiciones establecidas tienen valores altos al igual que cercanía entre el porcentaje de fluorescencia y la intensidad media de fluorescencia, por lo que el análisis de comparación resulta importante para determinar la dilución ideal, pero con solo este análisis se podría identificar 1 uL la condición ideal. Al sobreponer ambos métodos de análisis se observa mucha similitud entre las condiciones, aunque en la condición de 2 uL se nota una ligera separación entre los puntos, por otro lado 1.5 uL y 1 uL se encuentran bastante similares, pero al tener un mayor porcentaje como IMF esto indica un mejor comportamiento en estos rangos aceptando 1 uL como mejor condición.

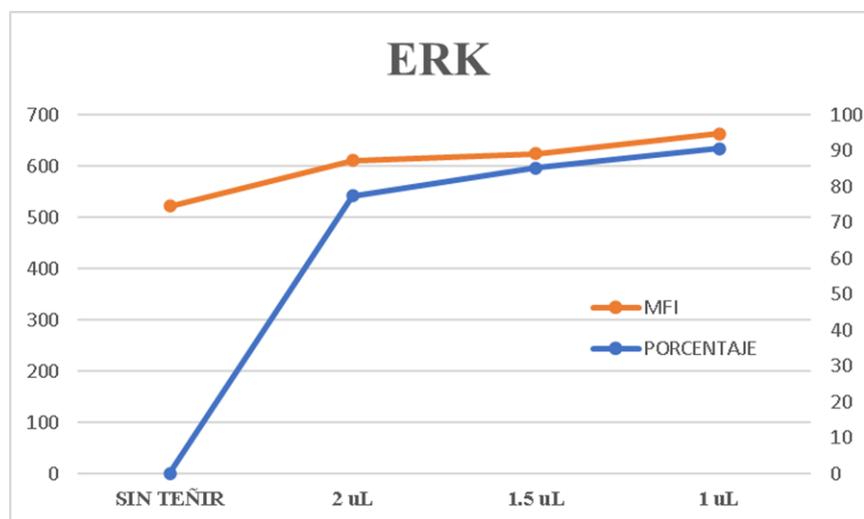


Ilustración 26. Gráfico de fluorescencia a partir de las condiciones establecidas de volumen de anticuerpo ERK. Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones y se compara con la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja, ambos resultados análisis correspondiente a ERK.

Los resultados obtenidos para el porcentaje de fluorescencia del ensayo ERK fueron bastante elevados arriba del 70% todos los resultados, pero para la condición 1:50 (1uL) se observa una activación de 90.5%, lo que indica como mejor condición; por otro lado el espectro correspondiente al histograma muestra un ligero desplazamiento hacia la derecha para la condición 1:50 (1uL) lo que permite determinar la condición ideal y por último el análisis comparativo resulta difícil de interpretar ya que todos los valores se encuentran bastante cercanos, para 2 uL se nota una ligera separación entre los puntos pero para 1.5 uL y 1 uL la cercanía de los puntos es bastante cercana pero el hecho de tener la condición 1 uL valores más altos que su contraparte permite concluir como mejor condición **1:50 (1uL)**

- ERKp
- I) Determinación de diluciones ideal con base en microlitros utilizados (1 uL / 1.5 uL / 2 uL)

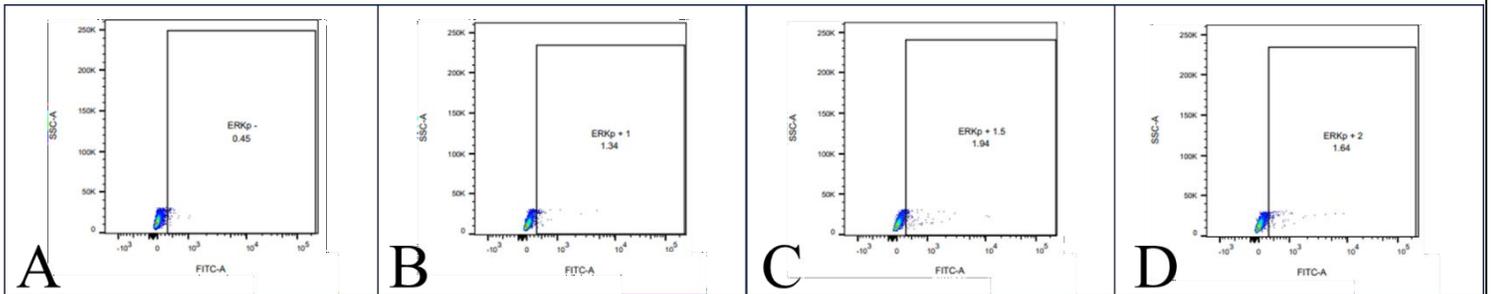


Ilustración 27. Adquisición para la estandarización del anticuerpo anti-ERKp Mouse (SC-81492) en linfocitos CD4+.

A) Resultado obtenido del control tubo sin teñir, B) Resultado obtenido al agregar 1 uL del anticuerpo en 50 uL, C) Resultado al agregar 1.5 uL en 50 uL y D) Resultado al agregar 2 uL de volumen del anticuerpo.

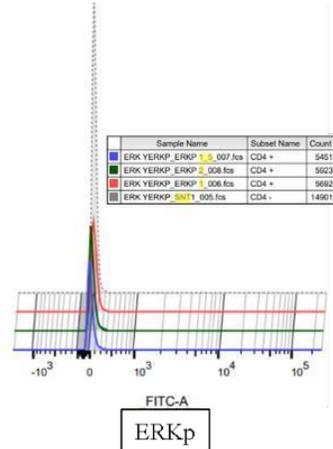


Ilustración 28. Histograma de fluorescencia del experimento de ERKp

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de ERKp, de color gris se muestra el correspondiente al control, de color rojo se muestra el correspondiente a la adición de 1 uL, de color azul 1.5 uL y de color verde 2 uL. En este caso el espectro más desplazado a 10^3 resulta ser 1 uL de color rojo, la mejor condición.

El caso de ERKp, la muestra sanguínea corresponde a la misma persona del ensayo ERK con 22 años, se contabilizaron en promedio 74.5% de linfocitos, a partir de los linfocitos, cerca del 40.96% emitieron la fluorescencia e intensidad correspondiente para linfocitos T CD4+ (APC-CY7) la cual resulta la población de interés para la determinación de ERK fosforilado. Se colocaron 1 uL, 1.5 uL y 2 uL del anticuerpo ERKp (Santa Cruz) en los diferentes tubos eppendorf correspondientes; en este caso en particular, el comportamiento de las diluciones resulta diferente en comparación con los demás análisis, se observa un porcentaje de fluorescencia de 1.34% para 1 uL, 1.94% de intensidad de fluorescencia para 1.5 uL añadidos y finalmente 1.64% para los 2 uL de ERKp. Este es el primer caso en el cual se identifica una dilución diferente a 1 uL, siendo 1.5 uL la condición ideal, al comparar con la IMF se identifica de igual modo la condición como ideal.

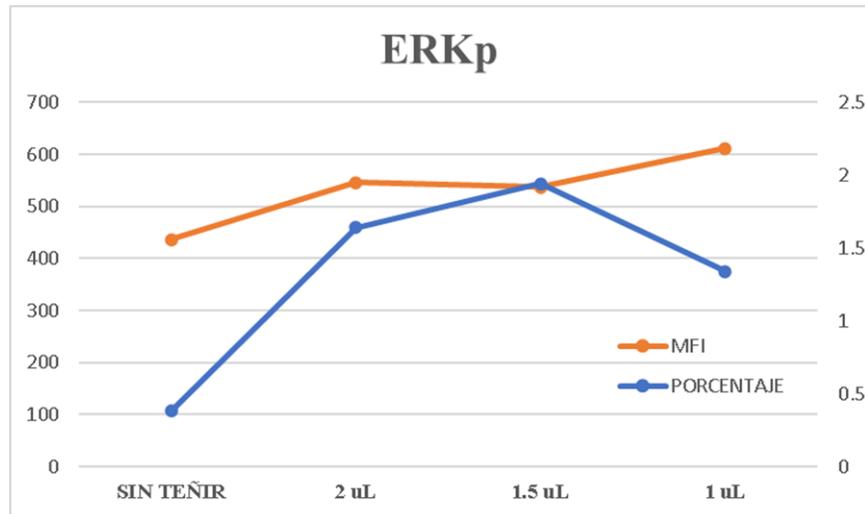


Ilustración 29. Gráfico de fluorescencia a partir de las condiciones establecidas de volumen de anticuerpo ERKp. Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones y se compara con la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja.

Para el caso de ERKp se observan valores bajos los cuales nos sobrepasan el 2 % donde se encuentra la mejor dilución 1:3 (1.5 uL) al analizar el porcentaje de fluorescencia en las diferentes condiciones, en el caso del histograma se encuentran todos los espectros bastante cercanos entre ellos pero se observa uno mayor para el caso de 1 uL así como para 1.5 uL por lo que en este caso ambos podrían resultar como condición ideal y no se determina una condición ideal pero con los otros métodos se logra determinar. Para el caso de la comparativa entre el porcentaje y la IMF se identifica de manera sencilla la identificación de la mejor condición al tener una sobreposición de los puntos, al momento de observar los otros comportamientos se identifica una lejanía de los puntos así que con certeza se determina que la mejor condición para el uso del anticuerpo ERKp es **1:3 (1.5 uL)**.

- PPAR α

I) Determinación de diluciones ideal con base en microlitros utilizados (1 uL / 1.5 uL / 2 uL)

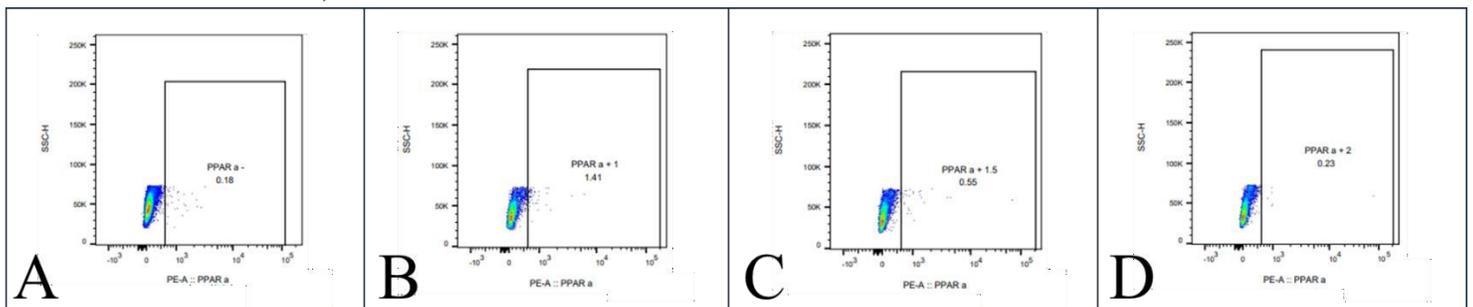


Ilustración 30. Adquisición para la estandarización del anticuerpo anti-PPAR α (SC-9000) en linfocitos CD4+.

A) Resultado obtenido del control tubo sin tinción, B) Resultado obtenido al agregar 1 uL del anticuerpo, C) Resultado al agregar 1.5 uL y D) Resultado al agregar 2 uL de volumen del anticuerpo.

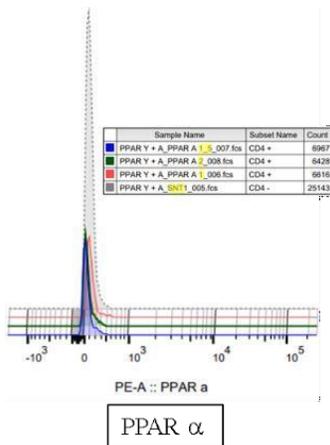


Ilustración 31. Histograma de fluorescencia del experimento de PPAR γ

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de PPAR γ , de color gris de muestra el correspondiente al control, de color rojo se muestra el correspondiente a la adición de 1 uL, de color azul 1.5 uL y de color verde 2 uL. En este caso el espectro más desplazado a 10^3 resulta ser 1 uL de color rojo, la mejor condición.

El ultimo análisis corresponde a PPAR α , cuya muestra sanguíneas son de un joven sano de 22 años, de esta muestra se obtuvieron en promedio 48.25% total de linfocitos, a partir de ellos 27.73% fueron linfocitos CD4+ (APC-CY7). Los resultados adquiridos por el citómetro fueron de 1.41% para la condición de 1 uL agregado, un valor menor de 0.55% en el caso de 1.5 uL y el más bajo de los valores de 0.23% al agregar 2 uL. Para PPAR la condición ideal resulto al usar 1 uL del anticuerpo y al tener valores muy cercanos la comparación con la IMF permite determinar una condición con certeza.

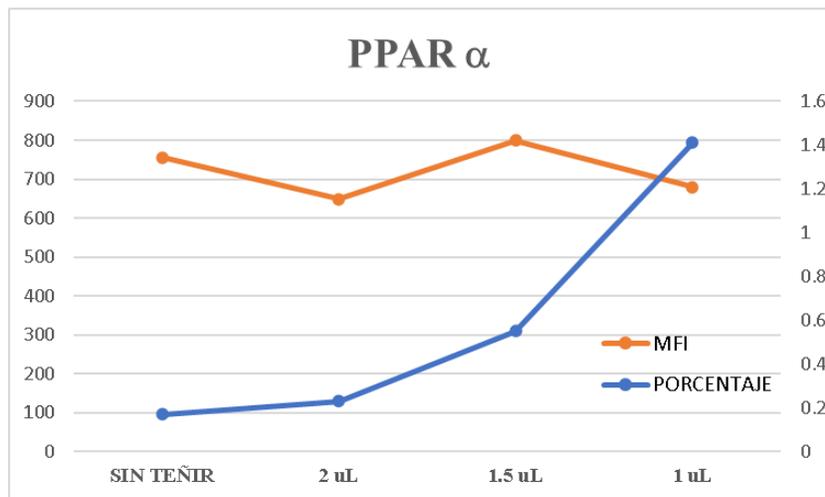


Ilustración 32. Gráfico de fluorescencia a partir de las condiciones establecidas de volumen de anticuerpo PPAR α . Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones y hace una comparación con la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja.

Para PPAR α se obtienen los siguientes porcentajes de fluorescencia para PPAR α 0.23% al adicionar 2 uL, 0.55 % al añadir 1.5 uL y 1.41 % en la condición de 1 uL, por lo que se identifica como dilución ideal 1:50 (1 uL). Al observar los histogramas correspondientes se observa un desplazamiento hacia el lado derecho en la condición 1:50 (1 uL) la que indica como mejor condición y finalmente al comparar los valores obtenidos del porcentaje de fluorescencia con la MFI se idéntica una cercanía entre los dos puntos correspondientes a **1:50 (1 uL)** y existe una concordancia de los tres análisis por lo que se determina como mejor condición.

- PPAR γ

I) Determinación de diluciones ideal con base en microlitros utilizados (1 uL / 1.5 uL / 2 uL)

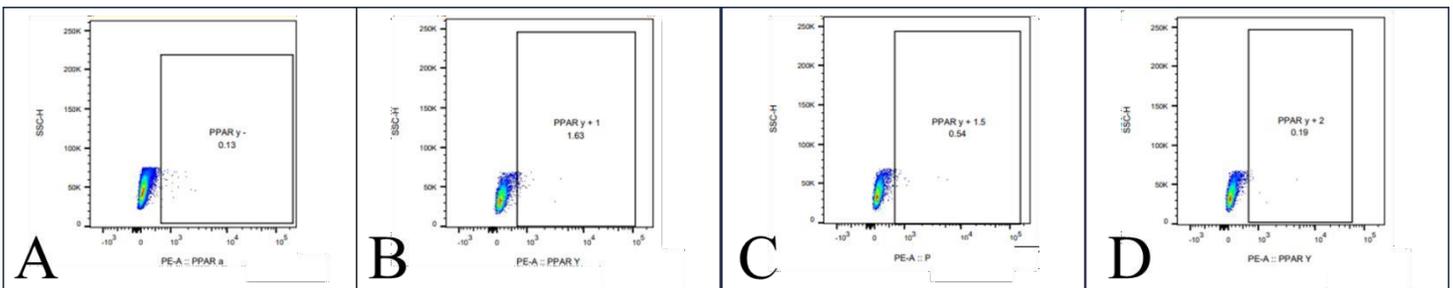


Ilustración 33. Adquisición para la estandarización del anticuerpo anti-PPAR γ (SC-7196) en linfocitos CD4+.

A) Resultado obtenido del control tubo sin tinción, B) Resultado obtenido al agregar 1 uL del anticuerpo, C) Resultado al agregar 1.5 uL y D) Resultado al agregar 2 uL de volumen del anticuerpo.

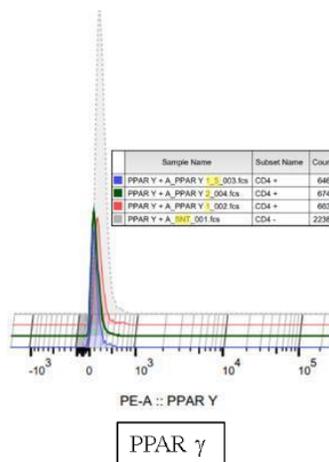


Ilustración 34. Histograma de fluorescencia del experimento de PPAR γ

Se muestran las intensidades de fluorescencia en las diferentes condiciones de PPAR γ , de color gris de muestra el correspondiente al control, de color rojo se muestra el correspondiente a la adición de 1 uL, de color azul 1.5 uL y de color verde 2 uL. En este caso el espectro más desplazado a 10^3 resulta ser 1 uL de color rojo, la mejor condición.

PPAR γ se realizo a partir de una muestra sanguíneas correspondiente a un joven sano de 22 años, de la cual se identificaron en promedio 49.55% de células linfocitarias, se ellos aproximadamente el 31.36% de ellos fueron linfocitos CD4+ (APC-CY7) de los cuales se realizaron las posteriores determinaciones. Se adicionaron a los tubos correspondientes 1 uL, 1.5 uL y 2 uL de PPAR γ de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados: para 1 uL el porcentaje de fluorescencia obtenido fue 1.63%, en el caso de 1.5 uL el porcentaje fue 0.54% y por último para 2 uL solo el 0.19%. En este caso el porcentaje de fluorescencia se encuentra cercano entre los valores, pero se identifica 1 uL como el ideal y al hacer la comparación con la IMF se identifica que el comportamiento es similar por lo que resulta como el mejor volumen de adición.

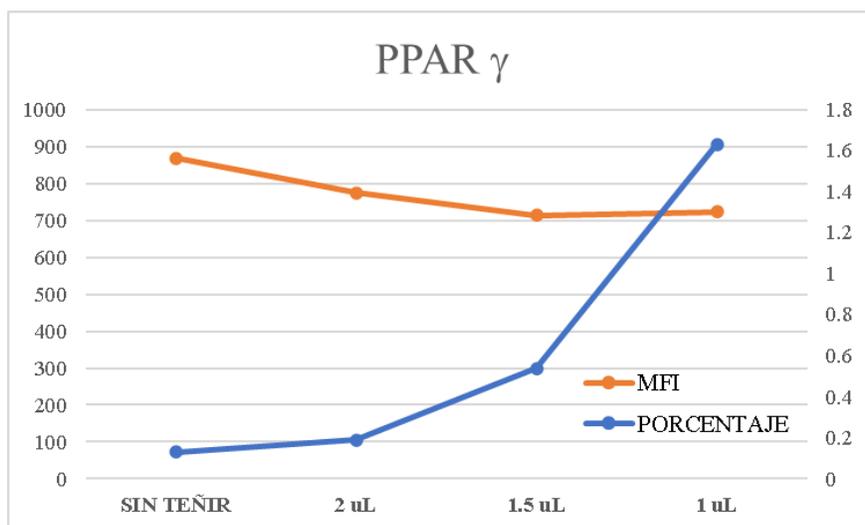


Ilustración 35. Gráfico de fluorescencia a partir de las condiciones establecidas de volumen de anticuerpo PPAR γ . Se muestra de color azul el porcentaje de fluorescencia obtenido en las diferentes condiciones y hace una comparación con la Intensidad Media de Fluorescencia de color naranja.

Finalmente, el análisis correspondiente a PPAR γ arrojó resultados similares al tener un bajo porcentaje, pero con una diferencia notoria entre cada una de las condiciones, donde la condición 1:50 (1 uL) arroja un porcentaje de 1.63% resultando un valor tres veces mayor en comparación con el resto de las condiciones, por lo que se identifica como buena condición. Al observar la grafica de histogramas se identifica un ligero desplazamiento hacia la derecha para el espectro color rosa correspondiente a la condición 1:50 (1 uL) mientras que el resto están encimados entre sí cerca del valor 0. Y finalmente la comparación entre el porcentaje de fluorescencia con la intensidad media de fluorescencia demuestra una lejanía de puntos para las condiciones 2 uL, así como 1.5 uL, esta última tiene una cercanía, pero insuficiente y por último en la condición **1:50 (1 uL)** es donde se observa una mayor cercanía de puntos indicando una mayor presencia de receptores, así como células. Este receptor resulta importante ya que permite la diferenciación de células, la regulación inflamatoria, homeostasis de glucosa/lípidos y es un objetivo de interés como terapia en diversas enfermedades.

En la tabla 5 se muestra un resumen de los datos registrados y resultados obtenidos al adquirir las células en el Citómetro de flujo, así como el posterior análisis con el software FlowJo; donde se observa en los primeros análisis edades variadas de adultos, pero posteriormente se realiza con muestras de un joven adulto (22 años), lo cual permite reducir las diferencias asociadas a este factor. Los singlets se refieren a las células que atraviesan individualmente por la “nozzle” gracias al flujo hidrodinámico, las PBMC no tienden a agregarse fácilmente por lo cual se obtienen resultados cercanos al 100% de singlets contados, similar a los obtenidos. En el caso de linfocitos, normalmente se reporta una variación con base en los factores mencionados como tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, obesidad mórbida, sedentarismo, bajo consumo de frutas/vegetales, consumo problemático de alcohol así como enfermedades autoinmunes o infecciones específicas, pero en promedio se deberían encontrar entre el 70% - 90 % de linfocitos, resultado que puede verse afectado por la recolecta del anillo de PBMC o alguna otra circunstancia relacionada con el proceso de separación. Grievnik y colaboradores, compararon el aislamiento de PBMC con tres métodos diferentes y obtuvieron los siguientes resultados: al aislar utilizando Ficoll obtuvieron 6×10^5 células/mL, al aislar con tubos SepMate 8×10^5 células/mL y mediante CPT 13×10^5 células/mL (resultando la recuperación de PBMC cerca del 70% en el caso de tubos de separación celular por sus siglas en inglés Cellular Preparation Tubes (CPT) y tubos SepMate. Por otro lado, reportaron en sus resultados los porcentajes de las diferentes PMBC, obtuvieron 65% - 70% de linfocitos T, 5% - 22% de linfocitos B, 5% - 14% de Natural Killers y 4 % - 12 % de monocitos; lo cual concuerda con los resultados obtenidos (Grievink,2016).

Tabla 5. Porcentajes obtenidos en los diferentes análisis obtenidos de la estandarización de anticuerpos.

	Edad	Singlets	Linfocitos	CD4+	CD28null	uL	Porcentaje
AKT v AKTp	53	94.6 %	74 %	50.55 %	3.99 %	n/a	32.6%/61.9%
AKT diluciones	38	95.67%	62.5 %	42.2 %		0.5	32 %
AKT uL	29	96.1 %	9.41 %	36.4 %		1	65.7 %
AKTp	22	94.8 %	54.32 %	34.63 %		1	20.1 %
STAT1p	22	92.75%	41.12 %	30.9 %		1	16.3 %
STAT1	22	92.87 %	35 %	28.23 %		1	11.3 %
ERK	22	95.07 %	76.47 %	38.16 %		1	90.5 %
ERKp	22	94.7 %	74.5 %	40.96 %		1.5	1.94 %
PPAR γ	22	92.17 %	49.55 %	31.36 %		1	1.63 %
PPAR α	22	92.6 %	48.25 %	27.73 %		1	1.41 %

El único análisis que reporta anomalías en valores de PBMC, es el caso de “AKT uL” esto debido a que el número recuperado es muy bajo, donde el rango esperado sería cercano a 70%, se identifica 9.41% esto debido a un problema de recuperación del anillo durante el procedimiento lo cual limita la cantidad de análisis que se podrían realizar con la muestra, pero al realizar el conteo de linfocitos e identificar una cantidad suficiente se logra realizar el análisis correspondiente; fuera de este hecho, el resto de experimentos concuerdan con lo reportado en la literatura tanto para CD4+ como para la cantidad requerida del anticuerpo.

Al realizar los experimentos y análisis requeridos para cada una de las estandarizaciones se enlistan los resultados obtenidos para cada ensayo realizado:

“AKT dilución 1:100 (0.5 uL en 50 uL), AKTp dilución 1:50 (1 uL en 50 uL), STAT1 dilución 1:50 (1 uL en 50 uL), STAT1p dilución 1:50 (1 uL en 50 uL), ERK dilución 1:50 (1 uL en 50 uL), ERKp dilución 1:33 (1.5 uL en 50 uL), PPAR α dilución 1:50 (1 uL en 50 uL) y PPAR γ dilución 1:50 (1 uL en 50 uL).”

En el primer experimento “AKT v AKTp” se realizó la comparación de linfocitos CD4+ CD28+ contra CD4+ CD28null en un adulto sano de 53 años, donde se reportaron valores “normales” dentro de los rangos establecidos de linfocitos CD4+ CD28null; se identificó 3.99% de CD28null lo cual concuerda con la literatura mencionada. En este caso, al comparar las proteínas quinasas B, se obtuvieron los valores de AKT = 32.6 % y AKTp = 61.9 %; por lo que podemos reportar una mayor activación de AKTp en comparación de AKT, con lo que podemos deducir que la vía de señalización P13K-AKT esta más activada. AKT es un paso crucial en esta vía, permite la supervivencia y proliferación celular. Podemos suponer que existe una relación con la función y supervivencia de las CD28null, esto es un primer punto, a partir de ello y con ayuda de inactivadores, se puede determinar mayor o menor presencia de anticuerpos para la determinación de la vía de señalización. Es importante mencionar que la vía AKT se puede activar por más de un receptor, existe una asociación directa al interactuar con el coestimulador CD28null, pero también se han identificado que diferentes vías la activan, razón por la cual se nota esta presencia; también es importante recalcar que para la identificación de una vía de señalización celular es importante contar con todos los anticuerpos necesarios y con inhibidores de vías para así determinar el comportamiento de la vía de manera certera. La presencia de AKT y AKTp deben de ser similares en personas sanas, esta desregulación de porcentaje de activación entre ellos se observa comúnmente en enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares y cáncer, esto debido a la alteración de la vía de señalización PI3K-AKT.

Al realizar la comparativa entre STAT1 con STAT1p se identifica una mayor activación de STAT1p que STAT1 lo que señala que la vía de señalización que produce la fosforilación de STAT1 esta más activa en las células. Y justamente este comportamiento se reporta, en el caso de STAT1, se determina como mejor dilución 1:50 con una activación de esta proteína con un 11.3 %, por otro lado, para STAT1p se identificó como mejor dilución 1:50 con una activación de 16.3 %. STAT1 es un factor de transcripción, el cual actúa a nivel de señalización celular, una mayor activación de STAT1p podría asociarse con la diferenciación celular de Th u otras células, esto no se puede concluir, es una hipótesis la cual se puede comprobar con una investigación correspondiente.

Para el caso de la proteína quinasa regulada por señal extracelular (ERK), la cual forma parte de la vía de señalización MAP quinasa, se activa en presencia de estímulos extracelulares, en linfocitos CD4+ se asocian con ambas proteínas con la diferenciación de subpoblaciones de linfocitos Th o Treg. Para ERK inactivado se observaron comportamientos bastante similares en los análisis realizados, en este caso se observa un aumento constante conforme aumenta el volumen de microlitros. Los porcentajes tan bajos de fluorescencia se deben a que no existen estímulos extracelulares como factores de crecimiento o señales mitogénicas, lo cual es un comportamiento esperado, se identifica el valor más alto de 1.94 % para una dilución 1:33. En este caso se observa algo curioso, varía la cantidad de anticuerpo necesario a pesar de ser pertenecientes a la misma vía de señalización MAPK, y este comportamiento se puede deber a varios factores como:

- Abundancia relativa, si existe menor cantidad de ERKp se requerirá una mayor cantidad del anticuerpo para capturar y visualizar eficientemente las moléculas de ERKp.
- Especificidad, el anticuerpo puede tener mayor afinidad por ERKp, por lo cual requiere una mayor cantidad para que se emita la señal óptima de detección.
- Accesibilidad de epítomos, los cambios conformacionales de las proteínas cercanas pueden bloquear los epítomos de ERKp.

Para el último conjunto de análisis, PPAR α y PPAR γ , es importante mencionar que son subtipos de receptores nucleares de la familia de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) los cuales son estructuralmente similares pero diferentes en cuanto a distribución, funcionalidades, efecto en inflamación e implicaciones terapéuticas, resultando PPAR γ el más

relacionado en este caso debido a la asociación que se tiene con enfermedades autoinmunitarias, entre otras; por otro lado, PPAR α se asocia con el metabolismo de lípidos y con la regulación de inflamación sistémica; en este caso la relación con linfocitos CD4+ es mucho menor que la existente con PPAR γ , no hay que descartar la posibilidad de que exista una relación mas estrecha con el sistema inmunológico y una funcionalidad desconocida al actuar con agentes patógenos.

8. Discusión

El uso de la técnica citometría de flujo resulta certera para el análisis de diversas muestras biológicas como en el presente caso con PBMC, el trabajar este tipo de células en las diferentes afecciones resulta sencillo al identificar los diferentes receptores o citocinas de interés asociadas a las patologías lo que abre una amplia gama de oportunidades, como el presente caso al identificar en una primera instancia los porcentajes de linfocitos T CD4+ CD28null así como los diferentes incrementos o disminuciones. Al utilizar muestras de pacientes con SICA, el estado de inflamación, así como de respuesta inmunitaria resulta crónico, por lo que la identificación de receptores o citocinas asociadas a la inflamación está presente. Al obtener las muestras y realizar el procedimiento de separación de las PBMC se pueden identificar diferentes poblaciones como monocitos, linfocitos y eritrocitos, debido a las características morfológicas, pero el análisis primordial comienza al realizar el marcaje o tinción de la población de interés. Por lo que antes de ello, resulta importante la estandarización de anticuerpos, ya que en un proyecto de vías de señalización es el punto de partida debido a que una menor cantidad de anticuerpo a la requerida puede limitar la detección de las poblaciones o un desprecio de su presencia (también como un gasto económico importante), así como los límites de detección positivos y negativos, por otro lado, un exceso de volumen de anticuerpo puede generar interferencia o la formación de complejos que alteren la lectura; en ambos casos la consecuencia es una obstaculización durante los procesos de compensación, definición de poblaciones, análisis de datos y la obtención de resultados (Kaneko, 2019). Identificar y conocer la dilución ideal es fundamental ya que garantiza especificidad de tinción, por ello resulta importante realizar la titulación con diferentes rangos de condiciones, para de este modo tener una certeza mayor del volumen de anticuerpos requeridos, es importante revisar los datos reportados por diversos autores para la investigación de las células de interés (Kalina, 2020).

Al trabajar con el mismo tipo de células se reduce el rango, en el presente proyecto se utilizan PBMC, en específico linfocitos T CD4+ los cuales constan de un rango de volumen de adición de anticuerpos desde 0.1 uL hasta 20 uL, y mediante el análisis realizado se determinan las condiciones de dilución y/o volumen ideal para obtener resultados reproducibles y confiables.

En diversos artículos se ha reportado el uso de distintas diluciones de anticuerpos; por ejemplo Gopinath y colaboradores, en 2020 reportaron la metodología utilizada en su proyecto “marcadores de señalización de dopamina en células del sistema inmune”, para determinar los resultados utilizaron los anticuerpos extracelulares “CD14” y “IgG2B”, utilizaron 2 uL / dilución 1:50 (1uL) respectivamente; por otro lado, realizaron fijación y permeación de membrana para colocar los anticuerpos intracelulares “DAT” y “TH” de los cuales agregaron 1 uL /dilución 1:100 y para los anticuerpos secundarios solo mencionan agregar el respectivo para el anticuerpo primario utilizando 2.5 uL / dilución 1:40 (Gopinath, 2020). Otros autores agregan el volumen de microlitros con base en la cantidad de muestra disponible, Porichis y colaboradores utilizaron los siguientes anticuerpos CD3 (BV605), CD4 (BV421) y CD8 (BV785); para cada uno se utilizaron 5 uL por cada 100 uL de muestra (Porichis, 2014).

Vásquez en 2009 estandarizó un protocolo de citometría para identificar los diferentes niveles de linfocitos CD4+, linfocitos CD8+, linfocitos reguladores, linfocitos B y células natural killers en pacientes con síndrome de Down en su sangre periférica, para su titulación utilizó un volumen de 50 uL de sangre total como volumen final donde agregó directamente los anticuerpos sin un proceso de separación. De este proyecto estandarizó los anticuerpos mencionados a continuación: CD45 APC-H7 (1 uL), CD3 Pacific Blue (3 uL), CD4 PercP-Cy5.5 (5 uL), CD25 APC (18 uL), CD127 PE (7 uL), CD19 PECy7 (1 uL), CD16 FITC (5 uL), CD56 FITC (5 uL) (Vásquez, 2009). Del protocolo estandarizado de Vásquez podemos identificar varios puntos, el hecho de utilizar sangre total para la estandarización puede ser un factor por el cual se utilice en alguna condición una cantidad de volumen mayor, en caso de realizar un aislamiento de PBMC estos valores se verían reducidos; otro punto importante es la variabilidad del volumen de adición en cada uno de los distintos anticuerpos titulados ya que existen variaciones del doble del volumen o inclusive 17 veces mayor por lo que resulta importante no limitarse un rango e identificar las recomendaciones establecidas en los insertos.

Los linfocitos B tienen relación con los linfocitos T, pertenecientes a la misma categoría de origen linfoide, así como receptores similares como CD45/CD2, de igual modo el tamaño. Grammer y colaboradores evaluaron las cascadas de señalización NF- κ B y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) a partir de linfocitos B de la periferia en pacientes con Lupus Eritematoso (LES) así como en controles, analizaron diferentes receptores asociados a esta vía, cultivaron 300,000 células B las cuales estimularon con CD154 recombinante (un estímulo que se ha demostrado induce la fosforilación de ERK, JNK y p38) posteriormente agregaron los anticuerpos: 3 ug de ERKp, 3 ug de JNKp, 3 ug de p38(p), 3 ug de I κ B α , 3 ug de I κ B β y utilizaron los anticuerpos secundarios correspondientes agregando 6 uL para cada uno. En este caso la cantidad de anticuerpo es alta, de 3ug para la identificación, se correlaciona con los anticuerpos estandarizados, ya que en este caso se determinó como cantidad 1.5 uL del anticuerpo para el uso de ERKp, el cual resultó el valor más alto dentro de las estandarizaciones realizadas, sin olvidar que en este caso se trabajaron con linfocitos B a pesar de ello, los resultados no se encuentran tan alejados, de igual modo el uso del resto de anticuerpos que funcionan para la vía de señalización MAPK resultaron valores cercanos (Grammer, 2004 & Kingma, 2002).

Kondadasula y colaboradores, publicaron en 2008 un artículo donde tenían natural killers y monocitos con ERKp, donde existía una estimulación con IL-2 para posteriormente realizar un análisis en el citómetro de flujo, asilaron las PBMC de manera similar a las realizadas en el presente proyecto. A partir de las cuales trabajaron con 20,000 células las cuales fijaron, permeabilizaron y tñieron con 0.1ug de ERKp para posteriormente agregar el volumen correspondiente de anticuerpo secundario, adquirieron 10,000 eventos para cada determinación. Este está alejado de los resultados obtenidos en el presente proyecto, pero existe esta variabilidad asociada a diversas cosas, las células analizadas en este caso el interés fueron linfocitos y natural killers (pero siguiendo el proceso de separación por gradiente de centrifugación Ficoll), por lo cual ese es un factor que podría afectar, durante la realización de su tinción trabajaron únicamente con 20,000 células las cuales resultan pocas a comparación del análisis presente de linfocitos CD4+, donde se utilizaron 200,000 células resultando 10 veces menor la cantidad, de igual modo es importante resaltar la pérdida del número de células que puede existir durante un proceso de permeabilización (Kondadasula, 2008 & Salcedo, 2009). En este caso se evidencia la variabilidad que puede existir entre dos usos de anticuerpos similares, pero con finalidades y procedimientos diferentes, se identifican diferencias entre ambos autores por un lado Grammer utiliza 3 ug de ERKp para monocitos y, por otro lado, Kondadasula 0.1ug igualmente para monocitos, pero también utilizando natural killers, es importante identificar que Kondadasula detalla de mejor manera el procedimiento realizado, así como cantidades celulares utilizadas, mientras que Grammer limita el acceso a esa información, pero se determina por la finalidad de ambos proyectos, así como el hecho de que sus procedimientos y uso de anticuerpos son diferentes.

Henning mediante tinción FISH y citometría de flujo, midió ARNm intracelular en monocitos, en su publicación indican detalladamente el procedimiento que realizaron para la tinción, pero no indican su procedimiento de aislamiento de monocitos, al tener los linfocitos aislados trabajan con 5 millones de células para la detección, donde añadieron 25 uL de CD14 o dilución 1:5 (glicoproteína reguladora de respuesta inflamatoria microglía la cual modula la proteína beta amiloide), 25 uL CD16 o dilución 1:10 (receptor que participa en la transducción de señales para medir citotoxicidad); las cuales no son moléculas utilizadas en el presente proyecto, pero son de naturaleza resulta similar, siendo receptores de monocitos los cuales comparten ciertas características con los linfocitos como CD16 en diferente isoforma o tamaño celular parecido, por lo que es comprensible identificar diluciones cercanas a las obtenidas en los analizados, en su mayoría una dilución 1:50. Por otro lado, realizaron los procedimientos de fijación/permeación para agregar el anticuerpo PPAR γ donde agregaron 25 uL del anticuerpo equivalente a una dilución 1:25, menor en comparación con el anticuerpo estandarizado, esta variación se asocia a los factores mencionados como un tipo celular diferente, cantidades utilizadas o reactivos ya que el procedimiento utilizado por Henning y colaboradores es diferente al realizado en el presente proyecto pero con la misma finalidad; estas fueron las condiciones donde se encontró una mayor variabilidad y números bastante elevados de uso de anticuerpos pero correspondiente a los rangos de diluciones mencionados (Henning, 2016).

Como se describió, los valores obtenidos en la presente estandarización de anticuerpos en personas sanas, son bastante similares a las investigaciones publicadas actualmente en cuanto al manejo de anticuerpos para el análisis de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en específico para el manejo de linfocitos T CD4+, rangos que se encuentran entre 0.1 uL hasta 25 uL pero las diluciones se mantienen dentro de los rangos que se establecieron al inicio del análisis: diluciones propuestas (1:25, 1:33, 1:50, 1:100 y 1:250), diluciones obtenidas (1:33, 1:50 y 1:100) y diluciones encontradas (1:5, 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100) se observa la similitud entre los resultados. De igual modo la cantidad de anticuerpo necesario pueden variar ya que cada estandarización es diferente, existen factores que varían las cantidades requeridas, por ejemplo: tipo de células, antígeno de interés, objetivo del proyecto, condiciones de la muestra, eficiencia de la conjugación de anticuerpos, tipo de ensayo, protocolo de tinción y anticuerpo seleccionado; estos factores afectan la variabilidad de los rangos de microlitros o las diluciones a utilizar.

Dentro de estos factores es importante identificar el número de células que se requieren teñir, ya que este número puede variar con base en las técnicas que se utilicen para la toma de muestra, almacenamiento de la muestra, proceso de aislamiento de PBMC, procedimiento de tinción/fijación/permeabilización (durante la permeabilización celular existe una pérdida importante de células), así como el almacenamiento de las muestras previo a su lectura en el equipo. El número de células que se deben adquirir depende de factores como el objetivo del experimento (población general o subpoblación específica), la precisión estadística que se desea alcanzar (mayor cantidad de células adquiridas mayor precisión en cuanto a términos de porcentaje y números absolutos), la frecuencia de eventos "raros" que existan (requieren cientos, miles o hasta millones de eventos grabados para generar resultados confiables) y fluorescencia de fondo (requieren mayor cantidad para la distinción adecuada de señales positivas). Normalmente el número de eventos adquiridos es 10,000 células como punto de partida, a partir de ello, se realizan los ajustes del experimento con base en las situaciones mencionadas previamente (Salcedo, 2009 & McKinnon, 2018). Con base en lo mencionado previamente, es fundamental identificar los intereses de cada proyecto, resaltar la importancia y necesidad de estandarizar cada uno de los paneles de anticuerpos en todos los proyectos los cuales involucren el uso de citometría de flujo multiparamétrica, si se realiza de forma correcta se obtendrán procesamientos de muestras tanto reproducibles como seguros, así como la obtención de datos o resultados de calidad, precisos y confiables.

9. Conclusiones

Se estandarizaron e identificaron las diluciones optimas de los anticuerpos AKT, AKTp, STAT1, STAT1p, ERK,ERKp, PPAR γ y PPAR α en personas sanas donde se encontraron rangos cercanos de estas proteínas o cinasas (0.5 – 1.5 uL), las cuales se pueden utilizar para trabajar con linfocitos T CD4+. De este modo, en el proyecto externo, resulta más sencillo identificar las posibles vías de señalización con los anticuerpos previamente estandarizadas, a partir de la técnica citometría de flujo multiparamétrica, asegurando el volumen de anticuerpos requeridos ya que de este modo se garantiza la utilización adecuada de anticuerpos de este modo mejorando la precisión y confiabilidad de los resultados.

10. Bibliografía

1. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in immunology*, 9, 1869. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
2. Alegre, ML., Frauwirth, K. & Thompson, C. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1, 220–228 (2001). <https://doi.org/10.1038/35105024>
3. Becerra-Partida EN, Casillas-Torres L, Becerra-Álvarez F. Prevalencia del síndrome coronario agudo en primer nivel de atención. *Rev CONAMED*. 2020;25(1):16-22. doi:10.35366/92891.
4. Borrayo-Sánchez, G., Rosas-Peralta, M., Pérez-Rodríguez, G., Ramírez-Árias, E., Almeida-Gutiérrez, E., & de Jesús Arriaga-Dávila, J. (2018). Infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST: Código I. *Revista médica del Instituto mexicano del Seguro Social*, 56(1), 26-37.
5. Boyle, A. J., Shih, H., Hwang, J., Ye, J., Lee, B., Zhang, Y., ... & Lee, R. (2011). Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy. *Experimental gerontology*, 46(7), 549-559.
6. Bullenkamp, J., Mengoni, V., Kaur, S., Chhetri, I., Dimou, P., Astroulakis, Z. M. J., ... Dumitriu, I. E. (2020). Interleukin-7 and interleukin-15 drive CD4+CD28null T lymphocyte expansion and function in patients with acute coronary syndrome. *Cardiovascular Research*. doi:10.1093/cvr/cvaa202
7. Cassiani, C. A., & Cabrera, A. (2009). Síndromes coronarios agudos: epidemiología y diagnóstico. *Org.co*. <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v25n1/v25n1a11.pdf>
8. David, E. P., & Blas, J. R. R. *Cardiopatía Isquémica: Angina de Pecho*.
9. Dumitriu, I. E., Araguás, E. T., Baboonian, C., & Kaski, J. C. (2009). CD4+ CD28 null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. *Cardiovascular Research*, 81(1), 11-19. doi:10.1093/cvr/cvn248
10. Dumitriu, I. E., Baruah, P., Finlayson, C. J., Loftus, I. M., Antunes, R. F., Lim, P., Bunce, N., & Kaski, J. C. (2012). High levels of costimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterize CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndrome. *Circulation Research*, 110(6), 857-869. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261933>
11. ElAlfy, M.S., Adly, A.A.M., Ebeid, F.S.E. et al. Immunological role of CD4+CD28null T lymphocytes, natural killer cells, and interferon-gamma in pediatric patients with sickle cell disease: relation to disease severity and response to therapy. *Immunol Res* 66, 480–490 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9010-y>
12. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., & Bluestone, J. A. (2016). CD28 costimulation: From mechanism to therapy. *Immunity*, 44(5), 973-988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>
13. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., & Bluestone, J. A. (2016). CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*, 44(5), 973–988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>
14. Gerli, R., Schillaci, G., Giordano, A., Bocci, E. B., Bistoni, O., Vaudo, G., Marchesi, S., Pirro, M., Ragni, F., Shoenfeld, Y., & Mannarino, E. (2004). CD4+CD28- T lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients. *Circulation*, 109(22), 2744–2748. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131450.66017.B3>
15. Gopinath, A., Doty, A., Mackie, P. M., Hashimi, B., Francis, M., Saadatpour, L., ... Khoshbouei, H. (2020). A novel approach to study markers of dopamine signaling in peripheral immune cells. *Journal of Immunological Methods*, 476, 112686. doi:10.1016/j.jim.2019.112686

16. Grammer, AC, Fischer, R., Lee, O. et al. Evaluación por citometría de flujo del estado de señalización de los linfocitos B humanos de individuos normales y autoinmunes. *Arthritis Res Ther* 6, 28 (2004). <https://doi.org/10.1186/ar1155>
17. Grievink, H. W., Luisman, T., Kluft, C., Moerland, M., & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14(5), 410–415. doi:10.1089/bio.2015.0104
18. H. (2003). Clonally expanded CD4+CD28null T cells in rheumatoid arthritis use distinct combinations of T cell receptor BV and BJ elements. *European journal of immunology*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/immu.200390010>
19. Henning, AL, Sampson, JNB y McFarlin, BK (2016). Medición de ARNm intracelular de baja abundancia mediante tinción con FISH amplificada y citometría de flujo basada en imágenes. *Protocolos actuales en citometría*, 7.46.1–7.46.8. doi:10.1002/0471142956.cy0746s76
20. Ildefonso, J. Á., & Arias-Díaz, J. (2010). Fisiopatología de la lesión hepática por isquemia-reperusión. *Cirugía Española*, 87(4), 202–209. doi:10.1016/j.ciresp.2009.11.009
21. Jadav, G., & Doodipala, M. R. (2022). The Role of Cd28 Costimulatory Receptors in Signalling Pathways. *Int J Health Policy Plann*, 1 (1): 46, 54.
22. Kalina, T., Lundsten, K., & Engel, P. (2020). Relevance of antibody validation for flow cytometry. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 97(2), 126-136. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23895>
23. Kaneko, S. (Ed.). (2019). *In vitro differentiation of T-cells: Methods and protocols*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9728-2>
24. Kingma, D. W., Imus, P., Xie, X. Y., Jasper, G., Sorbara, L., Stewart, C., & Stetler-Stevenson, M. (2002). CD2 is expressed by a subpopulation of normal B cells and is frequently present in mature B-cell neoplasms. *Cytometry*, 50(5), 243–248. <https://doi.org/10.1002/cyto.10131>
25. Kondadasula, S. V., Varker, K. A., Lesinski, G. B., Benson, D. M., Jr, Lehman, A., Olencki, T., Monk, J. P., Kendra, K., & Carson, W. E., III. (2008). Activation of extracellular signaling regulated kinase in natural killer cells and monocytes following IL-2 stimulation in vitro and in patients undergoing IL-2 immunotherapy: analysis via dual parameter flow-cytometric assay. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 57(8), 1137-1149. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0444-7>
26. Kosmaczewska, A., Ciszak, L., Stosio, M., Szteblich, A., Madej, M., Frydecka, I., ... Szmyrka, M. (2020). CD4+CD28null T cells are expanded in moderately active systemic lupus erythematosus and secrete pro-inflammatory interferon gamma, depending on the Disease Activity Index. *Lupus*, 096120332091774. doi:10.1177/0961203320917749
27. Lavoie, H., Gagnon, J., & Therrien, M. (2020). ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(10), 607-632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
28. Lechler, R., Chai, J. G., Marelli-Berg, F., & Lombardi, G. (2001). The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunology*, 103(3), 262–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01250.x>
29. Libby, P., & Aikawa, M. (2002). Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nature Medicine*, 8(11), 1257-1262. <https://doi.org/10.1038/nm1102-1257>
30. Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Trotta, G., Brugaletta, S., Pinnelli, M., DiGianuario, G., ... Crea, F. (2007). Unusual CD4+CD28null T Lymphocytes and Recurrence of Acute Coronary Events. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(15), 1450–1458. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.040

31. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+ T cells: differentiation and functions. *Clinical and developmental immunology*, 2012.
32. M^a Teresa Vidán Astiz . SÍNDROME CORONARIO AGUDO . Tratado de Geriatria. [Internet]. (31)325-. 332. 7. Dr. José Luís Villegas Peñaloza.
33. Maly, K., & Schirmer, M. (2015). The story of CD4+ CD28- T cells revisited: solved or still ongoing? *Journal of Immunology Research*, 2015, 348746. doi:10.1155/2015/348746
34. Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: Navigating the network. *Cell*, 169(3), 381-405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
35. Manteca, L. A., Delgado, E. I., Calvo, M. A., Tejedor, G. V., González, M. M., & Castrillón, J. P. (2010). Prevalencia de osteoporosis en pacientes con síndrome coronario agudo. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2(1), 15-20.
36. Martens, P. B., Goronzy, J. J., Schaid, D., & Weyand, C. M. (1997). Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 40(6), 1106–1114. <https://doi.org/10.1002/art.1780400615>
37. Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., & de Nadal, E. (2020). The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>
38. McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
39. McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 5.1.1–5.1.11. doi:10.1002/cpim.40
40. Olvera Lopez E, Ballard BD, Jan A. Cardiovascular Disease. [Updated 2022 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/>
41. Pérez-Lara, J. C., Santiago-Cruz, W., Romero-Ramírez, H., & Rodríguez-Alba, J. C. (2019). Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 18(2), 41-52.
42. Pètre, Graciane, Michèle EL Atifi, and Arnaud Millet. "Proteomic signature reveals modulation of human macrophage polarization and functions under differing environmental oxygen conditions." *Molecular & Cellular Proteomics* 16.12 (2017): 2153-2168.
43. Porichis, F., Hart, M., Griesbeck, M. et al. High-throughput detection of miRNAs and gene-specific mRNA at the single-cell level by flow cytometry. *Nat Commun* 5, 5641 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms6641>
44. Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Owen, J. A. (2020). *Kuby Inmunología – 8^a Edición (8.^a ed.)*. McGraw-Hill. McGraw-Hill.
45. Salcedo-Morales, G., Trejo-Tapia, G., Martínez-Bonfil, B. P., Jesús-Sánchez, D., Arenas-Ocampo, M. L., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2009). Establecimiento de un protocolo de permeabilización con detergentes que incrementa la eficiencia en la producción de betacianinas en cultivos de células de *Beta vulgaris* L. *Interciencia*, 34(9), 666-671.
46. Sampani, E., Daikidou, D. V., Lioulios, G., Xochelli, A., Mitsoglou, Z., Nikolaidou, V., Dimitriadis, C., Fylaktou, A., Papagianni, A., & Stangou, M. (2021). CD28null and Regulatory T Cells Are Substantially Disrupted in Patients with End-Stage Renal Disease Due to Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2975. <https://doi.org/10.3390/ijms22062975>
47. Sanjay, S., Sharma, A., & Lee, H.-J. (2021). Role of Phytoconstituents as PPAR Agonists: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines*, 9(12), 1914. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9121914>

48. Sayed, N. M., Abdel-Rahman, S. M., Esmat, I., & Nammas, W. (2015). CD4+CD28null T cells in acute coronary syndrome: lower with ST-elevation myocardial infarction. *Scandinavian cardiovascular journal* : SCJ, 49(6), 325–330. <https://doi.org/10.3109/14017431.2015.1088167>
49. Sebastián, C. G., Sequeiros, M. A., Ruiz, J. M. M., & Gómez, J. L. Z. (2021). Infarto agudo de miocardio. *SCACEST. Medicina - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(38), 2177–2184. doi:10.1016/j.med.2021.07.002
50. Sharpe, A., Freeman, G. The B7–CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2, 116–126 (2002). <https://doi.org/10.1038/nri727>
51. Shuai, K., Liu, B. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3, 900–911 (2003). <https://doi.org/10.1038/nri1226>
52. Téó, F. H., de Oliveira, R. T. D., Mamoni, R. L., Ferreira, M. C. S., Nadruz, W., Jr, Coelho, O. R., ... Blotta, M. H. S. L. (2013). Characterization of CD4+CD28null T cells in patients with coronary artery disease and individuals with risk factors for atherosclerosis. *Cellular Immunology*, 281(1), 11-19. doi:10.1016/j.cellimm.2013.01.007
53. Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., ... & Anderson, J. L. (2018). Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European heart journal*, 40(3), 237-269. doi: 10.1093/eurheartj/ehy462
54. Tuttolomondo, A., Pecoraro, R., Casuccio, A., Di Raimondo, D., Buttà, C., Clemente, G., Corte, V. D., Guggino, G., Arnao, V., Maida, C., Simonetta, I., Maugeri, R., Squatrito, R., & Pinto, A. (2015). Peripheral frequency of CD4+ CD28- cells in acute ischemic stroke: relationship with stroke subtype and severity markers. *Medicine*, 94(20), e813. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000813>
55. Tybulewicz, V., Henderson, R. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 9, 630–644 (2009). <https://doi.org/10.1038/nri2606>
56. Ugarte-Gil MF, Sánchez-Zúñiga C, Gamboa-Cárdenas RV, et al. Circulating CD4+CD28null and extra-thymic CD4+CD8+ double positive T cells are independently associated with disease damage in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2016;25(3):233-240. doi:10.1177/0961203315604910
57. Ugarte-Gil, M. F., Sánchez-Zúñiga, C., Gamboa-Cardenas, R. V., Aliaga-Zamudio, M., Zevallos, F., Mosqueira-Riveros, A., Medina-Chinchón, M., Tineo-Pozo, G., Elera-Fitzcarrald, C., Pimentel-Quiroz, V., Sarmiento-Velasquez, O., Reátegui-Sokolova, C., Cucho-Venegas, J. M., Alfaro-Lozano, J., Rodriguez-Bellido, Z., Pastor-Asurza, C., Alarcón, G. S., & Perich-Campos, R. (2018). Peripheral CD4+CD28null T-cells as
58. Vásquez Flórez, Andrés Camilo. "Estandarización de un protocolo de citometría de flujo para determinar simultáneamente los recuentos absolutos de LTCD4+ LTCD8+, LT reguladores, LB y células NK en sangre periférica con el fin de evaluar los recuentos en pacientes con síndrome de Down." (2009).
59. Vergallo, R., & Crea, F. (2020). Atherosclerotic Plaque Healing. *New England Journal of Medicine*, 383(9), 846–857. doi:10.1056/nejmra2000317
60. Wagner, U., Pierer, M., Kaltenhäuser, S., Wilke, B., Seidel, W., Arnold, S., & Häntzschel,
61. World Health Organization. WHO Mortality Database. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015 [actualización 2017; acceso febrero 2023]. Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/
62. Yen, Jeng-Hsien, et al. "Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis." *The Journal of experimental medicine* 193.10 (2001): 1159-1168.
63. Zambrano, S. K. M., Cajilema, A. E. A., Salinas, K. T. K., & Zambrano, E. C. R. (2022). Angina Inestable. *RECIMUNDO*, 6(1), 104-116.

64. Zhang, Y., Wang, X., Yang, H., Liu, H., Lu, Y., Han, L., & Liu, G. (2013). Kinase AKT controls innate immune cell development and function. *Immunology*, 140(2), 143-152. <https://doi.org/10.1111/imm.12123>
65. Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>