



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Fisiología y Farmacología/ Química

Tesis

“El efecto del selenio sobre células T reguladoras”

Presenta

Jonathan Aguilar Manzo

Para optar por el grado de

Maestro en Ciencias en el Área de Toxicología

Tutores

Dr. Javier Ventura Juárez

Dra. Mariana Haydee García Hernández

Integrantes del comité tutorial

Asesor: Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

Asesor: Dr. José Francisco Morales Domínguez

Aguascalientes, Ags, 23 de noviembre del 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como **TUTOR** designado del estudiante **JONATHAN AGUILAR MANZO** con ID 260696 quien realizó la tesis titulado: **"EL EFECTO DEL SELENIO SOBRE CÉLULAS T REGULADORAS"**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de noviembre del 2020.

Dr. Javier Ventura Juárez
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS


PRESENTE

Por medio del presente como **CO-TUTOR** designado del estudiante **JONATHAN AGUILAR MANZO** con ID 260696 quien realizó la tesis titulado: **"EL EFECTO DEL SELENIO SOBRE CÉLULAS T REGULADORAS"**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de noviembre del 2020.



Dra. Mariana Haydee García Hernández
Co-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **JONATHAN AGUILAR MANZO** con ID 260696 quien realizó la tesis titulado: **"EL EFECTO DEL SELENIO SOBRE CÉLULAS T REGULADORAS"**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 14 de noviembre del 2020.

Martín Humberto Muñoz O.

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **JONATHAN AGUILAR MANZO** con ID 260696 quien realizó la tesis titulado: **“EL EFECTO DEL SELENIO SOBRE CÉLULAS T REGULADORAS”**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 14 de noviembre del 2020.

Dr. José Francisco Morales Domínguez
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 20/11/2020

NOMBRE: Jonathan Aguilar Manzo **ID** 260696

PROGRAMA: Maestría en Ciencias: área de Biotecnología Vegetal o Toxicología **LGAC (del posgrado):** Biotecnología Vegetal y Toxicología

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: EL EFECTO DEL SELENIO SOBRE CÉLULAS T REGULADORAS

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Desarrollo de protocolos de expansión celular para tratamiento a enfermedades autoinmunes, alergias y rechazo a injerto.

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
 SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
 SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
 SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
 SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
 SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
 SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
 SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
 SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
 SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
 SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
 SI Coincide con el título y objetivo registrado
 SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
 SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
 N/A Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- N/A Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
 N/A El estudiante es el primer autor
 N/A El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
 N/A En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
 N/A Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
 N/A La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí

No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Javier Ventura Juárez

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. EUGENIO MARTIN PÉREZ MOLPHE BALCH

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDEE MARTINEZ RUVALCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTIN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Agradecimientos

Un logro no solo se mide por los objetivos cumplidos o las metas alcanzadas, son tangibles gracias al esfuerzo, sacrificio, lucha, perseverancia y disciplina que te acompañan durante todo el recorrido. Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el espacio brindado para llevar a cabo mi posgrado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por ser participe como aportador de la beca de estudios para el desarrollo de mi posgrado, a la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas por permitirme realizar mi trabajo experimental de mi proyecto de tesis, al Dr. Javier Ventura Juárez por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y ser participe como mi tutor de tesis.

Agradezco enormemente a la Dra. Mariana Haydee García Hernández por abrirme las puertas de la Unidad de Investigación Biomédica de la Ciudad de Zacatecas para realizar mi estancia de trabajo con el objetivo de desarrollar el trabajo experimental de mi tesis, dirigirme y asesorarme y compartir sus conocimientos. De igual manera agradezco al Dr. Martin Humberto por darme la oportunidad de conocer e integrarme al grandioso equipo de trabajo, al Dr. José Francisco por ser partícipe de mi comité tutorial. Agradezco a Marina la oportunidad que me brindo para comenzar el maravilloso proyecto que tuve a bien desarrollar, pero el cual es resultado de todos, a Rocío Edith y Wendolin por su tiempo y apoyo durante mi estancia en Zacatecas.

Mi más grande reconocimiento y agradecimiento para Alely Candelas Delgado por confiar y apoyarme en los mejores, pero sobre todo en los más complejos momentos, aportando sus ideas y consejos y por ser una incansable promotora de mis sueños. A mi familia por ser eslabón de mi crecimiento personal y académico. Agradezco a todos quienes formaron parte de esta grandiosa etapa, mis compañeros de generación, profesores, amigos y a todos quienes formaron parte del camino recorrido y desearon lo mejor para este proyecto que hoy culmina.

Dedicatorias

Como mérito propio de vida es para mí un placer dedicar este logro a mis padres quienes ejercieron en mi un carácter de superación y preparación, por su esmero y buenos deseos, como un resultado que imprime tantos años de sacrificio es para mí un honor mostrar a mis padres que todo es posible cuando se quiere y se sueña. A mi familia quienes con palabras me hacían sentir orgulloso de mi e incrementaban mis expectativas deseando lo mejor siempre.

Dedico este logro a mi cómplice y compañera de aventura Alely Candelas Delgado quien apoyó y confió en mi a ciegas, quien formo parte de mi toma de decisiones, las más complicadas y quien incansablemente fue fuente de energía pura para seguir adelante y jamás claudicar, mi diario y mi mejor consejera sin duda un logro que sin su presencia hubiera sido poco probable de realizar. Es un logro con títulos propios, pero con un proceso de muchos participes.

Crecer es parte de un proceso biológico y evolutivo que nos muestra que tan capaces de adaptarnos somos para llegar a un meta, hoy la vida me regala esa oportunidad de recordar el inicio y disfrutar una conclusión, de saberme satisfecho y realizado, mi más grande reconocimiento a todos quienes lo hicieron posible.

1. Índice general

1. Introducción 1

 1.1 Sistema inmune innato 1

 1.2. El sistema inmune adaptativo 1

2. Antecedentes 4

 2.1. Células T reguladoras 4

 2.2. Mecanismos de acción de las células T reguladoras 4

 2.3. Foxp3 5

 2.4. Región CNS2/TSDR 7

 2.5. TET2 y TET3 8

 2.6. Células T reguladoras en enfermedades y procesos autoinmunes 9

 2.7. Importancia de las células T reguladoras 10

 2.8. El Selenio y su participación en procesos redox y en el metabolismo celular 12

 2.9. Selenio y su actividad en el sistema inmunológico 12

 2.10. Selenio en la proliferación de células del sistema inmune 13

 2.11. Selenio y su participación en procesos epigenéticos en células del sistema inmunológico 14

 2.12. El selenio y su función en células Treg 16

3. Justificación 18

4. Hipótesis 19

5. Objetivos 20

 5.1. Objetivo general 20

 5.2. Objetivos específicos 20

6. Metodología 21

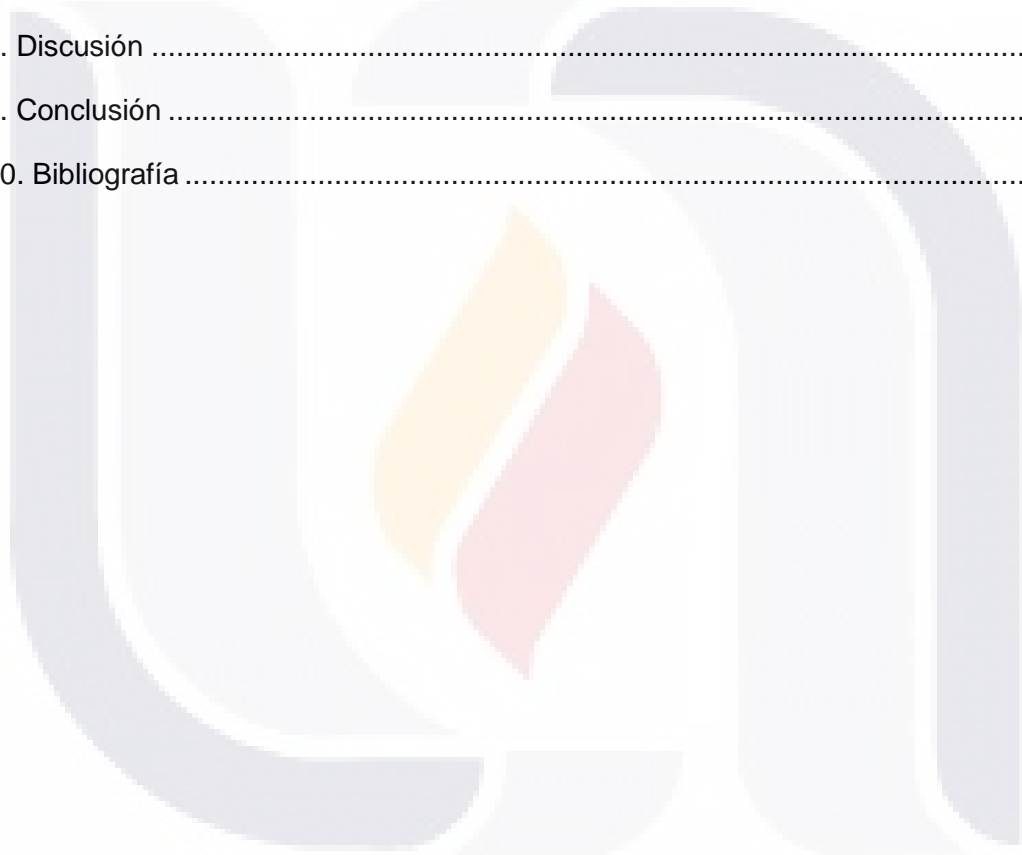
 6.1. Toma de muestras de sangre venosa periférica 21

 6.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica 21

 6.3. Purificación de células CD4+ 21

 6.4. Preparación de Selenito de sodio 21

6.5. Cultivo de PBMC y células CD4+ con Selenito de sodio	22
6.6. Evaluación de la toxicidad (Anexina/Yoduro de propidio) y marcaje celular mediante citometría de flujo.....	22
6.7. RT-qPCR.....	23
6.7.1. Diseño de oligonucleótidos	23
6.7.2. Extracción de ARN.....	23
6.7.3. Síntesis de cDNA.....	24
7. Resultados	25
8. Discusión	32
9. Conclusión	35
10. Bibliografía	36



Índice de figuras

Figura 1. Selenoproteínas.....3

Figura 2. Estructura de la proteína Foxp3..6

Figura 3. Estructura del gen Foxp3..8

Figura 4. Efecto del selenito de sodio 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M sobre PBMC...25

Figura 5. Viabilidad de PBMC tratadas con selenito de sodio 2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M durante 6 días..26

Figura 6. Activación de PBMC a concentraciones de 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M ...26

Figura 7. Activación de PBMC a concentraciones de 2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M..27

Figura 8. Expresión de TET2/TET3 en PBMC expuestas a selenito de sodio 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M27

Figura 9. Expresión de TET2/TET3 en PBMC expuestas a selenito de sodio 2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M.....28

Figura 10. Porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+ expuestas a selenito de sodio 2×10^{-6} M durante 6 días.....29

Figura 11. Expresión de TET2 en Treg tratadas con selenito de sodio 2×10^{-6} M.....30

Figura 12. Expresión de TET3 en Treg tratadas con selenito de sodio 2×10^{-6} M.....30

Índice de cuadros

Cuadro 1. Secuencias de los oligonucleótidos para TET2 y TET323



Acrónimos

- IgM:** Inmunoglobulina M.
- IgE:** Inmunoglobulina E.
- IgG:** Inmunoglobulina G.
- CD:** Cluster of differentiation.
- Foxp3:** Proteína P3 de la forkhead box.
- IL-2:** Interleucina 2.
- TGF- β :** Factor de transcripción beta.
- APC:** Células presentadoras de antígenos.
- CTLA-4:** Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos.
- DC:** Células dendríticas.
- IDO:** Indolamina 2,3-d ioxigenasa.
- MHCII:** Complejo mayor de histocompatibilidad dos.
- MHCI:** Complejo mayor de histocompatibilidad uno.
- TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa.
- mTOR:** Diana de rapamicina en célula de mamífero.
- NK:** Células asesinas naturales
- TCR:** Receptor de células T.
- BCR:** Receptor de células B.
- CD8:** Linfocitos T citotóxicos.
- CD4:** Linfocitos T cooperadores.
- Treg:** Linfocitos T reguladores.
- nTreg:** Linfocitos T reguladores naturales.
- iTreg:** Linfocitos T reguladores inducidos *in vitro*.
- pTreg:** Linfocitos T reguladores periféricos.
- IgA:** Inmunoglobulina A.
- IgD:** Inmunoglobulina D.
- NFAT:** Factor nuclear del factor de transcripción.
- NF- κ B:** Factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de células B activas.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- CNS1:** Secuencia no codificante 1 de células T reg.
- CNS2:** Secuencia no codificante 2 de células T reg.
- CNS3:** Secuencia no codificante 3 de células T reg.
- TSDR:** Región desmetilada específica de células Treg.
- microRNA:** Micro ácidos ribonucleicos.

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.

DNMT: ADN metiltransferasa 1.

DNMT 3a: ADN metiltransferasa 3a.

DNMT 3b: ADN metiltransferasa 3b.

CpG: Región de citocinas y guaninas.

AP-1: Activador de la proteína 1.

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta cAMP.

STAT5: Traductor de señal y activador de transcripción 5.

TET: Proteína de translocación diez-once.

IPEX: Síndrome de desregulación inmune poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X.

Se: Selenio.

Secis: Selenocisteína.

Semet: Semelometionina.

GPx: Glutación peroxidasa.

CYP450: Citocromo P450.

IFN- γ : Interferón gama.

FELC: Células eritroleucemicas de Friend.

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

HPLC: Cromatografía de alto rendimiento.

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa

EDTA: Acido detilendiaminotetraacetico.

NCBI: Centro nacional para la información biotecnológica.

cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

Resumen

Los linfocitos T reguladoras (Treg) son células del sistema inmunológico con la capacidad de regular las respuestas activas del sistema inmunológico y promover la auto tolerancia. Estas células son encargadas de proveer tolerancia central y periférica a los organismos para hacer frente a moléculas propias y externas capaces de provocar un daño. El estudio de los mecanismos de diferenciación y expansión de las células Treg han tomado gran importancia derivado de sus características para ser diferenciadas *in vitro* a partir de linfocitos T naive en presencia de estímulos como IL-2, TGF- β , anti-CD3 y anti-CD28. Uno de los más grandes retos en el estudio de las células Treg están dirigido a encontrar protocolos que favorezcan la diferenciación, función y estabilidad de dichas células. El selenito de sodio es un micronutriente capaz de regular procesos epigenéticos como la metilación global del ADN el cual juega un papel fundamental en la diferenciación de células Treg. El objetivo de este trabajo es dilucidar el efecto que tiene el selenito de sodio en la diferenciación de células T reguladoras. Nosotros observamos que el selenito de sodio a una concentración de 2×10^{-6} M, no muestra efectos adversos en la viabilidad de las células precursoras de células Treg, así mismo, se obtuvo un ligero aumento en el porcentaje de células Treg en el tratamiento con todos los estímulos (anti-CD3, anti-CD28, IL-2, TGF- β y selenito de sodio), por lo contrario no se observó diferencia en la expresión de las desmetilasas de ADN TET2 y TET3. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con selenito de sodio, anti-CD3, anti-CD28, IL-2, TGF- β durante 6 días, favorece el porcentaje de células Treg, pero no muestra un efecto favorable en la expresión de las desmetilasas de ADN TET2 y TET3 de células Treg.

Palabras clave: PBMC, células Treg, TET2, TET3, selenito de sodio.

Abstract

Regulatory T lymphocytes (Tregs) are cells of the immune system with the ability to regulate active responses of the immune system and promote self-tolerance. These cells are responsible for providing central and peripheral tolerance to organisms to deal with their own and external molecules capable of causing damage, the study of the differentiation and expansion mechanisms of Treg cells has taken on great importance derived from their peculiar characteristic to be able to be generated *in vitro* from naive T lymphocytes and in the presence of stimuli such as IL-2, TGF- β , anti-CD3, and anti-CD28. One of the greatest challenges in the study of Treg cells is to find protocols that favor the differentiation, function, and stability of these cells. Sodium selenite is a micronutrient capable of regulating epigenetic processes such as DNA methylation, which plays a fundamental role in the differentiation of Treg cells. The objective of this work is to elucidate the effect that sodium selenite has as a micronutrient capable of regulating processes of T regulatory cells differentiation. We note that sodium selenite at a concentration of 2×10^{-6} M does not show adverse effects on the viability of precursor cells Treg cells, likewise, a slight increase in the percentage of Treg cells in the treatment it contains all the stimuli. (anti-CD3, anti-CD28, IL-2, TGF- β and sodium selenite), on the contrary, there was no difference in the expression of the DNA demethylases TET2 and TET3. Our results suggest that treatment with sodium selenite, anti-CD3, anti-CD28, IL-2, TGF- β for 6 days, favors the percentage of reg cells but does not show a favorable effect on the expression of the DNA demethylases TET2 and TET3 from Treg cells

Keywords: PBMC, Treg cells, TET2, TET3, sodium selenite.

1. Introducción

El sistema inmunológico se conforma de células, órganos y tejidos que desarrollan mecanismos de defensa con el objetivo de proteger a los organismos contra moléculas externas y propias, capaces de generar daño. Se clasifica en dos principales tipos:

1.1 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato, también denominada respuesta inmune innata. Es el primer mecanismo de defensa en activarse y es considerado una respuesta inespecífica. La respuesta inmune innata está constituida por barreras físicas y químicas que impiden el paso como primer bloqueo de agentes nocivos al organismo. En la respuesta inmune innata participan cierto grupo de células que se encargan de contener al antígeno a través de distintos mecanismos como la fagocitosis y citólisis, entre otros. Dentro de las células que conforman el sistema inmune innato se encuentran los neutrófilos, eosinófilos y basófilos (polimorfonucleares), que presentan gránulos en el citoplasma que contienen entre otras cosas, enzimas que son liberadas durante algunos eventos de reacciones alérgicas o en infecciones. Otro grupo celular de la respuesta inmune innata son los monocitos y macrófagos (mononucleares), capaces de fagocitar y sintetizar hidrolasas y peroxidasa promoviendo la muerte celular. Así mismo, participan las células dendríticas. Este grupo actúa principalmente, como agentes que captan y presentan a los antígenos ante otros tipos celulares para activar mecanismos de destrucción contra los organismos nocivos. Finalmente las células asesinas naturales (NK), células con potencial citotóxico contra células potencialmente patógenas (Abbas *et al.*, 2014; Calame *et al.*, 2016; Vivier *et al.*, 2011).

1.2. El sistema inmune adaptativo

Es caracterizado por reconocer patógenos de manera altamente específica gracias a la presencia de receptores (TCR y BCR principalmente) en linfocitos, así mismo. En la respuesta inmune adaptativa es posible la generación de células de memoria, que permiten incrementar la velocidad de respuesta contra patógenos en el caso de existir un segundo evento de contacto con el agente patógeno.

En la respuesta inmune adaptativa, participan células especializadas, capacitados para de generar moléculas de defensa específicas denominados anticuerpos, así como diferenciarse en células con funciones de memoria, defensa y regulación. Cabe resaltar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que en la respuesta inmune adaptativa también participan células del sistema inmune innato (macrófagos, células dendríticas, etc.), estas encargadas de presentar antígenos a los linfocitos (T y B), favoreciendo así la generar anticuerpos (IgA, IgE, IgG, IgD e IgM) por las células B plasmática. La generación de anticuerpos induce señales para diferenciar a los linfocitos T en linfocitos específicos, tal como los linfocitos T citotóxicos CD8+ (conformados para destruir células dañadas mediante la generación de perforinas), los linfocitos T cooperadores CD4+ (que favorecen la proliferación de linfocitos T y la activación de linfocitos B) y los linfocitos T reguladores (con actividad reguladora de los mecanismos de defensa y promotores de la tolerancia inmunológica) (Cheng & Anderson, 2012; Hamon & Quintini, 2016; Shuai *et al.*, 2016).

Como una alternativa que potencie la actividad del sistema inmunológico, se ha propuesto el uso de micronutrientes, tal es el caso del selenio (Se), un oligoelemento de gran importancia para los organismos vivos. El selenio está presente en una gran variedad de compuestos biológicos los cuales forman parte de la dieta humana como la carne vacuna, de aves, porcina, huevos, derivados lácteos, cereales y pan. El selenio forma parte de aminoácidos selenocisteína (Secis) y selenometionína (Semet) principalmente. En su estructura original el selenio sustituye al azufre de la cisteína y metionina para formar los aminoácidos Secis y Semet (Fig. 1) que a su vez forman parte de las selenoproteínas, mediante las cuales el selenio desarrolla sus funciones en los humanos (Thiry *et al.*, 2013).

Las selenoproteínas son proteínas que contienen residuos de Secis codificadas por el codón UGA, en los seres humanos se han identificado alrededor de 25 genes que codifican selenoproteínas, por ejemplo, el glutatión peroxidasas con función catalítica de H₂O₂, las tioredoxinas reductasas con actividad de oxidorreductasa y como cofactores y las yododironinas desodinasas que favorecen la conversión de T4 y T3 que participan en patologías como la Tiroiditis autoinmune. Por tal motivo desempeñan funciones en el sistema inmunológico de gran relevancia (Lockitch, 1989; Combs, 2001; Lu & Holmgren, 2009; Uğuz *et al.*, 2009; Weeks *et al.*, 2012).

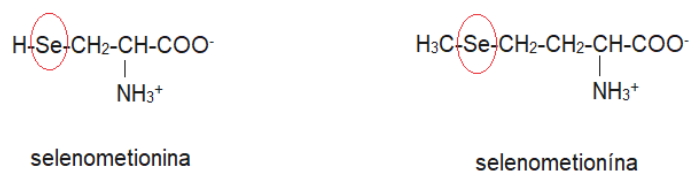


Figura 1. Selenoproteínas. El selenio es un elemento constitutivo estructural de las selenoproteínas como eslabón constitutivo de los aminoácidos (Tomado y modificado de Cațianis et al., 2020).

En este trabajo se pretende evaluar el efecto toxico del selenito de sodio sobre la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de donantes sanos y tratadas con selenito de sodio, así como la función del selenito de sodio como agente potencial en la diferenciación de células T reguladoras (Treg) y de la expresión de los marcadores CD4+CD25+Foxp3+) de células Treg. De igual manera se busca evaluar la expresión de los genes TET2 y TET3 que codifican para las hipometilasas de ADN TET2 y TET3 de Treg, expuestas a selenito de sodio durante 6 días.

2. Antecedentes

2.1. Células T reguladoras

La tolerancia inmunológica central es un mecanismo que tiene lugar en el timo a través de la eliminación de las células autorreactivas generadas tras una falla en la tolerancia central, en dicho momento el cuerpo humano activa un segundo mecanismo de regulación (tolerancia periférica) dirigido por células denominadas linfocitos T reguladoras (Treg) cuya función es regular las respuestas activas del sistema inmunológico promoviendo la auto tolerancia (Sakaguchi *et al.*, 1995) Zenewicz *et al.*, 2010). Los linfocitos Treg también denominados células T reguladoras, están constituidas por tres principales grupos; 1) las células Treg naturales CD4+CD25+Foxp3+ (nTreg), generadas en el timo, 2) las células Treg periféricas CD4+CD25+Foxp3- (pTreg) con origen en nódulos linfáticos y tracto digestivo, a partir de células naive y tras la exposición a TGF- β e IL-2 principalmente (Chen *et al.*, 2003) (Saadoun *et al.*, 2011), y 3) las células Treg inducidas CD4+CD25+Foxp3- (iTreg), generadas *in vitro* a partir de células naive y en presencia de IL-2 y TGF- β principalmente, pueden ser utilizadas como tratamiento de enfermedades autoinmunes así como el rechazo a injerto (inmunoterapia) (Chen & Konkel, 2010) (Bilate & Lafaille, 2012).

2.2. Mecanismos de acción de las células T reguladoras

Los linfocitos Treg son capaces de implementar un entorno de equilibrio a través de distintos mecanismos de supresión los cuales pueden ser dirigidos al microambiente celular o dependientes del contacto con células diana.

Uno de los principales objetivos de los linfocitos T reguladores, es suprimir la proliferación de células T efectoras evitando respuestas autoinmunes derivadas de fallas y daños en el organismo, el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) actúa como un componente competitivo de CD28 en el ensamblaje a las proteínas B7 (CD80/CD86) principales moléculas de estimulación de las APC evitando la proliferación de células T efectoras (Bengsch *et al.*, 2017). Además, las células Treg pueden condicionar a las células dendríticas (DC) a través de la interacción entre CTLA-4 y CD80/CD86 mediante la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que actúa como inductor del catabolismo del triptófano generando metabolitos como leunurenin con potencial proapoptóticos suprimiendo la activación de células T efectoras, cabe destacar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que la expresión de IDO es dependiente de una elevada expresión de CTLA-4 en las células Treg (Grohmann *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2008).

Por otra parte, las células Treg actúan como agentes competitivos de la adquisición de la IL-2 con la finalidad de agotar por completo a este componente esencial para los linfocitos T efectores privándolos de la IL-2 que actúa como factor de crecimiento y desarrollo, este proceso se lleva a cabo a través de la cadena α del receptor de interleucina 2 (CD25) presente constitutivamente en células Treg propiciando así la apoptosis celular (Deaglio *et al.*, 2007).

Otro mecanismo de regulación está dirigido a la citólisis de linfocitos T mediante la secreción de moléculas que participan como agentes citotóxicos, por ejemplo, las granzimas A y B dependientes de perforina capaces de unirse a la membrana de la célula formando poros y permitiendo que las granzimas penetren y desarrollen su función citolítica en la célula. Se ha demostrado que las células nTreg presentan la granzima A y por lo contrario las células iTreg presentan granzima B (Grossman *et al.*, 2004; Gondek *et al.*, 2005).

También se ha visto que las células Treg son capaces de inhibir la proliferación de células dendríticas y macrófagos, así como de células T efectoras, debido a la secreción de interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). La IL-10 actúa como un agente inhibitorio en el proceso de la presentación antigénica reduciendo la interacción entre el complejo principal de histocompatibilidad dos (MHC II) y CD80/CD86 de células dendríticas, afectando la maduración de dichas células, al mismo tiempo es capaz de inhibir la producción de IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) secretados por macrófagos con función antiinflamatoria (Kingsley *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, se ha demostrado que TGF- β participa en la prevención de la autoinmunidad dado que posee propiedades antiproliferativas y antiinflamatorias, actúa como bloqueador de IL-15 la cual comprometiéndolo el crecimiento de células T CD8+ y modula la proliferación de células NK (Liu *et al.*, 2008).

2.3. Foxp3

Gracias a los avances en las investigaciones se ha logrado identificar que la participación del factor de transcripción Foxp3 es crucial para diferenciar células Treg, este factor constituye el marcador de mayor importancia como diferenciador fenotípico de los linfocitos Treg (Roncador *et al.*, 2005) (Toker *et al.*, 2013). Foxp3 está regulado por la expresión de su gen promotor *Foxp3* presente principalmente en células Treg,

siendo capaz de suprimir la expresión del factor nuclear de células T activadas (NFAT) que promueve la secreción de citocinas efectoras de linfocitos T como IL-2 y NFKB complejo que controla la transcripción del ADN principalmente, fungiendo como un controlador maestro en el desarrollo y actividad de los linfocitos Treg (awrence, 2009; Huehn *et al.*, 2009). De igual manera, promueve la activación CD25 y CTLA-4, moléculas de gran importancia en la regulación de la respuesta inmune como parte constitutiva de las células Treg (Wu *et al.*, 2006).

El factor de transcripción Foxp3 está constituido por 431 aminoácidos estructurada por cuatro dominios: Dominio Forkhead de unión al ADN, cremallera de leucina que participa en el proceso de dimerización, un dominio denominado dedo de zinc cuyas características aún siguen sin ser claras y un dominio N-terminal rico en prolina cuya función está dirigida a la supresión de los factores de transcripción NFAT y NFKB (Fig. 2) (Kim, 2009).

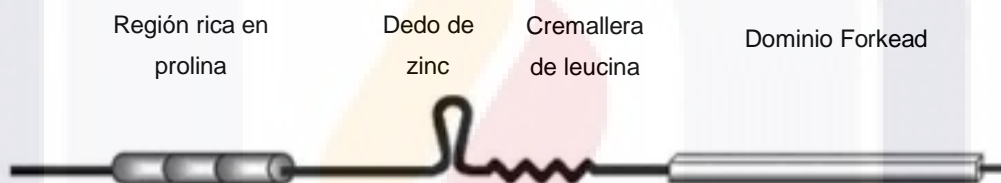


Figura 2. Estructura de la proteína Foxp3. La proteína Foxp3 codificada por el gen Foxp3, está constituida por 431 aminoácidos que conforman una región rica en prolina, dedo de zinc, cremallera de leucina y un dominio Forkhead (Tomado y modificado de Parias *et al.*, 2010).

El gen promotor del factor de transcripción Foxp3 es el gen *Foxp3*, situado en el brazo corto (p) del cromosoma X y cuya estructura está dada por 11 exones, así mismo presenta 3 regiones no codificantes (CNS) en el UTR 3' altamente conservadas evolutivamente que juegan un papel fundamental en la expresión estabilidad y función de las células Treg. Dichas regiones están constituidas por una región promotora, una región CNS1 involucrada en la generación de células pTreg en la periferia, la región CNS2 involucrada en la expresión y estabilidad de Foxp3, también denominada TSDR y la región CNS3 la cual está estrechamente relacionada con la diferenciación de células nTreg (Feng *et al.*, 2014; Karl *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2010) (Fig. 2a).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los estudios han demostrado que dichas regiones (CNS) se encuentran reguladas por marcas epigenéticas como la acetilación, metilación y fosforilación de histonas que regulan la compactación de la cromatina generando la relajación de la cromatina favoreciendo la expresión de genes o por lo contrario una cromatina compacta evitando la expresión de genes y la activación del mecanismo de transcripción a través de la unión de grupos fosfatos a los residuos de Serina, Treonina y Tirosina respectivamente. El mecanismo de metilación del ADN se lleva a cabo por las enzimas ADN Metil transferasas (DNMT), la DNMT1 responsable del mantenimiento de la metilación y DNMT3a/DNMT3b encargadas de la metilación de *novo* (Kazantsev, & Thompson, 2008; Lourt & Sassone, 2003; Martens *et al.*, 2009; Mentch, *et al.*, 2015; Pechalrieu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2008).

2.4. Región CNS2/TSDR

La secuencia no codificante 2, también denominada región desmetilada específica de células T reguladoras (TSDR), es una región de vital importancia ya que se encuentra involucrada en el mantenimiento de la expresión y estabilidad de Foxp3 de las células Treg. Esta región se caracteriza por presentar 14 regiones CpG, las cuales cuatro se encuentran desmetiladas en células nTreg (CpG9, CpG12, CpG13 y CpG14) (Fig. 2b). Así mismo, esta región concentra zonas de interacción a distintos factores de transcripción que forman parte del mecanismo de expresión y estabilidad de las células Treg tales como AP-1, CREB, STAT5, GATA3, Ets1 y Foxp3 (Fig. 2b) (Baron *et al.*, 2007; Polansky *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014).

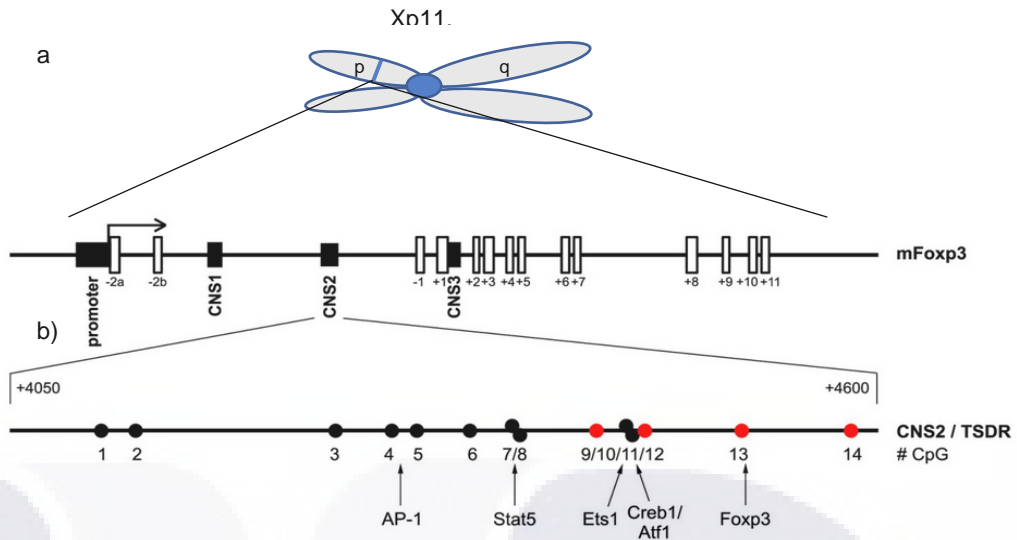


Figura 3. Estructura del gen Foxp3. Estructura del gen promotor de FOXP3 y ubicación del gen y conformación de la proteína (dominios) (Tomado y modificado de Karl M et al., 2019).

2.5. TET2 y TET3

La región CNS2 presenta la región Foxp3/TSDR que se encuentra desmetilada en células nTreg, este proceso de desmetilación es catalizado de manera activa por las dioxigenasas de metilcitosina de la familia de translocación diez once (TET). Las proteínas TET son enzimas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe (II) capaces de oxidar la 5-metilcitosina en 5-formilcitosina, 5-hidroximetilcitosina y 5-carboxilcitosina, es decir, las proteínas TET participan como un agente hipometilador del ADN añadiendo una citocina no metilada lo cual favorece la expresión y estabilidad de las células Treg (Nair et al., 2016).

Por tal motivo las proteínas TET2 y TET3 tienen la capacidad de generar la conversión de 5-metilcitosina en diferentes productos como 5-hidroximetilcitosina lo que resulta en la desmetilación específica del TSDR de Foxp3 de células Treg promoviendo la estabilidad y correcta expresión del factor de transcripción Foxp3. Así mismo se ha demostrado que TET2 es un elemento esencial que favorece la desmetilación del (CNS2) en el desarrollo de células Treg principalmente en etapas tempranas (Nair & Oh, 2014; Yang et al., 2015).

Así mismo se ha demostrado que la transferencia adoptiva de Treg carentes de TET2 y TET3 inhibió la expresión de Foxp3 provocando y la conversión en células productoras de IL-17 (Nakatsukasa et al., 2019).

2.6. Células T reguladoras en enfermedades y procesos autoinmunes

Las células Treg son parte esencial del cuerpo humano como factor regulador de la respuesta inmune, favoreciendo la tolerancia inmunológica. Cuando el organismo presenta algún tipo de alteración en su funcionamiento las células Treg tienden a disminuir perdiendo la capacidad de regulación en el sistema inmunológico lo que puede resultar en padecimientos autoinmunes (Ferguson *et al.*, 2000). En la última década el estudio de los procesos de regulación, diferenciación y generación de las células Treg ha tomado gran relevancia derivado del papel que desarrollan en el control y retraso de enfermedades autoinmunes, procesos inflamatorios y en la prevención en el rechazo a injertos (Trenado *et al.*, 2006). Los primeros trabajos cuya tarea de estudiar las alteraciones en *Foxp3* con repercusiones en padecimientos autoinmunes se han realizado en modelos animales, específicamente en ratones que presentaban una mutación espontánea, ligada al cromosoma X del gen *Foxp3* denominado Scurfy y cuya alteración es asignada a la ausencia de células Treg y que resulta en inflamación multiorgánica, especialmente en la piel, el pulmón y el hígado (Godfrey *et al.*, 1991).

En humanos también se reportado las implicaciones de las células Treg en padecimientos autoinmunes. El síndrome de inmunodesregulación poliendocrinopatía enteropática ligada al cromosoma X (IPEX) en humanos, es un claro ejemplo de dichas alteraciones derivadas de una serie de mutaciones en el gen *FOXP3* (17-20-cM en Xp11.23 –Xq13.3) en células Treg caracterizado por el desarrollo de trastornos autoinmunes que afecta las glándulas endocrinas (Bennett *et al.*, 2000).

La *Diabetes Mellitus* tipo I es considerada una patología autoinmune cuya afección se basa a la auto destrucción de las células β pancreáticas, en esta enfermedad se ha identificado que las células Treg carecen de función y el porcentaje de reguladoras es reducido lo que desencadena un aumento de citocinas proinflamatorias (Kukreja *et al.*, 2002). De igual manera, la tiroiditis autoinmune es otro padecimiento en el cual se produce un ataque del sistema inmunológico a la glándula tiroidea y la cual está presente en personas con el síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al cromosoma X (IPEX), reduciendo su actividad provocando hipotiroidismo, por lo contrario, la desregulación puede desencadenar el hipertiroidismo en el cual se ha identificado que la población de células Treg es reducida aumentando la gravedad de dicha patología (Ellis *et al.*, 2013).

En la esclerosis múltiple el sistema inmunológico ataca la mielina que recubre las fibras nerviosas, se ha demostrado que existe disminución de la expresión del mRNA y la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

proteína FOXP3 en los linfocitos Treg la cual desencadena alteraciones en la inmunoregulación siendo un factor capaz de propiciar la esclerosis múltiple. También se ha detallado que personas que padecen la enfermedad atópica, un padecimiento en la piel, caracterizada por una reacción de hipersensibilidad anómala inflamatoria y una excesiva producción de IgE, presentándose la disminución de células Treg conforme progresaba la enfermedad (Huan *et al.*, 2005) (Su *et al.*, 2017).

2.7. Importancia de las células T reguladoras

El estudio de las células Treg ha permitido ampliar el conocimiento sobre su uso terapéutico con la finalidad de emprender tratamientos contra enfermedades autoinmunes un ejemplo de ellas es la enfermedad de Crohn en la cual se ha observado que el uso transferencia adoptiva con Treg es capaz de controlar el proceso inflamatorio y restituir la estructura de la mucosa intestinal (Park *et al.*, 2005).

De acuerdo con la Asociación de Industrias de Investigación Farmacéutica, se han identificado más de 80 tipos de enfermedades autoinmunes tales como Lupus Eritematoso Sistémico, Tiroiditis de Hashimoto entre otros, sobre las cuales se sigue trabajando en la búsqueda de tratamientos eficaces para contrarrestar las patologías y sus efectos secundarios. Derivado de las características que engloban el funcionamiento de los linfocitos Treg, los investigadores dirigen su atención en el uso de la terapia a base de citocinas y células Treg con el objetivo de manipular dichas células como transferencia adoptiva. Al mismo tiempo es de gran importancia considerar la existencia de limitantes que potencien la inmunoterapia con Treg como los procesos de diferenciación que otorguen mayor estabilidad funcional y la pureza a las células, algunos autores han descrito que el compromiso del linaje de las células Treg puede desaparecer como consecuencia de condiciones ambientales y el estado de salud e incluso es posible que las células puedan convertirse de células CD4+Foxp3+ a CD4+Foxp3-.

En los procesos de trasplantes de órganos, uno de los objetivos primordiales es inmunosuprimir a los pacientes con la finalidad de evitar una reacción de rechazo hacia el órgano o tejido, este proceso es un tratamiento crónico el cual puede desencadenar efectos secundarios ya que el sistema inmune del paciente es inmunocompetente ante la aparición de otras patologías las cuales podrían causar su muerte. Aunado a esto la ingesta de medicamentos como micofenolato y metilprednisolona (inmunosupresores) utilizados como tratamientos para el trasplante de tejidos y órganos, pueden generar disrupción metabólica impidiendo su correcta eliminación y favoreciendo enfermedades

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como la nefropatía crónica por aloinjerto y morbilidad cardiovascular como un efecto secundario de la ingesta de dichos medicamentos (Trenado *et al.*, 2003; Sánchez, 2005; Scottà *et al.*, 2016; AMIIF, 2018).

Si bien hoy en día existen terapias a base de citocinas y células con esperanza prometedora en el campo de la inmunoterapia, se precisa necesario la búsqueda de mecanismos que potencien los aspectos negativos de dichas técnicas con mejoras sustanciales. Uno de los grandes retos para la investigación en el campo de las células Treg y en específico con las células iTreg está dirigido a la expresión y estabilidad de su regulador maestro Foxp3. Las iTreg tienen una gran diferencia con respecto a las nTreg la cual se evidencia por la expresión estable de Foxp3 y la desmetilación de la región conservada TSDR. Una razón a la cual se le podría atribuir la inestabilidad de iTreg está dirigida a los procesos y patrones de heredabilidad que se producen durante la generación intratímica la cual no se suscitan durante la generación *in vitro* (Flooss *et al.*, 2007)

Polansky y colaboradores en el 2008 describieron que células iTreg generadas a partir de células *naïve* de ratones reporteros Foxp3-GFP C57BL / 6 estimuladas con anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 en presencia o ausencia de TGF- β durante 15 días, perdían la expresión de Foxp3 sobre todo en aquellas células re-estimuladas a los 10 y 15 días en ausencia de TGF- β . Así mismo, se observó un aumento en la metilación del TSDR en relación con la pérdida de la expresión de Foxp3 y una disminución en la actividad transcripcional del TSDR metilado en comparación con un TSDR no metilado, mediante un ensayo de luciferasa, mostrando que la generación de células iTreg a través del estímulo con TGF- β no es suficiente para regular la expresión y estabilidad de las células iTreg y que el grado de metilación está estrechamente relacionado con la expresión y la actividad transcripcional del TSDR.

Como una alternativa biológica, se ha demostrado que el uso de micronutrientes que forman parte de la dieta nutricional en conjunto con factores ambientales, son capaces de regular distintos procesos epigenéticos, Sasidharan, Hye e Ik en el 2016 evaluaron el efecto de la vitamina C sobre la desmetilación de *Foxp3*, mediante la generaron células iTreg a partir de nódulos linfáticos y bazo de ratones machos Transgénicos Foxp3-GFP de tipo salvaje y floxados para TET2, tratadas a diferentes concentraciones de Vitamina 1, 10 y 100 mg/ml lo que resultó en un aumento en la desmetilación específica del CNS2 a una concentración de 10 mg/ml evaluada mediante secuenciación con bisulfito con una elevada expresión y actividad de TET2 en comparación con células no tratadas con Vitamina C, así mismo se observó una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

correlación positiva entre el grado de desmetilación, la expresión de TET2 y el tratamiento con Vitamina C. Esto demostró que un micronutriente como la vitamina C es capaz de regular procesos epigenéticos, en específico, desmetilar la región CNS2 de foxp3 de una manera dependiente de TET2, sin embargo, en dicho análisis no se re-estimulo en ausencia de vitamina C con el objetivo de evaluar si la desmetilación del CNS2, actividad y expresión de TET2 logra estabilizarse.

Los estudios previos que describen el uso de micronutrientes como alternativas de regulación en procesos biológicos y sobre todo en el sistema inmunológico, han dirigido el enfoque al papel que desarrolla el selenio.

2.8. El Selenio y su participación en procesos redox y en el metabolismo celular

El selenio es un elemento que participa en el metabolismo celular y en la regulación del estado oxidativo, tal característica fue descrita en ratones suplementados con selenio, resultando en una disminución de la enzima GPx, la cisteína y la isoenzima del citocromo P450 (CYP450), además de presentarse un aumento en la actividad de la enzima UDP, afectando el proceso de biotransformación y excreción de agentes potencialmente dañinos para el organismo en ratones carentes de Se. Así mismo se ha informado que la suplementación con 200 µg de selenito de sodio redujo significativamente las concentraciones de los anticuerpos de la peroxidasa tiroidea después de 3 meses de tratamiento, este patrón se repitió a los seis meses de ingesta. Resultados similares se mostraron en un estudio realizado a personas con tiroiditis autoinmune, tras la suplementación con 86 µg de selenometionína (Seme), se observó una reducción de los niveles de hormona estimulante de la tiroides (TSH) en comparación a los individuos no suplementados con Seme (Davis & Uthus, 2002; Duntas *et al.*, 2003, Pace *et al.*, 2020).

Estos resultados demuestran que la deficiencia de selenio propicia un aumento de radicales libres generando un efecto nocivo al no eliminar los metabolitos resultantes como el peróxido de hidrógeno, que se forma como consecuencia de la oxidación celular, esto se presenta con frecuencia como un efecto de las enfermedades autoinmunes y como consecuencia de los tratamientos.

2.9. Selenio y su actividad en el sistema inmunológico

Estudios realizados han demostrado que el selenio influye en la respuesta inmunológica a través de la modulación de procesos inflamatorios y en la proliferación de células del sistema inmune con capacidad reguladora como linfocitos Treg. Así mismo es capaz de

suprimir procesos inflamatorios con el objetivo de mantener la homeostasis del organismo, esta propiedad fue evaluada en pacientes con Tiroiditis de Hashimoto, dicha enfermedad se ve acompañada de una condición de hipotiroidismo. Los resultados mostraron una reducción de la proteína C reactiva y un aumento en el grado de inflamación, así mismo se observó un aumento de anticuerpos antitiroideos y se redujo de manera significativa la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-2 e IFN- γ .

En células Treg, se evaluó el efecto del SE en colitis crónica en ratones suplementados con selenato de sodio, se demostró una mayor expresión de IL-10 con capacidad antiinflamatoria y de FOXP3 por las células, así como una reducción significativa de citocinas proinflamatorias COX-2 y TNF α , hasta un 70% en comparación al grupo control, citocinas tales como COX-2 y TNF α , en un 70% en comparación al grupo control. Aunado a esto, se ha demostrado que el selenio en forma de selenito de sodio tiene la capacidad de inducir la producción de hemoglobina en células eritroleucémicas de Friend (FELC) puesto que al administrar una dosis de 20 μ M, el 70-80% de las células son capaces de producir hemoglobina (Krysiak & Okopien, 2011; Ahsan *et al.*, 2014; Morikawa *et al.*, 2014; Sang *et al.*, 2017).

Es posible evidenciar el papel fundamental que juega la presencia del SE como un elemento capaz de modular y contrarrestar el proceso de inflamación mediante la reducción en la producción de citocinas con potencial proinflamatoria, así como favorecer la expresión de citocinas antiinflamatorias y promover la generación de células capaces de modular respuesta exacerbada del sistema inmune generadas por un desequilibrio en el organismo como lo son las células Treg. Cabe destacar que a pesar de los resultados que demuestran los beneficios del uso de Se en distintos procesos, existe desconocimiento de los mecanismos mediante los cuales el Se potencia la diferenciación y función de células Treg.

2.10. Selenio en la proliferación de células del sistema inmune

Dentro de las diversas funciones descritas del selenio, se ha demostrado que favorece la proliferación de las células del sistema inmunológico. Sun *et al.*, (2017), informaron que el tratamiento de células precursoras de células dendríticas con selenito de sodio 10^{-7} mol/L, promueve la diferenciación y maduración de células dendríticas de aves.

En otro ensayo, se registraron datos similares en pacientes que padecían VIH tratados con 50 selenio de levadura, resultó un aumento de la población de células T CD4+ en comparación al grupo control (Otieno, 2017). Es imprescindible recordar que, al decrecer

la población de células del sistema inmune, es probable que se desencadenen eventos desfavorables de defensa sistema inmunológico. Se ha evidenciado que la deficiencia de selenoproteínas en ratones propicia desencadena la disminución significativa la población de células T y células CD3+ hasta un 50% en el, de igual forma una función deficiente de células T CD8+ en el mismo órgano linfoide (Shrimali *et al.*, 2008). De igual forma, se observaron resultados similares en un trabajo el cual mostró una menor cantidad de células T maduras en comparación con el grupo control suplementado con selenoproteínas, así como una respuesta inmune deficiente de las células T (Kitagawa *et al.*, 2015). De manera similar, se registraron datos en un modelo de esplenocitos porcinos suplementados con selenito de sodio, aumentaron un 19% de células CD3+ en comparación con el control (Ren *et al.*, 2012).

EL conjunto de estos resultados sugiere que la ausencia del selenio en el organismo, es un factor que puede influir en la deficiencia en cantidad y función de las células del sistema inmune y sobre todo, se evidencia que la presencia de la población de células T se reduce de manera significativa, mostrando la función del selenio como agente capaz de favorecer la proliferación de células involucradas en la respuesta inmune y que en ausencia de selenoproteínas es posible una maduración deficiente de linfocitos T, así como una respuesta inmunológica deficientes y reducida, incapaz de proteger al organismo de agentes que puedan generar patologías en el organismo.

2.11. Selenio y su participación en procesos epigenéticos en células del sistema inmunológico

La epigenética, muestra los cambios heredables producidas por las modificaciones o rearrreglos en la estructura del ADN, dichas modificaciones son capaces de generar alteraciones en la expresión de genes y por consiguiente en las funciones y fenotipo de los humanos, la metilación del DNA es una de ellas, (Martens *et al.*, 2009), las modificaciones en las histonas como la acetilación, metilación y fosforilación (Kazantsev, & Thompson, 2008).

La adición de los grupos metilo está dirigida principalmente a los dinucleótidos Citocina-Guanina denominadas islas CpG presentes en las regiones promotoras de genes (Jin *et al.*, 2007). La metilación del ADN en las regiones promotoras de genes, este proceso se ha asociado con la supresión de la expresión de genes derivado del bloqueo de zonas de unión de factores de transcripción, sin embargo, el proceso de metilación es un proceso dinámico y puede revertirse que es completamente reversible y puedan ser tratados a través de fármacos y diferentes compuestos biológicos (Teperino *et al.*, 2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Uthus *et al.*, (2006), reportaron que ratas Fischer-344 suplementadas con 0.2 mg/kg de selenito mostraron una disminución en la actividad de la ADN metiltransferasa en comparación al grupo control.

Así mismo se ha demostrado que el selenio promueve la hipometilación del ADN. Tal es el caso del trabajo realizado por Armstrong *et al.*, (2011), en el que se evaluó la función del selenio como suplemento posnatal en un modelo murino mediante la técnica optimizada de HPLC. El resultado obtenido resultó en una reducción significativa ($P = 0,009$) de la metilación del ADN en muestras de hígado del ratón. Resultados similares se informaron por Metes-Kosik *et al.*, (2012) en el que se mostró que ratones adultos C57 / BL6 con dieta suplementada (0.5 mg / kg) de selenito de sodio, disminuye significativamente la actividad de la metiltransferasa del ADN y la metilación del ADN global.

Más tarde De Miranda *et al.*, (2014), informaron que células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 tratadas con selenito de sodio (10 $\mu\text{mol/L}$), bloquean la actividad de la DNMT1 de manera dependiente de la concentración de selenito de sodio.

El estudio de las funciones del selenio ha tomado un gran realce debido a las grandes aportaciones y ventajas contra distintas patologías, se ha reportado que en células Caco-2, una línea celular de cáncer de colon y en ratas Fischer 344 que no son tratadas con selenita muestran hipometilación en comparación con las células que si se trataron con el compuesto de selenio demostrando que el tratamiento con selenio afecta el proceso de metilación inhibiéndolo. Por otro lado, en el tratamiento epigenético de carcinogénesis se evaluó el uso de selenio el cual redujo la expresión de la enzima DNMT1 favoreciendo la expresión de la acetona de histona H3. Se ha reportado que los compuestos de selenio en su forma orgánica (ácido metilselenínico [MSA] y selenito) muestran efectos inhibitorios en eventos epigenéticos en células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. MSA mostró capacidad de disminuir la expresión de la histona metilasa H3K9me3 y por lo contrario aumentar la expresión de la histona acetilasa H4K16ac, mientras que el selenito disminuye H4K16ac. Ambos compuestos de selenio inhiben la expresión de DNMT1 (Davis *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2013; De Miranda *et al.*, 2014)

Un trabajo realizado por Xiang *et al.*, 2008 determinó la actividad del selenio en células LNCaP de cáncer de próstata, en el cual mostraron que el tratamiento con selenita genera desmetilación parcial del ADN del promotor, inhibe la expresión y función de las enzimas metiltransferasas DNMT1 y DNMT3A, así como los niveles de proteína de DNMT1. De igual forma la selenita también afectó la actividad de la histona deacetilasa

al disminuir su actividad y aumentó los niveles de lisina 9 acetilada en la histona H3 (H3-Lys 9), pero disminuyó los niveles de H3-Lys 9 metilada, además el tratamiento con selenita redujo la metilación general del ADN. Se demuestra entonces que él Se es capaz de regular a través de cambios epigenéticos a las histonas y al ADN contribuyendo a la activación de genes silenciados por metilación.

2.12. El selenio y su función en células Treg

Una vez identificado que las modificaciones epigenéticas son parte esencial de la regulación de Foxp3 (Huehn & Beyer, 2015), los trabajos apuntan a un mayor conocimiento de esta característica puesto que se ha demostrado que al no encontrarse presente Foxp3 puede afectar severamente en estado físico de los organismos afectando los procesos de diferenciación de los linfocitos Treg y por ende la regulación de las respuestas inmunológicas, dicha característica se demostró en un experimento realizado en ratones carentes de Foxp3 neonatos, carecen de función inmunoreguladora y esta función es capaz de transferirse a ratones con dicha carencia al transferir células Treg (Fontenot *et al.*, 2003). No solamente la transferencia adoptiva con células Treg podría ser un objetivo como solución a los padecimientos que pudieran propiciarse a causa de una alteración, sino también el tratar de reestablecer las poblaciones mediante compuestos biológico como el selenio ya que Xue *et al.*, (2010), identificaron que el selenio es capaz reestablecer la población de células Treg después de haber realizado un experimento en ratones NODH2H4 tratados con 0.3 mg/kg de selenito de sodio y mostrando que porcentaje de células Treg así como la expresión de ARNm de Foxp3 incrementan posterior al tratamiento con selenio.

Se conoce poco sobre la participación que el selenio pudiera tener sobre la regulación de los cambios epigenéticos en células. Las modificaciones epigenéticas como metilación del ADN y la acetilación y metilación de histonas están dirigidas en concreto a las tres secuencias altamente conservadas no codificadas cuya participación es crucial para la regulación de Foxp3 (Göschl *et al.*, 2019). En el locus Foxp3 existen elementos cis-reguladores (regiones no codificantes) y trans reguladores (regiones reguladoras), aunado a los factores trans que se unen al promotor de Foxp3, el nivel de metilación en las islas CpG del promotor son esenciales para la expresión de foxp3 (Zom *et al.*, 2006).

Es posible inferir a través de los datos obtenidos de los trabajos reportados, que él selenito de sodio podría favorecer la reestructuración de poblaciones de células Treg

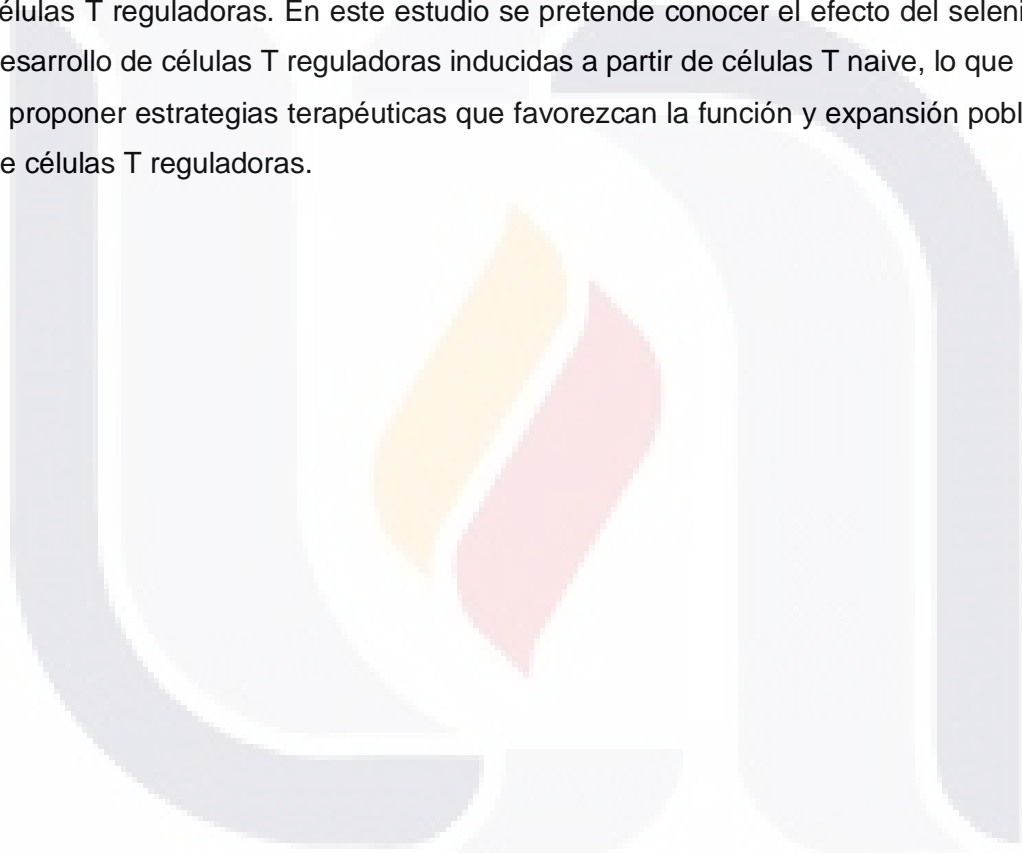
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mediante la regulación positiva de la expresión de Foxp3 a través de la metilación en el ADN, que la expresión de Foxp3 es indispensable para la correcta función moduladora de las células Treg y que en su ausencia esta función podría ser deficiente e incluso nula.



3. Justificación

Es de gran relevancia identificar factores que favorezcan la inducción de células Treg *in vitro*, ya que el desarrollo de protocolos que aceleren su diferenciación favorecerá su estabilidad fenotípica y función reguladora, serían una estrategia terapéutica prometedora para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes e inflamatorias. A pesar de que se conoce que el uso de selenio en algunos padecimientos autoinmunes resulta en el incremento del porcentaje de células T reguladoras, hasta el momento no han sido descritos los efectos de selenio sobre la diferenciación, estabilidad y función de las células T reguladoras. En este estudio se pretende conocer el efecto del selenio en el desarrollo de células T reguladoras inducidas a partir de células T naive, lo que llevaría a proponer estrategias terapéuticas que favorezcan la función y expansión poblacional de células T reguladoras.



4. Hipótesis

El selenio promueve la diferenciación, estabilidad fenotípica y mejora la función de células T reguladoras inducidas.



5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del selenio sobre los procesos de diferenciación y estabilidad de células T reguladoras inducidas.

5.2. Objetivos específicos

- Colectar sangre periférica de donadores sanos
- Purificar células mononucleares de sangre periférica con un gradiente de ficoll.
- Analizar de la toxicidad del Selenito de sodio en PBMC a las 24, 72 y 144 horas.
- Evaluar el efecto del selenito de sodio la activación de células mononucleares de sangre periférica.
- Purificar T naive a partir de PBMC con columnas magnéticas para generar células iTreg a partir de células T naive en presencia de IL-2, TGF-Beta y Selenito de sodio.
- Determinar la expresión de los genes TET2 y TET3 en PBMC y células T reguladoras mediante RT-qPCR.

6. Metodología

6.1. Toma de muestras de sangre venosa periférica

Se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica de personas sanas de entre 24 y 30 años (6 ml) en tubos vacutainer con EDTA para la conservación del contenido sanguíneo completo. La muestra se procesó inmediatamente después de la obtención para mejores resultados.

6.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Para la correcta separación de las PBMC, las muestras de sangre se colectaron en tubos vacutainer con EDTA (para conservar la integridad total de la sangre), se diluyó 1:1 con PBS 1X con el objetivo de que la sangre pueda separarse correctamente en sus diferentes capas, para obtener un total de 12 ml de sangre diluida. Posteriormente se colocaron 3 ml de Ficoll-Hypaque en un tubo de 15 ml a la cual se le adicionaron 6 ml de sangre diluida, se centrifugaron por 20 minutos a 2500 rpm. Se separó la capa de PBMC evitando tocar la capa de Ficoll-Hypaque y de plasma. Las PBMC se lavaron con 10 ml de PBS 1X centrifugando por 10 minutos a 1500 rpm. Finalmente, se resuspendieron en 1 ml de medio completo (medio RPMI, estreptomicina, suero bobino fetal). El conteo de las PBMC se utilizó azul de tripano en una dilución 1:10 con la suspensión celular (90 μ l de azul de tripano y 10 μ l de suspensión celular). El cálculo realizado para la obtención de células fue el siguiente:

Células totales = (Total de células contadas) \div (cuadrantes contados) (10) (10,000) (2).

Nota: cabe destacar que las muestras se procesaron por duplicado.

6.3. Purificación de células CD4+

Para la obtención de las células CD4+ se realizó la separación mediante inmunomarcaje con columnas magnéticas (CD4+ T Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec).

6.4. Preparación de Selenito de sodio

Se pesaron 100 ml de selenito de sodio diluido en medio incompleto de RPMI (0.0086 gr de selenito de sodio, 100 ml de medio incompleto de RPMI) filtrado a 0.2 micras, para obtener una concentración stock de 5×10^{-4} a partir de la cual se utilizaron las concentraciones de 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M, utilizando 1×10^6 células/ml. Para la

segunda evaluación se utilizaron las concentraciones de 5×10^{-7} M, 2.5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M partiendo de la solución stock a una concentración 5×10^{-4} M.

6.5. Cultivo de PBMC y células CD4+ con Selenito de sodio

Para el cultivo PBMC se colocaron un total de 1×10^6 células/ml en tubos de cultivo celular de 5 ml (12 tubos), divididos en 4 concentraciones diferentes (1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M) y para la segunda evaluación (2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M) las cuales se evaluaron a las 24, 72 y 144 horas. El cultivo celular se realizó a 37°C y CO_2 al 5%. Para el cultivo de células CD4+ se colocaron 1×10^6 células/ml en tubos de cultivo celular de 5 ml (8 tubos), divididos en 4 tratamientos diferentes: Control: 1×10^6 células/1ml, 4×10^6 perlas (anti-CD3/anti-CD28)/ml. Tratamiento 1: 1×10^6 células/1ml, 4×10^6 perlas (anti-CD3/anti-CD28)/ml, IL-2 (0.2ng/ml) y TGF- β (5ng/ml). Tratamiento 2: 1×10^6 células/1ml, 4×10^6 perlas (anti-CD3/anti-CD28)/ml, IL-2 (0.2ng/ml), TGF- β (5ng/ml) y selenito de sodio (2×10^{-6} M), Tratamiento 3: 1×10^6 células/1ml, 4×10^6 perlas (anti-CD3/anti-CD28)/ml y selenito de sodio (2×10^{-6} M) durante 6 días, se realizó el cambio de medio al día 3, se retiró 500 μl del sobrenadante y se añadieron 500 μl de medio completo más los estímulos iniciales a las concentraciones iniciales. El cultivo celular se realizó a 37°C y CO_2 al 5%.

6.6. Evaluación de la toxicidad (Anexina/Yoduro de propidio) y marcaje celular mediante citometría de flujo

Para realizar el análisis de apoptosis, se utilizó el kit de anexina y yoduro de propidio (Invitrogen), el marcaje se realizó durante tres periodos (24, 72, 144 horas) para evaluar su viabilidad, las células se lavaron con 1ml de PBS 1X y se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante, se agregó 500 μl de buffer de unión y se agitó, posteriormente se separaron en 5 tubos para cada tratamiento (sin marcar, 0.8 μl anexina, 0.8 μl anexina/ 5 μl yoduro de propidio, 5 μl yoduro de propidio y 1 μl CD69) y se agitaron en vórtex, las muestras se incubaron a 4°C en la oscuridad por 20 minutos, posterior a la incubación se agregaron 250 μl de buffer de unión y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante, finalmente se resuspendieron en 200 μl de buffer de unión y se evaluaron mediante citometría de flujo. Para la evaluación de los marcadores CD4, CD25 y Foxp3, se realizó el marcaje utilizando 250,000 células para cada evaluación, posteriormente se incubaron con 1 μl de CD4 y CD25 por 20 minutos a 4°C en la oscuridad, una vez concluido la incubación las células se lavaron con 1 ml de PBS 1X, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5

minutos y se decantó el sobrenadante, las células se permeabilizaron con 500 µl de buffer de fijación/permeabilización durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad y se lavaron en dos ocasiones con 1 ml de buffer de permeabilización, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se añadió 5 µl de Foxp3 y se incubaron a 4°C en la oscuridad por 30 minutos, las células se lavaron un par de ocasiones con buffer de permeabilización, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en el remanente y se adquirieron en el citómetro de flujo.

6.7. RT-qPCR

6.7.1. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos para TET2 y TET3, se realizó consultando la base de datos de NCBI y utilizando la herramienta de OligoAnalyzer Tool-primer analysis | IDT.

Cuadro 1. Secuencias de los oligonucleótidos para TET2 y TET3

Gen	Secuencia de oligonucleótidos
TET2 Forward	CCCAATCCAGTTAGTCCTTATC
TET2 Reverse	GCTTGAGATGAGGTGGAATAG
TET3 Forward	CCGTGCTATAATCTGCTCTG.
TET3 Reverse	CCTTCTCGACTTGCTTTGT.

6.7.2. Extracción de ARN

Para la extracción del RNA de las células tratadas con selenito de sodio durante 6 días, las células se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 ml de TRIzol y se mezcló en vórtex, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 250 µl de cloroformo, se incubó por 7 minutos y se centrifugó por 1300 rpm por 15 minutos a 4°C.

Se separó la fase acuosa y se agregó glicógeno grado biología molecular y 500 µl de isopropanol al 100% dejando incubar durante 24 horas a 20°C. Posterior a la incubación se centrifugó a 1300 rpm por 15 minutos a 4°C descartando el sobrenadante, se agregó

500 μ l de etanol al 75% y se centrifugó 1300 rpm por 15 minutos a 4°C dejando secar el pelle durante 7 minutos y se resuspendió en 25 μ l de agua libre de nucleasas y se realizó la cuantificación del RNA mediante lectura en nanodrop.

6.7.3. Síntesis de cDNA

Para la preparación del cDNA se utilizaron 20 μ l de RNA total, se realizó la preparación del Mix A 1X (1 μ l de Random primers a 50 ng, 1 μ l dNTPs [10 mM] y 10 μ l de muestra) en un volumen de 12 μ l, calentando a 65°C por 5 minutos, se pasó rápidamente a hielo. Para el Mix B 1X (4 μ l de first-strand Buffer 5x, 2 μ l de MDTT 0.1 y 1 μ l de RNaseout 40 u/ml). Se agregó el Mix B al Mix A y se incubó a 25°C por 2 minutos, se agregó 1 μ l de la enzima (SuperScript II RT Invitrogen). La reacción se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 25° por 10 minutos, 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos y 4°C indeterminado.

Para corrida de la qPCR, las muestras de cDNA se prepararon a una concentración de 75 ng/ml. Se agregaron 82 μ l del máster mix (5 μ l de iQ™ SYBR Green supermix (2x), 0.25 μ l de los oligonucleótidos forward y reverse y 2.5 μ l de H₂O), como control positivo se utilizó GAPDH (2 μ l), H₂O (2 μ l) como control negativo y 2 μ l de cDNA. Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes: 3 minutos para la activación de la polimerasa y desnaturalización a 95°C, 15 segundos para la desnaturalización, 40 segundos a 60°C para la alineación, extensión y lectura (3 segundos a 72°C) durante 40 ciclos y finalmente para el análisis de la curva Melt a 95°C por 30 segundos y 65°C por 30 segundos.

7. Resultados

En las células mononucleares de sangre venosa periférica cultivadas bajo el tratamiento con selenito de sodio durante 144 horas a concentraciones de 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M, se observó una disminución en el porcentaje de células conforme aumento la concentración de selenito de sodio, así mismo se observó un aumento en el porcentaje de células en etapa de apoptosis tardía, temprana y necrosis conforme aumento la concentración de selenito de sodio (Figura 4).

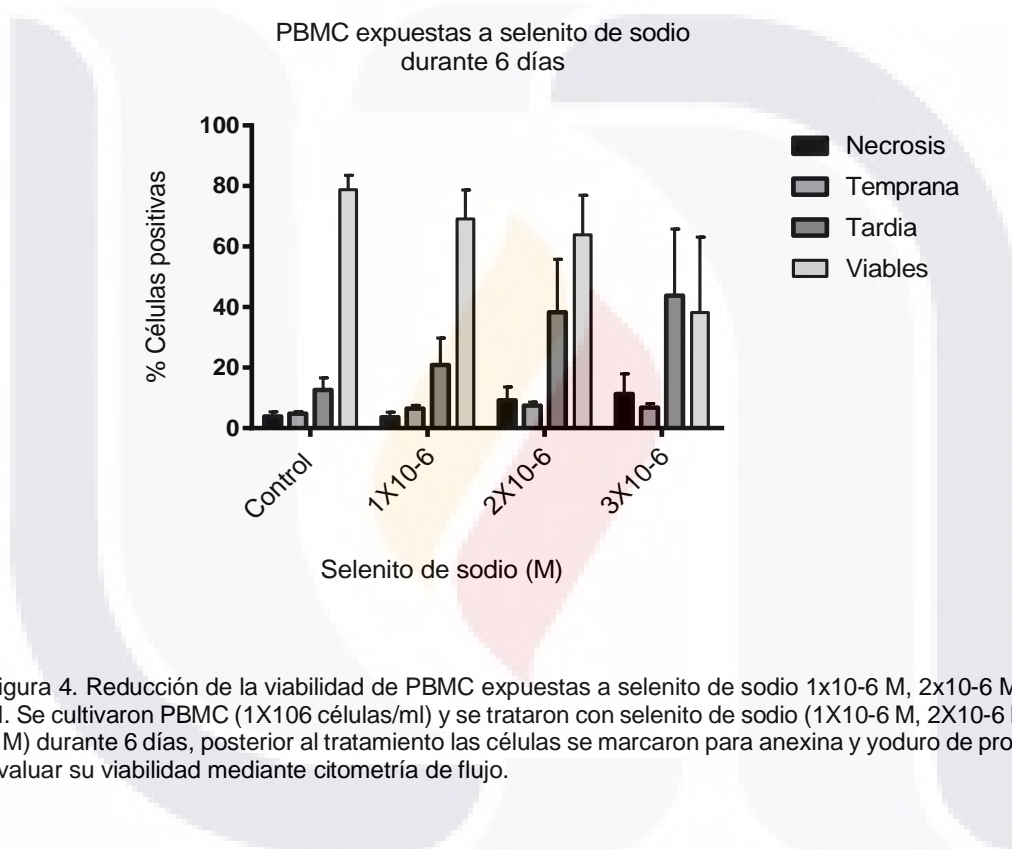


Figura 4. Reducción de la viabilidad de PBMC expuestas a selenito de sodio 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M. Se cultivaron PBMC (1×10^6 células/ml) y se trataron con selenito de sodio (1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M) durante 6 días, posterior al tratamiento las células se marcaron para anexina y yoduro de propidio para evaluar su viabilidad mediante citometría de flujo.

Las PBMC tratadas con selenito de sodio a concentraciones menores (2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M), mostraron un efecto totalmente contrario a las células evaluadas a concentraciones mayores, las PBMC mostraron una tendencia homogénea la cual mantuvo el porcentaje de células viables aun a concentraciones altas de selenito de sodio, se observó un ligero aumento en el porcentaje de células en apoptosis temprana con respecto del control. Por lo contrario, no se mostró un aumento en el porcentaje de células en etapas de necrosis y apoptosis tardía (Figura 5).

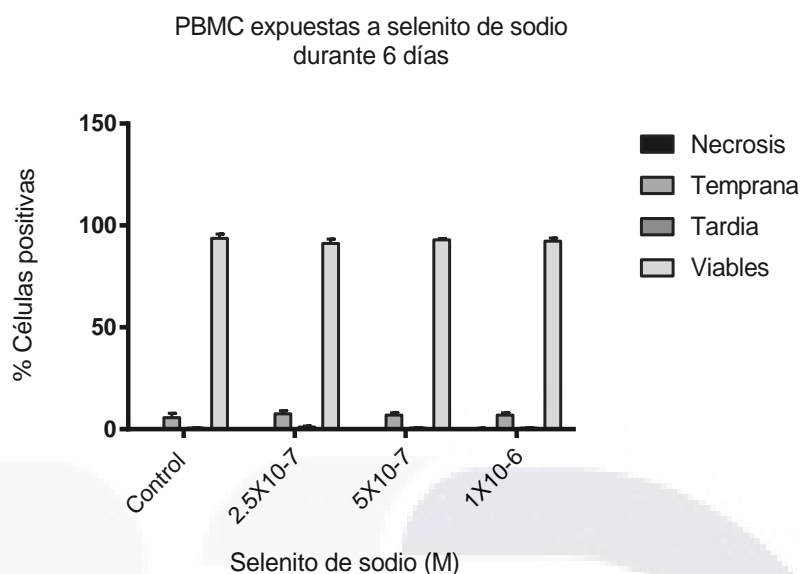


Figura 5. Conservación de la viabilidad de PBMC tratadas con selenito de sodio 5X10⁻⁷ M, 2.5X10⁻⁷ M y 1X10⁻⁶ M durante 6 días. Las PBMC (1X10⁶ células/ml) se trataron con selenito de sodio a concentraciones de 2.5X10⁻⁷ M, 5X10⁻⁷ M y 1X10⁻⁶ M durante 6 días, las células se marcaron para anexina y yoduro de propidio y se evaluó el porcentaje de células viables.

Así mismo los resultados obtenidos tras la evaluación del efecto del selenito de sodio sobre la activación de PBMC mediante el marcaje para CD69, mostro una ligera disminución a una concentración de 1X10⁻⁶ M y 1X10⁻⁶ M, por lo contrario, se observó un aumento a una concentración media (2X10⁻⁶ M) (Figura 6).

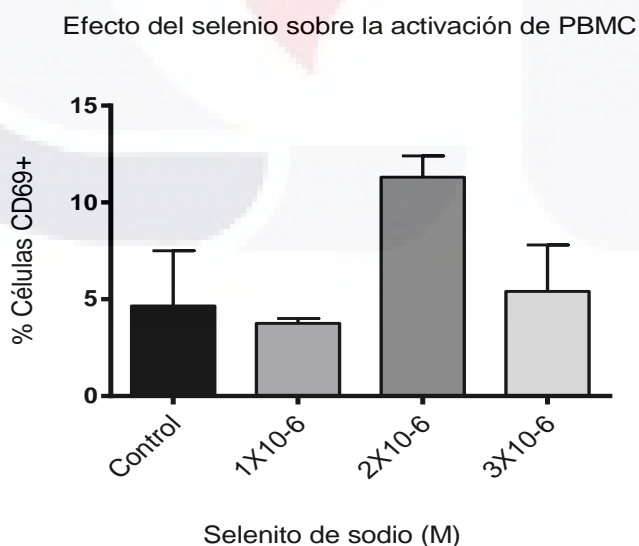


Figura 6. Activación de PBMC a concentraciones de 1X10⁻⁶ M, 2X10⁻⁶ M y 3X10⁻⁶ M. Se trataron PBMC (1X10⁶ células/ml) con selenito de sodio a concentraciones de 1X10⁻⁶ M, 2X10⁻⁶ M y 3X10⁻⁶ M durante 6 días, se realizó la marcación para CD69 (marcador de activación) para evaluar el porcentaje de activación mediante citometría de flujo.

Por lo contrario, no se observó efecto alguno sobre la activación de PBMC tratadas con selenito de sodio a concentraciones menores (5×10^{-7} M, 2.5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M) con respecto del control (Figura 7).

Efecto del selenio sobre la activación de PBMC

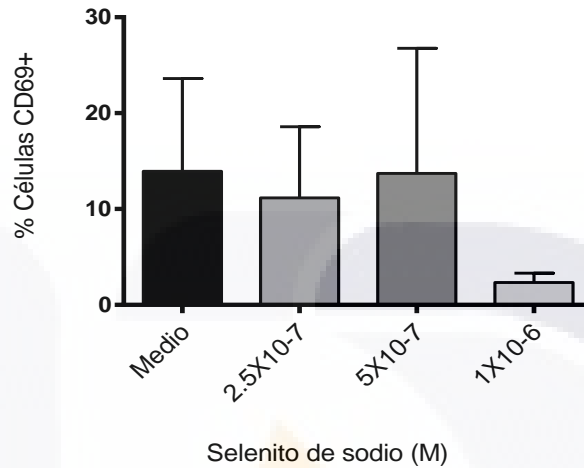


Figura 7. Activación de PBMC a concentraciones de 5×10^{-7} M, 2.5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M. Las PBMC (1×10^6 células/ml) se trataron con selenito de sodio a concentraciones de 5×10^{-7} M, 2.5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M durante 6 días, posterior al tratamiento se marcaron las células con anti-CD69 para evaluar la activación de las PBMC mediante citometría de flujo.

Posterior al diseño de oligonucleótidos, la evaluación de la expresión por qPCR y mostró un aumento en la expresión de TET2 y TET3 posterior al tratamiento con selenito de sodio a concentraciones de 5×10^{-7} M, 2.5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M durante 6 días (Figura 8).

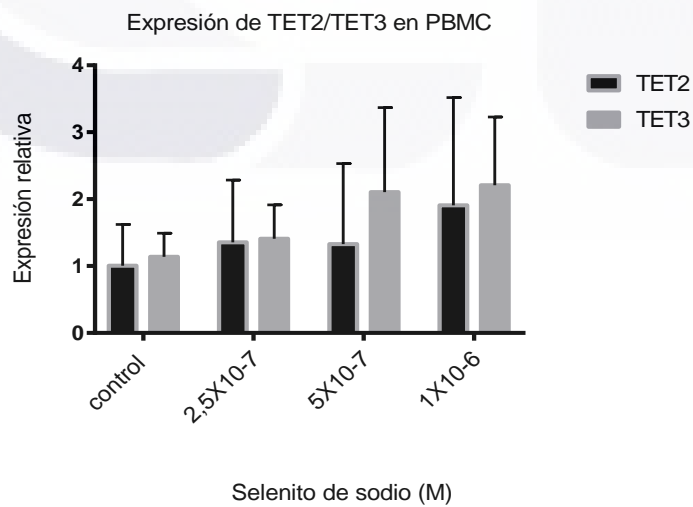


Figura 8. Expresión de los genes TET2/TET3 en PBMC expuestas a selenito de sodio. Las PBMC se expusieron a selenito de sodio a concentraciones de 2.5×10^{-7} M, 5×10^{-7} M y 1×10^{-6} M durante 144 horas.

El análisis de la expresión de TET2 y TET3 posterior a la exposición a selenito de sodio a concentraciones de 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M durante 6 días mostró un aumento en la expresión de TET2 y TET3 en las células expuestas a 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M de selenito de sodio en comparación a la muestra control (Figura 9).

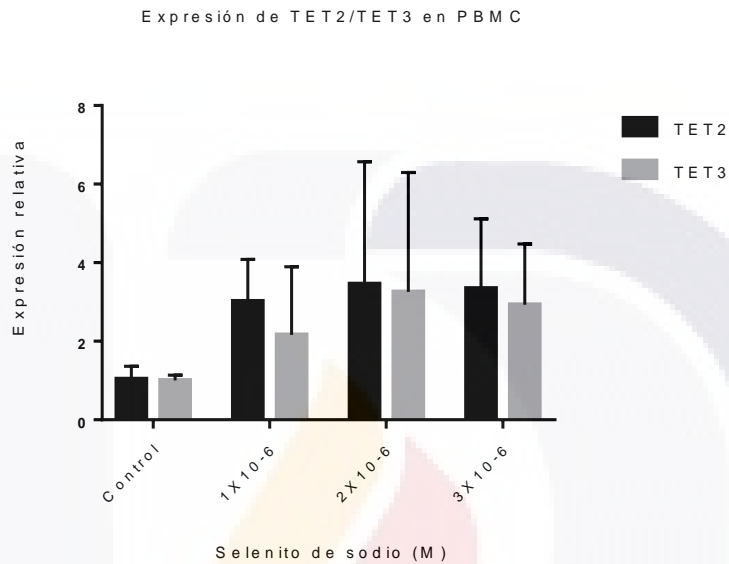


Figura 9. Expresión de los genes TET2/TET3 en PBMC expuestas a selenito de sodio. Las PBMC se expusieron a selenito de sodio a concentraciones de 1×10^{-6} M, 2×10^{-6} M y 3×10^{-6} M durante 6 días.

Para evaluar al selenito de sodio 2×10^{-6} M como tratamiento para incrementar el porcentaje de células Treg ($CD4+CD25+Foxp3+$), se llevó a cabo el cultivo celular en células CD4 aisladas mediante inmunomarcaje por selección negativa, posterior a la purificación, las células se estimularon con anti-CD3, anti-CD28, IL-2, TGF- β y selenito de sodio, bajo tres distintos tratamientos y una muestra control. Dicha evaluación mostró un ligero aumento del porcentaje de células $CD4+CD25+Foxp3+$ en el tratamiento 3 (T2) en el que fueron expuestas a todos los estímulos (anti-CD3, anti-CD28, IL-2 TGF- β y selenito de sodio) aunque no de manera significativa, pero una ligera disminución tras la exposición únicamente a anti-CD3, anti-CD28 y selenito de sodio en el tratamiento 3 (T3) (Figura 10).

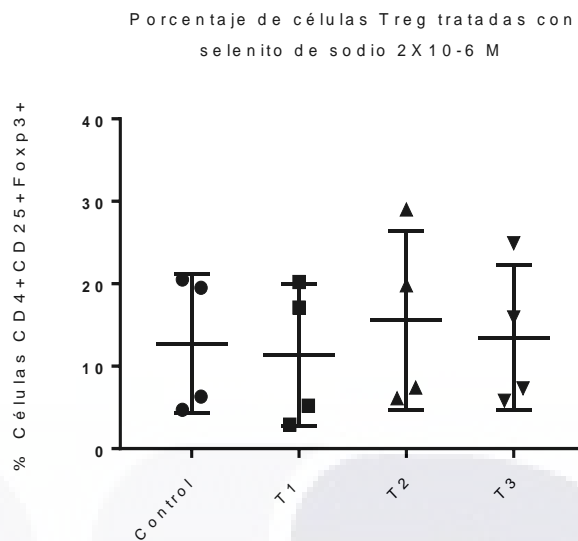


Figura 10. Porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+ expuestas a selenito de sodio durante 6 días. Las células CD4 purificadas mediante inmunomarcaje a partir de PBMC y cultivadas durante 6 días bajo los tratamientos control: 1×10^6 células/ml, 4×10^6 perlas/ml (anti-CD3/anti-CD28), tratamiento 1: 1×10^6 células/ml, 4×10^6 perlas/ml (anti-CD3/anti-CD28), IL-2 0.2 ng/ml y TGF- β 5 ng/ml. Tratamiento 2: 1×10^6 células/ml, 4×10^6 perlas (anti-CD3/anti-CD28) /ml, IL-2 0.2ng/ml, TGF- β 5ng/ml y selenito de sodio 2×10^{-6} M, Tratamiento 3: 1×10^6 células/ml, 4×10^6 perlas/ml (anti-CD3/anti-CD28) y selenito de sodio (2×10^{-6} M). Se evaluó el porcentaje de células que expresaban los marcadores de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) por citometría de flujo. Los resultados de la evaluación del porcentaje de células Treg no muestra una diferencia significativa ($P = 0.80$) entre ningún tratamiento en base a la prueba Kruskal-Wallis ($P < 0.05$).

Como resultado de la expresión de los genes TET2 y TET3 de PBMC expuestas a selenito de sodio durante 6 días, TET2 mostro un aumento en el tratamiento 1 con respecto de los otros tratamientos y carente de selenito de sodio, por lo contrario, se observa una disminución de la expresión relativa de TET2 en los tratamientos 2 y 3 los cuales ya contaban con la presencia de selenito de sodio. Cabe resaltar que dicha variación entre tratamientos no muestra diferencia significativa ($P = 0.59$) (Fig. 11).

A la par de la evaluación del porcentaje de células que expresaron los marcadores CD4+CD25+Foxp3+, se evaluó la expresión de los genes TET2 y TET3 de células Treg tratadas con selenito de sodio 2×10^{-6} M. En este experimento, la expresión del gen TET2 mostró una reducción en la expresión, posterior a la exposición a selenito de sodio 2×10^{-6} M en combinación con IL-2 0.2 ng/ml y TGF- β 5 ng/ml, anti-CD3, anti-CD28 (T2) y el selenito de sodio 2×10^{-6} M en combinación con anti-CD3, anti-CD28 (T3) con respecto del tratamiento 2 el cual no contenía selenito de sodio (Fig. 11).

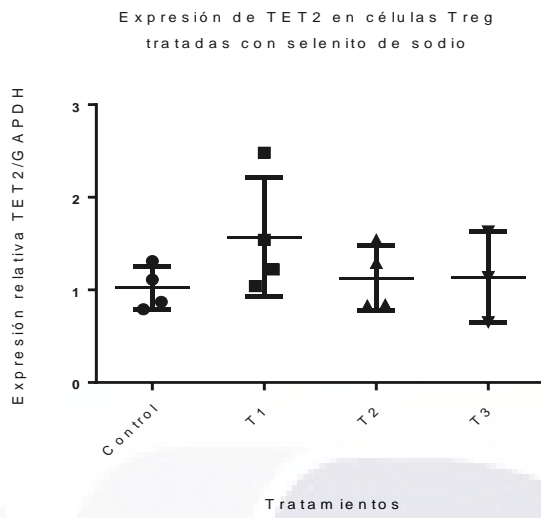


Figura 11. Expresión del gen TET2 en Treg tratadas con selenito de sodio. Posterior al tratamiento de las células CD4+CD25+Foxp3+ durante 6 días, se obtuvo el RNA de las células y se sintetizó el cDNA utilizando la Super script II y se realizó la corrida de la PCR para evaluar la expresión relativa de TET2 de Treg. Los resultados de la evaluación de la expresión de TET2 no muestra una diferencia significativa (P = 0.59) entre ningún tratamiento en base a la prueba Kruskal-Wallis (P < 0.05).

TET3 mostró un patrón similar de reducción en la expresión posterior al tratamiento con selenito de sodio 2×10^{-6} M (T2 y T3) con respecto del tratamiento 1 que no presentaba selenito de sodio (Fig. 12).

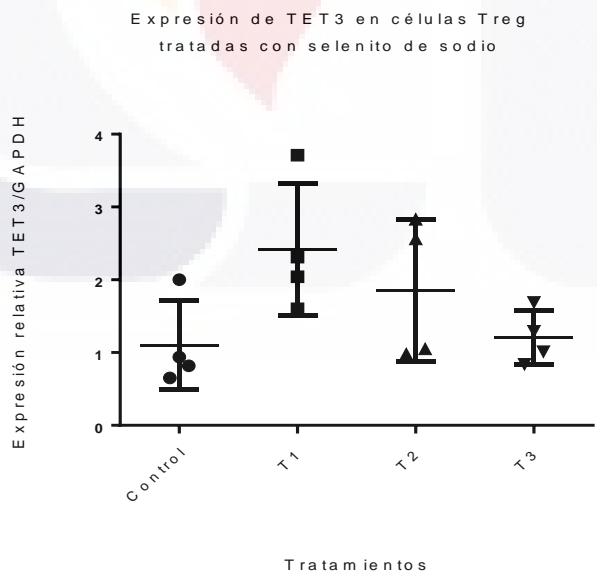


Figura 12. Expresión del gen TET3 en Treg tratadas con selenito de sodio. La evaluación de la expresión del gen TET3 en células Treg expuestas a selenito de sodio bajo 4 diferentes tratamientos 6 días, se obtuvo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

posterior a la obtención del RNA y se síntesis del cDNA utilizando la Super script II y tras la corrida de la PCR. Los resultados de la evaluación de la expresión del gen TET3 no muestra una diferencia significativa ($P = 0.59$) entre ningún tratamiento en base a la prueba Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). la expresión de los genes TET2 y TET3 se muestran como expresión relativa normalizada al grupo control.

Estos resultados reafirman el rol del selenito de sodio como un microelemento con participación en procesos epigenéticos en células con participación directa en células Treg y la expresión de las desmetilasas de ADN.



8. Discusión

Existe un gran avance en el estudio del selenito de sodio y su participación en diversos procesos biológicos en los organismos, tanto en modelos humanos como en animales, esto ha mejorado la comprensión de la participación de este micronutriente en diversas enfermedades, así como su uso nutricional. Por tal motivo es de gran interés estudiar al selenito de sodio con un enfoque terapéutico en el tratamiento de enfermedades. En este estudio se evaluó el efecto del selenito de sodio en la viabilidad y activación de células de células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC), el porcentaje de células Treg con fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ y la expresión de los genes TET2 y TET3.

Los resultados obtenidos de las evaluaciones mostraron que la concentración de 2×10^{-6} M de selenito de sodio es la más viable para el cultivo celular. Con respecto a este resultado Yang *et al.*, (2018) demostraron que el selenito de sodio a concentraciones mayores ($5 \mu\text{M}$) es capaz de inducir apoptosis de manera dependiente de tiempo y concentración en células SW982 de sarcoma sinovial. Por lo contrario, Yan *et al.*, (2019) determinaron que el selenito de sodio a concentraciones de $0.1 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$ promueve la diferenciación y proliferación de células madre mesenquimales de la médula ósea. Sin embargo, existe poca evidencia que muestre el papel del selenito de sodio sobre la viabilidad de leucocitos y en los procesos de diferenciación y expansión de células Treg. Por tal motivo en este trabajo se ha dado especial relevancia al efecto del selenito de sodio como estímulo en cultivos de PBMC y células Treg.

Por otro lado, existe amplia evidencia de la participación del selenito de sodio en la expansión de células Treg *in vivo*. En este sentido, en un modelo de colitis crónica, la suplementación con selenito de sodio ($0,1 \mu\text{g/g}$ de dieta) incrementó el porcentaje de células Treg de ratones C57BL /6 (Sang *et al.*, 2017). El mismo efecto se observó en la tiroiditis autoinmune al promover el restablecimiento de la población de células Treg posterior a la suplementación durante 16 semanas (Xue *et al.*, 2010).

Nuestros resultados indican un aumento en el porcentaje células Treg estimuladas con selenito de sodio 2×10^{-6} M durante 6 días (Fig. 10). Estos resultados corroboran los obtenidos por Zhuang *et al.*, (2015) al mostrar que el tratamiento de esplenocitos porcinos con selenito de sodio ($0.5 \mu\text{mol/L}$ y $2 \mu\text{mol/L}$) promueve la secreción de IL-2 así como la proliferación celular. Así mismo lo obtenido por Wang *et al.*, (2018) en el que el tratamiento de linfocitos esplénicos de lechones con selenito de sodio $2 \mu\text{M}$ durante 48

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

horas, aumentó los niveles de IL-2 y por tanto el crecimiento y mantenimiento de los linfocitos esplénicos.

Al igual que la IL-2, TGF- β es una citocina de vital importancia en el proceso de diferenciación y expansión de células Treg. Al coexistir diferentes poblaciones de linfocitos T CD4+ en el cultivo celular, es fundamental que existan las condiciones necesarias para diferenciar y expandir a las células Treg, al ser privadas de IL-2 y TGF- β su tasa de crecimiento puede verse afectada. Nuestros resultados muestran que el tratamiento uno que contenía IL-2 y TGF- β pero que carecía de selenito de sodio, muestra un porcentaje menor de células Treg en comparación al tratamiento que contenía todos los estímulos (IL-2, TGF- β y selenito de sodio). Este resultado podría explicarse debido a que la cantidad de TGF- β del tratamiento uno es insuficiente. En este sentido, al agregar el selenito de sodio, se promueve la síntesis de TGF- β y por lo tanto la proliferación de células Treg, así como su expansión. Este resultado concuerda con los hallazgos de Adegoke *et al.*, (2018) en los cuales se demuestra que la exposición de células Sertoli de terneros a selenito de sodio (0.25mg/L) aumentaron la expresión de TGF- β 1 en comparación a las no tratadas con este micronutriente, así como la viabilidad de las células germinales testiculares. Juntos estos resultados nos sugieren que el selenito de sodio puede estar participando como agente promotor de la expresión de IL-2, previamente descrito como factor de crecimiento que participa en la generación, desarrollo y mantenimiento de los linfocitos T. Asimismo, el selenito de sodio participa en la expansión de linfocitos Treg *in vitro* (Malek & Castro, 2010) y en la secreción de TGF- β , uno de los principales factores para la diferenciación y expansión de las células Treg (Fraser *et al.*, 2018) .

Estudios previos han descrito el papel de las proteínas TET2 y TET3 como agentes hipometilantes en células Treg (Yue *et al.*, 2019) (Nakatsukasa & Yoshimura, 2017). Un patrón de hipometilación del ADN, en específico del CNS2 de células Treg es fundamental para su funcionamiento, estabilidad y desarrollo (Ohkura *et al.*, 2012). Los datos obtenidos en este trabajo mostraron una expresión similar de los genes TET2 y TET3 en cultivos de células T estimulados o no con selenito de sodio. Es probable que el selenito de sodio este participando como agente hipometilante independiente a las enzimas TET2/3. En este sentido el selenito de sodio podría evitar la metilación del ADN en las células Treg inhibiendo especies reactivas de oxígeno e induciendo el bloqueo

de la actividad de las DNMT tal como los datos reportados por Zhang *et al.*, (2019). En este estudio se muestra que la presencia de especies reactivas de oxígeno promueve un estado de metilación elevado, así como fallas en el mecanismo de escisión de la 5-metil-citocina a 5-hidrixi-metil-citocina. Asimismo, sugiere que la actividad de TET2 está relacionada con una actividad reducida de la DNMT (Li *et al.*, 2020). Finalmente, se ha reportado que algunos micronutrientes con características de regulación antioxidante similares al selenito de sodio, promueven la expresión de los genes TE2 y TET3 en células Treg, tal es el caso de la vitamina c que mantiene el equilibrio del estrés oxidativo y funge como cofactor de unión de metales como hierro reducido (Fe II), el cual es esencial para la expresión y actividad de las dioxigenasas TET2 y TET3 (Yue *et al.*, 2016).



9. Conclusión

El selenito de sodio promueve la diferenciación de células T reguladoras con fenotipo CD4CD25Foxp3+. Asimismo, podría estar promoviendo su estabilidad debido a que induce la expresión de enzimas hipometilantes específicas de la región CNS2, TET2/3. Sin embargo, es necesario realizar ensayos para confirmar la estabilidad de las células T reguladoras diferenciadas en presencia de selenito de sodio evaluando el nivel de desmetilación en la región CNS2.



10. Bibliografía

Adegoke, E. O., Wang, X., Wang, H., Wang, C., Zhang, H., & Zhang, G. (2018). Selenium (Na_2SeO_3) Upregulates Expression of Immune Genes and Blood–Testis Barrier Constituent Proteins of Bovine Sertoli Cell In Vitro. *Biological trace element research*, 185(2), 332-343.

Armstrong, K. M., Bermingham, E. N., Bassett, S. A., Treloar, B. P., Roy, N. C., & Barnett, M. P. (2011). Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnology journal*, 6(1), 113-117.

Appleby, M. W., & Ramsdell, F. (2008). Scurfy, the Foxp3 locus, and the molecular basis of peripheral tolerance. In *Immunology, Phenotype First: How Mutations Have Established New Principles and Pathways in Immunology* (pp. 151-168). Springer, Berlin, Heidelberg.

Araki, K., Youngblood, B., & Ahmed, R. (2010). The role of mTOR in memory CD8+ T-cell differentiation. *Immunological reviews*, 235(1), 234-243.

Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grützkau, A., Dong, J., ... & Türbachova, I. (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *European journal of immunology*, 37(9), 2378-2389.

Bensch, F., Knoblock, D. M., Liu, A., McAllister, F., & Beatty, G. L. (2017). CTLA-4/CD80 pathway regulates T cell infiltration into pancreatic cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(12), 1609-1617.

Bennett, C. L., Yoshioka, R., Kiyosawa, H., Barker, D. F., Fain, P. R., Shigeoka, A. O., & Chance, P. F. (2000). X-Linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea maps to Xp11.23-Xq13.3. *The American Journal of Human Genetics*, 66(2), 461-468.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Bilate, A. M., & Lafaille, J. J. (2012). Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 733-758.

Calame, D. G., Mueller-Ortiz, S. L., & Wetsel, R. A. (2016). Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunobiology*, 221(12), 1407-1417.

Cațianis, A. G., Virgolici, B., Dogaru, B. C., Virgolici, H., & Mohora, M. (2020). From Selenium to Selenoproteins and their Role-Minireview. *Acta Medica Transilvanica*, 25(3), 56-59.

Cheng, M. H., & Anderson, M. S. (2012). Monogenic autoimmunity. *Annual review of immunology*, 30, 393–427.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., ... Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875-1886.

Chen, W., & Konkel, J. E. (2010). TGF- β and 'Adaptive' Foxp3+ Regulatory T cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(1), 30-36.

Combs, G. F. (2001). Selenium in global food systems. *British journal of nutrition*, 85(5), 517-547.

Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., & Lafaille, J. J. (2008). Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity*, 29(1), 114–126. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.010

Davis, C. D., Uthus, E. O., & Finley, J. W. (2000). Dietary Selenium and Arsenic Affect DNA Methylation *In Vitro* in Caco-2 Cells and *In Vivo* in Rat Liver and Colon. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 2903-2909.

Davis, C. D., & Uthus, E. O. (2002). Dietary selenite and azadeoxycytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT-29 cells. *The Journal of nutrition*, 132(2), 292-297.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., ... Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1257-1265.

De Miranda, J. X., Andrade, F. de O., Conti, A. de, Dagli, M. L. Z., Moreno, F. S., & Ong, T. P. (2014). Effects of selenium compounds on proliferation and epigenetic marks of breast cancer cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4), 486–491. doi:10.1016/j.jtemb.2014.06.017

Duntas, L. H., Mantzou, E., & Koutras, D. A. (2003). Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis. *European Journal of Endocrinology*, 148(4), 389-393.

Ellis, J. S., Hong, S. H., Zaghouani, H., & Braley-Mullen, H. (2013). Reduced effectiveness of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in CD28-deficient NOD. H-2h4 mice leads to increased severity of spontaneous autoimmune thyroiditis. *The Journal of Immunology*, 191(10), 4940-4949.

Estève, P. O., Chin, H. G., Benner, J., Feehery, G. R., Samaranayake, M., Horwitz, G. A., ... & Pradhan, S. (2009). Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5076-5081.

Feng, Y., Arvey, A., Chinen, T., van der Veeke, J., Gasteiger, G., & Rudensky, A. Y. (2014). Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. *Cell*, 158(4), 749-763.

Ferguson, P. J., Blanton, S. H., Saulsbury, F. T., McDuffie, M. J., Lemahieu, V., Gastier, J. M., ... & Kelly, T. E. (2000). Manifestations and linkage analysis in X-linked autoimmunity-immunodeficiency syndrome. *American journal of medical genetics*, 90(5), 390-397.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., ... & Klein-Hessling, S. (2007). Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS biology*, 5(2), e38.

Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4), 330-336.

Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., & Noelle, R. J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *The Journal of Immunology*, 174(4), 1783-1786.

Göschl, L., Scheinecker, C., & Bonelli, M. (2019). Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Seminars in Immunopathology*.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., ... & Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology*, 3(11), 1097.

Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P., & Ley, T. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), 2840-2848.

Hamon, M. A., & Quintin, J. (2016, August). Innate immune memory in mammals. In *Seminars in immunology* (Vol. 28, No. 4, pp. 351-358). Academic Press.

Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G. G., Chou, Y. K., ... & Vandenbark, A. A. (2005). Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *Journal of neuroscience research*, 81(1), 45-52.

Huehn, J., Polansky, J. K., & Hamann, A. (2009). *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? Nature Reviews Immunology*, 9(2), 83-89.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Huehn, J., & Beyer, M. (2015). Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. *Seminars in Immunology*, 27(1), 10-18.

Jin, B., Tao, Q., Peng, J., Soo, H. M., Wu, W., Ying, J., & Robertson, K. D. (2007). DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Human molecular genetics*, 17(5), 690-709.

Kazantsev, A. G., & Thompson, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature reviews Drug discovery*, 7(10), 854.

Kim, C. H. (2009). FOXP3 and its role in the immune system. In *Forkhead transcription Factors* (pp. 17-29). Springer, New York, NY.

Kingsley, C. I., Karim, M., Bushell, A. R., & Wood, K. J. (2002). CD25+ CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4-and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1080-1086.

Kitagawa, Y., Ohkura, N., & Sakaguchi, S. (2015). Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *European Journal of Immunology*, 45(1), 11-16.

Krysiak, R., & Okopien, B. (2011). The effect of levothyroxine and selenomethionine on lymphocyte and monocyte cytokine release in women with Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(7), 2206-2215.

Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., ... Maclaren, N. (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(1), 131-140.

Lal, G., Zhang, N., Van Der Touw, W., Ding, Y., Ju, W., Bottinger, E. P., ... & Bromberg, J. S. (2009). Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *The Journal of Immunology*, 182(1), 259-273.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Lan, Q., Fan, H., Quesniaux, V., Ryffel, B., Liu, Z., & Guo Zheng, S. (2011). Induced Foxp3+ regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Journal of molecular cell biology*, 4(1), 22-28.

Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a001651.

Li X, Liang Y, LeBlanc M, Benner C, Zheng Y (2014) Function of a Foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell* 158: 734–748. 10.1016/j.cell.2014.07.030.

Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., & Chen, W. (2008). A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Nature immunology*, 9(6), 632.

Lockitch, G. (1989). Selenium: Clinical Significance and Analytical Concepts. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 27(6), 483-541.

Lu, J., & Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 723-727.

Malek, T. R., & Castro, I. (2010). Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity*, 33(2), 153-165.

Martens, J. W., Margossian, A. L., Schmitt, M., Foekens, J., & Harbeck, N. (2009). DNA methylation as a biomarker in breast cancer. *Future oncology*, 5(8), 1245-1256.

Mentch, Samantha J., et al. "Histone methylation dynamics and gene regulation occur through the sensing of one-carbon metabolism." *Cell metabolism* 22.5 (2015): 861-873.

Metes-Kosik, N., Luptak, I., DiBello, P. M., Handy, D. E., Tang, S. S., Zhi, H., ... & Joseph, J. (2012). Both selenium deficiency and modest selenium supplementation lead to myocardial fibrosis in mice via effects on redox-methylation balance. *Molecular nutrition & food research*, 56(12), 1812-1824.

Montoya, C. J., Velilla, P. A., & Rugeles, M. T. (2010). Caracterización de las células T reguladoras por citometría de flujo: estado del arte y controversias. *Biomédica*, 30.

Nair, V. S., & Oh, K. I. (2014). Down-regulation of Tet2 prevents TSDR demethylation in IL2 deficient regulatory T cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(1), 918-924.

Nair, V. S., Song, M. H., Ko, M., & Oh, K. I. (2016). DNA demethylation of the Foxp3 enhancer is maintained through modulation of ten-eleven-translocation and DNA methyltransferases. *Molecules and cells*, 39(12), 888.

Nakatsukasa, H., & Yoshimura, A. (2017). TET2 and TET3 regulate stability and function of regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 198(1 Supplement), 212.7-212.7.

Nakatsukasa, H., Oda, M., Yin, J., Chikuma, S., Ito, M., Koga-lizuka, M., ... & Koya, I. (2019). Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization and IL-17 expression. *International immunology*, 31(5), 335-347.

Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., Huehn, J., Fehling, H. J., Sparwasser, T., Nakai, K., & Sakaguchi, S. (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity*, 37(5),

Otieno, S. B. (2017). Gender as Determinant of the Effect of Yeast Selenium on CD4 T Cells Count Among HIV 1 Positive Children. *Journal of Cells*, 2(1), 6-14.

Pace, C., Tumino, D., Russo, M., Le Moli, R., Naselli, A., Borzì, G., ... & Frasca, F. (2020). Role of selenium and myo-inositol supplementation on autoimmune thyroiditis progression. *Endocrine Journal*, EJ20-0062.

Park, O., Grishina, I., Leung, P. S., Gershwin, M. E., & Prindiville, T. (2005). Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051(1), 218-228

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Parias, J. L. G., Giraldo, V. E. D., & Velásquez-Lopera, M. M. (2010). FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*, 29(2), 74-84.

Polansky, J. K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., ... & Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European journal of immunology*, 38(6), 1654-1663.

Ren, F., Chen, X., Hesketh, J., Gan, F., & Huang, K. (2012). Selenium Promotes T-Cell Response to TCR-Stimulation and ConA, but Not PHA in Primary Porcine Splenocytes. *PLOS ONE*, 7(4), e35375.

Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martínez-Torrecedrada, J. L., Ling, K. L., & Powrie, F. (2005). Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+ CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *European journal of immunology*, 35(6), 1681-1691.

Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., & Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-Cell Responses to Low-Dose Interleukin-2 in HCV-Induced Vasculitis. *New England Journal of Medicine*, 365(22), 2067-2077.

Sang, L.-X., Chang, B., Zhu, J.-F., Yang, F.-L., Li, Y., Jiang, X.-F., Wang, D.-N., Lu, C.-L., & Sun, X. (2017). Sodium selenite ameliorates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice by decreasing Th1, Th17, and $\gamma\delta$ T and increasing CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell responses. *World Journal of Gastroenterology*, 23(21), 3850-3863.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155(3), 1151-1164.

Sánchez-Fueyo, A. (2005). Tolerancia inmunológica y trasplante de hígado. *Gastroenterología y Hepatología*, 28(4), 250-256.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sauerbruch, T. (1997). Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-1 infection. *Biological Trace Element Research*, 56(1), 31-41.

Scottà, C., Fanelli, G., Hoong, S. J., Romano, M., Lamperti, E. N., Sukthankar, M., Lombardi, G. (2016). Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica*, 101(1), 91-100.

Shrimali, R. K., Irons, R. D., Carlson, B. A., Sano, Y., Gladyshev, V. N., Park, J. M., & Hatfield, D. L. (2008). Selenoproteins Mediate T Cell Immunity through an Antioxidant Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20181-20185.

Shuai, Z., Leung, M. W., He, X., Zhang, W., Yang, G., Leung, P. S., & Gershwin, M. E. (2016). Adaptive immunity in the liver. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 354.

Stassen, M., Fondel, S., Bopp, T., Richter, C., Müller, C., Kubach, J., ... & Schmitt, E. (2004). Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins $\alpha 4\beta 7$ or $\alpha 4\beta 1$ confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *European journal of immunology*, 34(5), 1303-1311.

Su, C., Yang, T., Wu, Z., Zhong, J., Huang, Y., Huang, T., & Zheng, E. (2017). Differentiation of T-helper cells in distinct phases of atopic dermatitis involves Th1/Th2 and Th17/Treg. *European Journal of Inflammation*, 15(1), 46-52.

Sun, Z., Liu, C., Pan, T., Yao, H. y Li, S. (2017). El selenio acelera la diferenciación de las células dendríticas de pollo y afecta la expresión de selenoproteínas. *Inmunología del desarrollo y comparativa* , 77 , 30-37.

Thiry, C., Ruttens, A., Pussemier, L., & Schneider, Y. J. (2013). An *in vitro* investigation of species-dependent intestinal transport of selenium and the impact of this process on selenium bioavailability. *British Journal of Nutrition*, 109(12), 2126-2134.

Teperino, R., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2010). Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription?. *Cell metabolism*, 12(4), 321-327.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Toker, A., Engelbert, D., Garg, G., Polansky, J. K., Floess, S., Miyao, T., Baron, U., Düber, S., Geffers, R., Giehr, P., Schallenberg, S., Kretschmer, K., Olek, S., Walter, J., Weiss, S., Hori, S., Hamann, A., & Huehn, J. (2013). Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus.

Trenado, A., Charlotte, F., Fisson, S., Yagello, M., Klatzmann, D., Salomon, B. L., & Cohen, J. L. (2003). Recipient-type specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 112(11), 1688-1696.

Trenado, A., Sudres, M., Tang, Q., Maury, S., Charlotte, F., Grégoire, S., ... & Cohen, J. L. (2006). Ex vivo-expanded CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *The Journal of Immunology*, 176(2), 1266-1273.

Uğuz, A. C., Nazıroğlu, M., Espino, J., Bejarano, I., González, D., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2009). Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase-3 and -9 Activities. *Journal of Membrane Biology*, 232(1), 15.

Uthus, E. O., Ross, S. A., & Davis, C. D. (2006). Differential effects of dietary selenium (Se) and folate on methyl metabolism in liver and colon of rats. *Biological trace element research*, 109(3), 201-214.

Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., ... & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *science*, 331(6013), 44-49.

Wang, X., Zuo, Z., Deng, J., Zhang, Z., Chen, C., Fan, Y., ... & Chen, C. (2018). Protective role of selenium in immune-relevant cytokine and immunoglobulin production by piglet splenic lymphocytes exposed to Deoxynivalenol. *Biological trace element research*, 184(1), 83-91.

Weeks, B. S., Hanna, M. S., & Cooperstein, D. (2012). Dietary selenium and selenoprotein function. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 18(8), RA127-RA132.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science*, 322(5899), 271-275.

Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., ... & Mathis, D. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126(2), 375-387.

Xue, H., Wang, W., Li, Y., Shan, Z., Li, Y., Teng, X., ... Teng, W. (2010). Selenium upregulates CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in iodine-induced autoimmune thyroiditis model of NOD.H-2(h4) mice. *Endocrine Journal*, 57(7), 595-601.

Yang, R., Qu, C., Zhou, Y., Konkel, J. E., Shi, S., Liu, Y., ... & Zandi, E. (2015). Hydrogen sulfide promotes Tet1-and Tet2-mediated Foxp3 demethylation to drive regulatory T cell differentiation and maintain immune homeostasis. *Immunity*, 43(2), 251-263.

Yang, L., Cai, Y. S., Xu, K., Zhu, J. L., Li, Y. B., Wu, X. Q., ... & Xu, P. (2018). Sodium selenite induces apoptosis and inhibits autophagy in human synovial sarcoma cell line SW982 in vitro. *Molecular medicine reports*, 17(5), 6560-6568.

Yan, D., Tang, B., Yan, L., Zhang, L., Miao, M., Chen, X., ... & Wang, H. (2019). Sodium Selenite Improves The Therapeutic Effect Of BMSCs Via Promoting The Proliferation And Differentiation, Thereby Promoting The Hematopoietic Factors. *OncoTargets and therapy*, 12, 9685.

Yue, X., Trifari, S., Äijö, T., Tsagaratou, A., Pastor, W. A., Zepeda-Martínez, J. A., Lio, C.-W. J., Li, X., Huang, Y., Vijayanand, P., Lähdesmäki, H., & Rao, A. (2016). Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *Journal of Experimental Medicine*, 213(3), 377-397.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Yue, X., Lio, C.-W. J., Samaniego-Castruita, D., Li, X., & Rao, A. (2019). Loss of TET2 and TET3 in regulatory T cells unleashes effector function. *Nature Communications*, 10(1), 2011.

Zenewicz, L. A., Abraham, C., Flavell, R. A., & Cho, J. H. (2010). Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell*, 140(6), 791-797.

Zhang, Q., Zheng, S., Wang, S., Jiang, Z., & Xu, S. (2019). The effects of low selenium on DNA methylation in the tissues of chickens. *Biological trace element research*, 191(2), 474-484.

Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, et al. (2010) Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463: 808–812. 10.1038/nature08750.

Zheng, H., Wei, J., Wang, L., Wang, Q., Zhao, J., Chen, S., & Wei, F. (2018). Effects of Selenium Supplementation on Graves' Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2018.

Zhuang, T., Xu, H., Hao, S., Ren, F., Chen, X., Pan, C., & Huang, K. (2015). Effects of selenium on proliferation, interleukin-2 production and selenoprotein mRNA expression of normal and dexamethasone-treated porcine splenocytes. *Research in veterinary science*, 98, 59-65.