



**Universidad de Concepción**

**Facultad Farmacia**

**ROL DE LA GLUTAMINÓLISIS EN LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup>  
ACTIVADOS EN PRESENCIA DE VITAMINA D.**

**POR AGUSTÍN ANDRÉS VERA ARAYA**

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al título profesional de Bioquímico

**Profesor Patrocinante y Guía:** Dra. Estefanía Andrea Nova Lamperti  
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Julio, 2024  
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

### **Agradecimientos.**

Quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional durante el desarrollo de mi periodo universitario. A mis amigos de la universidad, que me apoyaron y ayudaron a estudiar para las evaluaciones. A mis amigos de la infancia que me despejaban cuando el estrés era demasiado.

Se agradece a la Dra. Estefanía Nova, por recibirme en su laboratorio, y por la paciencia que ha tenido para ayudarme a desarrollar de mejor manera esta tesis. Y agradecer también al grupo del laboratorio MTI, con los que hemos compartido buenos momentos durante el trabajo en el laboratorio o en los congresos.

## INDICE

Resumen .....	9
Introducción .....	11
Vitamina D y sistema inmune. ....	16
Vitamina D y Linfocitos T. ....	19
Vitamina D y regulación metabólica. ....	21
Glutaminólisis. ....	27
Presentación del problema: .....	33
Pregunta de investigación: .....	33
Hipótesis .....	34
Objetivos .....	35
Objetivo general: .....	35
Objetivos específicos:.....	35
Materiales y métodos.....	36
1.- Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por gradiente de densidad por Ficoll. ....	36
2.- Separación de células T CD4+ de memoria.....	37
3.- Separación por Cell-Sorting .....	38
4.- Cultivo celular y análisis de proliferación. ....	39
5.- Medición de glucosa y lactato. ....	40
6.- Marcaje con 2 NBDG. ....	41
7.- Cultivo con inhibidores. ....	41
8.- Preparación con marcador de ASCT2.....	42
9.- Transporte de glutamina por glutamina <sup>3</sup> H.....	43
10.- Proteómica. ....	45
11.- Análisis de datos.....	48
RESULTADOS .....	49
Objetivo específico 1: Determinar la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4+ activados en presencia de Vitamina D.....	49
Separación de linfocitos T CD4+ para cultivo celular.....	49

La Vitamina D incrementa el recuento celular de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> . .....	52
La Vitamina D reduce la utilización de glucólisis a pesar de su aumento en el recuento celular. ....	54
Análisis proteómico del efecto de la Vitamina D sobre las proteínas que participan en la Glutaminólisis en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados.....	57
Metabolismo de la glutamina en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.....	59
Objetivo específico 2: Analizar el efecto de la inhibición de la Glutaminólisis en el recuento de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en presencia de Vitamina D.....	63
Evaluación de la concertación óptima de inhibidores. ....	63
La inhibición del ingreso de glutamina a los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D afecta el recuento celular. ....	65
Efecto de los inhibidores BPTES y 968 en el recuento celular de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. ....	67
Objetivo específico 3: Cuantificar los niveles de expresión del receptor de Glutamina en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. ....	69
Cuantificación de la Expresión del transportador de glutamina. ....	69
Aumento del porcentaje de expresión del transportador de glutamina. ....	71
Objetivo específico 4: Evaluar la captación y transporte de glutamina en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.....	73
Evaluación de la captación de glutamina. ....	73
La actividad enzimática ( $V_{max}/K_m$ ) mejora en presencia de Vitamina D.....	76
Discusión .....	78
Conclusión .....	99
Bibliografía.....	102

Anexos ..... 115

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1: Metabolismo de la Vitamina D.....	12
Ilustración 2: Señalización molecular de 1,25-dihidroxiVitamina D3 en la célula. .....	14
Ilustración 3: Vitamina D en células inmunes innatas.....	18
Ilustración 4: Metabolismo de linfocitos T quiescente y activado. ....	23
Ilustración 5: Proliferación y recuento celular de linfocitos T CD4+ activados en presencia o ausencia de Vitamina D. ....	25
Ilustración 6: Estudio de la vía glucolítica. ....	26
Ilustración 7: Ruta glutaminolítica en linfocitos T. ....	30
Ilustración 8: ruta propuesta para el uso de glutamina en linfocitos T CD4+ activados en presencia de Vitamina D.....	62
Ilustración 9: Esquema resumido del impacto de la Vitamina D en la glutaminólisis y proliferación de linfocitos T CD4+.....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Plots de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	51
Figura 2: Recuento celular de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en presencia de Vitamina D. .	53
Figura 3: Captación de glucosa y producción de lactato. ....	56
Figura 4: Análisis proteómico de los transportadores de glutamina en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. ....	58
Figura 5: Análisis proteómico de las enzimas participantes en la Glutaminólisis en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. ....	61
Figura 6: Selección de concentraciones para los inhibidores.....	64
Figura 7: Inhibición del ingreso de glutamina en el recuento celular.....	66
Figura 8: Efecto en el recuento celular con inhibidores de la glutaminasa.....	68
Figura 9: Dot plots de citometría de flujo representando el marcaje de ASCT2.	70
Figura 10: Expresión del receptor SLC1A5 (ASCT2) en presencia de Vitamina D. ....	72
Figura 11: Constantes cinéticas de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. ....	75
Figura 12: Relación V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. ....	77

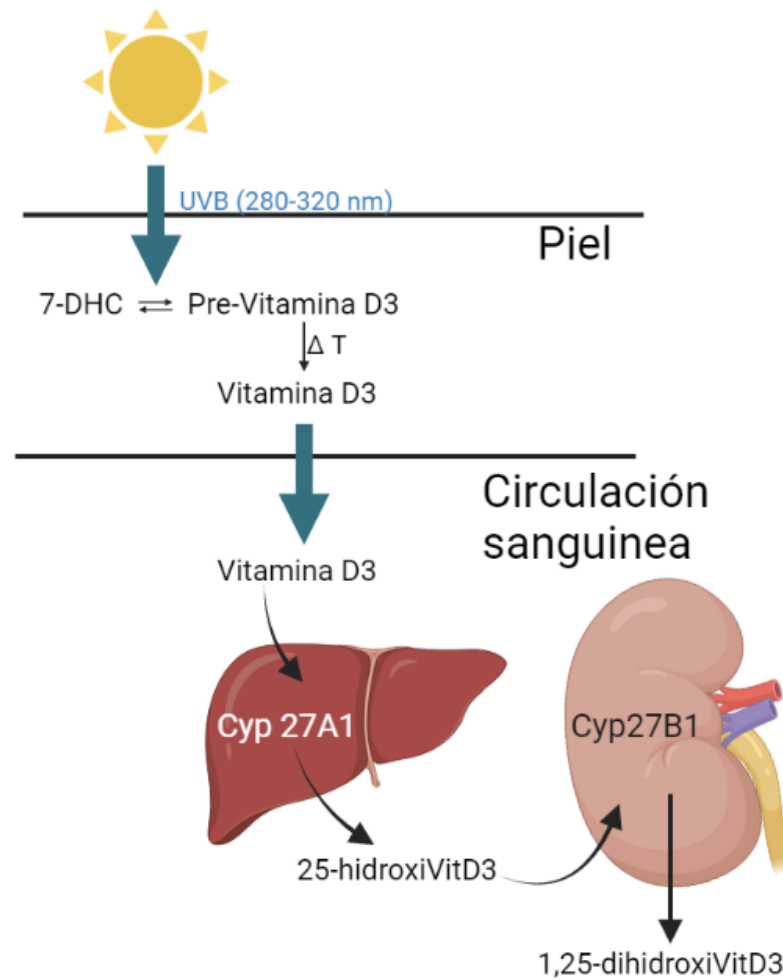
## Resumen

La Vitamina D es una hormona liposoluble que participa principalmente en la regulación del metabolismo del calcio y el fósforo, sin embargo, también es capaz de modular el sistema inmunológico, tanto a nivel de respuesta innata como adaptativa, y promover principalmente los linajes T helper (Th) de tipo Th2 y Treg. El metabolismo del linfocito Th activado es principalmente glucolítico, utilizando la glucosa como fuente principal de energía para sustentar sus procesos proliferativos. En presencia de Vitamina D, se ha observado un aumento en el recuento celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, pero una disminución en la captación de glucosa y producción de lactato, dejando la interrogante de cuál vía metabólica podría estar otorgando energía a expensas de la reducción de la vía glucolítica. La Glutaminólisis es una vía metabólica asociada a la proliferación celular de linfocitos T que se basa en la obtención de energía mediante la degradación de la glutamina. El objetivo de este trabajo es analizar la participación de la Glutaminólisis sobre el recuento, viabilidad y transporte de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. Para ello, se extrajeron linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica de donantes sanos y se activaron con anti-CD3/CD28 en presencia o ausencia de Vitamina D. El efecto de la Vitamina D sobre la expresión de enzimas que participan en la Glutaminólisis y el transportador de glutamina, además del efecto de los

inhibidores de la Glutaminólisis sobre el recuento celular, se analizaron por proteómica y citometría de flujo en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. El transporte de glutamina en presencia de Vitamina D se midió en linfocitos T CD4<sup>+</sup> utilizando glutamina marcada con tritio en un contador de centelleo. Los resultados revelaron un aumento en el recuento celular y una disminución de la glucólisis en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D al cuarto día de activación. Resultados proteómicos revelaron un aumento en la cuantificación de dos enzimas claves de la Glutaminólisis, la Glutaminasa y la Glutamato deshidrogenasa, al igual que la expresión del transportador ASCT2 en presencia de Vitamina D. Inhibidores de la Glutaminólisis, GPNA, Inh 968 y BPTES, redujeron el recuento celular en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D. Finalmente, el transporte de glutamina se vio aumentado en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D. En conclusión, nuestros resultados demostraron que tras la reducción de la vía glucolítica en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, estos reprograman su metabolismo hacia uno glutaminolítico, compensando el alto requerimiento energético de la proliferación celular.

## Introducción

La Vitamina D es una vitamina liposoluble, que en el último tiempo se ha considerado también como hormona, debido a las diversas funciones que ejerce en varias células del organismo. Esta hormona se puede obtener desde 2 fuentes, desde la dieta a partir de pescados grasos, huevos y quesos, y por exposición a la luz ultravioleta B en un rango de 280-320 nm (Lehmann & Meurer, 2010). La exposición solar en el queratinocito induce un cambio conformacional del 7-Dehidrocolesterol (7-DHC) a Pre-Vitamina D. Esta Pre-Vitamina D es transformada rápidamente en Vitamina D por un proceso dependiente de calor, lo que le permite su ingreso a circulación de dos formas, como Vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) o Vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) (Jamali et al., 2018). La Vitamina D<sub>3</sub> es hidroxilada en el hígado por la enzima Cyp27A1, formando el compuesto 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> la cual corresponde a la principal forma circulante, y que continua al riñón donde sufre una segunda hidroxilación por la enzima Cyp27B1, la que como resultado genera el compuesto metabólicamente activo de la Vitamina D o 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (Ilustración 1) (Deluca & Cantorna, 2001)



### Ilustración 1: Metabolismo de la Vitamina D.

Proceso de síntesis de la forma activa de la Vitamina D a partir de la exposición a la radiación UVB en la piel, en donde 7-DHC (7-dehidrocolesterol) sufre un cambio conformacional a Pre-Vitamina D<sub>3</sub>, y que por una reacción dependiente de calor es transformada a Vitamina D<sub>3</sub>, esta ingresa a circulación donde sufre 2 hidroxilaciones, una en el hígado, y otra en el riñón, por las enzimas Cyp27A1 y Cyp27B1 respectivamente, para obtener así la forma activa, la 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub>.

La Vitamina D cumple su función tras unirse al receptor de Vitamina D (VDR) correspondiente a la familia de receptores nucleares de la hormona tiroidea, el cual se encuentra expresado en diferentes tejidos (huesos, hígado, riñón, intestino, sistema inmune, etc.) y que tras la interacción del receptor con su ligando, genera una hetero-dimerización con el receptor X retinoide (RXR), el cual se transloca al núcleo generando una acción reguladora a nivel transcripcional (Coronato Solari et al., 2005). (Ilustración 2).

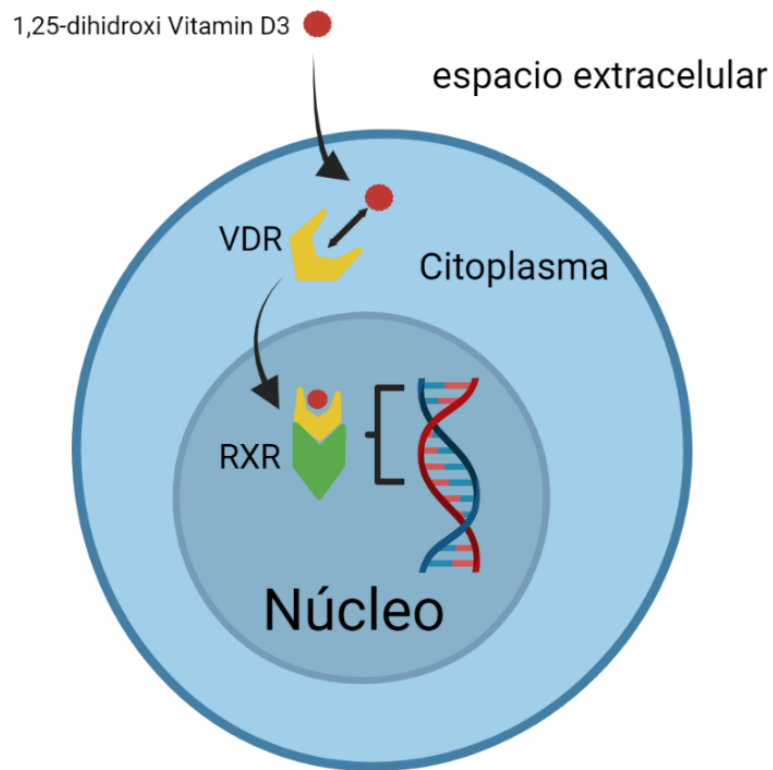


Ilustración 2: Señalización molecular de 1,25-dihidroxiVitamina D<sub>3</sub> en la célula.

1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> ingresa a la célula por sus propiedades liposolubles y se une a un receptor VDR, el cual genera un heterodímero con el receptor retinoide tipo X (RXR), este heterodímero se transloca al núcleo para generar su efecto regulador a nivel transcripcional.

La función principal que se le atribuye a la Vitamina D es la regulación en el metabolismo del calcio (Khazai et al., 2008) y el fosforo, que junto a algunas hormonas como la Paratohormona (PTH) regulan la excreción de calcio a nivel renal, estimulan su absorción a nivel intestinal y potencian la acción de los osteoclastos para obtener calcio desde el hueso (Zappulo et al., 2022), Por otro lado, se han asociado otras funciones extraóseas, entre ellas se pueden mencionar la regulación del desarrollo muscular y la contractilidad (Bischoff-Ferrari, 2012). También, la Vitamina D ha sido asociada con la proliferación, angiogénesis, migración e invasión de líneas celulares malignas de algunos tipos de cáncer (Deeb et al., 2007). En el contexto de enfermedades metabólicas, se ha reportado que esta vitamina tiene efectos positivos en la diabetes, reduciendo el riesgo de sufrir diabetes mellitus tipo 2 y mediando efectos antidiabéticos debido a que las células beta pancreáticas expresan VDR y éste es capaz de estimular la secreción de insulina, mejorando su sensibilidad a través de un aumento en la expresión de receptores insulínicos (von Hurst et al., 2010; Wolden-Kirk et al., 2011). La Vitamina D puede asociarse también con obesidad ya que se encuentra disminuida en pacientes obesos, los cuales presentan una mejora a la sensibilidad a la insulina con suplementos de Vitamina D (Belenchia et al., 2013). Además, en los últimos años se ha reportado que la Vitamina D ejerce una amplia inmunomodulación en diversas células del sistema inmune (Gómez de Tejada Romero, 2014; Skrobot et al., 2018)

## **Vitamina D y sistema inmune.**

La Vitamina D es un modulador de la respuesta inmunológica, debido a que el receptor VDR es expresado en la mayoría de las células inmunes, tales como los monocitos, células presentadoras de antígeno (APC), linfocitos T y B. Además, las células del sistema inmune pueden expresar la enzima Cyp27B1 encargada de realizar la segunda hidroxilación que genera el metabolito activo de la Vitamina D (Chen et al., 2007).

La inmunidad innata es considerada la primera línea de defensa contra la invasión de algún patógeno (Bonilla & Oettgen, 2010), en ésta participan varias células en las cuales la Vitamina D puede generar un efecto modulador. En células fagocíticas como monocitos y macrófagos, la Vitamina D regula los procesos de autofagia, diferenciación y maduración (Abu-Amer & Bar-Shavit, 1993; Yuk et al., 2009). Además, también se ha visto que regulan el proceso tardío de infecciones bacterianas reduciendo receptores tipo Toll2 (TLR2) y Toll4 (TLR4) (Sadeghi et al., 2006). Los neutrófilos son células reclutadas desde circulación hacia el sitio de invasión de algún patógeno, en donde con sus mecanismos que incluye la producción de ROS, fagocitosis y formación de trampas extracelulares pueden eliminar el patógeno (Manda et al., 2014; Mantovani et al., 2011). En estas células se ha observado que la Vitamina D es capaz de reducir la capacidad migratoria, aumentar su capacidad anti-microbial y reducir el daño producido por la formación de trampas extracelulares de

neutrófilos en pacientes con Lupus eritematoso sistémico (Hoe et al., 2016; Skrobot et al., 2018). En otras células como por ejemplo en eosinófilos, la Vitamina D es capaz de regular su homeostasis a través del alza de inhibidores de quimiocinas (Hiraguchi et al., 2012), inhibe la necrosis y la liberación de gránulos citotóxicos (Ethier et al., 2016). En células dendríticas se ha observado un potente efecto inhibitorio sobre su maduración y diferenciación, y siendo capaz de reducir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHC-II) y otras moléculas co-estimuladoras que participan en la captación y procesamiento de antígenos (Canning et al., 2001; Hewison et al., 2003). (Ilustración 3).

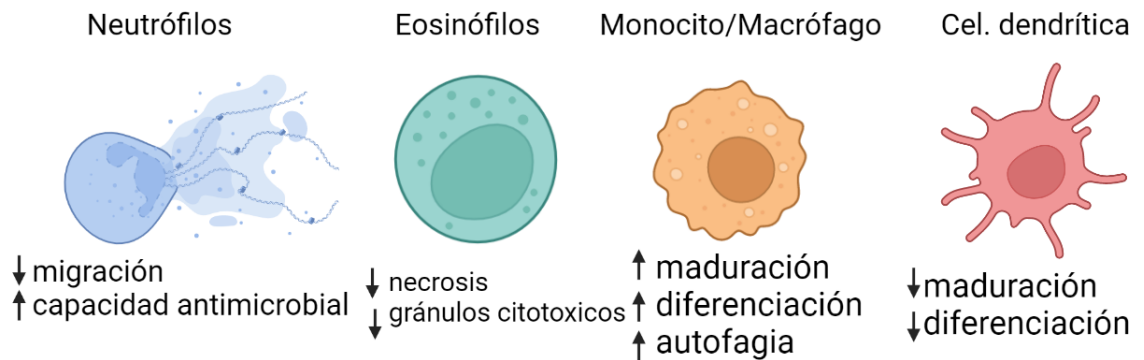


Ilustración 3: Vitamina D en células inmunes innatas.

Efecto de la Vitamina D frente a células de la inmunidad innata. Neutrófilos: reduce la migración y aumenta la capacidad anti-microbial; Eosinófilos: inhibe la necrosis, y reduce la liberación de gránulos citotóxicos; Monocito/Macrófago: aumenta la maduración, diferenciación y autofagia; Células dendríticas: inhibe su maduración y diferenciación.

## Vitamina D y Linfocitos T.

Si bien la respuesta inmune primaria es capaz de enfrentar rápidamente a los patógenos, su capacidad de eliminación es limitada, por lo que es necesaria una respuesta inmune especializada que corresponde a la inmunidad adaptativa. Las células del sistema inmune adaptativo incluyen las células T efectoras de la respuesta inmune, y las células B capaces de diferenciarse a células productoras de anticuerpos contra los antígenos del patógeno. Los linfocitos T se pueden dividir en 2 tipos, los citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) y los auxiliares o helper (CD4<sup>+</sup>) de los cuales existen distintos linajes en los cuales la Vitamina D puede tener función reguladora (Bonilla & Oettgen, 2010).

Se requiere interacción entre la Vitamina D y su receptor, sin embargo, este receptor no se encuentra expresado en linfocitos T no activados. Se ha descrito que tras la activación de los linfocitos T, se genera un aumento en la expresión del receptor VDR, permitiendo así la unión de la Vitamina D y produciendo su efecto inmunomodulador (Correale et al., 2009; Provvedini et al., 1983). La capacidad inmunomoduladora que tiene la Vitamina D está dada por su capacidad de regular factores de transcripción y la liberación de citoquinas. De esta forma se observa que la Vitamina D es capaz de metilar el gen que codifica para IFN- $\gamma$ , inhibiendo así la diferenciación del linaje Th1 (Das et al., 2014; Jiao et al., 2019). También se ha visto una disminución en la producción de IL-17, reduciendo la diferenciación de Th-17. Por otro lado, aumentan las interleuquinas

que promueven la diferenciación a Th2 y Treg como son IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13

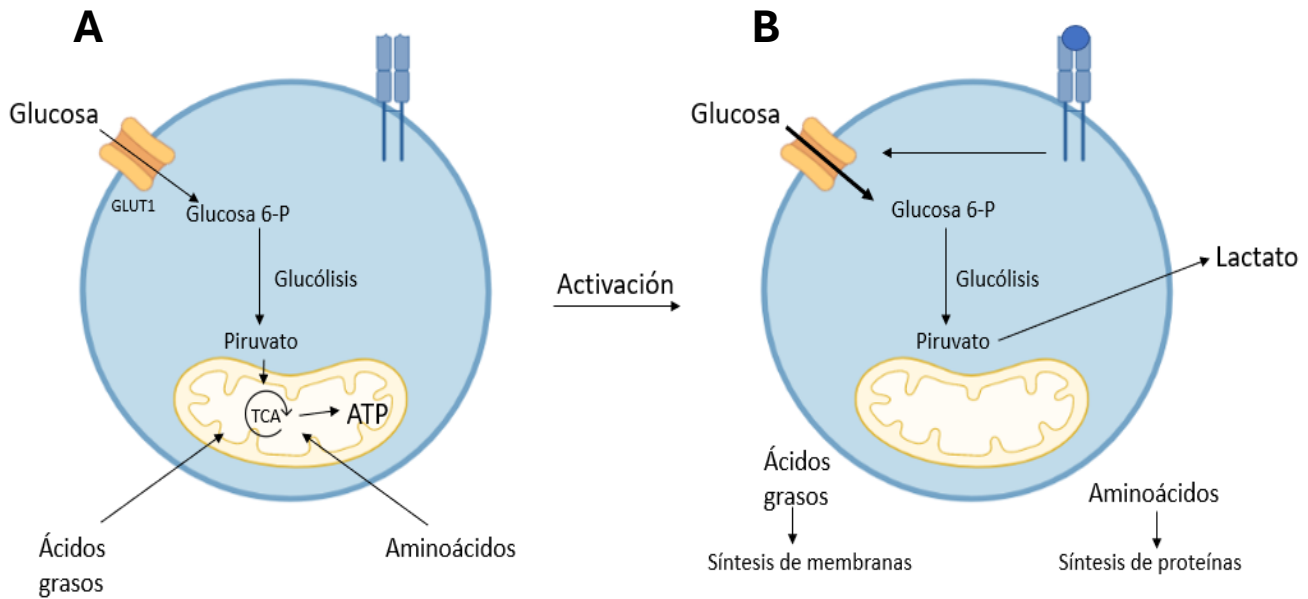
(Fraga et al., 2021; Sheikh et al., 2018).

## **Vitamina D y regulación metabólica.**

Las células T tienen la capacidad de encontrarse en diversos estadios, por ejemplo, cuando la célula no presenta ningún estímulo que requiera de sus acciones efectoras, se encontrara en un estado quiescente. Las células T quiescentes se encuentran en este estadio por largos periodos de tiempo en circulación, por lo que utilizan los pools de ATP y los nutrientes que se encuentran en el medio, principalmente glucosa, pero también por distintos procesos enzimáticos pueden generar ATP a partir de la cadena carbonada de aminoácidos o ácidos grasos(Plas et al., 2002), los cuales pueden ingresar a distintos niveles del ciclo del ácido cítrico para obtener el ATP desde la fosforilación oxidativa (Frauwirth & Thompson, 2004)

El linfocito T debe encontrarse preparado para responder de forma inmediata a una respuesta frente a un antígeno, de esta forma cuando el organismo reconoce un antígeno, el linfocito se activa y aumenta su proliferación para poder ejercer su función efectora. Los mecanismos de proliferación son energéticamente demandantes, por lo que el linfocito aumentara hasta 20 veces la captación de glucosa y si bien se esperaría que utilizara la ruta metabólica convencional de la fosforilación oxidativa, estas células usan un metabolismo que es prácticamente por completo glucolítico, ya que éste no entra al ciclo de Krebs, si no que el 85% de la glucosa que ingresa, es luego excretada en forma de lactato (Brand et al., 1988). Los otros nutrientes que se pueden obtener se encuentran participando

en otro tipo de procesos metabólicos que permiten la proliferación. Así, los ácidos grasos estarán participando en la síntesis de membranas, y los aminoácidos, en la síntesis de proteínas (Ilustración 4) (Fox et al., 2005). Si bien el linfocito utiliza la glucólisis como fuente principal de energía en su estado activo, éste aún puede realizar fosforilación oxidativa, por lo que tras la activación de las células T existe una elevación en los procesos de biogénesis y función mitocondrial (D'Souza et al., 2007)



**Ilustración 4: Metabolismo de linfocitos T quiescente y activado.**

A) Célula T que se encuentra en quiescencia, que utiliza los nutrientes glucosa, ácidos grasos y aminoácidos para obtener ATP por el ciclo del ácido cítrico. B) Célula T activada que utiliza la glucólisis como fuente de energía, y ácidos grasos como aminoácidos son utilizados en procesos de síntesis.

Respecto a los mismos procesos de activación de los linfocitos T activados, se ha demostrado que en presencia de Vitamina D se observa un mayor recuento celular en comparación a aquellas que no se encuentran en presencia de Vitamina D, siendo indicio de un aumento del proceso proliferativo (Ilustración 5). Por lo que sus requerimientos energéticos deberían ser aún más elevados, sin embargo, al estudiar la captación de glucosa y la liberación de lactato, estos no fueron elevados como se esperaba, si no que, por el contrario, existe una disminución de estos dos parámetros (Ilustración 6). Lo que propone que la Vitamina D utiliza otras rutas metabólicas para obtener energía para desarrollar el proceso proliferativo (Llerena, J. 2021). Además, al analizar la masa mitocondrial relativa que existe en estas células, no se observó una diferencia significativa que indique que existe mayor biogénesis mitocondrial (Bishop et al., 2022)

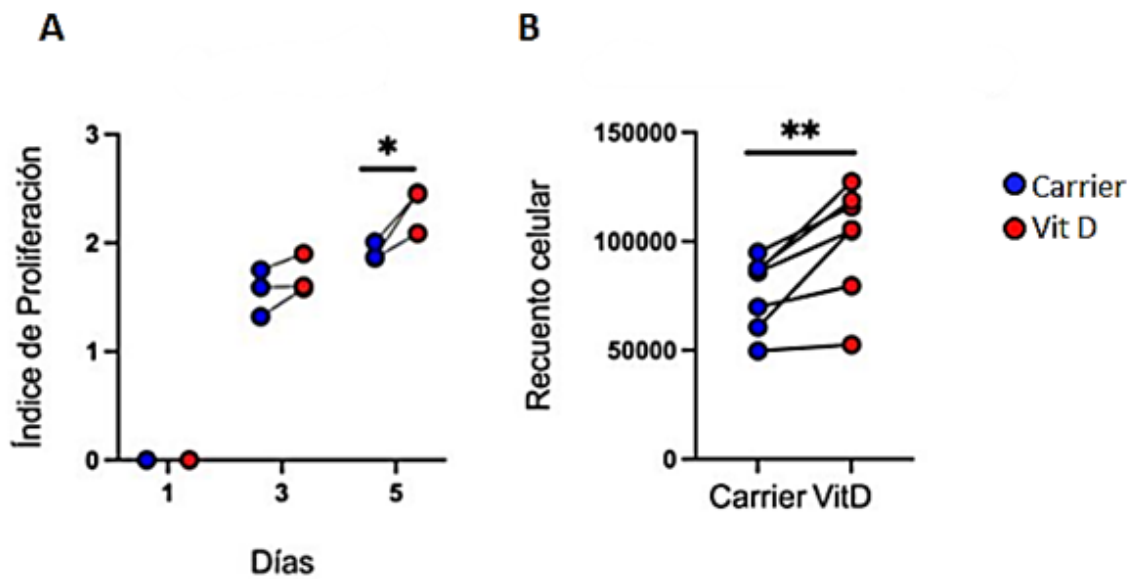


Ilustración 5: Proliferación y recuento celular de linfocitos T CD4+ activados en presencia o ausencia de Vitamina D.

A) Índice de proliferación de células T CD4+ en presencia (rojo) o ausencia (azul) de Vitamina D (10 nM) al día 1, 3 y 5 post activación (\*)  $p < 0.0037$ . B) Recuento celular de linfocitos T CD4+ en presencia (rojo) o ausencia (azul) de Vitamina D (10 nM) al día 5 post activación (\*\*)  $p < 0.0064$ .

(Extraído de Tesis MSc en Bioquímica Clínica e Inmunología de Faryd Llerena).

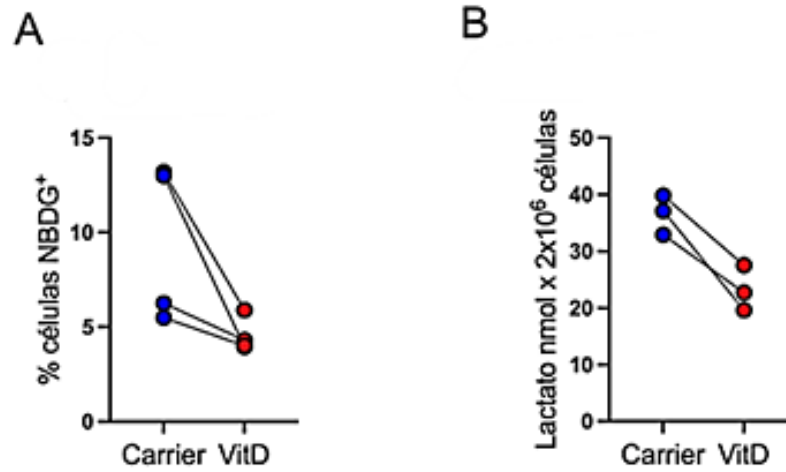


Ilustración 6: Estudio de la vía glucolítica.

A) Porcentaje de expresión de 2-NBDG en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia (rojo) o ausencia (azul) de Vitamina D (10 nM) al día 5 post activación. B) Concentración de lactato en sobrenadante de cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia o ausencia de Vitamina D (10 nM). (Extraído tesis MSc en Bioquímica Clínica e Inmunología Faryd Llerena).

## Glutaminólisis.

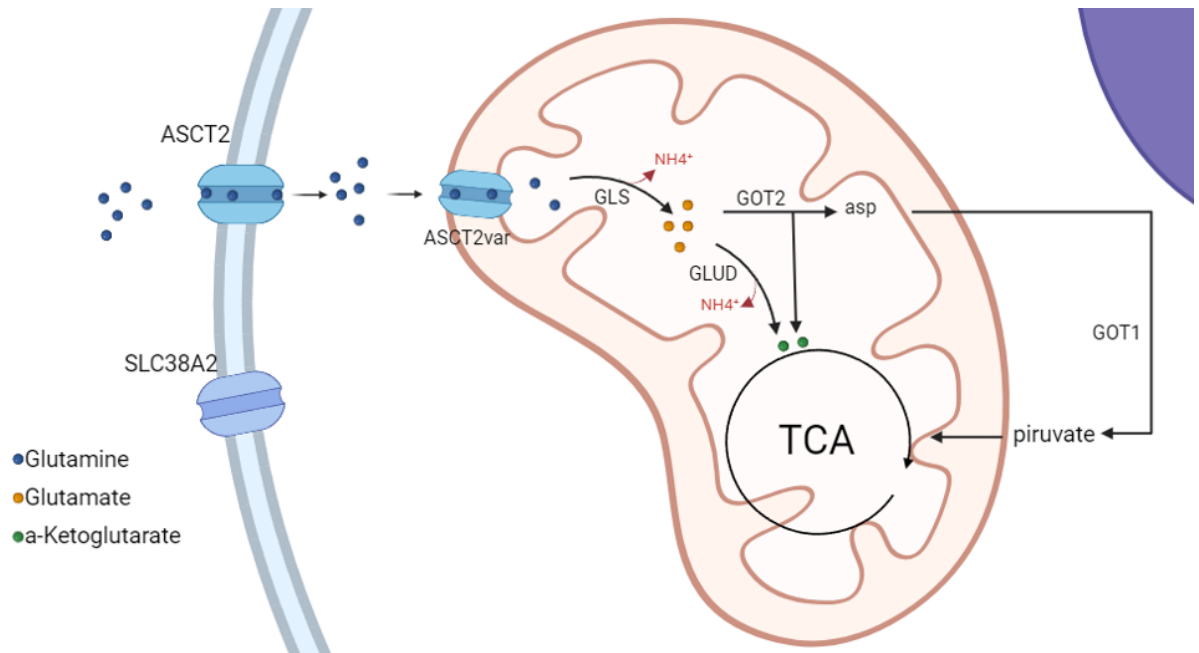
La glutamina es el aminoácido más abundante presente en la sangre humana, representando una concentración entre 10 a 100 veces más en comparación a otros aminoácidos, lo que representa aproximadamente entre un 40-60% del total de aminoácidos en plasma y tejidos (Feng et al., 2022). Las concentraciones de glutamina en sangre dependen del estado nutricional. En condiciones normales, los niveles de glutamina suelen estar en el rango de 500-900  $\mu\text{mol/L}$ . Sin embargo, estas pueden disminuir en situaciones de estrés metabólico, como ejercicio intenso, traumatismos, o por procesos infecciosos donde la demanda de glutamina por parte de las células inmunitarias es mayor (Walsh et al., 1998).

Se ha descrito que este aminoácido es esencial para los procesos de proliferación, diferenciación y sobrevivencia de las células inmunes, particularmente para los linfocitos T  $\text{CD4}^+$  por lo que se considera un aminoácido irremplazable para los procesos de activación del linfocito T (Feng et al., 2022; Newsholme, 2001). El transporte de glutamina hacia el interior de los linfocitos T  $\text{CD4}^+$  se lleva a cabo principalmente a través de transportadores específicos de aminoácidos donde pueden transportar glutamina con buena afinidad, como son el transportador ASCT2 (SLC1A5) (Ma et al., 2017) y el transportador SNAT1 (SLC38A1) (Pochini et al., 2014). La cinética de estos transportadores es un aspecto fundamental para su función. ASCT2 presenta una alta afinidad hacia glutamina con una constante de afinidad ( $K_m$ ) entre 10 a 50  $\mu\text{M}$ , lo que le permite

transportar glutamina eficazmente incluso a bajas concentraciones extracelulares la velocidad máxima de este transportador está optimizado para transportar rápidamente en situaciones de alta demanda celular, como es la proliferación (Scalise, Pochini, Console, Losso, et al., 2018; Scalise et al., 2016). Por otro lado, SNAT1 tiene una cinética que le permite transportar eficientemente en un rango de concentraciones más amplio, con una Km aproximadamente 20 a 100  $\mu\text{M}$  y una  $V_{\text{max}}$  adaptada para asegurar un suministro constante de glutamina a las células satisfaciendo las necesidades energéticas en diversas condiciones metabólicas. Una vez ingresa la glutamina a los linfocitos T puede servir como fuente de energía, y precursores en la síntesis de distintas moléculas cruciales para la proliferación y la función de los linfocitos (síntesis de glutatión, nucleótidos o proteínas). La glutamina también participa en la regulación de la señalización celular y la producción de citoquinas, contribuyendo en la coordinación de la respuesta inmune (Wang et al., 2024).

En el interior de los linfocitos T  $\text{CD4}^+$ , la glutamina es metabolizada principalmente a través del proceso de Glutaminólisis. Durante este proceso la glutamina es convertida a glutamato, proceso que puede ocurrir tanto a nivel citosólico como mitocondrial por la enzima glutaminasa que desamina la glutamina. Luego en la mitocondria por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa, el glutamato se transforma en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) (Newsholme et al., 1985). Existe también la opción de que glutamato sea metabolizado por las transaminasas GOT2 para generar  $\alpha$ -KG y aspartato, el cual

puede salir al citosol y por GOT1 aportar al ciclo del ácido cítrico en forma de piruvato(Ardawi & Newsholme, 1983). El  $\alpha$ -KG ingresa al ciclo del ácido cítrico (TCA), generando energía y precursores biosintéticos necesarios para el proceso proliferativo (Ilustración 7). De esta forma el  $\alpha$ -KG también puede utilizar la carboxilación reducida, en donde éste se convierte en citrato donde puede ser utilizado para la síntesis de lípidos y otros componentes necesarios para la rápida proliferación celular (Steinert et al., 2021).



### Ilustración 7: Ruta glutaminolítica en linfocitos T.

La glutamina (azul) puede ingresar a la célula por distintos transportadores como son ASCT2 y SLC38A2. Una vez dentro de la célula ingresan a la mitocondria por una variante de ASCT2, la glutamina es metabolizada por glutaminasa generando glutamato (amarillo). El glutamato puede ser metabolizado por GLUD y GOT2, en ambos generara  $\alpha$ -Kg (verde), ingresando al ciclo del ácido cítrico. Al ser metabolizado por GOT2 se genera aspartato, que puede salir al citosol y por GOT1 ingresar nuevamente en forma de piruvato para aportar al ciclo del ácido cítrico.

La Glutaminólisis es una ruta metabólica de gran relevancia, ya que también es crucial en el metabolismo de las células cancerosas (Ratnikov et al., 2015). Las células cancerosas también tienen una alta demanda energética y necesitan de precursores biosintéticos que gracias al aporte de los nitrógenos que puede aportar la glutamina aporta a las vías metabólicas que promueven este crecimiento celular (Hensley et al., 2013). Las proteínas y enzimas que participan en la Glutaminólisis se encuentran altamente expresadas en células cancerosas, esto dependiendo del tipo de cáncer se puede asociar al aumento en la tasa proliferativa (Qing et al., 2012), o por el lado contrario suprimiendo el crecimiento de estas células tras una regulación de la actividad antioxidante (Suzuki et al., 2010).

Esta desregulación energética que ocurre en el cáncer, puede ser un buen marcador de la malignidad del cáncer que se encuentre en estudio, logrando asociarse con señales proliferativas, facilitando la inmortalidad replicativa, o afectando en los procesos de invasión y metástasis (Hensley et al., 2013). Dado esto se han evaluado estrategias farmacológicas para inhibir la ruta de la Glutaminólisis con el fin de reducir la proliferación de aquellas células cancerosas que utilizan la glutamina en altas concentraciones. Siendo uno de los inhibidores más utilizados GPNA ( $\gamma$ -L-glutamil-p-nitroanilida), un análogo de glutamina que inhibe el transportador ASCT2 de manera competitiva, evitando el ingreso de glutamina hacia el interior de las células, inhibiendo así el crecimiento y proliferación de las células cancerosas (Hassanein et al., 2013). También se han

utilizados inhibidores específicos para otros puntos de la vía, como los inhibidores específicos de la glutaminasa, donde está el inhibidor-968 y BPTES, que se unen alostéricamente a la glutaminasa, lo que la inactiva. Se ha visto que esto reduce los niveles de ATP y las tasas de crecimiento de las células en varios tipos de cáncer (Masisi et al., 2020). Se ha demostrado que, un polifenol de té verde llamado galato epigallocatequina (EGCG) es capaz de eliminar células cancerosas glutamino-adictas durante la privación de glucosa o la inhibición de la glucólisis a nivel de la glutamato deshidrogenasa (Xiao et al., 2016).

El aumento del recuento celular y proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D observada en la tesis de MCs de Faryd Llerena, nos presentó que estos linfocitos se encuentran en procesos de alto requerimiento energético. Pero esto no tiene relación con la captación de glucosa y producción de lactato, ya que esta descrito que la Vitamina D suprime la glucólisis en Linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Bishop et al., 2022). Al estar suprimida, estos linfocitos T deben obtener su energía por otra ruta metabólica, en donde la Glutaminólisis es una ruta que podría estar cumpliendo como la fuente de obtención de energía para el proceso proliferativo.

**Presentación del problema:**

Se ha descrito que la activación de las células T genera un aumento en el recuento celular a expensas de un aumento de la vía glucolítica. Sin embargo, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D se observa una disminución en la captación de glucosa y producción de lactato, al mismo tiempo que un aumento en el recuento y viabilidad celular.

**Pregunta de investigación:**

¿Cuál es la relevancia de la Glutaminólisis sobre el recuento, la viabilidad y transporte de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D?

## Hipótesis

La Vitamina D aumenta el recuento, viabilidad y el transporte de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados mediante la Glutaminólisis.

## **Objetivos**

### **Objetivo general:**

Analizar la participación de la Glutaminólisis sobre el recuento, viabilidad y transporte de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.
2. Analizar el efecto de la inhibición de la Glutaminólisis en el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D.
3. Cuantificar los niveles de expresión del receptor de Glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.
4. Evaluar la captación de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.

## Materiales y métodos

### **1.- Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por gradiente de densidad por Ficoll.**

Se obtuvieron células a partir de aproximadamente 40 mL de sangre, la cual se puso en tubo Falcon de 50 mL y se llevó a 50 mL añadiendo PBS. La muestra se separó en 2 tubos añadiendo aproximadamente 25 mL a cada uno y diluyéndolos a la mitad con otros 25 mL de Ficoll, protegiéndolos de la luz directa debido la fotosensibilidad del Ficoll. Se agregó gota a gota la sangre diluida al tubo con Ficoll, con el tubo inclinado para luego seguir con un flujo continuo, para acelerar la separación se centrifugaron los tubos a 2000 rpm por 30 minutos a una aceleración y desaceleración [1\_0]. La separación generó 4 fases, en orden desde arriba hacia abajo: suero, anillo mononuclear, Ficoll y células rojas. Usando una pipeta Pasteur se recolectó el anillo mononuclear en un tubo Falcon de 15 mL, y luego se lavó con PBS en la centrifuga a 1500 rpm por 10 minutos a una aceleración y desaceleración [9\_9]. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el Pellet en 1 mL de PBS. 10 uL de la suspensión se mezclaron con 90 uL de azul de tripán, para contar las células mononucleares en una cámara de Neubauer.

## 2.- Separación de células T CD4<sup>+</sup> de memoria.

Para la separación de células T CD4<sup>+</sup> se utilizó el protocolo “Memory CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit Human”. Según el conteo de células en la cámara de Neubauer, se ajustó el protocolo según el número millones de células a utilizar, determinando así los mL correspondientes a la cantidad de células a procesar. Dada las células contadas se agregarán 500 uL de PBS y se centrifugan a 330 g por 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 40 uL de buffer por cada 10<sup>7</sup> totales. Luego se añaden 10 uL de “Memory CD4<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail” por cada 10<sup>7</sup> células totales. Se resuspendió para mezclar y se incubó por 10 minutos a 2-8 °C. Luego, se agregaron 30 uL de Buffer por cada 10<sup>7</sup> células totales, y 20 uL de “Anti-Biotin MicroBeads” por cada 10<sup>7</sup>, y se incubaron por 15 minutos a 2-8 °C, Las muestras se lavaron agregando entre 1-2 mL de Buffer por cada 10<sup>7</sup> células totales y se centrifugaron a 300 g por 10 minutos, para luego aspirar el sobrenadante y las células se resuspendieron finalmente en 500 uL de Buffer.

Para la separación magnética se utilizó la columna adecuada a la Tabla 1.

Column	Max. number of labeled cells	Max. number of total cells	Separator
MS	$10^7$	$2 \times 10^8$	MiniMACS, OctoMACS, VarioMACS, SuperMACS
LS	$10^8$	$2 \times 10^9$	MidiMACS, QuadroMACS, VarioMACS, SuperMACS
XS	$10^9$	$2 \times 10^{10}$	SuperMACS
autoMACS	$2 \times 10^8$	$4 \times 10^9$	autoMACS, autoMACS Pro

Tabla 1: Columnas para separación que se deben utilizar dependiendo los millones de células a procesar.

Esta columna se acopló al magneto, y se cebó con Buffer MACS agregando 500 uL en caso de utilizar columnas MS o 3 mL en caso de que se use la columna LS. Una vez finalizando el paso de cebado, se procedió a pasar las células por la columna, seguido de 3 mL de Buffer MACS 3 veces para asegurar el paso de las células por la columna. Se retiró el tubo colector de los 9 mL de Buffer, se colocó un nuevo tubo colector y se agregaron 5 mL de Buffer MACS y con un embolo se hizo pasar todo por la columna para recuperar las células T CD4<sup>+</sup>.

### 3.- Separación por Cell-Sorting

Se tomó una porción de las células obtenidas y se marcaron con 2 uL de anticuerpos fluoróforos anti-CD4 FITC. Se incubarán a 4°C durante 30 minutos y

luego se enviaron al Cell Sorter (Aria II, BD)(Lehmann & Meurer, 2010) donde las células fueron sorteadas, y tener así una población pura de células T CD4<sup>+</sup> de memoria. Como control negativo se utilizó un FMO.

#### **4.- Cultivo celular y análisis de proliferación.**

El cultivo se realizó en placa de 96 pocillos de fondo redondo. Donde aproximadamente se trasvasijaron 100 uL de las células en cada pocillo, equivalentes entre 50.000 y 5.000.000 de células. Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con glutamina 2 mM, tanto en presencia como en ausencia de Vitamina D. Estas fueron activadas con anticuerpos anti-CD3 y anti CD28 de los cuales se agregaron 6.25 uL por cada 1 millón de células (Relación 1:4)

La 1,25 dihidroxivitamina D viene a una concentración inicial de 2 micromol/L y se agregó a una concentración final de 10 nmol/L, y el control sin Vitamina D debe tener la misma proporción agregada del Carrier (etanol).

Para estudiar la proliferación se preparó un stock de “CellTrace Violet” (Invitrogen) agregando 5 mM de vial a 20 uL de DMSO, de esta solución stock, se agregó 1 uL a cada mL de células en suspensión en PBS precalentadas para quedar con una concentración final de 1 uM. Se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente o a 37°C, protegidas de la luz. Luego se agregó 5 veces lo agregado de tinción, pero de medio de cultivo y se incubó durante 5 minutos

en hielo para remover el exceso de tinción. Finalmente se formó el pellet de células por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos y se resuspendió en medio de cultivo precalentado, se incubaron las células por al menos 10 minutos antes de analizar la proliferación, la cual se estudió desde el día 2, hasta el día 4.

Para el estudio de la viabilidad las células se separaron del sobrenadante, y se recolectaron en tubos de citometría. A las células se les agregaron 200 uL de PBS con 1 uL del fluoróforo Live/Dead (invitrogen) en APC a una concentración 1:1000, y se incubaron a 4°C durante 15 minutos en oscuridad. Posteriormente se lavaron por 5 minutos a 1500 rpm con 1-2 mL de PBS, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 uL de PBS con 5 uL de Beads de conteo (invitrogen). Y se analizó en el citómetro de flujo (LSR-Fortessa X20. BD).

#### **5.- Medición de glucosa y lactato.**

Para medición de glucosa y lactato en los linfocitos T en cultivo, el sobrenadante fue recolectado desde el día 2, y el día 4. Para luego diluirlo en una relación 1:10 con agua bidestilada. De esta dilución se agregaron 10 uL en una placa de 96 pocillos. Para la medición de glucosa se agregaron 200 uL del reactivo de glucosa de BioSystem y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para luego medir en el lector de microplacas a 500 nm. Para la medición de lactato se preparó una mezcla de los reactivos A y B del kit de BioSystem en la proporción

de 80uL del reactivo A y 20 uL del reactivo B para cada uno de los pocillos a los que se le medirá lactato. Tras agregar el mix se esperaron 5 minutos a 37°C y se leerá absorbancia en el lector de microplacas (SYNERGY 2 BIOTEK) a 600 nm. En ambos casos se utilizaron curvas estándar para obtener la concentración correspondiente.

#### **6.- Marcaje con 2 NBDG.**

Para el marcaje con 2-NBDG (Invitrogen) las células se colectaron en tubos de citometría y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se eliminó todo el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 uL de PBS para privarlas de glucosa, lo cual se realizó durante 1 hora a 37°C. transcurrido el tiempo, se le agregaron 100 uL de PBS que contiene 2-NBDG a una concentración de 20 uM, generando una concentración final de 10 uM y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. La reacción será detenida con 800 uL de PBS frío, luego se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, para posteriormente hacer marcajes con Live/Dead y agregando los 5 uL de Beads de conteo.

#### **7.- Cultivo con inhibidores.**

Para el estudio con los inhibidores, primero se estandarizó la concentración necesaria de los inhibidores a utilizar realizando una curva de concentraciones.

Se utilizaron los inhibidores GPNA que inhibe a ASCT2 en un rango de concentración entre 100-250  $\mu$ M, inhibidor 968 y BPTES que inhiben la glutaminasa en un rango de concentración entre los 5-25  $\mu$ M.

Con estas concentraciones se realizó la incubación de los linfocitos a partir de los 2 días, para que los cambios metabólicos de la Vitamina D ya estén presentes. Posteriormente, se estudió la viabilidad con los marcadores Live/Dead mediante citometría de flujo.

#### **8.- Preparación con marcador de ASCT2.**

Para el estudio del nivel de expresión del transportador de aminoácidos ASCT2 en superficie, se utilizó un anticuerpo policlonal acoplado a fluoróforo FITC (Invitrogen), Se tomaron del cultivo celular los linfocitos que se encuentren en los periodos entre 2 y 4 días en presencia y ausencia de Vitamina D. A estos se le añadirán 100  $\mu$ L de PBS con una concentración del fluoróforo de 5 $\mu$ g/mL y se incubaron a 4°C durante 1 hora en oscuridad, para luego medir por citometría de flujo.

## 9.- Transporte de glutamina por glutamina $^3\text{H}$ .

El transporte de glutamina marcada con tritio [ $^3\text{H}$ ], se realizó por viales con linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia y ausencia de Vitamina D. Antes del ensayo de transporte, las células fueron lavadas dos veces con PBS tibio con el fin de remover la glutamina extracelular. La captación de glutamina marcada (5uCi  $^3\text{H}$  glutamina/mL) a concentraciones de glutamina fría de 0 a 150 uM en PBS se realizó durante 1 minuto a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con 800 uL de PBS frío con glutamina a una concentración de 2mM. Luego, se agregaron 200 uL de NaOH a 0.2 N al pellet de linfocitos y se agitó durante 30 minutos para lisis celular. 100 uL se trasvasijaron en vial de centelleo a las cuales se agregaron 2.8 mL de líquido de centelleo para ser analizado en el contador de centelleo: LS 6500 MULTI-PURPOSE SCINTILLATION COUNTER. Los 100 uL restantes fueron utilizados para la medición de proteínas. Se realizó una curva estándar de 0 a 1 mg/mL agregando 10 uL del estándar a distintas concentraciones en una placa de 96 pocillos, a cada pocillo se le añadieron 10 uL de muestra. Posteriormente, se agregaron 25 uL del reactivo A a cada pocillo, seguido de 200 uL del reactivo B. La placa se dejó en oscuridad y temperatura ambiente durante 15 minutos, se analizó la absorbancia en el lector de microplacas (SYNERGY 2 BIOTEK) a 750 nm.

La captación total se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Captación} = (R_s * S_t * T) / (R_{st} * X)$$

Donde  $R_s$  es la radioactividad (dpm) en la muestra,  $S_t$  es la cantidad de Glutamina agregada por cada pocillo ( $\mu\text{mol}$ ),  $R_{st}$  es la radioactividad del estándar (dpm),  $X$  la concentración de proteínas por pocillo ( $\mu\text{g}$ ) y  $T$  es el factor de corrección por el tiempo. La captación se expresó como  $\text{pmol} (\mu\text{g proteína})^{-1} \text{min}^{-1}$ .

Una vez calculada la captación celular de glutamina, se generaron curvas de saturación para estimar los parámetros de velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y saturación media (Di Lorenzo et al.). La presencia de un componente no saturable para el transporte de glutamina se derivó a partir de la captación obtenida de la ecuación de Michaelis-Menten más un componente lineal no saturable dado por la siguiente expresión:

$$v = \{ (V_{max} * [\text{Glutamina}] / (K_m + [\text{Glutamina}])) + (m * [\text{Glutamina}]) \}$$

donde  $v$  es la captación total de glutamina,  $m$  es la pendiente del componente lineal para la captación de glutamina y  $[\text{Glutamina}]$  representa la concentración de glutamina. La clásica ecuación de Michaelis-Menten representa el componente saturable para el transporte de glutamina y  $m * [\text{Glutamina}]$  es el componente lineal no saturable.

El componente saturable para el transporte de glutamina se calculó mediante la expresión:

$$Sat = v - (m * [Glutamina])$$

Donde Sat es el componente saturable para el transporte total (v) de Glutamina.

Los parámetros cinéticos para el componente saturable se calcularon como:

$$v = (V_{max} * [Glutamina]) / (K_m + [Glutamina])$$

Y se expresaron como:

$$V_{max} \text{ en pmol (ug de proteína)}^{-1}\text{min}^{-1}$$

$$K_m \text{ en uM}$$

Las variaciones fueron calculadas por error estándar.

## 10.- Proteómica.

Tras el cultivo, a cada una de las muestras se le añadió inhibidor de proteasas/fosfatasa (#1861284, Thermo Scientific) a una concentración final 1X. luego las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 8M urea con 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8 y posteriormente homogeneizadas utilizando ultrasonido por 1 min con pulsos de 10 s (on/off) a una amplitud del 50% utilizando un baño frío. luego, se incubaron en hielo por 5 min y posteriormente se centrifugaron para eliminar debris 21.000 x g por 10 min a 4°C. las muestras inmediatamente fueron cuantificadas mediante Qubit 4™ (Thermo Scientific)

usando el kit *Qubit Protein Assay*. Se tomo un total de 100  $\mu\text{g}$  para digestión triptica.

Las proteínas resultantes fueron precipitadas agregando 5 volúmenes de acetona fría e incubadas *overnight* a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Luego, fueron equilibradas a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugaron a 16000 x *g* por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante fue lavado 3 veces con acetona 80% fría. Posteriormente, se dejó secar el pellet de proteínas en un concentrador rotatorio.

Las muestras fueron resuspendidas en 30  $\mu\text{L}$  8M Urea y 25 mM bicarbonato de amonio. Luego, fueron reducidas con DTT a una concentración final de 20 mM en 25 mM bicarbonato de amonio e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Seguido, se alquilaron agregando Iodoacetamida a una concentración final de 20 mM en 25 mM de bicarbonato de amonio e incubaron por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras son diluidas 8 veces con 25 mM bicarbonato de amonio.

La digestión fue realizada con Tripsina grado secuenciación (V#5071, Promega) en una proporción 1:50 de proteasa:proteína (masa/masa) se incubo por 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , la reacción de digestión se detuvo por pH agregando ácido fórmico al 10%. Luego, las muestras fueron sometidas a *Clean Up* Thermo Pierce C18 Spin Columns (cat cod 89870, ThermoFisher), según indicaciones del proveedor. Posteriormente, los péptidos limpios fueron secados en un concentrador rotatorio a 1000 rpm *overnight* a  $10^{\circ}\text{C}$ .

200 ng de los péptidos obtenidos en el paso anterior fueron inyectados a un Evosep One (Evosep Biosystems) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (“Trapped Ion Mobility Spectrometry – Quadruple Time Of Flight Mass Spectrometer”, Bruker Daltonics) utilizando una columna PePsep Eight (8 cm x 150  $\mu$ M ID, 1.5  $\mu$ m C18, Bruker Daltonics). La cromatografía líquida se realizó utilizando la modalidad de 30 SPD (“Samples per-Day”) en todas las muestras. El gradiente utilizado fue de 2% al 35% de tampón B (0.1% Ac. Fórmico – Acetonitrilo). La colección de resultados fue realizada utilizando el software TimsControl 2.0 (Bruker Daltonics) bajo 10 ciclos de PASEF, con un rango de masas de 100-1700 m/z, ionización del capilar 1500V y una temperatura de 180°C en el capilar, frecuencia del TOF 10 KHz a una resolución de 50000 FWHM.

Los datos obtenidos fueron analizados con el software MSFragger 3.8 (Kong et al., 2017) por medio de la plataforma Fragpipe v20.1 (<https://fragpipe.nesvilab.org/>) utilizando el flujo de trabajo “default”, en un servidor de análisis de datos compuestos por 48 núcleos y 512 Gb de memoria RAM. Se utilizaron parámetros de tolerancia de masas de precursores de -20 a 20 PPM y tolerancia de fragmentos de masa de 40 PPM. Dentro de las opciones de digestión se utilizó tripsina como enzima, modo de digestión específico y un máximo de 2 escisiones de pérdidas por péptido (“*missed cleavages per peptides*”). Se utilizaron como modificaciones post-traduccionales (PTM):

carbomidometilación de la cisteína, como PTM fija: oxidación de Metionina (M), Acetilación N-terminal, como PTMs variables. Se incluyó la estimación de FDR <1% por medio de una base de datos decoy. Para la identificación de proteínas se utilizó el proteoma humano de referencia, disponible en Uniprot. Adicionalmente, se adiciono una base de datos de contaminantes comunes en espectrofotometría de masas, disponible en la plataforma FragPipe.

### **11.- Análisis de datos.**

Los datos obtenidos por el citómetro de flujo fueron analizados por el programa FlowJo 7.6, junto a los otros datos obtenidos en lector de microplacas (SYNERGY 2 BIOTEK) la comparación de valores se realizó utilizando la distribución *t* de Student (dos lados) de datos pareados, y un valor  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados utilizando el programa GrahPad Prism 10.

## **RESULTADOS**

**Objetivo específico 1: Determinar la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.**

### **Separación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> para cultivo celular.**

Para confirmar los hallazgos asociados al efecto de la Vitamina D sobre la glucólisis reportados anteriormente, (Tesis de MSc, Faryd Llerena), se realizaron experimentos para evaluar el recuento, la captación de glucosa y producción de lactato en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. Todos los estudios se llevaron a cabo utilizando linfocitos obtenidos de donantes sanos.

La selección de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vivos se realizó mediante separación de gradiente Ficoll, el enriquecimiento con beads magnéticos y el aislamiento con cell sorting. Las células fueron cultivadas en condiciones controladas durante 4 días. Utilizando citometría de flujo discriminamos entre células vivas y muertas, permitiendo aislar con precisión la población viva de linfocitos CD4<sup>+</sup> viables estudios realizados, se consideró la población de linfocitos T CD<sup>+</sup> vivos.

Las imágenes de los plots de citometría de flujo (Figura 1) muestran la selección de la población de células vivas, y asegurar que solo células viables fueran utilizadas para el recuento celular y los experimentos posteriores, asegurando la validez de los resultados obtenidos.

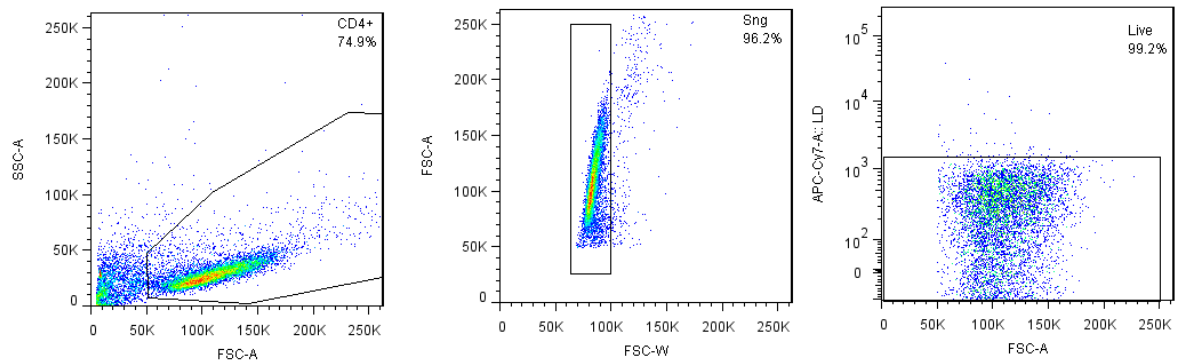


Figura 1: Plots de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Representación gráfica por dot plots obtenida por citometría de flujo, mostrando la selección de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vivos. Se visualizan los plots que indican la separación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, luego los singletes, y finalmente la separación de células vivas y muertas con el marcador (LIVE/DEAD (LD), asegurando que solo las células viables sean utilizadas para el recuento celular y experimentos posteriores.

### **La Vitamina D incrementa el recuento celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Una vez obtenidos nuestros linfocitos T CD4<sup>+</sup> se activaron con anti-CD3/CD28 y se cultivaron en placa de 96 pocillos, sembrando aproximadamente 100.000 células por pocillo durante 4 días. Se establecieron dos condiciones, Vitamina D a una concentración de 10 nM y para el control se agregó el mismo volumen, pero de etanol, el que corresponde al Carrier en el cual se encuentra disuelta la Vitamina D.

Los resultados del recuento celular (Figura 2) son congruentes con la bibliografía y lo observado anteriormente en nuestro laboratorio. Estos resultados indican que la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D muestra un aumento en su recuento celular a los 4 días de cultivo.

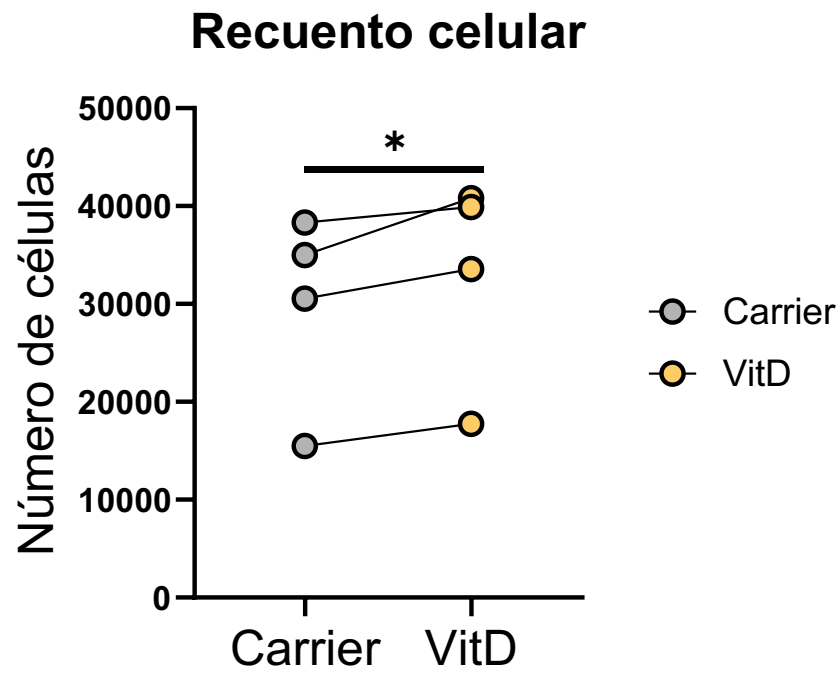


Figura 2: Recuento celular de linfocitos T CD4+ en presencia de Vitamina D.

Gráfico de símbolos y líneas que muestran el recuento celular de linfocitos T CD4+ activados en presencia o ausencia de Vitamina D (10 nM) por 4 días (n=4,  $p < 0.0423$ , t-student pareado).

**La Vitamina D reduce la utilización de glucólisis a pesar de su aumento en el recuento celular.**

Dado el aumento celular en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D, se realizó el mismo protocolo de cultivo celular, y se tomaron los sobrenadantes de las células cultivadas tras los 4 días de incubación, para evaluar el consumo de glucosa. Se midió la diferencia entre la glucosa inicial que tenía el medio de cultivo RPMI (200mg/dL) y la glucosa remanente tras los 4 días. Así se calculó la cantidad de glucosa consumida por los linfocitos (Figura 3A). Los resultados mostraron que el consumo de glucosa fue significativamente reducido en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D.

Luego, se midió la concentración de lactato en sobrenadante, el cual es el producto final de la ruta glucolítica, y es liberado al medio extracelular. Los resultados mostraron que, al igual que la glucosa, el lactato extracelular presentó una disminución significativa en presencia de Vitamina D (Figura 3B).

Otro método utilizado para medir la captación de glucosa fue mediante un análogo fluorescente de glucosa (2-NBDG). Las células, tras los 4 días de cultivo, fueron privadas de glucosa durante 1 hora y luego se le agregó el análogo fluorescente a una concentración de 10  $\mu$ M, para posteriormente ser analizadas por citometría de flujo. Se evaluó el porcentaje de células positivas para la

captación de este análogo. Este método directo mostró una disminución significativa en la captación de glucosa en presencia de Vitamina D (Figura 3C).

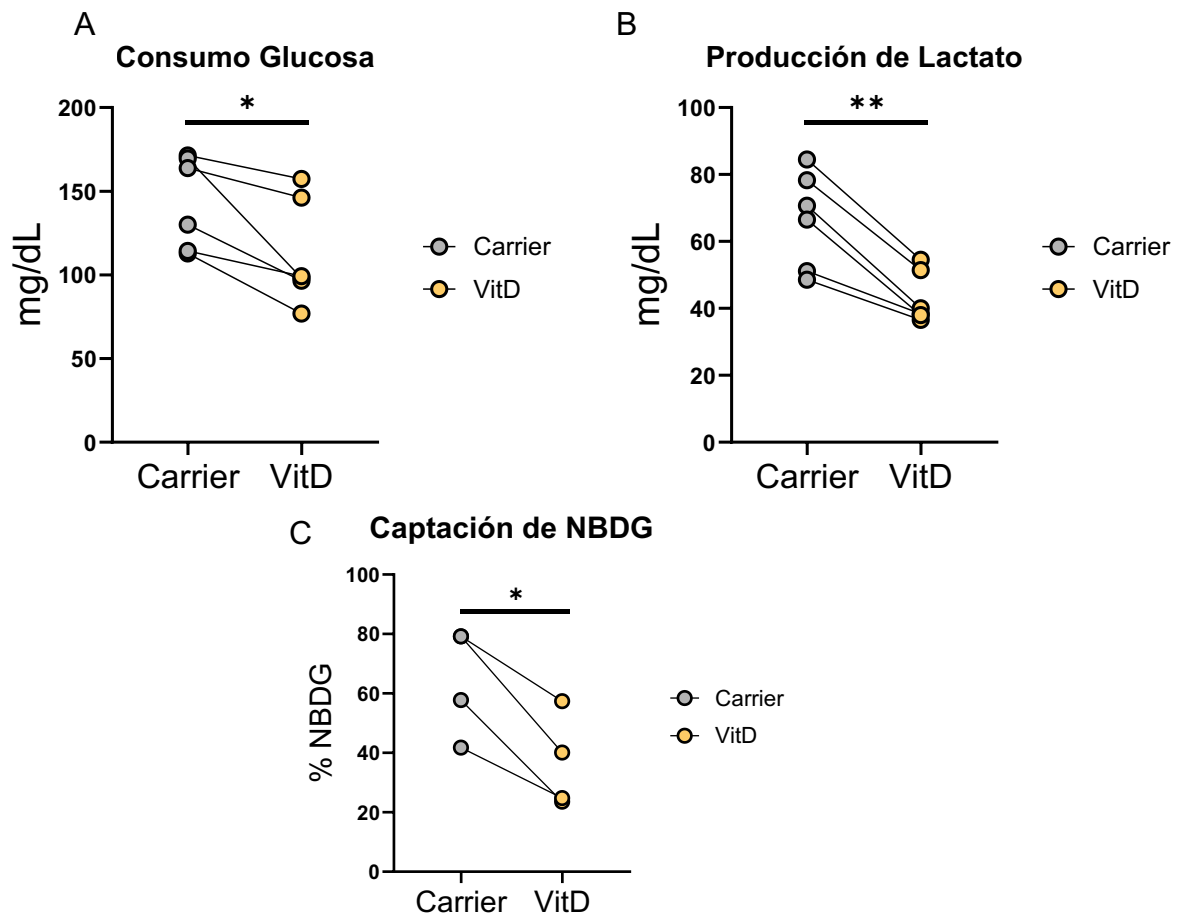


Figura 3: Captación de glucosa y producción de lactato.

A) Gráfico de símbolos y líneas del consumo de glucosa por linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D (10 nM), evaluado por la diferencia de glucosa en el medio de cultivo (n=6, p<0.0171, t-student pareado). B) Gráfico de símbolos y líneas de la concentración de lactato en el sobrenadante de los cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D (10nM) por 5 días (n=6, p<0.0012, t-student pareado)). C) Gráfico de símbolos y líneas del porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> para el análogo fluorescente de glucosa (2-NBDG) en presencia y ausencia de Vitamina D (10nM) por 4 días (n=4, p<0.0123, t-student pareado).

**Análisis proteómico del efecto de la Vitamina D sobre las proteínas que participan en la Glutaminólisis en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados.**

Con los resultados obtenidos, se observa que la glucólisis no se favorece en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, a pesar del aumento en el recuento celular. Esto sugiere que estos linfocitos podrían estar empleando rutas metabólicas alternativas para satisfacer sus demandas energéticas durante la proliferación.

Una de las rutas metabólicas más utilizadas por células altamente proliferativas es la glutaminólisis, que utiliza la glutamina como fuente rápida de energía. La glutamina ingresa a través de varios transportadores de aminoácidos, siendo los principales SLC38A1, SLC38A2, y especialmente, SLC1A5 (ASCT2), que es el principal en el transporte de células altamente proliferativas.

Los análisis proteómicos realizados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras 5 días de cultivo no revelaron diferencias significativas en los transportadores de (Figura 4).

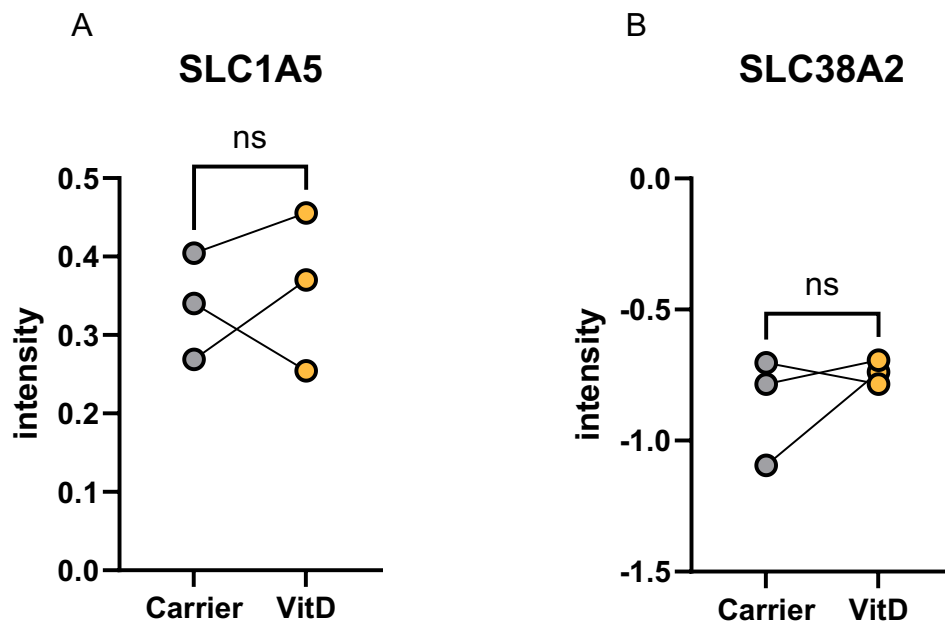


Figura 4: Análisis proteómico de los transportadores de glutamina en linfocitos T CD4+ activados en presencia de Vitamina D.

A) Gráfico de símbolos y líneas de la cuantificación del transportador SLC1A5 (ASCT2) de linfocitos T CD4+ activados en presencia y ausencia de Vitamina D (10nM) por 4 días. B) Gráfico de símbolos y líneas de la cuantificación del transportador de glutamina SLC38A2 de linfocitos T CD4+ activados en presencia de Vitamina D (10 nM) por 4 días.

## **Metabolismo de la glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.**

Tras el ingreso de glutamina al interior de la célula, ésta debe ser metabolizada por la glutaminasa para convertirse en glutamato. Este proceso puede ocurrir tanto en el citoplasma como en las mitocondrias. Las isoformas citoplasmáticas pueden participar en el proceso de la Glutaminólisis y también puede contribuir a la producción de glutamato para involucrarse en la regulación del estrés oxidativo mediante la producción de glutatión.

En las mitocondrias, encontramos las isoformas GLSK y GLS, que generan glutamato. Los resultados de la proteómica mostraron un aumento significativo en la isoforma GLSK (Figura 5<sup>a</sup>) y la isoforma GLS (Figura 5B) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fueron activados en presencia de Vitamina D.

Una vez dentro de la mitocondria, el glutamato se convierte hacia  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). Este proceso puede ser realizado por GOT2, que genera  $\alpha$ -KG y aspartato, o por la glutamato deshidrogenasa (GLUD1). En el primer caso, el aspartato puede salir al citoplasma y, mediante GOT1, transformarse en piruvato. Los resultados de la proteómica mostraron una disminución significativa en GOT1 (Figura 5C), más no un cambio significativo en GOT2 (Figura 5D) lo que sugiere que esta ruta alternativa no es la principal utilizada por el glutamato para participar en el ciclo del ácido cítrico. Por otro lado, GLUD1 presentó un aumento

significativo en presencia de Vitamina D (Figura 5E), lo que indica que esta ruta directa es la que se propone para el aporte de  $\alpha$ -KG al ciclo del ácido cítrico (Ilustración 7).

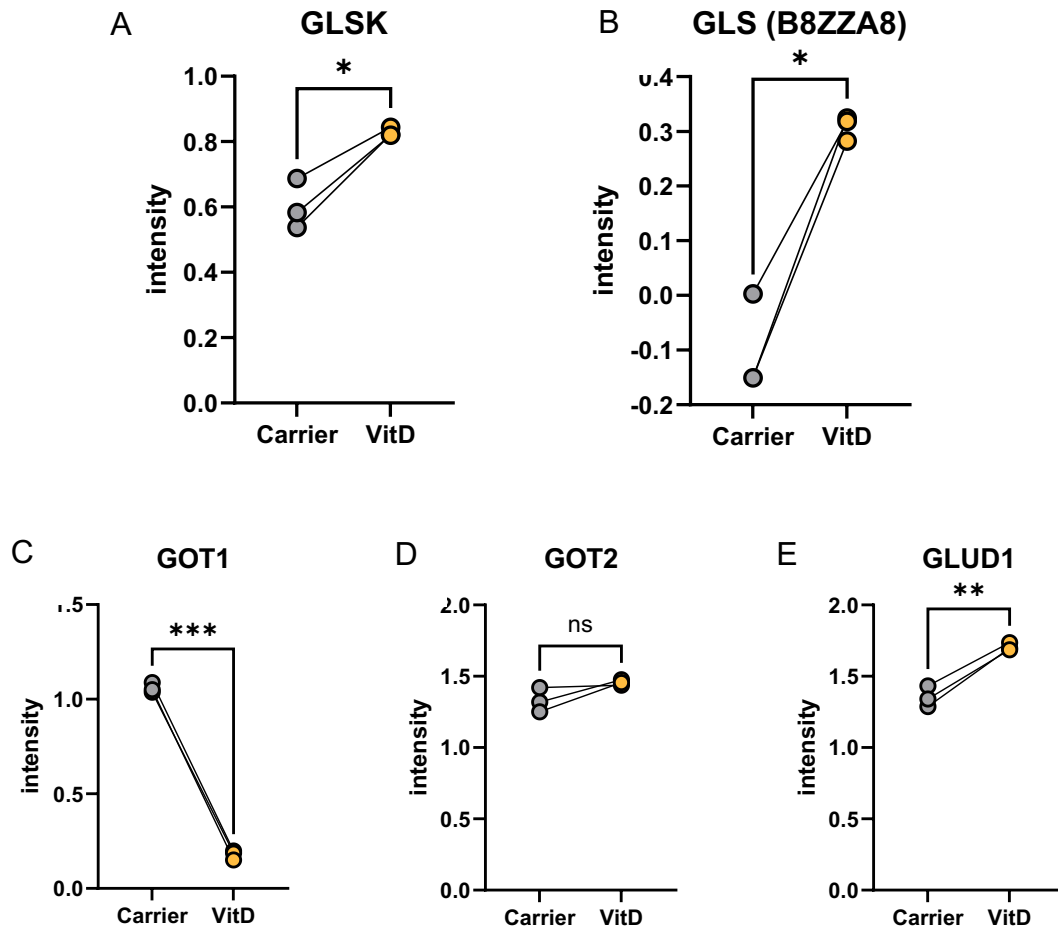


Figura 5: Análisis proteómico de las enzimas participantes en la Glutaminólisis en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.

Gráfico de símbolos y líneas de la cuantificación de A) la isoforma de glutaminasa GLSK (n=3, p<0.0261, t-student parado), B) la isoforma de la glutaminasa GLS (B8ZZA8) (n=3, p<0.0133, t-student pareado), C) la Glutamato Oxaloacetato Transaminasa 1 (GOT1) (n=3, p<0.0003), t-student pareado), D) la Glutamato Oxaloacetato Transaminasa 2 (GOT<sup>2</sup>) (n=3, p<0.1545, t-student pareado) y E) la Glutamato deshidrogenasa 1 (GLUD1) (n=3, p<0.0075, t-student pareado) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D (10nM) por 4 días.

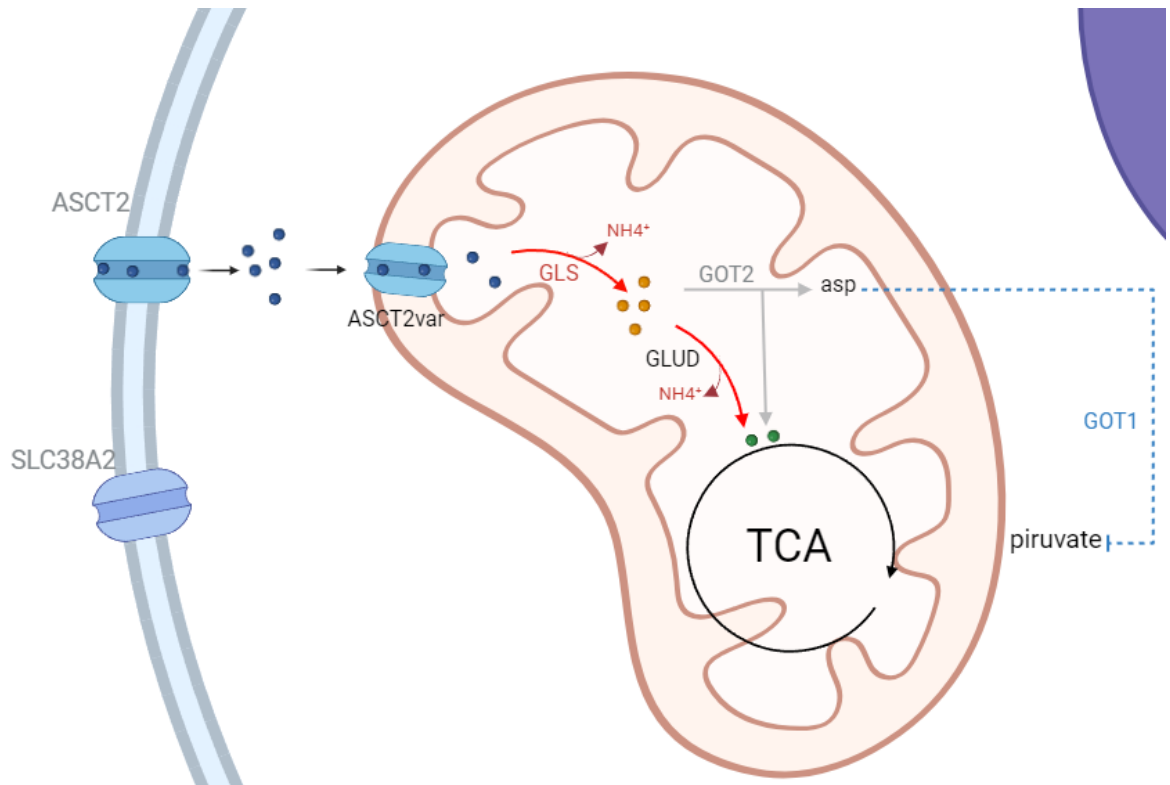


Ilustración 8: ruta propuesta para el uso de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.

A) el ingreso de glutamina por los transportadores ASCT2 y SLC38A2 no muestran diferencias significativas en presencia de Vitamina D (en gris), tras el ingreso de la glutamina, la ruta que se encuentra favorecida es por Glutaminasa (GLS) y Glutamato deshidrogenasa 1 (GLUD) ingresando de esta forma al ciclo del ácido cítrico (ruta en rojo). GOT2 no presenta diferencias significativas (en gris), y su salida al citosol para ser metabolizada por GOT1, se encuentra reducida (ruta en azul).

**Objetivo específico 2: Analizar el efecto de la inhibición de la Glutaminólisis en el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D.**

**Evaluación de la concertación óptima de inhibidores.**

Tras observar que la ruta glutaminolítica se encuentra favorecida en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D se procedió a evaluar el efecto de la inhibición de esta ruta en el recuento celular de estos linfocitos. Para ello se realizaron curvas de concentraciones con distintos inhibidores, para determinar la concentración óptima que se debía utilizar en los experimentos (Figura 6).

Los inhibidores fueron añadidos a partir del día 2 de incubación ya que la adición desde el día 0 resultaba en una muerte celular excesiva. Se seleccionaron las concentraciones que redujeron el recuento celular en aproximadamente un 50%. La concentración óptima del inhibidor del transporte de glutamina (GPNA) fue de 250  $\mu$ M, mientras que para los inhibidores de glutaminasa (Inhibidor 968 y BPTES) fue de 5  $\mu$ M.

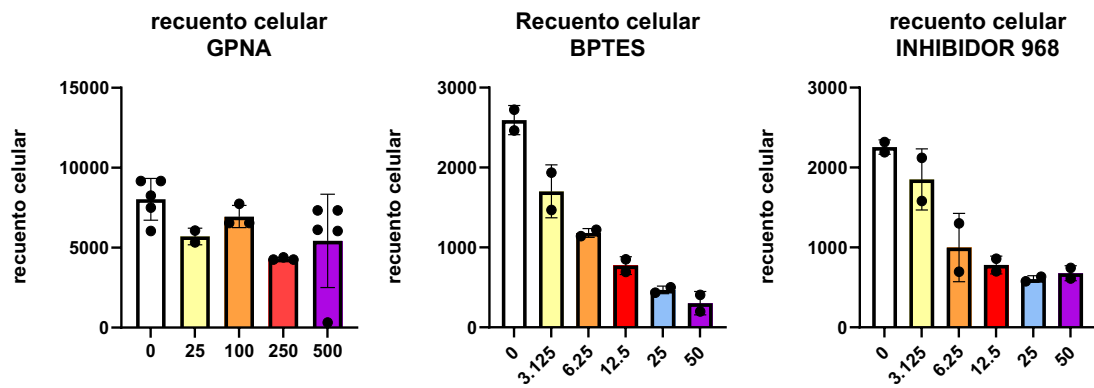


Figura 6: Selección de concentraciones para los inhibidores.

Curva de concentración de los inhibidores utilizados para evaluar el efecto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. Se seleccionaron las concentraciones optimas, que redujeron el recuento celular en aproximadamente un 50%.

**La inhibición del ingreso de glutamina a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D afecta el recuento celular.**

Para evaluar la efectividad del inhibidor GPNA en bloquear el ingreso de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, utilizamos glutamina tritiada a una concentración de 1000uM siguiendo protocolos establecidos para este tipo de ensayos. Los resultados mostraron que la presencia de GPNA redujo significativamente la captación de glutamina marcada en comparación con las células no tratadas. Lo que sugiere que GPNA es eficaz en inhibir el transporte de glutamina al bloquear el transportador ASCT2 (Figura 7A).

Para comprender como la inhibición del transporte de glutamina afecta la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se realizó un recuento celular tras el tratamiento con GPNA a la concentración seleccionada (250 uM). Los resultados indicaron una disminución significativa en el recuento celular en comparación con el grupo tratado con Vitamina D (Figura 7B). Esto sugiere que la captación de glutamina desempeña un papel crucial en la proliferación de estas células y que el bloqueo del transporte de glutamina impide su crecimiento adecuado.

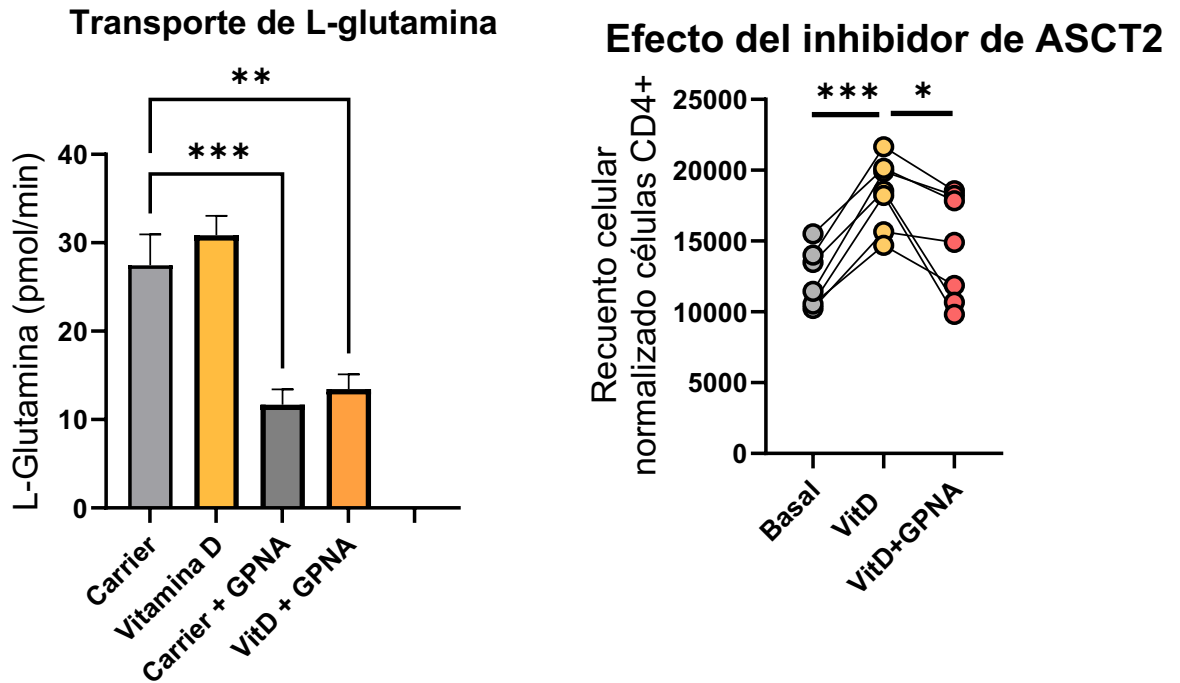


Figura 7: Inhibición del ingreso de glutamina en el recuento celular

A) Gráfico de barras de la captación de glutamina tritiada en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia y ausencia de Vitamina D (10nM) y GPNA (250 uM) (n=3, \*\*p<0.0011, \*\*\*p<0.0006, ANOVA pareado). B) Gráfico de símbolos y líneas del recuento celular de linfocitos en presencia y ausencia de Vitamina D (10nM) y GPNA (250 uM) (n=6, \*\*\* p<0.0002)

### **Efecto de los inhibidores BPTES y 968 en el recuento celular de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.**

Para determinar el impacto de la inhibición de la Glutaminólisis en la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, se utilizaron los inhibidores BPTES y 968. Ambos inhiben la glutaminasa, una enzima clave en la conversión de glutamina a glutamato, un paso crucial en la ruta glutaminolítica.

Tras dos días de activación con las condiciones de nuestro experimento se administraron los inhibidores a la concentración elegida (5 uM), y se realizó el recuento celular al finalizar los 4 días de cultivo.

Los resultados mostraron que el tratamiento con BPTES y inhibidor 968 resultó en una reducción significativa del recuento celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en comparación con el grupo control tratado únicamente con Vitamina D. Esto indica que la inhibición con BPTES y 968 afecta negativamente la proliferación celular (Figura 8). Estos hallazgos sugieren que la Glutaminólisis es esencial al crecimiento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, y que este efecto no solo depende del ingreso de glutamina hacia el interior de la célula, sino que también su metabolismo a través de la glutaminasa.

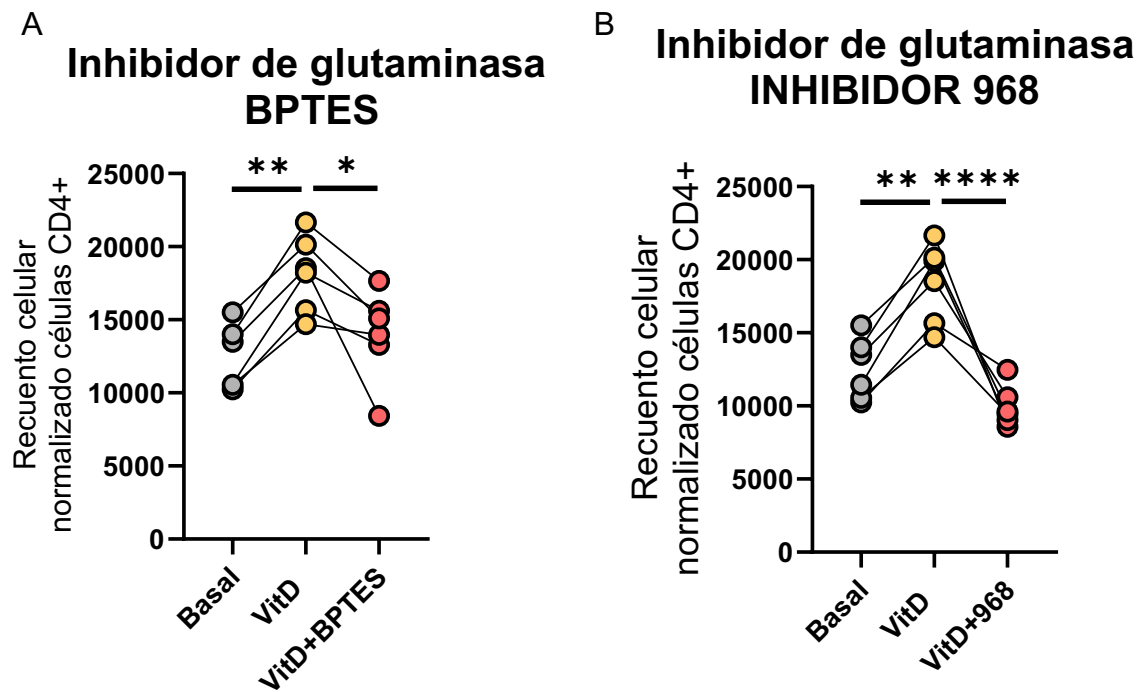


Figura 8: Efecto en el recuento celular con inhibidores de la glutaminasa.

A) Gráfico de símbolos y líneas del recuento celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en ausencia y presencia de Vitamina D (10 nM) con el inhibidor BPTES (n=6, \* p<0.0173, \*\*p<0.0022) ANOVA pareado).

B) Gráfico de símbolos y líneas del recuento celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en ausencia y presencia de Vitamina D (10nM) con el inhibidor 968 (n=6, \*\* p<0.016; \*\*\*\* p<0.0001, ANOVA pareado).

**Objetivo específico 3: Cuantificar los niveles de expresión del receptor de Glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.**

**Cuantificación de la Expresión del transportador de glutamina.**

Para evaluar los niveles de expresión del receptor de glutamina (ASCT2) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, se realizó citometría de flujo. Tras 4 días de cultivo, los linfocitos fueron marcados con un anticuerpo conjugado a fluorocromo FITC específico para el receptor de glutamina a una concentración de 5 ug/mL. Se compararon los porcentajes del control con respecto a las tratadas con Vitamina D. Las células marcadas fueron analizadas mediante citometría de flujo para cuantificar la expresión del receptor de glutamina en términos de porcentaje de células positivas (Figura 9).

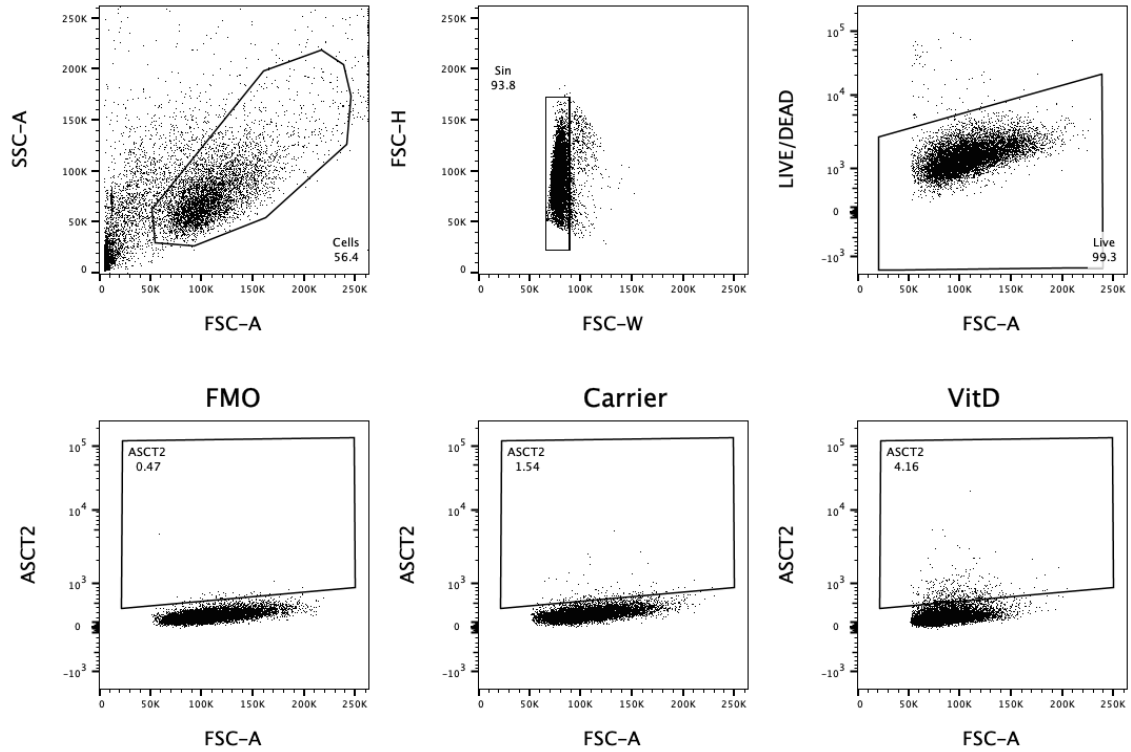


Figura 9: Dot plots de citometría de flujo representando el marcaje de ASCT2. Representación de los resultados obtenidos por citometría de flujo, mostrando el análisis de la expresión del receptor de glutamina ASCT2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. tras la selección se encuentran los plots que reflejan la señal del marcador ASCT2-FITC.

### **Aumento del porcentaje de expresión del transportador de glutamina.**

Los resultados de los análisis de citometría de flujo indicaron un aumento en el porcentaje de expresión del receptor ASCT2 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D en comparación con el control sin Vitamina D (Figura 10).

A pesar del incremento observado, el porcentaje de expresión del transportador ASCT2 fue relativamente bajo, esto nos llevó a cuestionar la confiabilidad del protocolo utilizado por no contar con un control de la verdadera expresión del receptor a nivel de membrana. Esto sugiere que puede existir limitaciones en el protocolo de marcaje que podrían haber afectado los resultados obtenidos.

### Expresión SLC1A5 (ASCT2) en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

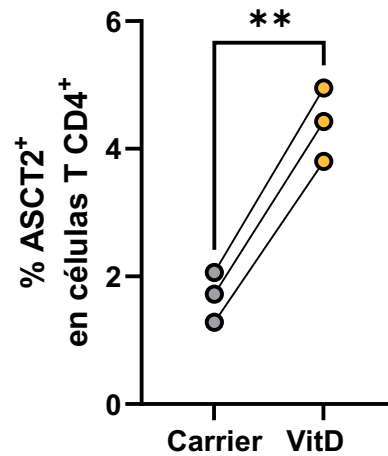


Figura 10: Expresión del receptor SLC1A5 (ASCT2) en presencia de Vitamina D.

A) Gráfico de símbolos y líneas de los porcentajes de expresión del transportador de glutamina ASCT2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. (n=3, \*\* p<0.0016, t-student pareado).

**Objetivo específico 4: Evaluar la captación y transporte de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D.**

**Evaluación de la captación de glutamina.**

Para evaluar la captación de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, se llevó a cabo una serie de experimentos utilizando glutamina tritiada. Se colectaron los linfocitos tras los 4 días de cultivo y se removió la glutamina presente en el medio. Luego éstos fueron sometidos a glutamina tritiada (5 uCi/mL), acompañada de glutamina fría (no marcada) a distintas concentraciones (0 a 250 uM) durante 1 minuto a 37°C. La cantidad de glutamina transportada al interior de las células se midió con un contador de centelleo.

Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, la cual describe la cinética enzimática y de transporte en términos de velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y constante de afinidad ( $K_m$ ). Para el grupo control, los valores obtenidos fueron:  $V_{max} = 1389.03 \pm 416.34$  pmoles/min y  $K_m = 201.33 \pm 66.49$  uM. En el caso de los linfocitos tratados con Vitamina D, los valores fueron:  $V_{max} = 1703.93 \pm 506.5$  pmoles/min y una  $K_m$  de  $178.64 \pm 51.33$  uM. Para una descripción más detallada de las constantes cinéticas, se utilizó la representación de lineweaver Burk, que linealiza la ecuación de Michaelis-Menten (Figura 11A).

La representación de lineweaver-burk mostro que los linfocitos tratados con Vitamina D tenían una pendiente menor y una intersección con el eje y más baja, indicando una mayor velocidad máxima y eficiencia enzimática en comparación con el control. Además, la intersección con el eje X fue ligeramente mayor, sugiriendo una menor  $K_m$ , lo que implica una mayor afinidad por la glutamina en presencia de Vitamina D (Figura 11B). Estos resultados sugieren que la Vitamina D no solo incrementa la captación de glutamina, si no también mejora la eficiencia del transporte contribuyendo al aumento en la proliferación celular observada en los linfocitos T  $CD4^+$  activados en presencia de Vitamina D.

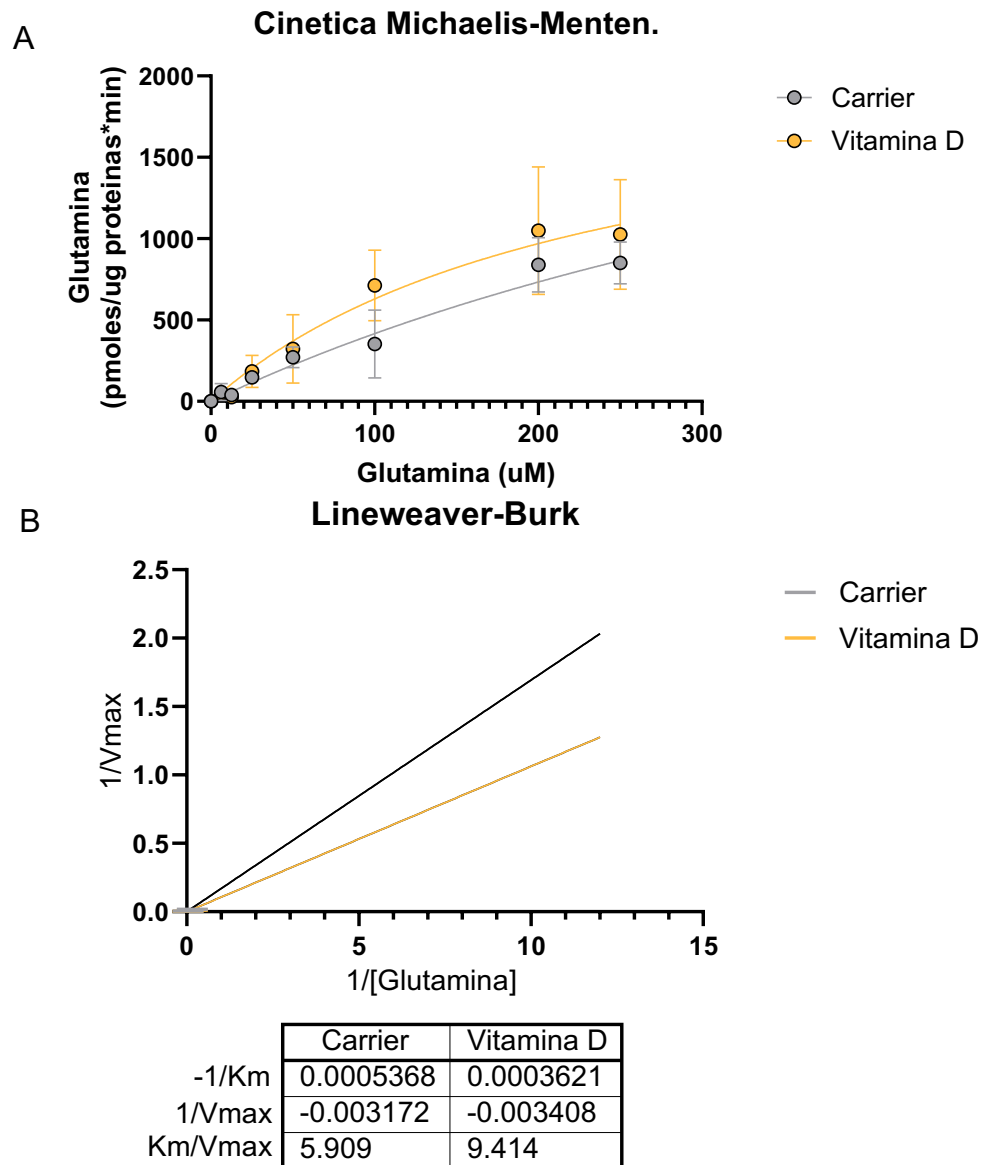


Figura 11: Constantes cinéticas de los linfocitos T CD4+ activados en presencia de Vitamina D.

A) Curva de Michaelis-Menten ajustada a los datos obtenidos de la captación de glutamina tritiada. B) Representación de Lineweaver-Burk, indicando una mayor eficiencia enzimática y afinidad, reflejada en la menor pendiente (Km/Vmax).

### **La actividad enzimática ( $V_{max}/K_m$ ) mejora en presencia de Vitamina D**

Para comparar la eficiencia del transporte de glutamina, se calculó la relación  $V_{max}/K_m$ , que es una medida de la actividad enzimática y de transporte donde un valor más alto indica una mayor eficiencia. Los resultados mostraron que la actividad de captación de glutamina aumenta significativamente en los linfocitos activados en presencia de Vitamina D.

En concreto, los datos revelaron que la relación  $V_{max}/K_m$  mejoro en aproximadamente un  $60 \pm 11.3\%$  en comparación con el grupo control sin Vitamina D (Figura 12). Este hallazgo indica que la Vitamina D no solo incrementa la captación de glutamina, como se observó previamente, sino que también mejora significativamente la eficiencia del transporte de glutamina en estos linfocitos activados.

Estos resultados subrayan el papel crucial de la Vitamina en la regulación del metabolismo de la glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, sugiriendo que puede ser un factor determinante en la adaptación metabólica durante la activación celular y la proliferación.

### Constante de actividad

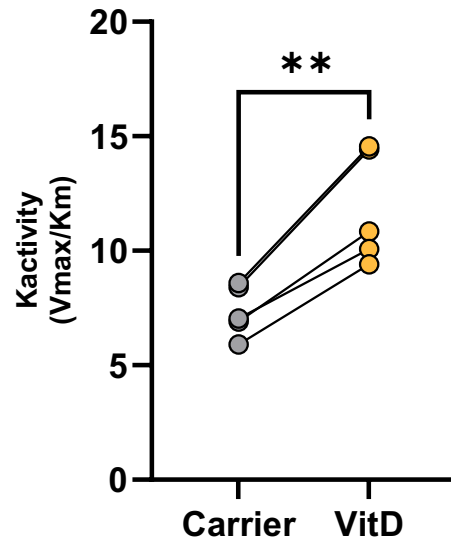


Figura 12: Relación Vmax/Km en linfocitos T CD4+ activados en presencia de Vitamina D.

A) Gráfico de símbolos y líneas de la relación Vmax/Km entre el grupo control y el grupo tratado con Vitamina D (10nM) (n=5, \*\*p<0.002, t-student pareado).

## Discusión

El papel de la Vitamina D en la regulación del sistema inmunológico ha sido objeto de investigación en las últimas décadas, revelando que cumple efectos adicionales a la tradicional regulación del metabolismo del calcio y el fósforo (Chen et al., 2007; Correale et al., 2009). Estudios recientes han ampliado este entendimiento al demostrar su influencia en la función inmunológica, particularmente en la modulación de la respuesta de los linfocitos T (Correale et al., 2009). Este estudio se centra en la influencia de la Vitamina D en el metabolismo energético de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, explorando cómo la intervención con esta vitamina puede afectar la inmunidad celular, desde una perspectiva de inmunología y bioquímica metabólica (Bishop et al., 2022).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> juegan un papel crucial en la orquestación de la respuesta inmune, y su activación y función están reguladas por señales que incluyen cambios en el metabolismo energético (Frauwirth & Thompson, 2004). La capacidad de estos linfocitos para cambiar su metabolismo de fosforilación oxidativa a glucólisis aeróbica tras la activación es bien conocida; sin embargo, la participación de la Vitamina D en este cambio metabólico y sus consecuencias funcionales continúan en exploración (Bishop et al., 2022; BRAND et al., 1988) este estudio aporta evaluando cómo la presencia de Vitamina D puede alterar la

captación de glucosa y promover vías metabólicas alternativas como la Glutaminólisis, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados.

Además, la implicación de la Vitamina D en la regulación de transportadores específicos de nutrientes y enzimas metabólicas ofrece un nuevo ángulo desde el cual se puede examinar su papel como modulador inmunológico (Deluca & Cantorna, 2001; Fox et al., 2005). Al investigar estos aspectos, este estudio no solo contribuye al conocimiento básico de la biología de los linfocitos T sino también tiene implicaciones potenciales para la manipulación de la respuesta inmune en contextos clínicos, especialmente en condiciones asociados a enfermedades autoinmunes y cáncer (Feng et al., 2022; Fraga et al., 2021).

Los resultados obtenidos en el estudio corroboran indirectamente la hipótesis, que propone que la Vitamina D modula el recuento celular y la actividad metabólica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados. Se observó un aumento en el recuento celular de estos linfocitos cuando se encuentran en presencia de Vitamina D, sugiriendo una promoción de un estado proliferativo (Chen et al., 2007; Correale et al., 2009). Este hallazgo indica que la Vitamina D está involucrada en favorecer la proliferación celular a través de la modulación de vías celulares que son cruciales para la división y la supervivencia de los linfocitos (Frauwirth & Thompson, 2004).

Además, la disminución observada en la glucólisis, medida como la reducción en la captación de glucosa y la producción de lactato, proporciona evidencia

adicional de que la vitamina D podría estar influyendo en el cambio metabólico de los linfocitos hacia rutas menos dependientes de glucólisis aeróbica (Deluca & Cantorna, 2001). Este cambio podría representar una adaptación metabólica que permite a los linfocitos T sostener una función prolongada o intensificada en un entorno inmunológico activo, reduciendo su dependencia de la glucólisis rápida que típicamente se asocia con estados de activación aguda (Fox et al., 2005; Kempkes et al., 2019).

La capacidad de la Vitamina D en influir en el metabolismo energético de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> puede tener implicaciones significativas para la comprensión de cómo se pueden manipular las respuestas inmunes en tratamientos para enfermedades autoinmunes, infecciosas, o incluso en el contexto del cáncer, donde la modulación de la función de linfocitos puede ser crucial (Fraga et al., 2021; Rao et al., 2021).

Aunque Bishop *et al.*, (2022) confirma la disminución de la dependencia a la glucólisis, indican que la glutaminólisis no es una vía metabólica utilizada por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, nuestros resultados sugieren lo contrario. Es crucial destacar que en el estudio de Bishop, los resultados se obtuvieron tras solo 2 días de cultivo, un periodo que podría ser demasiado temprano para observar los efectos completos de la modulación metabólica inducida por la Vitamina D. En contraste, nuestro estudio proteómico extendió la observación hasta 4 días de cultivo, lo que permite observar cambios

significativos por la modulación de la vitamina D sobre el metabolismo de los linfocitos.

Nuestros hallazgos revelan que, en presencia de Vitamina D, hay una notable disminución en la dependencia de la glucólisis, con una tendencia al uso de otra ruta metabólica. Esto sugiere la glutaminólisis como una alternativa para satisfacer las demandas energéticas durante estados prolongados de activación. Esta modificación podría explicarse por la capacidad de la Vitamina D en influir en la expresión de enzimas claves involucradas en esta vía, como las que observamos en nuestros resultados, aspecto que no podría observarse en evaluaciones tempranas del cultivo.

Esto no solo desafía las conclusiones de estudios anteriores, sino que también destaca la importancia de considerar el tiempo al evaluar los efectos moduladores de la Vitamina D. Recordemos que, tras la activación, la expresión del receptor de Vitamina D (VDR) aumenta considerablemente, alcanzando un pico de expresión al día 2, lo que sugiere que los efectos moduladores de la Vitamina D serían más visibles después de este punto (Baeke et al., 2010). Extender el periodo de observación hasta el día 4 en nuestro estudio permitió a la Vitamina D ejercer su influencia, revelando una modulación significativa en el metabolismo celular no observada en estudios con periodos más cortos.

Además, Bishop *et al.*, también analizaron la masa mitocondrial de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados al día 2 de cultivo, sin observar significativas. Sería interesante

extender este análisis a un periodo 4 días de cultivo, para observar si la vitamina D induce un aumento en la masa mitocondrial, lo que podría relacionarse con la eficiencia energética asociada a la dependencia a la glutaminólisis.

Los resultados proteómicos para los transportadores SLC38A2 y SLC1A5 (ASCT2) no mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que la proteómica no dirigida podría no captar cambios en estos transportadores debido a limitaciones en sensibilidad o especificidad. Es interesante destacar que el ingreso de glutamina al interior de la mitocondria no ha sido ampliamente descrito(Scalise, Pochini, Console, Losso, et al., 2018); sin embargo, se ha descrito una variante de ASCT2 en células cancerosas que podría ser responsable del transporte de glutamina al interior de las mitocondrias en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Yoo, Park, et al., 2020; Yoo, Yu, et al., 2020), regulando así el ingreso de este aminoácido, lo cual podría ser crítico bajo la influencia de la Vitamina D. Aunque no se observaron modificaciones evidentes en los niveles de estos transportadores, es posible que estén ocurriendo alteraciones en la actividad o regulación post-traducciona.

Nuestros hallazgos destacan un aumento en las glutaminasas GLSK y GLS (B8ZZA8), pertenecientes a glutaminasas mitocondriales, las cuales apoyan la utilización de glutamina como un importante precursor biosintético bajo la influencia de la Vitamina D, mientras que la expresión de GOT2 no cambió significativamente, la disminución de GOT1 sugiere una reducción en la

conversión de aspartato a piruvato en el citosol y un posible aumento en la retención de glutamato dentro de la mitocondria, indicando una preferencia por la utilización de este glutamato por glutamato deshidrogenasa (GLUD1) para la síntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato, facilitando así su entrada en el ciclo del ácido cítrico (Brand et al., 1988). Esto apoya la hipótesis que, bajo la influencia de la Vitamina D, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados pueden preferir la Glutaminólisis para la optimización del metabolismo, asegurando la disponibilidad de intermediarios del ciclo del ácido cítrico necesarios para la proliferación y función celular.

El uso de inhibidores específicos en nuestro estudio proporcionó perspectivas claras sobre la dependencia funcional de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en la ruta glutaminolítica. El inhibidor GPNA, que impide el transporte de glutamina, mostro ser crucial para la proliferación celular (Hassanein et al., 2013; Liu et al., 2023; Wang et al., 2022). Esto subraya que otros procesos metabólicos dependientes de glutamina, como la síntesis de ácidos nucleicos y el mantenimiento redox, quedan comprometidos al bloquear el transporte de glutamina (Liu et al., 2021). Al inhibir el transporte de glutamina con GPNA, nuestros resultados demostraron una reducción significativa en la proliferación celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, confirmando así la importancia de la glutamina en estos procesos vitales (Liu et al., 2023).

Por otro lado, la inhibición de la glutamina mediante BPTES y el inhibidor 968 impidió la conversión de glutamina a glutamato, un paso clave que facilita no solo la producción de energía, sino también la síntesis de biomoléculas críticas como nucleótidos y glutatión (Wang et al., 2020). Este enfoque bifurcado de la inhibición resalta la importancia de cada paso en la ruta glutaminolítica y su impacto en la proliferación celular. Estos hallazgos sugieren que la manipulación de la Glutaminólisis podría ser una estrategia terapéutica viable para modular la respuesta inmune en diversas enfermedades, incluyendo cáncer y trastornos autoinmunes (Feng et al., 2022; Kao et al., 2022; Wang et al., 2021; Xiao et al., 2023).

Además de los estudios realizados, se sugiere la realización de experimentos que utilicen inhibidores de etapas posteriores a la acción de la glutaminasa en el metabolismo de la glutamina, como la inhibición de las enzimas que procesan el glutamato, para proporcionar una confirmación más específica de que los efectos observados son directamente atribuibles a la Glutaminólisis. Inhibidores específicos, como EGCG (epigallocatequina galato) que actúa sobre glutamato deshidrogenasa (Zhang et al., 2016) o el AOA (aminoxyacetato) que inhibe las transaminasas como GOT1 y GOT2 (Sun et al., 2019; Zhou et al., 2018), podrían ser utilizados para este propósito. Esto ayudaría a determinar si la conversión de glutamato a  $\alpha$ -cetoglutarato podría tener efectos comparables o adicionales sobre la proliferación y funcionalidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D. Tales estudios podrían ofrecer una visión más completa de la

importancia de la Glutaminólisis en la respuesta inmune y abrir nuevas vías al desarrollo de terapias dirigidas en enfermedades autoinmunes y cáncer.

La utilización de inhibidores específicos trae consigo desafíos inherentes, incluyendo la posibilidad de efectos no deseados que pueden influir en otros aspectos del metabolismo celular. Por ejemplo, inhibidores como el GPNA, que se dirige al transportador de glutamina ASCT2, pueden afectar otros transportadores no relacionados directamente con la Glutaminólisis, como los transportadores LAT1, SNAT1 y SNAT 2, alterando la interpretación de los resultados (Teixeira et al., 2021). Estos resultados deben ser interpretados con cautela, y futuros estudios deberían incluir enfoques que permitan una evaluación más detallada de la red metabólica global activa en estos linfocitos. Técnicas como la metabolómica y el uso de inhibidores combinados podrían proporcionar una visión más completa del metabolismo celular bajo la influencia de la Vitamina D.

Además, es importante considerar las variaciones en la expresión enzimática inducida por la Vitamina D, lo que puede influir en la respuesta a los inhibidores utilizados. Estudios previos han demostrado que la Vitamina D puede modular la expresión de enzimas clave en la glucólisis, lo que sugiere que también podría influir indirectamente en la Glutaminólisis al alterar el balance energético y metabólico global de las células (Bishop et al., 2022). Estos factores deben ser

tenidos en cuenta para diseñar experimentos futuros que minimicen sesgos y proporcionen datos más robustos.

En suma, nuestros hallazgos, junto con la literatura existente, indican que la regulación de la Glutaminólisis puede tener aplicaciones clínicas importantes, tanto en la potenciación de la respuesta inmunitaria como en la supresión de la proliferación en células tumorales, dependiendo del contexto clínico (Wang et al., 2024).

El análisis de la expresión del transportador de glutamina ASCT2 por citometría de flujo mostró un aumento en la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados cuando son cultivados en presencia de Vitamina D.

Aunque se observó un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan ASCT2 en presencia de Vitamina D, el porcentaje de expresión global del transportador en todas las células fue relativamente baja (entre 1 a 5%). Este hallazgo podría reflejar limitaciones en el protocolo experimental empleado. Es posible que las condiciones experimentales necesiten optimizarse para reflejar más fielmente los efectos moduladores de la Vitamina D sobre la expresión del transportador ASCT2. Reevaluar la sensibilidad de los anticuerpos, la concentración utilizada y la duración de la incubación podría asegurar que los niveles de expresión de ASCT2 sean medidos de manera precisa.

En resumen, el incremento observado en la expresión de ASCT2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D resalta el potencial de esta vitamina

para influir en el metabolismo inmunitario y ofrece un fundamento sólido para investigaciones futuras sobre su papel en la regulación de la inmunidad celular y la respuesta a la terapia en implicaciones clínicas de ASCT2.

Habiendo discutido el aumento en la expresión del transportador ASCT2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Vitamina D, es pertinente analizar cómo esto afecta la cinética del transporte de glutamina.

Para comprender más a fondo la función del transportador ASCT2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, se realizaron estudios de cinética para evaluar cómo la Vitamina D influye en la captación de glutamina. Se observó que la actividad de ASCT2, medida como la relación  $V_{max}/K_m$ , se ve alterada por la presencia de Vitamina D. Los resultados indicaron que la  $V_{max}$  para la captación de glutamina, aumentó significativamente en presencia de Vitamina D, mientras que la  $K_m$  disminuyó, sugiriendo un incremento en la afinidad del transportador por su sustrato.

Este aumento en la  $V_{max}$  puede reflejar una mayor capacidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> para transportar glutamina, esencial para soportar las demandas metabólicas elevadas durante la activación. En contraste, la disminución en la  $K_m$  sugiere una mayor afinidad por la glutamina, lo que podría ser crucial en entornos donde la concentración de glutamina es limitante, permitiendo a los linfocitos mantener una eficiencia metabólica óptima (Feng et al., 2022; Wang et al., 2024).

La literatura indica que los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  del transportador ASCT2 pueden variar dependiendo del tipo celular y las condiciones experimentales. En proteoliposomas que simulan la orientación natural del transportador ASCT2, se determinó una  $V_{max}$  basal de  $3.2 \pm 1.2$  nmol/min\*mg de proteína (Scalise, Pochini, Console, Pappacoda, et al., 2018). Adicionalmente, el valor de  $K_m$  para la glutamina en el lado externo fue de 0.097 mM, reflejando la afinidad del transportador en este modelo (Pingitore et al., 2013). En estudios con oocitos de *X. laevis* expresando ASCT2, se demostró una alta afinidad de este transportador por la glutamina, con un valor de  $K_m$  aproximadamente de 70  $\mu$ M. Este dato refleja la capacidad del ASCT2 para acumular glutamina contra un gradiente de concentración de manera eficiente ("The Astroglial ASCT2 Amino Acid Transporter as a Mediator of Glutamine Efflux," 1999). Estas diferencias reflejan variaciones significativas en la afinidad y capacidad de transporte del ASCT2 según el tipo celular y sus requerimientos metabólicos específicos.

En nuestro estudio, los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  del transportador ASCT2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados también mostraron variaciones significativas dependiendo de la presencia de Vitamina D. En ausencia de Vitamina D, se obtuvo una  $V_{max}$  de  $1389.03 \pm 416.34$  pmoles/min y un  $K_m$  de  $201.33 \pm 66.49$   $\mu$ M. Estos valores son considerablemente diferentes a los reportados en otras líneas celulares, lo que sugiere una menor afinidad del ASCT2 por la glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, pero con una capacidad de transporte aún sustancial.

Por otro lado, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados tratados con Vitamina D, la  $V_{\max}$  fue de  $1703.93 \pm 506.5$  pmoles/min y el  $K_m$  fue de  $178.64 \pm 51.33$  uM. Estos resultados indican un aumento en la capacidad máxima de transporte del ASCT2 en la afinidad del transportador por la glutamina. La comparación de estos valores sugiere que la Vitamina D puede tener un efecto modulador sobre el transportador ASCT2, mejorando su capacidad de captar glutamina, lo cual podría ser crucial para la función y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados.

En resumen, mientras que los valores de  $K_m$  y  $V_{\max}$  del ASCT2 en otras líneas celulares destacan su alta afinidad y capacidad para la captación de glutamina, nuestros hallazgos en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, tanto en presencia como en ausencia de Vitamina D, revelan un patrón diferente de regulación. Las diferencias observadas en la velocidad máxima y constante de afinidad del ASCT2 pueden atribuirse al tipo específico de células en el que se realiza el estudio. Además, nuestros hallazgos revelan que la Vitamina D parece potenciar la capacidad de transporte del ASCT2, lo cual podría tener importantes implicaciones para la modulación del metabolismo inmunitario y el diseño de estrategias terapéuticas.

El aumento en la actividad de ASCT2 tiene importantes implicaciones clínicas. En enfermedades autoinmunes, la modulación de la actividad de linfocitos T podría regular la patología (Elkoshi, 2022; Wang et al., 2021), mientras que en

cáncer, alterar la disponibilidad de nutrientes puede impactar la supervivencia y proliferación de células tumorales (Halama & Suhre, 2022; Li et al., 2024).

Finalmente, mientras estos resultados ofrecen una visión valiosa sobre la influencia de la Vitamina D en la función de los transportadores de aminoácidos en linfocitos T, también subrayan la necesidad de estudios adicionales para explorar los mecanismos exactos a través de los cuales la Vitamina D afecta la actividad de ASCT2, ya que estos cambios pueden deberse tanto a un aumento de la afinidad y velocidad máxima, o, por otro lado, que estos resultados estén siendo alterados por el aumento de la expresión del transportador.

Los hallazgos de este estudio no solo enriquecen nuestra comprensión del metabolismo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> bajo la influencia de la Vitamina D, sino que también abren nuevas perspectivas para la aplicación clínica, particularmente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y cáncer. La capacidad de la Vitamina D para modular rutas metabólicas críticas sugiere potenciales estrategias terapéuticas que podrían optimizar la respuesta inmunológica y mejorar los resultados clínicos en diversas patologías.

La competencia por nutrientes entre células cancerosas y células del sistema inmune es un factor crítico en la dinámica del microambiente tumoral. Las células cancerosas, conocidas por su alta demanda metabólica, a menudo compiten con los linfocitos T por la glutamina, un nutriente esencial para ambas (Elkoshi, 2022). Se sabe que la dependencia de glutamina en células cancerosas es de gran

importancia, incluso induciendo la competencia por glutamina contra el sistema inmune, lo que induciría a la desregulación vía mTOR, provocando un estrés metabólico que afecta la proliferación celular de los linfocitos T (Wang et al., 2024). Nuestros hallazgos muestran que la Vitamina D aumenta la captación de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, lo que mejoraría la competitividad frente a células cancerosas. Esto podría tener importantes implicaciones clínicas, ya que potenciar la capacidad de los linfocitos T para captar glutamina podría aumentar su eficiencia en la eliminación de células tumorales, ya que es sabido que una reducción o inhibición de los procesos glutaminolíticos en células de cáncer promueven el microambiente inmunitario, promoviendo un fenotipo altamente activo en un entorno de competencia metabólica intensa (Leone et al., 2019).

Además de su influencia en los linfocitos T, la Vitamina D también podría afectar directamente en las células cancerosas. Se ha demostrado que en células cocultivadas con el secretoma de OSCC presenta una relación con la señalización de Vitamina D (Fraga et al., 2021). También se ha demostrado que puede inhibir la proliferación de ciertas líneas celulares cancerosas y promover la apoptosis, lo que sugiere un efecto antitumoral directo, lo cual podría estar mediado por la modulación de rutas metabólicas clave, incluidas la Glutaminólisis. La vitamina D puede interferir con señales de factores de crecimiento y vías de señalización oncogénicas como Wnt/ $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$  y EGF, que son cruciales para la progresión del cáncer. Estos efectos no solo

inhiben la proliferación celular, sino que también promueven la diferenciación y apoptosis de las células tumorales (Fernández-Barral et al., 2020).

En estudios preclínicos, se ha observado que la Vitamina D induce arresto en la fase G1 del ciclo celular en varias líneas celulares, lo cual está asociado con la activación de inhibidores de cinasas dependientes de ciclina como p21 y p27, y la disminución de la expresión de c-myc (Beer & Myrthue, 2004). La capacidad de la Vitamina D para influir en la expresión de enzimas metabólicas y transportadores de nutrientes podría reducir la disponibilidad de glutamina para las células cancerosas, limitando su capacidad para proliferar y sobrevivir en un entorno competitivo.

En resumen, la Vitamina D tiene el potencial de actuar como un agente antitumoral mediante la modulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células cancerosas, así como la reducción de la disponibilidad de nutrientes esenciales como la glutamina. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar la Vitamina D en estrategias terapéuticas para combatir el cáncer.

Estudios de co-cultivo que involucren linfocitos T CD4<sup>+</sup> y células cancerosas en presencia de Vitamina D podrían proporcionar información valiosa sobre las interacciones directas e indirectas entre estas poblaciones celulares. Estos estudios podrían revelar si la suplementación con Vitamina D favorece a los linfocitos T en términos de proliferación y función efectora, o si tiene un impacto más significativo en la reducción de la viabilidad de las células cancerosas.

Además, el análisis de la competencia por glutamina en estos co-cultivos podría demostrar cómo la Vitamina D modula esta dinámica competitiva, potenciando la respuesta inmunitaria antitumoral y sugiriendo posibles combinaciones terapéuticas que incluyen la Vitamina D y otros moduladores metabólicos o inmunológicos.

La variabilidad en las respuestas de los donantes sanos es una limitación significativa, aunque se tomaron medidas para estandarizar las condiciones experimentales, las diferencias individuales en la expresión de enzimas y transportadores pueden haber influido en los resultados. Este factor es crucial al considerar la aplicabilidad de los hallazgos a una población más amplia, ya que las variaciones genéticas y epigenéticas entre individuos pueden afectar la respuesta a la Vitamina D y la regulación metabólica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Las diferencias individuales en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la Vitamina D y los transportadores de aminoácidos pueden resultar en una variabilidad significativa en la eficiencia de la Vitamina D para modular la actividad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estudios previos han demostrado que las variaciones en los genes que codifican para el receptor de Vitamina D (VDR) y las enzimas involucradas en su activación pueden influir en la respuesta inmunológica de los individuos (Fernández-Barral et al., 2020). Además, las influencias epigenéticas, como la metilación del ADN y las modificaciones de

histonas, también pueden jugar un papel importante en la modulación de la expresión génica y la respuesta a Vitamina D (Forouhari et al., 2023).

Estas variaciones subrayan la importancia de considerar factores individuales al interpretar los resultados de estudios sobre la Vitamina D y su impacto en la función inmunitaria. Para mejorar la aplicabilidad de estos hallazgos, futuros estudios podrían beneficiarse de un enfoque más personalizado que tenga en cuenta las características genéticas y epigénéticas de los individuos, lo que podría llevar a estrategias terapéuticas más personalizadas.

El tiempo de cultivo celular es otra variante para tener en cuenta en este estudio. Estudios a largo plazo podrían modular de manera diferente el metabolismo celular. Numerosos estudios han observado que la Vitamina D suprime la proliferación y modula la síntesis de citoquinas, promoviendo un estado inmunológico más tolerogénico y menos proinflamatorio, en comparación con los efectos observados a corto plazo en nuestro estudio a los 4 días (Gallo et al., 2023; Vikram Singh, 2021).

La investigación en cáncer también se beneficia enormemente de enfoques e interpretaciones que revelan los complejos roles de la vitamina D en diferentes contextos biológicos. La Vitamina D regula tempranamente un aumento en la proliferación celular y en la captación de glutamina en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, a largo plazo, la proliferación celular se encuentra disminuida y se genera un ambiente inmunológico más tolerogénico. Este efecto bifásico de la

Vitamina D en linfocitos sugiere que la vitamina tiene un rol regulador complejo, donde inicialmente estimula la proliferación y actividad de las células inmunitarias, pero con el tiempo promueve un equilibrio inmunológico que puede prevenir respuestas inflamatorias excesivas.

En contraste, la Vitamina D reduce la proliferación en células cancerosas, lo que sugiere su potencial como agente antitumoral. Sin embargo, se ha observado que la expresión de VDR se reduce progresivamente durante la progresión de diferentes tipos de cáncer, como el de piel, mama y próstata, proceso denominado como un desarrollo de resistencia a la Vitamina D (Apprato et al., 2020). Esta represión de VDR podría ser un mecanismo por el cual las células cancerosas modulan su supervivencia frente a la terapia con Vitamina D.

La capacidad de la Vitamina D para influir en la captación de glutamina en linfocitos T, combinada con su efecto inhibitor sobre la proliferación de células cancerosas, subraya su potencial dual en la terapia del cáncer. Por un lado, puede fortalecer la respuesta inmunitaria antitumoral al mejorar la competitividad de los linfocitos T por nutrientes críticos como la glutamina. Por otro lado, su capacidad para reducir la proliferación de células tumorales directamente ofrece un enfoque terapéutico adicional. No obstante, la resistencia a la Vitamina D en células cancerosas a través de la reducción de VDR, y el cambio a un fenotipo más regulador plantea un desafío que necesita ser abordado para maximizar la eficacia de esta estrategia terapéutica.

Volviendo al metabolismo celular, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de Vitamina D utilizan rutas metabólicas alternativas que son fundamentales para su proliferación y función. La importancia de la glutamina en estos procesos es destacable, ya que este aminoácido es crucial para múltiples vías metabólicas esenciales.

Un área que sería importante evaluar en presencia de Vitamina D es la carboxilación reductiva. En este proceso, la Glutaminólisis deriva a la formación de citrato luego de una serie de reacciones enzimáticas. Cuando la glutamina ya ha sido convertida en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), éste entra al ciclo del ácido cítrico (TCA). Dentro del TCA, el  $\alpha$ -KG es transformado en isocitrato por la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) mediante una reacción inversa al ciclo habitual de TCA, y luego a citrato, este puede ser exportado al citoplasma, donde es utilizado para la biosíntesis de lípidos, esenciales para la formación de membranas. Este proceso es crucial para células con alta tasa de proliferación, como las células cancerosas y las células del sistema inmune (Li et al., 2024; Steinert et al., 2021).

Además, la glutamina es crucial para la generación de nucleótidos, fundamentales para la síntesis de ADN y ARN durante la proliferación celular. Este proceso es vital para la replicación y reparación del ADN, así como para la síntesis de ARN mensajero, necesario para la transcripción de genes y la producción de proteínas. La glutamina proporciona el esqueleto de carbono y

nitrógeno necesario para la síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, componentes esenciales de los ácidos nucleicos. La regulación de estos procesos está mediada por la vía mTOR, una importante señalización celular que integra señales de nutrientes y regula el crecimiento y la proliferación celular, sería interesante observar si la Vitamina D puede generar alguna regulación de la vía mTOR generando alteraciones en la homeostasis celular (Takahara et al., 2020).

Otra función importante de la glutamina es su papel en la regulación redox, en el proceso de carboxilación reductiva, la IDH genera NADPH, que es esencial para la regeneración de glutati6n (GSH) y otras defensas antioxidantes, asegurando que las células manejen el estrés oxidativo. La síntesis de glutati6n, un antioxidante clave, también depende de la disponibilidad de glutamina. GSH se oxida a glutati6n disulfuro (GSSG) al neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) y luego se regenera a partir de GSSG por la enzima glutati6n reductasa, utilizando NADPH como cofactor. Esta regulaci6n redox es crucial para mantener un ambiente celular adecuado y prevenir el daño oxidativo (Cruzat et al., 2018; de Oliveira et al., 2016).

Explorar como la Vitamina D afecta estas vías metabólicas podría revelar nuevos mecanismos que apoyen la proliferaci6n y funci6n inmunitaria, ofreciendo potenciales blancos para intervenciones terapéuticas. Estos estudios no solo ayudarían a entender mejor el impacto de la Vitamina D en la funci6n

inmunológica, sino que también podrían identificar nuevas estrategias para potenciar la respuesta inmunitaria en enfermedades como el cáncer o enfermedades autoinmunes.

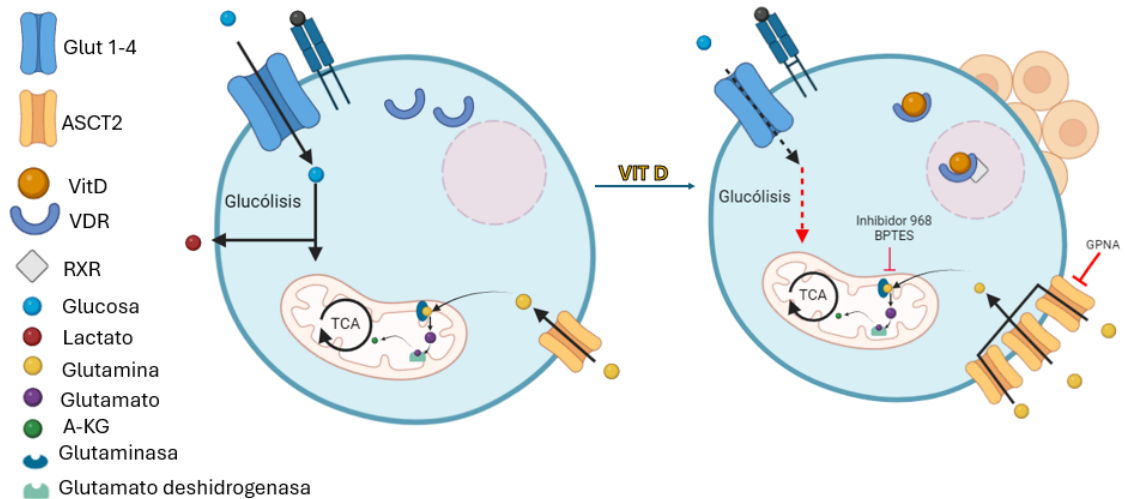
## Conclusión

En conclusión, este estudio proporciona una visión integral de cómo la Vitamina D modula el metabolismo energético y la función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, revelando que esta vitamina puede favorecer rutas metabólicas para compensar el requerimiento energético, como la Glutaminólisis, esenciales para la proliferación y función de estas células inmunitarias. Nuestros hallazgos confirman que la Vitamina D no solo aumenta la captación de glutamina y mejora la eficiencia del transportador ASCT2, sino que también influye en la expresión de enzimas clave involucradas en la Glutaminólisis, lo que sugiere una reprogramación metabólica significativa.

La capacidad de la Vitamina D para influir en la actividad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> podría tener implicaciones clínicas importantes, especialmente en el contexto de enfermedades autoinmunes y cáncer. Al mejorar la competitividad de los linfocitos T frente a las células tumorales en la captación de glutamina, la Vitamina D podría potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral y ofrecer una estrategia terapéutica adicional para combatir el cáncer. Sin embargo, las variaciones individuales en la respuesta a la Vitamina D subrayan la necesidad de enfoques personalizados en futuras investigaciones y aplicaciones clínicas.

Además, la inhibición de la Glutaminólisis mostro una reducción significativa en la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, destacando la importancia de esta ruta metabólica para la función y viabilidad celular. La posibilidad de manipular la Glutaminólisis ofrece nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias dirigidas que puedan mejorar la respuesta inmunitaria en diversas patologías. (Ilustración 8)

Finalmente, los resultados de este estudio abren nuevas líneas de investigación sobre el papel de la Vitamina D en la regulación de otras vías metabólicas, como la carboxilación reductiva y la síntesis de glutatión, que son cruciales para la función inmunitaria y la homeostasis celular, o por el efecto de la Vitamina D en modelos celulares cancerígenos y el co-cultivo con linfocitos T. La exploración de estos mecanismos podría proporcionar nuevas estrategias para potenciar la respuesta inmunitaria y desarrollar intervenciones terapéuticas más efectivas. En resumen, la Vitamina D emerge como un modulador clave del metabolismo inmunitario, con un potencial significativo para mejorar las estrategias terapéuticas en diversas enfermedades.



**Ilustración 9: Esquema resumido del impacto de la Vitamina D en la glutaminólisis y proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

El esquema muestra al lado izquierdo como los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cuando se encuentran activados, utilizan principalmente la ruta glucolítica para el requerimiento energético, en este proceso pueden participar otras rutas metabólicas aportando a la proliferación celular como la glutaminólisis. Cuando las células están en presencia de Vitamina D, y junto a su heterodímero se traslocan al núcleo generando su modulación. Donde podemos ver la reducción de la glucólisis, el aumento de enzimas importantes en el ciclo glutaminolítico como son Glutaminasa (GLS) y Glutamato deshidrogenasa (GLUD1), también aumenta la expresión del transportador ASCT2, el cual mejora la actividad enzimática con la cual transporta glutamina. La inhibición de estas rutas tanto por parte del transporte con GPNA o a nivel de la glutaminasa (inhibidor 968 y BPTES) generan una reducción significativa en el recuento de linfocito, indicando que son rutas cruciales para el proceso proliferativo durante su activación en presencia de Vitamina D

## **Bibliografía**

### **Uncategorized References**

Abu-Amer, Y., & Bar-Shavit, Z. (1993). Impaired Bone Marrow-Derived Macrophage Differentiation in Vitamin D Deficiency. *Cellular Immunology*, 151(2), 356-368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1245>

Apprato, G., Fiz, C., Fusano, I., Bergandi, L., & Silvagno, F. (2020). Natural Epigenetic Modulators of Vitamin D Receptor. *Applied Sciences*, 10(12), 4096. <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/12/4096>

Ardawi, M. S., & Newsholme, E. A. (1983). Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J*, 212(3), 835-842. <https://doi.org/10.1042/bj2120835>

The Astroglial ASCT2 Amino Acid Transporter as a Mediator of Glutamine Efflux. (1999). *Journal of Neurochemistry*, 73(5), 2184-2194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.02184.x>

Baeke, F., Korf, H., Overbergh, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121(1), 221-227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.037>

Beer, T. M., & Myrthue, A. (2004). Calcitriol in cancer treatment: From the lab to the clinic. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(3), 373-381. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.373.3.3>

Belenchia, A. M., Tosh, A. K., Hillman, L. S., & Peterson, C. A. (2013). Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a

randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(4), 774-781. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.050013>

Bischoff-Ferrari, H. A. (2012). Relevance of vitamin D in muscle health. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 13(1), 71-77. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9200-6>

Bishop, E. L., Gudgeon, N. H., Mackie, G. M., Chauss, D., Roberts, J., Tennant, D. A., Maslowski, K. M., Afzali, B., Hewison, M., & Dimeloe, S. (2022). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses CD4+ T-cell effector functionality by inhibition of glycolysis. *Immunology*, 166(3), 299-309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/imm.13472>

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Supplement 2), S33-S40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>

BRAND, K., AICHINGER, S., FORSTER, S., KUPPER, S., NEUMANN, B., NÜRNBERG, W., & OHRISCH, G. (1988). Cell-cycle-related metabolic and enzymatic events in proliferating rat thymocytes\*. *European Journal of Biochemistry*, 172(3), 695-702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13944.x>

Canning, M., Grotenhuis, K., Ruwhof, C., Drexhage, H., & de Wit, H. (2001). 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *European Journal of Endocrinology*. <http://hdl.handle.net/1765/9718>

Chen, S., Sims, G. P., Chen, X. X., Gu, Y. Y., Chen, S., & Lipsky, P. E. (2007). Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on Human B Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1634-1647. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1634>

Coronato Solari, S., Laguens Calabrese, G., & Di Girolamo Massimi, V. T. (2005). Acción de la vitamina D3 en el sistema inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 21, 0-0.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892005000200006&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892005000200006&nrm=iso)

Correale, J., Ysraelit, M. C., & Gaitán, M. I. (2009). Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*, 132(5), 1146-1160. <https://doi.org/10.1093/brain/awp033>

Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*, 10(11), 1564. <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1564>

D'Souza, A. D., Parikh, N., Kaech, S. M., & Shadel, G. S. (2007). Convergence of multiple signaling pathways is required to coordinately up-regulate mtDNA and mitochondrial biogenesis during T cell activation. *Mitochondrion*, 7(6), 374-385. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.08.001>

Das, M., Tomar, N., Sreenivas, V., Gupta, N., & Goswami, R. (2014). Effect of vitamin D supplementation on cathelicidin, IFN- $\gamma$ , IL-4 and Th1/Th2 transcription factors in young healthy females. *European Journal of Clinical Nutrition*, 68(3), 338-343. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.268>

de Oliveira, D. C., da Silva Lima, F., Sartori, T., Santos, A. C. A., Rogero, M. M., & Fock, R. A. (2016). Glutamine metabolism and its effects on immune response: molecular mechanism and gene expression. *Nutrire*, 41(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s41110-016-0016-8>

Deeb, K. K., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 684-700. <https://doi.org/10.1038/nrc2196>

Deluca, H. F., & Cantorna, M. T. (2001). Vitamin D: its role and uses in immunology1. *The FASEB Journal*, 15(14), 2579-2585. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.01-0433rev>

- Di Lorenzo, T. P., Peakman, M., & Roep, B. O. (2007). Translational Mini-Review Series on Type 1 Diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 148(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03244.x>
- Elkoshi, Z. (2022). Cancer and Autoimmune Diseases: A Tale of Two Immunological Opposites? [Hypothesis and Theory]. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.821598>
- Ethier, C., Yu, Y., Cameron, L., Lacy, P., & Davoine, F. (2016). Calcitriol Reduces Eosinophil Necrosis Which Leads to the Diminished Release of Cytotoxic Granules. *International Archives of Allergy and Immunology*, 171(2), 119-129. <https://doi.org/10.1159/000450951>
- Feng, X., Li, X., Liu, N., Hou, N., Sun, X., & Liu, Y. (2022). Glutaminolysis and CD4+ T-cell metabolism in autoimmunity: From pathogenesis to therapy prospects [Review]. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.986847>
- Fernández-Barral, A., Bustamante-Madrid, P., Ferrer-Mayorga, G., Barbáchano, A., Larriba, M. J., & Muñoz, A. (2020). Vitamin D Effects on Cell Differentiation and Stemness in Cancer. *Cancers*, 12(9), 2413. <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/9/2413>
- Forouhari, A., Heidari-Beni, M., Veisi, S., Poursafa, P., & Kelishadi, R. (2023). Effect of epigenetics on vitamin D levels: a systematic review until December 2020. *Archives of Public Health*, 81(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s13690-023-01122-2>
- Fox, C. J., Hammerman, P. S., & Thompson, C. B. (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nature Reviews Immunology*, 5(11), 844-852. <https://doi.org/10.1038/nri1710>
- Fraga, M., Yáñez, M., Sherman, M., Llerena, F., Hernandez, M., Nourdin, G., Álvarez, F., Urrizola, J., Rivera, C., Lamperti, L., Nova, L., Castro, S., Zambrano, O., Cifuentes, A., Campos, L., Moya, S., Pastor, J., Nuñez, M.,

- Gatica, J., . . . Nova-Lamperti, E. (2021). Immunomodulation of T Helper Cells by Tumor Microenvironment in Oral Cancer Is Associated With CCR8 Expression and Rapid Membrane Vitamin D Signaling Pathway. *Front Immunol*, 12, 643298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643298>
- Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2004). Regulation of T Lymphocyte Metabolism. *The Journal of Immunology*, 172(8), 4661-4665. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4661>
- Gallo, D., Baci, D., Kustrimovic, N., Lanzo, N., Patera, B., Tanda, M. L., Piantanida, E., & Mortara, L. (2023). How Does Vitamin D Affect Immune Cells Crosstalk in Autoimmune Diseases? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4689. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4689>
- Gómez de Tejada Romero, M. J. (2014). Acciones extraóseas de la vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 6, 11-18. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1889-836X2014000500003&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1889-836X2014000500003&nrm=iso)
- Halama, A., & Suhre, K. (2022). Advancing Cancer Treatment by Targeting Glutamine Metabolism-A Roadmap. *Cancers (Basel)*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/cancers14030553>
- Hassanein, M., Hoeksema, M. D., Shiota, M., Qian, J., Harris, B. K., Chen, H., Clark, J. E., Alborn, W. E., Eisenberg, R., & Massion, P. P. (2013). SLC1A5 Mediates Glutamine Transport Required for Lung Cancer Cell Growth and Survival. *Clinical Cancer Research*, 19(3), 560-570. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-12-2334>
- Hensley, C. T., Wasti, A. T., & DeBerardinis, R. J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3678-3684. <https://doi.org/10.1172/JCI69600>
- Hewison, M., Freeman, L., Hughes, S. V., Evans, K. N., Bland, R., Eliopoulos, A. G., Kilby, M. D., Moss, P. A. H., & Chakraverty, R. (2003). Differential

Regulation of Vitamin D Receptor and Its Ligand in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5382-5390. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5382>

Hiraguchi, Y., Tanida, H., Sugimoto, M., Hosoki, K., Nagao, M., Tokuda, R., & Fujisawa, T. (2012). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Upregulates Functional C-X-C Chemokine Receptor Type 4 Expression in Human Eosinophils. *International Archives of Allergy and Immunology*, 158(suppl 1)(Suppl. 1), 51-57. <https://doi.org/10.1159/000337767>

Hoe, E., Nathanielsz, J., Toh, Z. Q., Spry, L., Marimla, R., Balloch, A., Mulholland, K., & Licciardi, P. V. (2016). Anti-Inflammatory Effects of Vitamin D on Human Immune Cells in the Context of Bacterial Infection. *Nutrients*, 8(12), 806. <https://www.mdpi.com/2072-6643/8/12/806>

Jamali, N., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2018). Vitamin D and regulation of vascular cell function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314(4), H753-h765. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00319.2017>

Jiao, X., Wang, L., Wei, Z., Liu, B., Liu, X., & Yu, X. (2019). Vitamin D deficiency during pregnancy affects the function of Th1/Th2 cells and methylation of IFN- $\gamma$  gene in offspring rats. *Immunology Letters*, 212, 98-105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.012>

Kao, T.-W., Chuang, Y.-C., Lee, H.-L., Kuo, C.-C., & Shen, Y.-A. (2022). Therapeutic Targeting of Glutaminolysis as a Novel Strategy to Combat Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15296. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/23/15296>

Kempkes, R. W. M., Joosten, I., Koenen, H. J. P. M., & He, X. (2019). Metabolic Pathways Involved in Regulatory T Cell Functionality [Review]. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02839>

Khazai, N., Judd, S. E., & Tangpricha, V. (2008). Calcium and vitamin D: skeletal and extraskeletal health. *Curr Rheumatol Rep*, 10(2), 110-117. <https://doi.org/10.1007/s11926-008-0020-y>

- Lehmann, B., & Meurer, M. (2010). Vitamin D metabolism. *Dermatologic Therapy*, 23(1), 2-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01286.x>
- Leone, R. D., Zhao, L., Englert, J. M., Sun, I. M., Oh, M. H., Sun, I. H., Arwood, M. L., Bettencourt, I. A., Patel, C. H., Wen, J., Tam, A., Blosser, R. L., Prchalova, E., Alt, J., Rais, R., Slusher, B. S., & Powell, J. D. (2019). Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion. *Science*, 366(6468), 1013-1021. <https://doi.org/10.1126/science.aav2588>
- Li, X., Peng, X., Li, Y., Wei, S., He, G., Liu, J., Li, X., Yang, S., Li, D., Lin, W., Fang, J., Yang, L., & Li, H. (2024). Glutamine addiction in tumor cell: oncogene regulation and clinical treatment. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01449-x>
- Liu, T., Ren, S., Sun, C., Zhao, P., & Wang, H. (2023). Glutaminolysis and peripheral CD4+ T cell differentiation: from mechanism to intervention strategy [Review]. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1221530>
- Liu, Y., Xu, R., Gu, H., Zhang, E., Qu, J., Cao, W., Huang, X., Yan, H., He, J., & Cai, Z. (2021). Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomarker Research*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00251-y>
- Ma, C. A., Stinson, J. R., Zhang, Y., Abbott, J. K., Weinreich, M. A., Hauk, P. J., Reynolds, P. R., Lyons, J. J., Nelson, C. G., Ruffo, E., Dorjbal, B., Glauzy, S., Yamakawa, N., Arjunaraja, S., Voss, K., Stoddard, J., Niemela, J., Zhang, Y., Rosenzweig, S. D., . . . Milner, J. D. (2017). Germline hypomorphic CARD11 mutations in severe atopic disease. *Nat Genet*, 49(8), 1192-1201. <https://doi.org/10.1038/ng.3898>
- Manda, A., Pruchniak, M. P., Araźna, M., & Demkow, U. A. (2014). Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology [journal article]. *Central European Journal of Immunology*, 39(1), 116-121. <https://doi.org/10.5114/ceji.2014.42136>

- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8), 519-531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Masisi, B. K., El Ansari, R., Alfarsi, L., Rakha, E. A., Green, A. R., & Craze, M. L. (2020). The role of glutaminase in cancer. *Histopathology*, 76(4), 498-508. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/his.14014>
- Newsholme, E. A., Crabtree, B., & Ardawi, M. S. (1985). Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Q J Exp Physiol*, 70(4), 473-489. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1985.sp002935>
- Newsholme, P. (2001). Why Is L-Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health, Postinjury, Surgery or Infection? *The Journal of Nutrition*, 131(9), 2515S-2522S. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2515S>
- Pingitore, P., Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., Hedfalk, K., & Indiveri, C. (2013). Large scale production of the active human ASCT2 (SLC1A5) transporter in *Pichia pastoris* — functional and kinetic asymmetry revealed in proteoliposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(9), 2238-2246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.034>
- Plas, D. R., Rathmell, J. C., & Thompson, C. B. (2002). Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications. *Nature Immunology*, 3(6), 515-521. <https://doi.org/10.1038/ni0602-515>
- Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., & Indiveri, C. (2014). Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health [Review]. *Frontiers in Chemistry*, 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00061>

- Provvedini, D. M., Tsoukas, C. D., Deftos, L. J., & Manolagas, S. C. (1983). 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*, 221(4616), 1181-1183.
- Qing, G., Li, B., Vu, A., Skuli, N., Walton, Z. E., Liu, X., Mayes, P. A., Wise, D. R., Thompson, C. B., Maris, J. M., Hogarty, M. D., & Simon, M. C. (2012). ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. *Cancer Cell*, 22(5), 631-644. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.021>
- Rao, D., Verburg, F., Renner, K., Peeper, D. S., Lacroix, R., & Blank, C. U. (2021). Metabolic profiles of regulatory T cells in the tumour microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70(9), 2417-2427. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02881-z>
- Ratnikov, B., Jeon, Y. J., Smith, J. W., & Ronai, Z. A. (2015). Right on TARGET: glutamine metabolism in cancer. *Oncoscience*, 2(8), 681-683. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.205>
- Sadeghi, K., Wessner, B., Laggner, U., Ploder, M., Tamandl, D., Friedl, J., Zügel, U., Steinmeyer, A., Pollak, A., Roth, E., Boltz-Nitulescu, G., & Spittler, A. (2006). Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *European Journal of Immunology*, 36(2), 361-370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eji.200425995>
- Scalise, M., Pochini, L., Console, L., Losso, M. A., & Indiveri, C. (2018). The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00096>
- Scalise, M., Pochini, L., Console, L., Pappacoda, G., Pingitore, P., Hedfalk, K., & Indiveri, C. (2018). Cys Site-Directed Mutagenesis of the Human SLC1A5 (ASCT2) Transporter: Structure/Function Relationships and Crucial Role of Cys467 for Redox Sensing and Glutamine Transport. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 648. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/648>

- Scalise, M., Pochini, L., Galluccio, M., & Indiveri, C. (2016). Glutamine transport. From energy supply to sensing and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), 1147-1157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.006>
- Sheikh, V., Kasapoglu, P., Zamani, A., Basiri, Z., Tahamoli-Roudsari, A., & Alahgholi-Hajibehzad, M. (2018). Vitamin D3 inhibits the proliferation of T helper cells, downregulate CD4(+) T cell cytokines and upregulate inhibitory markers. *Hum Immunol*, 79(6), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.03.001>
- Skrobot, A., Demkow, U., & Wachowska, M. (2018). Immunomodulatory Role of Vitamin D: A Review. In M. Pokorski (Ed.), *Current Trends in Immunity and Respiratory Infections* (pp. 13-23). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2018\\_246](https://doi.org/10.1007/5584_2018_246)
- Steinert, E. M., Vasan, K., & Chandel, N. S. (2021). Mitochondrial Metabolism Regulation of T Cell-Mediated Immunity. *Annu Rev Immunol*, 39, 395-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-082015>
- Sun, W., Luan, S., Qi, C., Tong, Q., Yan, S., Li, H., & Zhang, Y. (2019). Aspulvinone O, a natural inhibitor of GOT1 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma cells growth by interfering glutamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0425-4>
- Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I., & Prives, C. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(16), 7461-7466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002459107>
- Takahara, T., Amemiya, Y., Sugiyama, R., Maki, M., & Shibata, H. (2020). Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00679-2>

- Teixeira, E., Silva, C., & Martel, F. (2021). The role of the glutamine transporter ASCT2 in antineoplastic therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 87(4), 447-464. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04218-6>
- Vikram Singh, C. (2021). Vitamin D and the Immune System. In Ö. Öner (Ed.), *Vitamin D* (pp. Ch. 4). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97300>
- von Hurst, P. R., Stonehouse, W., & Coad, J. (2010). Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient – a randomised, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 103(4), 549-555. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992017>
- Walsh, N. P., Blannin, A. K., Robson, P. J., & Gleeson, M. (1998). Glutamine, Exercise and Immune Function. *Sports Medicine*, 26(3), 177-191. <https://doi.org/10.2165/00007256-199826030-00004>
- Wang, B., Pei, J., Xu, S., Liu, J., & Yu, J. (2024). A glutamine tug-of-war between cancer and immune cells: recent advances in unraveling the ongoing battle. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 43(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02994-0>
- Wang, T., Jiao, Y., & Zhang, X. (2021). Immunometabolic Pathways and Its Therapeutic Implication in Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 60(1), 55-67. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08821-6>
- Wang, W., Pan, H., Ren, F., Chen, H., & Ren, P. (2022). Targeting ASCT2-mediated glutamine metabolism inhibits proliferation and promotes apoptosis of pancreatic cancer cells. *Bioscience Reports*, 42(3). <https://doi.org/10.1042/bsr20212171>
- Wang, Z., Liu, F., Fan, N., Zhou, C., Li, D., Macvicar, T., Dong, Q., Bruns, C. J., & Zhao, Y. (2020). Targeting Glutaminolysis: New Perspectives to

Understand Cancer Development and Novel Strategies for Potential Target Therapies [Review]. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.589508>

Wolden-Kirk, H., Overbergh, L., Christesen, H. T., Brusgaard, K., & Mathieu, C. (2011). Vitamin D and diabetes: Its importance for beta cell and immune function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 347(1), 106-120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.016>

Xiao, D., Zeng, L., Yao, K., Kong, X., Wu, G., & Yin, Y. (2016). The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids*, 48(9), 2067-2080. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2254-8>

Xiao, Y., Hu, B., Guo, Y., Zhang, D., Zhao, Y., Chen, Y., Li, N., & Yu, L. (2023). Targeting Glutamine Metabolism as an Attractive Therapeutic Strategy for Acute Myeloid Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 24(8), 1021-1035. <https://doi.org/10.1007/s11864-023-01104-0>

Yoo, H. C., Park, S. J., Nam, M., Kang, J., Kim, K., Yeo, J. H., Kim, J. K., Heo, Y., Lee, H. S., Lee, M. Y., Lee, C. W., Kang, J. S., Kim, Y. H., Lee, J., Choi, J., Hwang, G. S., Bang, S., & Han, J. M. (2020). A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Cell Metab*, 31(2), 267-283.e212. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.020>

Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med*, 52(9), 1496-1516. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>

Yuk, J.-M., Shin, D.-M., Lee, H.-M., Yang, C.-S., Jin, H. S., Kim, K.-K., Lee, Z.-W., Lee, S.-H., Kim, J.-M., & Jo, E.-K. (2009). Vitamin D3 Induces Autophagy in Human Monocytes/Macrophages via Cathelicidin. *Cell Host & Microbe*, 6(3), 231-243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.08.004>

- Zappulo, F., Cappuccilli, M., Cingolani, A., Scrivo, A., Chiocchini, A. L. C., Nunzio, M. D., Donadei, C., Napoli, M., Tondolo, F., Cianciolo, G., & La Manna, G. (2022). Vitamin D and the Kidney: Two Players, One Console. *Int J Mol Sci*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23169135>
- Zhang, J., Wang, G., Mao, Q., Li, S., Xiong, W., Lin, Y., & Ge, J. (2016). Glutamate dehydrogenase (GDH) regulates bioenergetics and redox homeostasis in human glioma. *Oncotarget*. <https://www.oncotarget.com/article/7657/text/>
- Zhou, X., Curbo, S., Li, F., Krishnan, S., & Karlsson, A. (2018). Inhibition of glutamate oxaloacetate transaminase 1 in cancer cell lines results in altered metabolism with increased dependency of glucose. *BMC Cancer*, 18(1), 559. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4443-1>

## Anexos



Universidad de Concepción

Concepción, Noviembre de 2017.

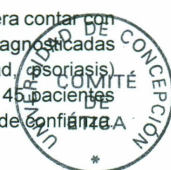
### CERTIFICADO

El Comité de Ética de la Universidad de Concepción ha revisado el **PROYECTO PAI Nº 79170082** adjudicado en el **CONCURSO NACIONAL INSERCIÓN DE CAPITAL HUMANO AVANZADO EN LA ACADEMIA CONVOCATORIA AÑO 2017 - PROGRAMA DE ATRACCIÓN E INSERCIÓN - CONICYT**, titulado **"FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN Y LA DOCENCIA EN ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES EN INMUNOLOGÍA CLÍNICA"**, postulado por la Universidad de Concepción, teniendo a la **DRA. ESTEFANÍA NOVA LAMPERTI**, Doctor a insertar, como Investigadora Responsable, patrocinada por el **DR. CLAUDIO AGUAYO TAPIA**, Docente del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia, y ha comprobado que cumple con las normas y procedimientos éticos, bioéticos y de bioseguridad establecidos nacional e internacionalmente para estudios que involucran personas y manipulación de material biológico.

El presente proyecto de Inserción en la Academia, tiene como objetivo fortalecer la Docencia y el área de investigación en inmunología celular y molecular en el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, teniendo como principal línea de investigación, el estudio de los mecanismos inmunológicos relacionados al uso de la Vitamina D en la respuesta anti-inflamatoria de linfocitos T CD4+ en un contexto fisiológico y fisiopatológico dirigido a entender respuestas inmunes exacerbadas en pacientes con psoriasis. Los objetivos específicos de desarrollo de la propuesta, en su ámbito científico, proponen ejecutar esta inserción profundizando en el estudio de la respuesta inmunológica mediada por la Vitamina D con énfasis en enfermedades autoinmunes-cutáneas como la psoriasis. Asimismo, propone incorporar masa crítica competente en el área de Inmunología Celular y Molecular con el fin de apoyar el desarrollo de proyectos de investigación y programas de Postgrado así como, fomentar y consolidar el grupo de investigación multidisciplinario que incorpora investigadores de ciencias básica y clínica en el área de la Inmunología.

Para desarrollar el estudio, prevé el reclutamiento de pacientes diagnosticados con psoriasis que se atienden en el Hospital Guillermo Grant Benavente, y de individuos sanos, considerando a los inscritos en el Programa de Examen de Medicina Preventiva del Adulto (EMPA) del Servicio de Salud de Concepción, en CESFAM de Concepción. Posterior a ello, se procederá con la intervención, que consiste en tomar muestras de sangre por punción venosa en tubos con (50mL) o sin EDTA (10mL) en el Laboratorio Clínico del Hospital o en el Laboratorio Clínico del CESFAM de Concepción. Éstas serán transportadas al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, todo según normas de Bioseguridad y Protocolos de transporte de muestras biológicas que rigen en la Universidad de Concepción por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL). Todo está rigurosa y detalladamente descrito en "Métodos y tecnologías a utilizar".

Durante los 03 (tres) años de ejecución de este proyecto de Inserción, se espera contar con al menos 60 pacientes, individuos mayores de 18 años de edad, sin otras patologías diagnosticadas (de un universo potencial de 130 pacientes diagnosticados con la enfermedad de psoriasis), considerando una deserción del 25%, para finalmente tener una muestra efectiva de 45 pacientes y 45 individuos sanos para esta investigación, con un error máximo del 5% y un 95% de confianza.






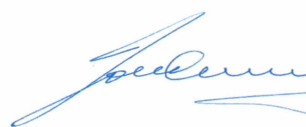
Universidad de Concepción

Todos los procedimientos para la manipulación de productos biológicos y químicos, así como los procedimientos que requieren manipulación de materiales riesgosos dentro de nuestra Institución como Unidad ejecutora, serán realizados bajo condiciones de bioseguridad que están garantizadas por la supervisada y rigurosa aplicación de los protocolos de trabajo estandarizados y de uso rutinario en los laboratorios del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, que cuenta con personal debidamente capacitado y la infraestructura necesaria para cada tipo de actividad contemplada en este estudio.

Los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto serán retirados y dispuestos por el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL) de la Universidad de Concepción, todo de acuerdo a las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT de 2008 y las propias emanadas por la Unidad ejecutora.

La ejecución de esta propuesta de investigación asegura que no vulnera los derechos y la dignidad de los sujetos participantes en la investigación, garantizando la libertad, la voluntariedad y la privacidad de los mismos, presentando para ello los métodos de protección que aseguran la confidencialidad de los datos de investigación y de custodia estricta de la información obtenida, conforme modelo de documento escrito de Consentimiento Informado, observando todas las características formales y necesarias para su validez.

Considerando que el proyecto presentado observa los derechos asegurados en la Declaración Universal de los Derechos Humanos, los derechos y principios de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, las Normas Éticas de la Organización Panamericana de la Salud para Investigaciones con Sujetos Humanos, la Constitución de la República de Chile, la Ley N° 20.120 "Sobre la investigación científica en el ser humano, su genoma y prohíbe la clonación humana", la Ley N° 20.584 que "Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud", la Ley N° 19.628 "SOBRE PROTECCION DE LA VIDA PRIVADA", así como también sigue las Sugerencias para Escribir un Consentimiento Informado en Estudios con Personas, del Comité Asesor de Bioética FONDECYT/CONICYT, y por lo tanto cumple con las normativas nacionales e internacionales vigentes y con los principios éticos que deben imperar en la investigación que involucra seres humanos, no presentando elementos que puedan transgredir las normas éticas y los principios bioéticos rectores en nuestra Institución Universitaria y las adoptadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.



DR. JOSÉ BECERRA ALLENDE  
PRESIDENTE  
COMITÉ DE ÉTICA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN