
Título en español (definido en Cascaras\cover.tex)
Title in English (defined in Cascaras\cover.tex)



Trabajo de Fin de Máster
Curso 2019–2020

Autor

Nombre Apellido1 Apellido2

Director

Director 1

Director 2

Colaborador

Colaborador 1

Colaborador 2

Máster en Ingeniería Informática
Facultad de Informática
Universidad Complutense de Madrid

Título en español (definido en
Cascaras\cover.tex)
Title in English (defined in
Cascaras\cover.tex)

Trabajo de Fin de Máster en **Ingeniería Informática**
Departamento de **XXXXXXXXXXXXXX**

Autor
Nombre Apellido1 Apellido2

Director
Director 1
Director 2
Colaborador
Colaborador 1
Colaborador 2

Convocatoria: *Febrero/Junio/Septiembre 2020*
Calificación: *Nota*

Máster en Ingeniería Informática
Facultad de Informática
Universidad Complutense de Madrid

DIA de MES de AÑO

Dedicatoria

*A Pedro Pablo y Marco Antonio, por crear TeXiS
e iluminar nuestro camino*

Agradecimientos

A Guillermo, por el tiempo empleado en hacer estas plantillas. A Adrián, Enrique y Nacho, por sus comentarios para mejorar lo que hicimos. Y a Narciso, a quien no le ha hecho falta el Anillo Único para coordinarnos a todos.

Resumen

Título en español (definido en `Cascaras\cover.tex`)

Nuestro sistema inmune es esencial para nuestra supervivencia. Sin el, estaríamos expuestos a ataques de bacterias, virus, parásitos, entre otros.

Este sistema se extiende por todo el cuerpo e involucra a muchos tipos de células, órganos, proteínas y tejidos. Su misión principal es reconocer patógenos y reaccionar frente a ellos, provocando un proceso que llamaremos *respuesta inmune*.

En lo que sigue nos centraremos en la dinámica de población de un tipo de célula inmune concreto: las células T, estas participan de manera fundamental en la respuesta inmune. A pesar de lo complicado que pueda parecer, veremos que la decisión entre división o muerte de estas células sigue un patrón sumamente sencillo y propondremos un modelo matemático para estas variaciones. Así mismo, se presentarán simulaciones de ejemplo de dicho modelo.

Palabras clave

Máximo 10 palabras clave separadas por comas

Abstract

Title in English (defined in Cascaras\cover.tex)

An abstract in English, half a page long, including the title in English. Below, a list with no more than 10 keywords.

Keywords

10 keywords max., separated by commas.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Motivación	2
1.2. Objetivos	2
1.3. Plan de trabajo	3
1.4. Estructura del documento	3
2. Estado de la Cuestión	5
2.1. Cuestiones básicas de inmunología	5
2.1.1. El sistema inmune innato	6
2.1.2. El sistema inmune adaptativo	7
3. Modelo matemático	9
3.1. Introducción	9
3.2. Hipótesis biológicas y modelo matemático	10
3.2.1. Hipótesis biológicas	10
3.2.2. Modelo matemático	11
3.3. Dinámica del patógeno durante la respuesta inmune	13
3.4. Resumen y conclusiones	14
4. Simulaciones	15
4.1. Modelo simplificado	15
4.2. Pseudocódigo	16
4.3. Resultados y análisis	17
4.3.1. Tolerancia al patógeno	18
4.3.2. Simulaciones con distintas poblaciones de células T	19
5. Conclusiones y Trabajo Futuro	23
6. Introduction	25
7. Conclusions and Future Work	27
Bibliografía	29
A. Título del Apéndice A	31

Índice de figuras

2.1. Fagocitación de un macrófago a una bacteria.	6
2.2. Macrófago reconociendo una bacteria gracias a la acción anticuerpo-antígeno.	8
3.1. Representación del ciclo celular.	10
4.1. Simulación: caso de intolerancia al patógeno.	18
4.2. Simulación: caso de tolerancia al patógeno.	19
4.3. Simulación: Distintas poblaciones de células T con distintas afinidades al patógeno.	20
4.4. Simulación: Distintas poblaciones de células T con distintas afinidades al patógeno. Clones subdominantes.	21
4.5. Simulación: Distintas poblaciones de células T con distintas afinidades al patógeno. Clon subdominante.	21

Índice de tablas

4.1. Tabla de variables y parámetros.	16
---	----

Introducción

“Frase célebre dicha por alguien inteligente”

— Autor

Las Matemáticas tienen una larga tradición dentro de la Biología, desde los trabajos de Gregor Mendel en genética o los de Theodor Boveri en la naturaleza de los cromosomas. Sin embargo, las colaboraciones matematico-biologo no se hacen notar demasiado frecuentes. Poco a poco los descubrimientos en biología se vuelven más especializados y su entendimiento requiere más detalle, es por eso que los modelos matemáticos que se proponen en este contexto han sido, con frecuencia, mirados “bajo sospecha”.

En el caso que nos ocupa, la inmunología, la cosa no es muy diferente. A pesar de ello, los modelos matemáticos son cada día más importantes. Una de las razones principales es porque la intuición es insuficiente a partir de un cierto nivel de complejidad y el análisis del sistema inmune (SI) debe ser más cuantitativo.

Los datos recogidos experimentalmente exponen la complejidad del SI, su no linealidad, sus redundancias, etc. Todo esto sumado al avance de la tecnología y la explosión de información, eso que llamamos hoy *big data*, hacen que las soluciones automáticas (computarizadas) sean la única manera de acercarse a determinados problemas biológicos y médicos.

No debemos olvidar que los modelos matemáticos no son una representación 100 % fiable del problema que modelizan, pues la misión que tienen estos modelos es ayudar a comprender el funcionamiento de un determinado proceso cuyo conocimiento aún está incompleto, reproducirlo y predecir qué consecuencias tendrá. Es, por tanto, importante, remarcar que los modelos se construyen sobre hipótesis aún inestables y que es precisamente esto lo que les hace tan potentes: permiten incluir variaciones, nuevas hipótesis, compararse con otros modelos,... y gracias a ello lograr una visión más amplia del problema. Pudiendo obtener información útil que de otra manera hubiera sido imposible, ya bien sea por razones del elevado coste económico de los experimentos, por el tiempo que lleva realizarlos, o por la cantidad de datos a examinar, entre otras razones. Pero no pensemos que los modelos “aciertan”, también nos ayudan a descartar vías de investigación que no se ajusten a lo observado. Y eso es, sin duda, avanzar en el problema.

En este trabajo propondremos un modelo matemático muy simple, basado en ecuaciones diferenciales, con el cual modelizaremos la dinámica de población de unas células del SI muy destacadas: las células T. Además, acompañaremos estos resultados con simulaciones de dicho modelo.

1.1. Motivación

- Matemáticas en este mundillo
- (Grandes problemas de la inmunología)
- Cómo ayudan las matemáticas
- Buscar preguntas sin resolver del SI
- (Grandes problemas de la inmunología)

La habilidad de nuestro sistema inmune (SI) para protegernos de los patógenos es ciertamente apasionante. Las células inmunes deben saber cómo diferenciar a las células amigas de las enemigas, cómo y dónde actuar.

Son diversas las amenazas a las que el SI tiene que enfrentarse y dar una respuesta eficiente y proporcional. Estas amenazas pueden ser de naturaleza biológica (agentes patógenos), físico-químicas (como contaminantes o radiaciones) o internas (por ejemplo, las células cancerosas).

A lo largo de los años, muchas preguntas sobre el funcionamiento del SI han sido respondidas, pero aún quedan muchas otras por responder: ¿Quién regula la actuación del SI? ¿qué influye en la respuesta inmune?, ¿cuál es el *software* que llevan las células inmunes?... PROBLEMAS SIN RESOLVER EN INMUNOLOGÍA EN GENERAL (BUSCAR)

Si bien parece natural pensar que hay un órgano que actúa de director, ese órgano, si existe, aún no se ha encontrado. Incita, por tanto, a considerar, que las células inmunes basan su actuación en la información local que encuentran a su alrededor. Y sobre esta suposición construiremos un modelo que describa las dos actuaciones básicas, división y muerte celular, que desarrollan las células inmunes que vamos a estudiar: las células T.

De este comportamiento aparentemente complejo destacaremos la simplicidad: las células T tienen un número muy limitado de opciones, y estas vienen determinadas por el ambiente en el que se mueven y la información que recogen de él.

A pesar de que en este trabajo nos centraremos en una tarea muy particular del SI, como es la dinámica de población de las células T, no debemos olvidar que estas células no son las únicas que forman parte de él, hay muchas otras, y de diversos tipos, interactuando con ellas. Pongamos un ejemplo que ayude a entender la dimensión del asunto: supongamos que estamos viendo un partido de fútbol en la televisión y nos enfocan a un jugador que va corriendo a toda velocidad y luego para en seco. Esto no parece tener mucho sentido. Después, repiten la misma jugada con un campo de visión más amplio, donde podemos ver todo el terreno de juego. Ahora entendemos que el jugador ha parado porque el equipo contrario se hizo con el balón que él estaba esperando.

Para la realización de este estudio presentaremos un modelo matemático, basado en ecuaciones diferenciales, que describa la dinámica de las células T, así como simulaciones de este mismo modelo...(a ver qué se hace aquí). —————

A pesar de la descentralización en sus tareas y del poco margen de maniobra, es asombroso que el resultado que nos ofrece el SI sea tan eficiente.

1.2. Objetivos

- Estudiar el entorno biológico sobre el que se sustenta este TFG.
- Estudiar y entender el modelo propuesto y sus aplicaciones.

- Desarrollar simulaciones de dicho modelo que complementen la teoría vista.

1.3. Plan de trabajo

Aquí se describe el plan de trabajo a seguir para la consecución de los objetivos descritos en el apartado anterior.

1.4. Estructura del documento

Estado de la Cuestión

2.1. Cuestiones básicas de inmunología

Antes de comenzar es conveniente introducir una serie de definiciones y explicaciones básicas referentes al sistema inmune y a los procesos que este lleva a cabo. De esta manera, los conceptos y modelos que se expondrán más adelante serán entendidos en su contexto y sin ningún impedimento terminológico. Recordemos que, a pesar de que este trabajo se centra en un modelo matemático, este modelo no puede pensarse fuera de su contexto biológico. De esta manera todos los resultados que se obtienen deben tener cabida dentro de este mismo ámbito. Es por ello que tener una noción, al menos básica como la que aquí se expone, sobre el sistema inmune es esencial para su entendimiento y posterior análisis.

En la Sección 1 de Introducción ya decíamos que el sistema inmune funciona como un equipo. Este está compuesto por numerosas células, proteínas y otros agentes de distinto tipo que trabajan de forma coordinada para dar una respuesta eficaz y proporcional al ataque recibido. Este último adjetivo es muy importante: necesitamos que la actuación de nuestro sistema inmune no sea insuficiente, lo que podría acarrear alguna inmunodeficiencia, ni tampoco excesiva, que es lo que ocurre con las alergias: el sistema inmune reacciona de manera exagerada a ciertos antígenos que son, en la mayoría de casos, inofensivos, dando lugar a malestar general, fiebre, estornudos y, en casos muy graves, puede llegar a tener consecuencias fatales. Otro de los requisitos que debe tener un buen sistema inmune es la capacidad para identificar a quién atacar, en algunos casos se producen alteraciones de este sistema inmunitario que provocan que las células del propio organismo sean atacadas. Es lo que se conoce como enfermedades autoinmunes, entre ellas encontramos la celiaquía, la artritis reumatoide o el cáncer.

Ahora que sabemos las características que debe tener una respuesta inmune veamos cómo lo hace: a continuación veremos los mecanismos de los que dispone el sistema inmune y cómo los utiliza. Haremos un recorrido desde lo más básico, comenzando por el *sistema inmune innato*, hasta conceptos más avanzados referentes al *sistema inmune adaptativo*. Dedicaremos buena parte de esta sección a entender qué son las células T y cual es su papel en el desarrollo de una respuesta ante una infección aguda. Como veremos, este tipo de células inmunes juega un papel primordial y, además, serán las grandes protagonistas de este trabajo de fin de grado.



Figura 2.1: Fagocitación de un macrófago a una bacteria.

2.1.1. El sistema inmune innato

Comencemos por lo más simple: las barreras físicas. La piel y la mucosa de nuestro sistema respiratorio, digestivo y reproductivo intentan que virus, bacterias, hongos o parásitos no entren en nuestro organismo. Es la primera defensa que tenemos y es bastante efectiva en muchos casos pero, ¿qué pasa si estos logran atravesar esta barrera?

Aquí entra en juego lo que se denomina *sistema inmune innato*, recibe este nombre porque parece la defensa “natural” que todo animal tiene. De hecho, muchos mecanismos de este sistema inmune innato llevan con nosotros más de 500 millones de años (Sompayrac, 2016). A pesar de que dispone de mecanismos mucho más sencillos que el *adaptativo*, el papel que tiene es fundamental, pues permite dar una primera respuesta rápida ante una infección. Un ejemplo podría ser el de una infección bacteriana. Las bacterias, una vez que entran al organismo, se reproducen a gran velocidad. Para que el sistema inmune pueda vencerlas es necesaria una primera actuación que no requiera mucho tiempo de preparación, para poder atacar cuanto antes. Es el *sistema inmune innato* quien se encarga.

Entre las armas de las que dispone encontramos proteínas, fagocitos y células NK (*Natural Killer*), que son un tipo de linfocito producido en la médula ósea y que se distribuyen por la piel, el intestino, el hígado, los pulmones y el útero, entre otros tejidos (Taborda et al., 2014). Pero centrémonos en uno de sus componentes más famosos: los *macrófagos*. Su nombre compuesto por dos palabras griegas: “*macro*”, que significa grande y “*fago*”, que significa comer, lo dice todo. En efecto, los *macrófagos* son células que se comen invasores mediante un proceso llamado *fagocitosis*, que ilustra la Figura 2.1. El mecanismo es muy similar al utilizado por una ameba. Una vez que el *macrófago* tiene en su interior a la bacteria, la degrada en una vesícula llamada *lisosoma*. Esta contiene sustancias que podrían degradar hasta el propio *macrófago* si salieran de esta vesícula.

Durante la batalla con las bacterias, los *macrófagos* producen y secretan unas proteínas llamadas *citoquinas*. Estas son hormonas que facilitan la comunicación entre células del SI y cobrarán un papel muy relevante en los capítulos que siguen. Podríamos decir que los *macrófagos* hacen el papel de centinelas, que cuando ven al enemigo mandan señales (*citoquinas*) para reclutar a más defensores. A continuación, veremos otros tipos de células, en este caso referentes al *sistema inmune adaptativo*.

2.1.2. El sistema inmune adaptativo

El nombre es bastante descriptivo y, valga la redundancia, gracias a este SI somos capaces de adaptar nuestras defensas contra nuevos invasores. Pero no fue hasta los años 70 cuando tuvimos constancia de esta habilidad adaptativa. Por aquel entonces Edward Jenner comenzó a vacunar a la población inglesa contra el virus de la viruela, en esa época este virus fue la causa de numerosas muertes y desfiguraciones. Lo que Jenner observó es que los ganaderos que se dedicaban a ordeñar vacas contraían el virus de la viruela bovina (*cowpox*, en inglés) y que, aquellos que habían contraído el virus bovino, raramente contraían la viruela. Así que Jenner decidió llevar a cabo un experimento: guardó pus de uno de los ganaderos con viruela bovina y lo usó para inocular a un niño sano, James Phipps. Después Phipps fue reinoculado con pus proveniente de una persona con viruela, pero no contrajo la enfermedad. De esta manera, quizá poco ortodoxa, Jenner demostró que el sistema inmune humano podía proporcionar armas para protegernos de un intruso que no había visto antes. Lo que debemos remarcar es que la vacuna contra la viruela solo protegía contra esta enfermedad o algunas causadas por virus similares, como en el caso de la viruela bovina. Es decir, el SI adaptativo se adapta para defendernos de invasores específicos.

Veamos ahora qué forma tienen estos invasores: seguro que el término *anticuerpo* no resulta desconocido, pero ¿a qué nos referimos con él? Los *anticuerpos* no son más que proteínas especiales que circulan por la sangre, y el agente que hace que se produzcan se denomina *antígeno* (en el ejemplo anterior, el *antígeno*, sería el virus de la viruela). Gracias a su estructura, los *anticuerpos* son capaces de encajar en un determinado *antígeno*, como vemos en la Figura 2.2. Los anticuerpos son producidos por unas células inmunes conocidas, las células B. Este tipo de células empiezan con el mismo ADN, pero cuando empiezan a madurar el ADN que forma los anticuerpos puede cambiar. Dando lugar así a gran diversidad de ellos y permitiendo la adaptabilidad de nuestro SI.

La misión principal de los *anticuerpos* es identificar a los “indeseables”, dejando que el trabajo sucio lo hagan otros. Es decir, gracias a la presencia de *anticuerpos*, otras células, como los ya conocidos *macrófagos* son capaces de identificar a los atacantes. Pero... ¿qué ocurre cuando un virus ya ha entrado en una célula de nuestro cuerpo? Los *anticuerpos* no pueden alcanzarlo y el virus puede dedicarse a replicarse cuanto quiera. En este momento, es el turno de las células protagonistas de este trabajo, las células T.

2.1.2.1. Las células T

Como las células B, las células T se producen en la médula y maduran en el timo, de ahí la T de su nombre. Su superficie consta de unas moléculas que permiten la interacción con los *anticuerpos* llamados receptores (TCR, *T Cell Receptors*). Hay distintos tipos de células T atendiendo al papel que desempeñan: las células T-Helper secretan *citoquinas* con el objetivo de avisar y activar a otras células inmunitarias, por su parte las células T-killer son un arma muy potente, pues pueden destruir células infectadas. La manera que tienen de acabar con los virus es haciendo que las células infectadas con ellos se suiciden, de esta forma tanto el virus como la célula infectada mueren.

Cuando las células T salen del timo se encuentran desactivadas, en un estado naïve y se dedican a circular por los órganos linfoides secundarios, cuyo máximo representante es el nodo linfático. Allí se encuentran con células provenientes del foco de una infección, que han fagocitado a algún agente infeccioso. Estas presentan en su membrana ciertos *antígenos*, que son reconocidos por las células T gracias a su TCR. Si este *antígeno* se reconoce como extraño, la célula T se activa, convirtiéndose así en una célula efectora,

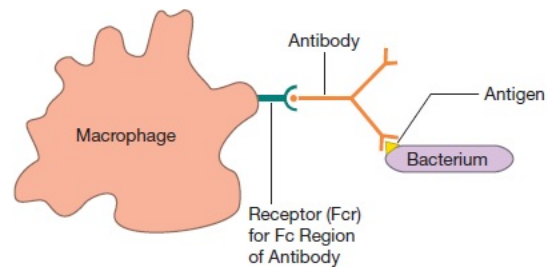


Figura 2.2: Macrófago reconociendo una bacteria gracias a la acción anticuerpo-antígeno.

capaz de secretar *citoquinas* y de ir a la zona afectada a combatir al agente extraño.

Capítulo 3

Modelo matemático

En este capítulo exponemos un modelo matemático sencillo que da una posible explicación al mecanismo de decisión entre reproducción y muerte de las células T. Para este algoritmo, se han supuesto una cantidad mínima de procesos bioquímicos conocidos y, a partir de ellos, se ha logrado un modelo que, a pesar de su simplicidad, es capaz de ajustarse a hechos observados.

En el siguiente capítulo se recogen una serie de simulaciones de este modelo, así como un análisis de las mismas.

3.1. Introducción

Como ya sabemos, las células T juegan un papel fundamental en cuanto a la defensa de patógenos se refiere. Una vez que se detecta el patógeno, estas se activan y diferencian en células T efectoras. Es entonces cuando empiezan a reproducirse de manera rápida para intentar paliar los efectos dañinos producidos por estos agentes. Durante este proceso de división masiva, la población puede llegar a incrementarse hasta 10^6 veces. Nos referiremos a esta etapa como *expansión clonal*. Una vez que el patógeno ha sido vencido, los niveles de población se restauran mediante un proceso denominado *contracción clonal*. Aunque durante esta última etapa muchas células T mueren, alrededor de un 5-10 % quedan, son las células T de memoria, células listas para dar una respuesta más rápida si el mismo patógeno vuelve a aparecer. La *expansión y contracción clonal* pueden ser vistas desde una perspectiva global como la manifestación de muchas decisiones individuales, recordemos que las células T basan sus decisiones únicamente en la información que recogen de su entorno.

Hechos experimentales demuestran que la aparición de un patógeno no es suficiente para la toma de decisión entre división o muerte de la célula. Las células T continúan dividiéndose en la ausencia de este estímulo o cometen apoptosis cuando este persiste. Siguiendo estos hechos, asumiremos en nuestro modelo que estas decisiones vienen determinadas por la competición de dos moléculas inhibitoras: Retinoblastoma (Rb), que previene la expresión de genes necesarios para que la célula pueda continuar el ciclo celular y dividirse, y célula B linfoma-2 (Bcl-2), que bloqueará la muerte celular. También tendremos en cuenta que las células T se comunican con el exterior gracias a sus TCR y, por tanto, sus decisiones se ven influenciadas por la cantidad de receptores que tengan, es decir, cuantos más receptores, más estímulos serán capaces de percibir.

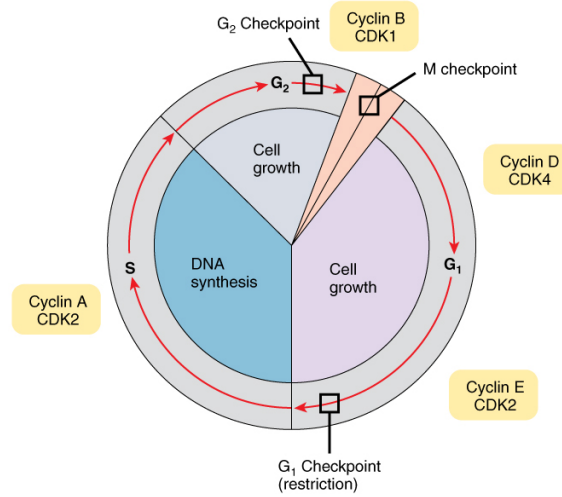


Figura 3.1: Representación del ciclo celular.

3.2. Hipótesis biológicas y modelo matemático

3.2.1. Hipótesis biológicas

En lo que sigue explicaremos con detalle las tres hipótesis biológicas en las que se centra nuestro modelo. Cabe destacar que estas se basan en hechos contrastados y observados en el campo de la biología y que no constituyen, en ningún caso, la explicación al problema que se modeliza. Es decir, no son las hipótesis las que se ajustan al modelo, sino el modelo el que se basa en estos hechos. Bien es cierto que estas hipótesis son los únicos hechos que se conocen, pero son suficientes para la formulación de un modelo sencillo y con resultados relevantes.

3.2.1.1. La competición entre dos moléculas inhibidoras determina la decisión y la duración de la vida de una célula T

La división celular, así como, el programa de apoptosis están bloqueados al comienzo de la formación de las células T. Como ya avanzábamos en la introducción 3.1, la acción de dos moléculas inhibidoras, Retinoblastoma (Rb) y célula B linfoma-2 (Bcl-2), va a tener un papel clave no solo en la decisión entre apoptosis o división de las células T, sino también en el momento en el que deben hacerlo. Por una parte, Rb frena el inicio del ciclo celular. Para desactivar esta función y que la célula pueda dividirse, es necesario que un número suficiente de estas moléculas sea fosforilado ¹. Por otra parte, las proteínas Bcl-2 bloquean el camino hacia la muerte celular durante infecciones agudas, mediante la contención de la acción de otras proteínas como *Bax* o *Bim*.

Para nuestro modelo estableceremos que la célula pasa el *punto de restricción* ² (ver Figura 3.1) si la cantidad de Bcl-2 o de Rb cae por debajo de cierto límite, dando lugar al inicio de la muerte celular o división, respectivamente. Es decir, cuando el número de moléculas de Rb activas disminuye hasta un valor crítico, la célula abandona G_1 para iniciar la división celular y, cuando la cantidad de moléculas de Bcl-2 alcanza un umbral, la célula abandona G_1 para poner en marcha los mecanismos que llevan a la muerte celular. La

¹Fosforilación: adición de un grupo fosfato a cualquier otra molécula.

²El punto de restricción es el punto entre las fases G_1 y S , donde pasamos del crecimiento celular a la división.

variación en las dinámicas de Rb y Bcl-2 da una explicación de la variabilidad observada en la duración de la fase G_1 de las células y, consecuentemente, en la duración de sus vidas.

3.2.1.2. Los receptores de membrana regulan las dinámicas de Rb y Bcl-2

La fluctuación en la cantidad de Rb y Bcl-2 depende de unas proteínas llamadas *citoquinas*³. Estas pueden inducir tanto la fosforilación de Rb, en cuyo caso se denominan *citoquinas de proliferación*. Como tener un efecto positivo o negativo en cuanto a la cantidad de Bcl-2 se refiere, en ese caso nos referiremos a ellas como *citoquinas de supervivencia* o *muerte*, respectivamente.

El punto importante es que la acción que las citoquinas llevan a cabo se produce gracias sus interacciones con receptores de membrana específicos. De esta manera, el efecto que percibe una célula T depende, no solo de la cantidad de citoquinas del ambiente, sino también del número de receptores de membrana de la célula. De esta manera, si, por ejemplo, tenemos una concentración muy alta de cierta citoquina, podríamos asumir que el efecto que esta va a tener en una célula T vendrá determinado por la cantidad de receptores de membrana específicos para ella que posea la célula en cuestión. También sabemos que el número de receptores de membrana de una célula varía a lo largo de su vida, haciendo así que células adyacentes que compartan un entorno similar (la concentración de citoquinas sea la misma, por ejemplo) presenten comportamientos distintos si expresan diferentes receptores de membrana.

3.2.1.3. Las células T naïve se dividen de manera asimétrica después de su activación.

Postulamos que tanto los fenotipos de las células T efectoras como los de las células T con memoria se determinan durante la sinapsis inmune. Esto es, una célula T en estado naïve puede diferenciarse en una célula T efectora o en una célula T de memoria. Por su parte, una vez diferenciadas, las células T efectoras y de memoria, se dividen de manera simétrica, es decir, las células hijas heredarán el tipo la madre, y ambos tipos pueden considerarse indistinguibles durante la respuesta inmune.

3.2.2. Modelo matemático

Basándonos en las hipótesis anteriormente formuladas proponemos a continuación una serie de ecuaciones, con variables continuas y discretas, que darán forma al algoritmo de decisión de nuestro estudio. Como ya habíamos avanzado, se trata de un modelo sencillo, tanto es el caso que los sistemas de ecuaciones diferenciales de primer orden propuestos tienen una solución explícita. Sin embargo, es esta misma sencillez lo que hace de él un modelo tan potente, pues, como veremos en el capítulo siguiente, obtenemos resultados que no solo se ajustan a los hechos observados sino que sacan a la luz comportamientos poblacionales difícilmente observables desde un laboratorio.

Antes de expresar en términos matemáticos las condiciones del modelo, damos cabida a la notación y a algunas aclaraciones previas:

- Denotaremos por $c(t)$ y $a(t)$ la cantidad de Rb y Bcl-2 activa en tiempo t , respectivamente.

³citoquinas: son proteínas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, entre otros. Ver <https://es.wikipedia.org/wiki/Citocina>

- Establecemos, sin pérdida de generalidad, que los límites que determinan la decisión entre división o apoptosis (ver hipótesis 3.2.1.1) estarán en $c(t) = 0$ y $a(t) = 0$, respectivamente. De acuerdo a esta hipótesis definimos:
 - *Decisión*: Fase que parte desde el nacimiento de la célula hasta que una de las células inhibitoras alcanza el límite establecido.
 - *Ciclo*: Fase que se extiende desde la *punto de restricción* hasta la división celular.
 - *Apoptosis*: Tiempo de vida de la célula que comprende desde la desactivación de Bcl-2 y la finalización del programa de muerte celular ACAD (Activated T Cell Autonomous Death).
 - *División*: Estado final después de que la célula haya entrado en la fase de ciclo.
 - *Muerte*: Estado final después de haberse completado la fase de apoptosis.
- R_i será el receptor de la i -ésima citoquina y $r_i(t)$ será la cantidad de ese receptor en tiempo t .
- r_T es el número de señales TCR/antígeno percibidas por la célula T correspondiente.
- Los parámetros μ_{Tc} y μ_{Ta} denotan la tasa de cambio de las moléculas inhibitoras por cada señal del TCR. Mientras que los parámetros μ_{ic} y μ_{ia} representan la tasas de cambio de las moléculas inhibitoras por cada señal R_i .
- λ_{Tj} es la tasa de cambio del receptor R_j por cada señal del TCR. Mientras que λ_{ij} es la tasa de cambio del receptor R_j por cada señal R_i .
- k es el número de receptores de membrana.

Así las cosas, ya estamos en condiciones de presentar las ecuaciones del modelo. Como ya hemos visto en la Sección 3.2.1, la dinámica de los inhibidores está controlada por las señales que recibe la célula de sus receptores de membrana durante la fase de decisión. Además, este número de señales depende del número de receptores de la célula. Si ponemos todas estas hipótesis en conjunto, llegamos a unas ecuaciones como las siguientes:

$$\begin{cases} \dot{c}(t) = \mu_{Tc}r_T(t) + \sum_{j=1}^k \mu_{jc}r_j(t) \\ \dot{a}(t) = \mu_{Ta}r_T(t) + \sum_{j=1}^k \mu_{ja}r_j(t) \end{cases} \quad (3.1)$$

Con el sistema 3.1, ponemos de manifiesto que las concentraciones de Rb y Bcl-2, representadas por $c(t)$ y $a(t)$, respectivamente, dependen del número de señales TCR/antígeno (r_T) y, del número de receptores de membrana que posea la célula en cuestión.

Asumimos que los receptores de membrana involucrados en el algoritmo de decisión de las células T son independientes y tienen efectos aditivos. Según la hipótesis 3.2.1.2, asumimos que las células son capaces de “contar” el número de señales que llegan, cuando estas llegan a cierto número la célula se divide o se suicida. De acuerdo con estas relaciones lineales obtenemos un modelo más robusto, puesto que configuraciones similares de receptores de membrana provocarán decisiones celulares similares.

Luego, para los receptores de membrana proponemos la siguiente ecuación:

$$\dot{r}_i(t) = \lambda_{Ti}r_T(t) + \sum_{j=1}^k \lambda_{ji}r_j(t) \quad \text{para } i = 1, \dots, k \quad (3.2)$$

3.2.2.1. Aspectos de la modelización

- Las condiciones $a(t) \geq 0$, $c(t) \geq 0$ y $r_i(t) \geq 0$, para $i = 1, \dots, k$ definen el dominio de las ecuaciones 3.1 y 3.2 durante la fase de decisión.
- Cualquier receptor con valor negativo $r_i(t) \leq 0$ es *reseteado* a 0 sin cambiar la fase de decisión en la que está la célula.
- Por su parte, las condiciones $a(t) = 0$, $c(t) = 0$ desencadenan el inicio de la fase de apoptosis y ciclo, respectivamente. Estas fases son excluyentes y no se pueden revertir mediante estimulación por citoquinas. Además tienen longitud constante que denotaremos por t_{apo} y t_{cycle} .
- Si la célula progresa en la fase de ciclo los valores de $a(t)$ y $c(t)$ deben ser reiniciados para que las células hijas puedan comenzar la fase de decisión otra vez.
- Una vez que la célula termina la fase de apoptosis es retirada de la población.
- Los parámetros λ_{ji} , μ_{ic} , μ_{ia} , μ_{Tc} , μ_{Ta} , $c(0)$ y $a(0)$ se consideran parámetros estructurales, es decir, se refieren a procesos biológicos que permanecen constantes durante la simulación. Mientras que los parámetros referentes a la composición de receptores de membrana para una célula concreta r_{i0} dependen de la historia de encuentros con el antígeno que ha tenido su madre y diferirán entre las células hijas cuando esta se divida.

3.3. Dinámica del patógeno durante la respuesta inmune

Ahora que ya tenemos un algoritmo para la dinámica de población de las células T, modelizamos la interacción del patógeno con estas células. Debemos recordar que la dinámica de un patógeno depende en gran cantidad de las características de este. Sin embargo, en esta sección daremos unas ecuaciones muy generales para que sean aplicables a la mayor cantidad posible de situaciones. En este caso, la dinámica del patógeno vendrá dada por:

$$\dot{y}(t) = \alpha y(t) - \beta n(t)y(t) \quad (3.3)$$

Donde $y(t)$ y $n(t)$ denotan el número de células del patógeno y el número de células T, respectivamente. Los parámetros α y β son positivos y dependen del antígeno. α representa la tasa de proliferación del patógeno, mientras que β la tasa de eliminación del mismo a causa de las células T.

De acuerdo con este modelo, podemos ver que el patógeno aumenta su población hasta que el número de células T alcanza cierto valor, en ese momento $\dot{y}(t)$ se hace negativa y, en consecuencia, $y(t)$ comienza a decrecer. Asumiremos que las señales captadas por el TCR de una célula T son proporcionales al número de encuentros que tenga con el antígeno. Si llamamos al número de señales TCR de una célula x en tiempo t , $r_T^x(t)$, tenemos:

$$r_T^x(t) = \gamma \rho_n^x y(t) \quad (3.4)$$

Donde γ es un parámetro que depende del antígeno y denota la probabilidad de que haya una activación del TCR debido a un encuentro con el antígeno. Por otro lado, ρ_n^x

representa la cantidad de antígeno que está disponible para una célula T x , en porcentaje. Luego:

$$\sum_{x=1}^n \rho_n^x \leq 1 \quad (3.5)$$

Según la hipótesis 3.2.1.3 las células T que ya se han diferenciado se dividen de manera simétrica y reparten sus receptores de membrana entre sus dos células hijas. De esta manera, la experiencia con el antígeno, propia de cada célula puede ser transmitida a la siguiente generación.

$$\begin{cases} r_{i0}^1 = \delta_i^x r_i^x \\ r_{i0}^2 = (1 - \delta_i^x) r_i^x \end{cases} \quad (3.6)$$

Donde δ_i^x representa el ratio de receptores de membrana de tipo R_i entre las células hijas, r_{i0}^1 y r_{i0}^2 denotan los valores iniciales de receptor R_i en las células hijas 1 y 2, respectivamente, y r_i^x denota el número de receptores R_i en la célula T x en el momento de la división celular.

3.4. Resumen y conclusiones

Antes de embarcarnos en las simulaciones de este modelo, vamos a resumir los aspectos más importantes de este capítulo con la finalidad de que el capítulo siguiente resulte más cómodo de leer.

Lista de puntos clave:

1. El algoritmo determina qué decisión, división o suicidio, toman las células T.
2. Las decisiones se toman de manera individual y se basan en la información que reciben del entorno a través de su TCR.
3. Lo que decide qué decisión se toma y cuándo es la cantidad de ciertas moléculas inhibidoras.
4. Ciclo y apoptosis son fases mutuamente exclusivas e irreversibles.
5. Cuando una célula T se divide sus hijas son del mismo tipo y comparten sus receptores de membrana.
6. Cuando una célula muere se elimina de la población.
7. El crecimiento del antígeno depende del número de células T y decrece cuando las células T comienzan a crecer.
8. Cuando las células T detectan al patógeno su población crece rápidamente y decrece también rápidamente cuando el patógeno ha sido vencido, aunque con cierto desfase.
9. En la última etapa de la respuesta inmune coexisten dos tipos de linfocitos T: los linfocitos sensibles a la apoptosis, que mueren durante la *contracción clonal* (efectores), los linfocitos resistentes a la apoptosis, que sobreviven en forma de linfocitos de memoria.

Capítulo 4

Simulaciones

A lo largo de este capítulo veremos con detalle las simulaciones que se han realizado del modelo visto en 3.2.2. Reproduciremos el comportamiento individual de cada célula y veremos, una vez completada la simulación, el efecto global de estas decisiones individuales.

El código propuesto se ha realizado en Matlab y puede verse en ... anexo?

4.1. Modelo simplificado

Para las simulaciones hemos optado por un sistema simplificado al propuesto en 3.2.2, de tal manera que el número de parámetros sea suficiente para no perder la esencia del modelo pero no muy elevado para no distraer al lector con notación engorrosa. Siguiendo con la notación de 3.2.2, asumiremos $k = 2$. Es decir, hay dos tipos de receptores: p (de proliferación) y d (de muerte) que controlan la evolución de los inhibidores de ciclo y apoptosis.

De esta manera y asumiendo que los receptores de proliferación de las células T efectoras se expresan siguiendo las señales TCR, que autorregulan su expresión y que inducen la producción de receptores tipo d , tenemos que las ecuaciones 3.1 y 3.2 pueden escribirse como:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{c}(t) = -\mu_{pc}p(t) \\ \dot{a}(t) = -\mu_{da}d(t) \\ \dot{p}(t) = \lambda_{Tp}r_T(t) - \lambda_{pp}p(t) \\ \dot{d}(t) = \lambda_{pd}p(t) \\ c(0) = c_0 \\ a(0) = a_0 \\ p(0) = p_0 \\ d(0) = d_0 \end{array} \right. \quad (4.1)$$

Así mismo, hemos simulado de manera conjunta este Sistema 4.1, la Ecuación 3.3 y la dinámica de las células T de memoria. Esta última viene dada por el mismo Sistema 4.1, en el que se ha tenido en cuenta que $d = 0$, puesto que nos centramos solamente en el inhibidor del ciclo celular (recordemos que las células T de memoria no mueren durante la *contracción clonal*). Así las cosas, las ecuaciones que rigen el algoritmo de decisión para

células T de memoria viene dado por:

$$\begin{cases} \dot{c}(t) = -\mu_{pc}p(t) \\ \dot{p}(t) = \lambda_{Tp}r_T(t) - \lambda_{pp}p(t) \\ c(0) = c_0 \\ p(0) = p_0 \end{cases} \quad (4.2)$$

A la hora de realizar la simulación de este modelo hay que tener especial cuidado con la elección de los parámetros y tener en cuenta que muchos de ellos son específicos para un patógeno concreto, lo que hace que obtengamos un resultado u otro dependiendo de estos. A continuación se muestra la Tabla 4.1 con los parámetros elegidos para nuestra simulación: **HAY QUE ACTUALIZAR LOS PARÁMETROS DE ESTA TABLA, NO SON LOS FINALES**

Variables	$t_{cycle} = 0,15$	Duración de la fase de ciclo.
	$t_{apo} = 0,2$	Duración de la fase de apoptosis.
	$t_{next} = 0,3$	Duración del paso en la simulación.
	$a_0 = 0,3$	Cantidad inicial de Bcl-2 para células T efectoras.
	$c_0 = 0,08$	Cantidad inicial de Rb para células T efectoras.
	$c_0^{mem} = 0,04$	Cantidad inicial de Rb para células T de memoria.
	$N_{ini} = 25$	Número inicial de células T naïve.
	$Y_{ini} = 5$	Número inicial de moléculas del patógeno.
	$r_p, r_d = 0$	Número inicial de receptores de membrana p y d .
Patógeno	$\alpha = 10$	Tasa de proliferación.
	$\beta = 0,1$	Tasa de muerte por linfocito.
Células T efectoras	$\lambda_{pd} = 0,04$	Tasa de cambio del receptor R_d por cada señal R_p .
	$\lambda_{Tp} = 6 * 10^{-5}$	Tasa de cambio del receptor R_p por cada señal del TCR.
	$\lambda_{pp} = 0,5 * 10^{-5}$	Tasa de cambio del receptor R_p por cada señal R_p .
	$\mu_{pc} = 0,4$	Tasa de cambio de Rb por cada señal del TCR.
	$\mu_{da} = 3,5$	Tasa de cambio de Bcl-2 por cada señal del TCR.
Células T de memoria	$\lambda_{Tp}^{mem} = 10^{-6}$	Igual que λ_{Tp} , para células T de memoria.
	$\lambda_{pp}^{mem} = 2 * 10^{-2}$	Igual que λ_{pp} , para células T de memoria.
	$\mu_{pc}^{mem} = 0,3$	Igual que μ_{pc} , para células T de memoria.

Tabla 4.1: Tabla de variables y parámetros.

4.2. Pseudocódigo

Con ánimo de aclarar los aspectos más básicos de la implementación, se presenta un pseudocódigo (ver Algoritmo 1) de la misma. El código completo puede verse en PONER ANEXO O DONDE VAYA.

En este pseudocódigo hemos omitido que cuando las condiciones son $a > 0$ y $c > 0$, en el caso de las células T efectoras y $c > 0$, en el caso de las células T de memoria, la célula permanece en la fase de decisión pero actualiza sus condiciones para la siguiente iteración según los resultados que ha obtenido en la iteración actual. También hay que tener en cuenta que la división celular y el proceso de apoptosis no se llevan a cabo de manera inmediata, tienen un tiempo t_{cycle} y t_{apo} , respectivamente, por lo que el número

Algorithm 1 Algoritmo de la decisión. Células T.

```

1: Inicialización de parámetros según 4.1
2:  $t = 0$ ; ▷ t será el tiempo por el que vamos simulando
3: while  $t < T_{final}$  do
4:    $Y = Y_{init} * e^{t*(\alpha - N*\beta)}$ ; ▷ Calculamos Y con la solución explícita de 3.3
5:   for  $nCell$ ;  $nCell++$ ;  $N$  do ▷ Para cada célula T de la población
6:      $r_T = \rho * Y$ ; ▷ Ecuación 3.4
7:     if  $efectora(nCell)$  then ▷ Si es una célula T efectora
8:       Se resuelve 4.1
9:       if  $a \leq 0$  then
10:         La célula  $nCell$  se elimina de la población
11:       else if  $c \leq 0$  then
12:         La célula  $nCell$  se divide
13:         Las condiciones iniciales de las células hijas vienen determinadas por
             $a_0, c_0$  y 3.6
14:       else if  $memoria(nCell)$  then ▷ Si es una célula T de memoria
15:         Se resuelve 4.2
16:         if  $c \leq 0$  then
17:           La célula  $nCell$  se divide siguiendo el mismo procedimiento que la divi-
            sión de una célula T efectora.
18:   Se actualiza el número de células de la población.
19:    $t = t + t_{next}$ ;

```

total de células en la población debe actualizarse cuando toque y no antes de que ninguna de estas dos fases haya finalizado. Otro aspecto que hemos supuesto es que el parámetro γ que aparecía en la Ecuación 3.4 es $\gamma = 1$. Es decir, suponemos que todo encuentro del TCR de la célula T con el antígeno va a desencadenar una activación. El parámetro ρ debe ser calculado de tal manera que todas las células T tengan las mismas posibilidades a la hora de “obtener su parte de patógeno”, en la implementación real se usó un vector de números aleatorios entre 0 y 1 normalizado por el número de células T.

Buena parte de la notación usada en el Algoritmo 1 ya ha sido introducida a lo largo de este trabajo, pero volvemos a insistir en que Y representa el número de moléculas del patógeno, mientras que N la cantidad total de células T, incluyendo las efectoras y las de memoria. Sin embargo, en la implementación real, en la línea 4 del pseudocódigo, el N utilizado es solamente el número total de células T efectoras, sin contar las de memoria ¹.

4.3. Resultados y análisis

En esta sección veremos los resultados de algunas simulaciones. La primera de ellas, Figura 4.1, muestra la simulación correspondiente a la elección de parámetros que se recoge en la Tabla 4.1. Estamos ante un caso de intolerancia al patógeno, puesto que las células T son capaces de eliminarlo por completo. Veámoslo con más detalle: el patógeno, representado con un línea roja, crece rápidamente, debido a la elección de una tasa de crecimiento, α , elevada. Una vez que las células T son conscientes de la rápida proliferación

¹Esto se ha hecho así porque el proceso que siguen las células T de memoria es más complejo que lo que se recoge en el modelo. Estas células al cabo de un tiempo se desactivan y para que tengan un efecto sobre el patógeno deben volver a activarse. Para intentar hacer el modelo lo más sencillo posible se ha optado por hacer que las únicas células que combaten al patógeno sean las T efectoras

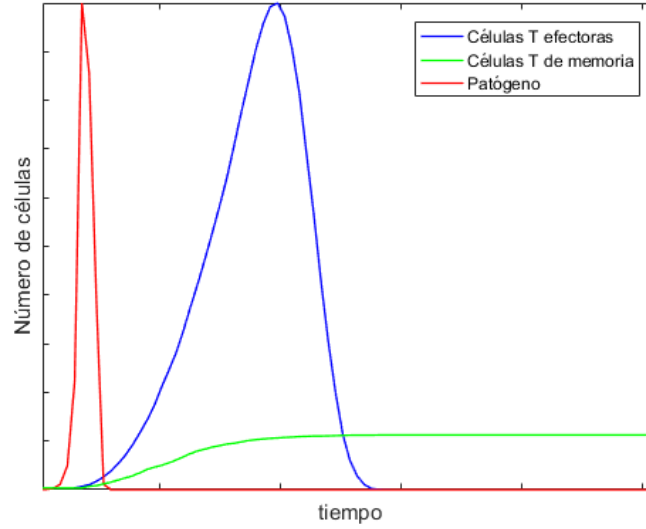


Figura 4.1: Simulación: caso de intolerancia al patógeno.

de un agente no deseado, su número comienza a crecer. Sin embargo, como ya habíamos comentado anteriormente, esto se produce con cierto retraso tras la aparición del patógeno. Lo que estamos describiendo es la conocida *expansión clonal*. Este crecimiento de células T provoca que el término que acompaña a β en la Ecuación 3.3 comience a ser más grande que el acompañado por α en esta misma ecuación, provocando así que la derivada de y se haga negativa y, por tanto, el número de moléculas del patógeno comience a decrecer. Debemos mencionar que el número de células T necesarias para eliminar el patógeno viene regulado por el parámetro β , si este fuera más grande, es decir, las células T fueran más dañinas con el patógeno, veríamos una curva azul con un máximo mas pequeño que el de la Figura 4.1. (EN REALIDAD EN ESTA FIGURA LA GRÁFICA ESTÁ NORMALIZADA, SERÍA MEJOR PONER LA OTRA SIN NORMALIZAR?) Pero ¿qué pasaría si la fuerza de estas células T no fuera suficiente? El patógeno crecería de manera exponencial, a mucha más velocidad que las células T, de forma que estas no podrían llegar a acabar con él.

Prestemos atención ahora al comportamiento de las células T de memoria. Por la sección anterior, ya sabíamos que las células T efectoras y las de memoria iban a constituir poblaciones distintas, puesto que las ecuaciones que rigen sus dinámicas son distintas. La principal diferencia es que las células T de memoria no se suicidan una vez el patógeno ha desaparecido, sabemos que permanecen con la información necesaria para atacar al patógeno más rápidamente en caso de reaparición. Vemos cómo estas células de memoria aumentan su población tras la aparición del patógeno, no vemos un crecimiento tan grande. Su población queda reducida a un 5 – 10 % de la población de células T.

4.3.1. Tolerancia al patógeno

En el caso anterior hemos visto una simulación de intolerancia al patógeno. Esto es, las células inmunes consiguen derrotarlo. Sin embargo, esto no es siempre así. Existen virus como PONER EJEMPLO SI SE SABE que han desarrollado una estrategia para intentar sobrevivir lo máximo posible dentro de nuestro cuerpo. Lo que hacen es crecer a un ritmo muy lento, de esta manera “sigilosa” engañan a las células T, haciéndolas creer que ha sido

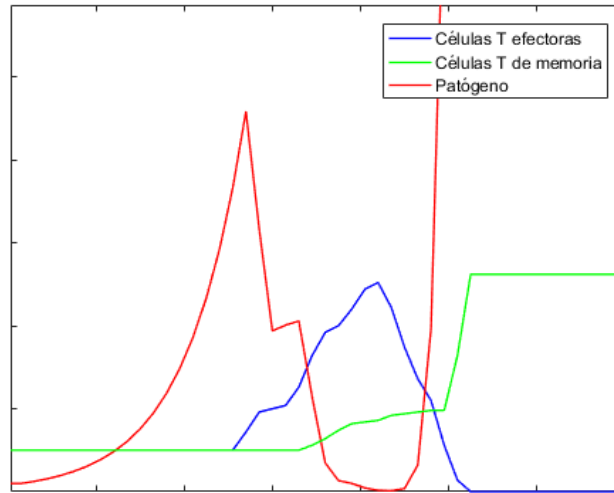


Figura 4.2: Simulación: caso de tolerancia al patógeno.

eliminado y provocando que estas células inmunes se suiciden. La Figura 4.2 ilustra esta situación.

Como vemos, las células T comienzan la *expansión clonal*. Este aumento de población inmune hace que la población del patógeno se vea afectada rápidamente, recordemos que su factor de crecimiento, α , es pequeño ahora. De esta manera, las células inmunes perciben que el patógeno ha sido eliminado con éxito y comienzan la *contracción clonal*, haciendo que su población baje hasta desaparecer. Sin embargo, el patógeno no ha sido erradicado por completo, aún quedaban algunos organismos, imperceptibles para las células inmunes, que, ahora sí, pueden reproducirse sin problema. No hay células inmunes que puedan atacarlos. Es por esto que su población crece de manera exponencial. En poco tiempo estos patógenos “astutos” pueden tomar el control del otro organismo.

En cuanto a las células T de memoria, vemos como crecen con la presencia del patógeno y se estabilizan cuando la población de células T efectoras llega a cero. Esto es así puesto que las células T de memoria no continúan reproduciéndose en ausencia de células T efectoras, a pesar de la presencia de patógeno. PREGUNTAR RAZÓN

4.3.2. Simulaciones con distintas poblaciones de células T

En esta sección veremos cómo se comportan distintas poblaciones de células T efectoras frente a un mismo patógeno. Veremos, además, qué ocurre cuando alguna de estas poblaciones desaparece.

Comencemos mirando la Figura 4.3, para esta simulación hemos tomado tres poblaciones con distinta afinidad, λ_{Tp} , al patógeno. Tenemos el clon 0 con la afinidad más alta y el clon 2 con la más baja. La diferencia en cuanto a expansión es considerable, la población más afín al patógeno es la que se reproduce a mayor velocidad. Esto parece lógico, puesto que es la más preparada para combatir al patógeno, se denomina *población inmunodominante*.

Pero... ¿qué pasaría si esta *población inmunodominante* desapareciera? Una posible explicación nos la da la Figura 4.4. En ella, podemos ver que el modelo sugiere que las *poblaciones subdominantes* se expanden para suplir la ausencia de la *inmunodominante* y

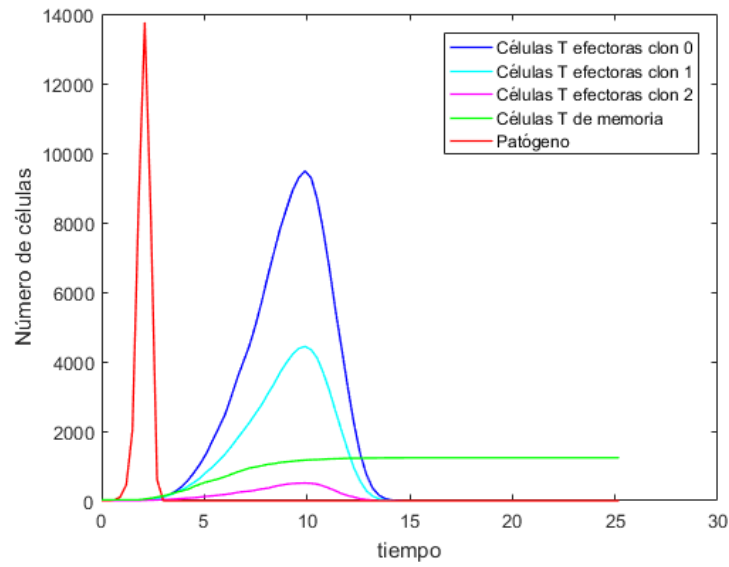


Figura 4.3: Simulación: Distintas poblaciones de células T con distintas afinidades al patógeno.

controlar la infección. No debemos olvidar que la afinidad que tienen estas poblaciones al patógeno es menor y esto hace que el patógeno pueda crecer más y más rápidamente.

Para finalizar veamos el comportamiento del clon 2 cuando el resto de clones han desaparecido. Como es de esperar, ocurre algo similar a lo que veíamos en la Figura 4.4. En este caso el clon 2 debe hacer un esfuerzo mayor (reproducirse más) para mantener la infección controlada. Comportamiento ilustrado en la Figura 4.5.

También se observa que la cantidad de células T de memoria aumenta. Esto se debe al aumento de células del patógeno.

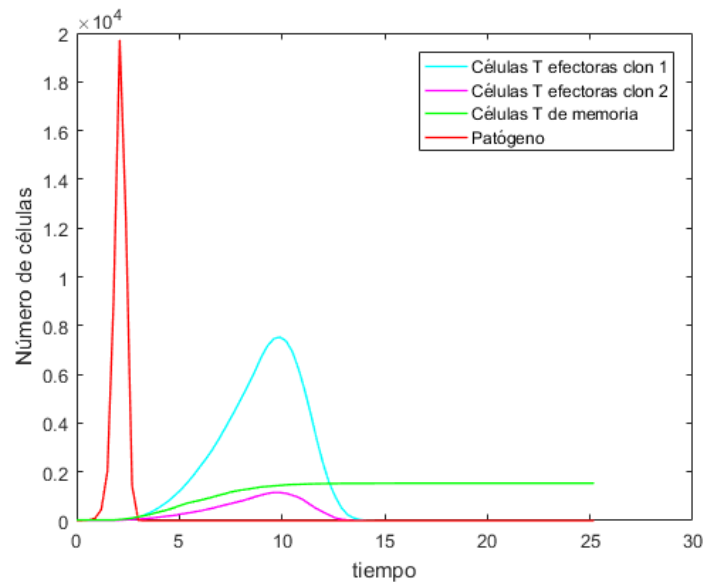


Figura 4.4: Simulación: Distintas poblaciones de células T con distintas afinidades al patógeno. Clones subdominantes.

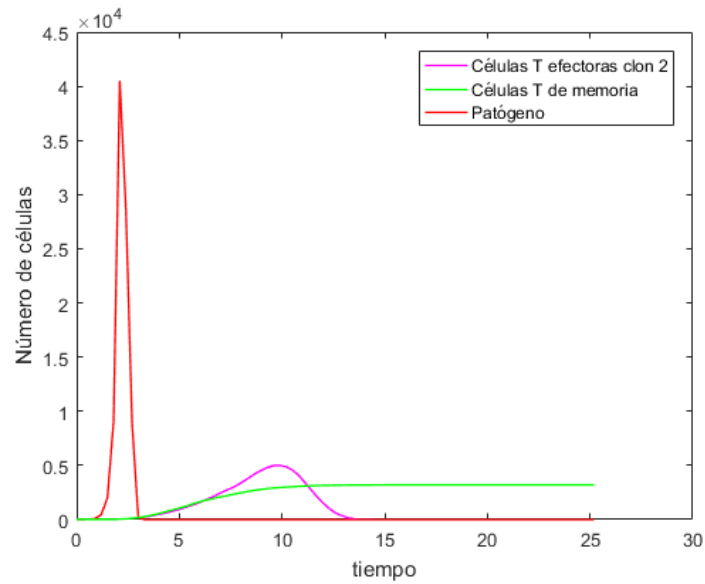


Figura 4.5: Simulación: Distintas poblaciones de células T con distintas afinidades al patógeno. Clon subdominante.

Capítulo 5

Conclusiones y Trabajo Futuro

Conclusiones del trabajo y líneas de trabajo futuro.

Antes de la entrega de actas de cada convocatoria, en el plazo que se indica en el calendario de los trabajos de fin de máster, el estudiante entregará en el Campus Virtual la versión final de la memoria en PDF. En la portada de la misma deberán figurar, como se ha señalado anteriormente, la convocatoria y la calificación obtenida. Asimismo, el estudiante también entregará todo el material que tenga concedido en préstamo a lo largo del curso.

Chapter 6

Introduction

Introduction to the subject area. This chapter contains the translation of Chapter 1.

Chapter 7

Conclusions and Future Work

Conclusions and future lines of work. This chapter contains the translation of Chapter 5.

Bibliografía

*Y así, del mucho leer y del poco dormir, se le
secó el cerebro de manera que vino a perder el
juicio.*

(modificar en Cascaras\bibliografia.tex)

Miguel de Cervantes Saavedra

SOMPAYRAC, L. *How The Immune System Works*. Versión electrónica, 2016.

TABORDA, N. A., HERNÁNDEZ, J. C., MONTOYA, C. J. y RUGELES, M. T. Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. 2014.

Apéndice **A**

Título del Apéndice A

Contenido del apéndice

Apéndice	B
----------	----------

Título del Apéndice B

Este texto se puede encontrar en el fichero Cascaras/fin.tex. Si deseas eliminarlo, basta con comentar la línea correspondiente al final del fichero TFMTeXiS.tex.

*–¿Qué te parece desto, Sancho? – Dijo Don Quijote –
Bien podrán los encantadores quitarme la ventura,
pero el esfuerzo y el ánimo, será imposible.*

*Segunda parte del Ingenioso Caballero
Don Quijote de la Mancha
Miguel de Cervantes*

*–Buena está – dijo Sancho –; firmela vuestra merced.
–No es menester firmarla – dijo Don Quijote–,
sino solamente poner mi rúbrica.*

*Primera parte del Ingenioso Caballero
Don Quijote de la Mancha
Miguel de Cervantes*

