



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

**“Efecto de la depleción de células eritroides y T reguladoras sobre la activación y proliferación de células T de neonatos nacidos por parto o cesárea”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**LICENCIADO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Ingrid Yaritzit Carreón Cortés**

DIRECTOR DE TESIS

**Dra. María Angélica Santana Calderón**

DIRECTOR EXPERIMENTAL

M. en C. Carlos Jesús Ventura Martínez  
L. en C. Alejandra Cedillo Baños.

CUERNAVACA, MORELOS

2022

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

**“Efecto de la depleción de células eritroides y T  
reguladoras sobre la activación y proliferación de  
células T de neonatos nacidos por parto o cesárea”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**LICENCIADO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Ingrid Yaritzit Carreón Cortés**

DIRECTOR DE TESIS

**Dra. María Angélica Santana Calderón**

COMITÉ SINODAL

**PRESIDENTE:** Dr. Ramón González García Conde

**SECRETARIO:** Dr. Iván Martínez Duncker

**SUPLETE:** Dra. Sonia Dávila Ramos

**SUPLENTE:** Dra. Vanessa López Guerrero



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CARREON CORTES INGRID YARITZIT** con número de matrícula **10002742** cuyo título es:

**“Efecto de la depleción de células eritroides y T reguladoras sobre la activación y proliferación de células T de neonatos nacidos por parto o cesárea”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 26 de septiembre de 2022

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE**  
**DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ**  
**DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN**  
**DRA. SONIA DÁVILA RAMOS**  
**DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO**

**PRESIDENTE**  
**SECRETARIO**  
**VOCAL**  
**PRIMER SUPLENTE**  
**SEGUNDO SUPLENTE**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2022-09-28 08:31:34 | Firmante**

qenpmhdXln0Zz50wIEZnsGG6NZ2gPMiyCs9ZL7dhlI+OyRlwXLazuJM1oLLHADk9Q8NVt9xT82otzd7IK67E9tXsYpGo/cv8OqGJGlvqGDysrtco5thTijYFM95IJriFsuGPXFg/EyS1n xpPFzqotuSAIb70LTZWvLxPCVbUXLDZCyp+HC4plMrAde2yq39ZvzKwUO1WCDRZHULatUMGX5vtvdKhqX2qwxSgrQoy6wB6pC9t60micQ8Z7sZtwuEg26QNW9U97qMHwRn1 SY3pXq4JzagMGtB6dXadqGe92Uwgg+DIM4OVkYwtrZZ/pTvbfe2qsqp+4darON+DOWow==

**MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-09-28 11:30:38 | Firmante**

z+YWgs7dwZZgaj3wMoW3wlfVOCYM+nIroOCIL90LN1EJAZxrtfZQ8x253E/qfjuNDkM3u027003qJwTrPi/EMTVy2q8q4WfDkxE2zDJ86oG5BaGwM7MbTfLmzc7u7LTmJxF8tcqJ ZCu1MkQ7OkeZLntaACM5Wu7FTY1tFBVVCU2jR+zB7WVrz/QD9l8Rr/31yqGPZejQOL5aX0m2lj6d36dZwBl+YJQn+usYL+7x27+wUWOkCz/tqajkyigWRoSmsPNqJUzc+NyF8 Svt20Rmd0R+LseW712hw3yG7qaULNiax5bD3dXQ0KYzDgB6bvFXyoQCoo0+cu8kzvhrJ7A==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2022-09-28 12:26:13 | Firmante**

cXfKUoRYng4XEU45NCm7Jpfr6uF8Nen+V8UALXeyEztMvdR+RDcsNZsJSD/uYpzmAIUD1HO4xzi9CdiI0Z/S77SmxiGkVSpRd8QkJPJWu6KXaD6nD4FcSD5BfO06Gm7NvVzh c6CylmURPufnzQMW RxAzk2/cvfn0FvZe+R8r9+d1Xg9FsKEbe1HddTmEOyr+xU1ICMEVw384ld7L7uaMiGPdZ98oCkkF3UfYnmiyCa7niG/yev4c63k1s9fnI3E+6zd/YefaO KQYO+dC4Bsxa0nOheBSaqZ6LW OXRxKsO/rc7UtBoW9wpPtA5/K4Z6Ux1BuzgtWj3f0++vsUQ==

**SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-09-29 12:00:30 | Firmante**

dfwaOEm7k+DqpZ5JQmryOlwAVXogax371N5KZZ+kGMoCHS21RjM2zrP2q3eF6jQamLrKLExEUUU/mNszW/2b6JqF9AUK4/HdsRHX/R3gN4VTFJJ1Hv4tSI6QNU4GPXpkQIB E2McXg6BOIXRZB2VxWjOprSjKlXgnRZa+TkEiOlP50iRnhrsHW EtFechSXg1V1P71PUm/HxZMFTi2JN9k+DV0uBW eG2ReSI3XmusQPfGj7gfV4azBXDpaC1tfQWITIMRyoZD Lqoi92BQYIPfbo7IKzH0mWKCZZxBW +FKTFGnNrcI5v8nyYjDDdafnmeON488vTNg/428V50tpQ==

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2022-10-01 10:45:47 | Firmante**

zI0nOQX8Etr5vrH8OfhRvTRwe5utsIUTIlusZ16VzX1hvr7/F0JaQ9FHy6HM1Yh4Tqda8HKZ/56mI1N1Rb6fIIPhiJwsRBFbICJm3/Sf/lciMiHTwFD+vPa4whuiQOkOUfjCsIJX9nmzr U4ELD1ESdgVPtnY+IYuGCvB5S4E/7FTK0ktEGLwLwkMRF0QVshQK6csu1miNfPbiHKHkXy1ty/z9l5gOzc+f5GMhAZy0WgD8lnG3ziUnhq83g/olKDL1KaelfGGEZsrG91xUgOL x2PKN11gaAShnPxxQvjkolmrBlzrZnjPm/5ylUxri9YCEODgvMtiAW0tDp6lw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**vRMBDnqe8**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kqmuLuK95emIXSTn3ulnBw5LUh1u4xpc>



*Dedicado a la familia que siempre se dice mucho, mucho.  
Sin Ingrid Cortés Paredes, José Daniel Carreón Martínez,  
Daniel Baruch y Daniela Suleym, esto no sería posible.  
Gracias por tanto.*

*A mi abuelo Miguel Carreón y a mi mamá Belinda Paredes por ser mi inspiración.*

## AGRADECIMIENTOS

A unos días de entregar el presente trabajo, me detengo a recordar el inicio de este camino. Que sin el ejemplo de esfuerzo y paciencia de mi madre y padre, me hubiera perdido.

Desde pequeña y hasta ahora, he escuchado muchas veces que nadie te enseña a ser padre o madre; jamás entenderé como aprendieron a serlo de tres personas tan diferentes como mis hermanos y yo, pero gracias. Gracias por todo, y a la vez por cada “¿Cómo te fue?”, “¿Dónde estás?” o “No te duermas tan tarde”, palabras que me acompañaron siempre en este recorrido, e incluso hoy que las escribo.

Así mismo, gracias a mi hermana por mostrarme su valentía, cuando la veo, no solo veo a una hermana, sino a una guerrera. Por otro lado, envío estos agradecimientos lejos, hasta donde esté mi hermano, y un feliz cumpleaños. A ambos mucho, mucho.

A mi mejor amiga Mariel Rossano, por darme siempre sus buenos consejos.

A las personas que conocí durante este trayecto, que me motivaron a seguir en la carrera:

A la Dra. María Angélica Santana, por abrirme las puertas del laboratorio de Inmunología Celular, dirigir mi tesis con sus críticas constructivas. Por tanta comprensión y cariño.

A mis supervisores experimentales, Carlos Ventura y Alejandra Cedillo, por ser tan pacientes y guiarme a través de su experiencia y conocimiento. Por ser grandes compañeros, no solamente de trabajo.

A mis profesores y profesoras, especialmente a la Dra. María Angélica Santana, al Dr. Ramón González y al Dr. Raúl Arredondo, sus clases son una revolución de conocimiento.

A mis amigas Lizbeth Hernández, Fernanda Mata, Carolina Bautista, Karla Martínez, Joseline Gutiérrez y Mariel Castañeda, por hacer de este viaje una aventura.

A Francisco Barreto, que por él termino este recorrido en bicicleta.

## RESUMEN

Durante el periodo de gestación, el sistema inmunológico se desarrolla y se prepara para responder y regular el primer contacto que tendrá el recién nacido con el exterior. En primera instancia, los recién nacidos dependen principalmente de los anticuerpos maternos que pasan a través de la placenta y el calostro, así como de la respuesta inmune innata. Esta última es una respuesta inmediata, que reconoce patrones moleculares comunes a muchos microorganismos, mientras que la inmunidad adaptativa, específica a antígenos moleculares, se encuentra limitada por la baja exposición de antígenos dentro del útero materno. Además, las células del sistema inmune adaptativo tienen un perfil tolerante y sesgado a la inmunidad innata [1].

Se ha descrito que la baja respuesta neonatal también está controlada por un ambiente tolerogénico o inmunosupresor activo. A este perfil tolerante se encuentra asociada una mayor proporción de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs) y células eritroides inmaduras nucleadas CD71<sup>+</sup> (NIEC). Éstas mantienen la tolerancia suprimiendo las funciones y poblaciones de los linfocitos T durante esta etapa temprana, lo que ayuda a una transición suave de un medio estéril a un medio rico en antígenos.

La maduración del sistema inmune fetal es sensible a cambios en el embarazo como la interrupción gestacional (neonatos pre-termino); infecciones tempranas; alimentación; medicación, entre otros. Así mismo, se han identificado variaciones inmunológicas entre el sistema inmunitario de los neonatos nacidos por parto vaginal y los neonatos nacidos por cesárea. Esto debido a que el nacimiento por parto vaginal tiene un mayor intervalo de tiempo, el cual está sujeto a estrés físico y oxidativo, niveles altos de las hormonas estrés, colonización microbiana vaginal, entre otros. Mientras que en el nacimiento por cesárea no acontece esto, lo que pudiera influir en el desarrollo de un sistema inmune alterado, que resulta en la predisposición a desarrollar afecciones como alergias y desórdenes respiratorios e inflamatorios. Durante este proyecto, se evaluó el efecto de la depleción de las células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> y las células eritroides CD71<sup>+</sup> en la respuesta inmune de los linfocitos T. Para esto, se obtuvieron células mononucleadas de sangre de cordón umbilical de nacimientos por partos y cesáreas para estudiar su activación y proliferación en presencia o ausencia de estas células reguladoras. Se hicieron depleciones mediante anticuerpos magnetizados dirigidos contra dos moléculas, CD71 para células eritroides y CD25 para células reguladoras.





## **INDICE GENERAL**

<b>1. Introducción</b> .....	10
1.1 Sistema inmunitario .....	10
1.2 Sistema inmunitario innato .....	10
1.3 Sistema inmunitario adaptivo .....	11
1.4 Linfocitos T .....	12
1.5 Activación de linfocitos T .....	14
1.6 Expansión clonal de linfocitos T .....	16
1.7 Sistema inmune neonatal.....	17
1.8 1.7.1 Inmunidad gestacional .....	18
1.9 1.7.2 Inmunidad neonatal .....	20
1.10 Tolerancia .....	22
<b>2. Antecedentes</b> .....	23
2.1 Células T reguladoras T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> .....	23
2.2 Células eritroides inmaduras nucleadas CD71 <sup>+</sup> .....	24
2.3 Diferencias debidas al modo de nacimiento .....	25
<b>3. Planteamiento del problema</b> .....	28
<b>4. Justificación</b> .....	28
<b>5. Objetivos</b> .....	29
<b>6. Hipótesis</b> .....	29
<b>7. Metodología</b> .....	30
7.1 Purificación de las células de sangre de cordón de neonatos por parto natural y por cesárea .....	30
7.2 Depleción celular de células <b>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> y CD71<sup>+</sup></b> .....	31
7.3 Estimulación celular: anti-CD3 y anti-CD28 para la evaluación de linfocitos T .....	33
7.4 Tinción celular multiparamétrica de marcadores extracelulares: para la Evaluación de la activación de linfocitos T por la expresión de CD69 .....	34
7.5 Marcaje con carboxifluoreceina (CFSE) para la evaluación de proliferación de linfocitos T .....	35
7.6 Estimulación celular: anti-CD3 y anti-CD28 para la evaluación de linfocitos T .....	36
7.7 Tinción celular multiparamétrica de marcadores extracelulares: para la evaluación de proliferación de linfocitos T .....	36
7.8 Evaluación de la activación y proliferación de células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> por citometría de flujo .....	37
<b>8. Resultados</b> .....	38

8.1 Muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas de nacimientos de termino por cesárea y parto vaginal .....	38
8.2 Evaluación de la depleción de células T reguladoras CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> y de células eritroides CD71 <sup>+</sup> .....	39
8.3 Efecto de la depleción celular de células supresoras sobres la activación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y T CD8 <sup>+</sup> en células de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal .....	42
8.4 Efecto de la depleción celular en la proliferación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> Y T CD8 <sup>+</sup> respecto al modo de nacimiento .....	45
<b>9. Discusión de resultados</b> .....	50
<b>10. Conclusión</b> .....	54
<b>11. Bibliografía</b> .....	55

## **Abreviaturas utilizadas**

**Tregs:** Células T reguladoras.

**NIEC:** Eritroides inmaduras nucleadas CD71.

**PRR's:** Receptores de Reconocimiento de Patrones.

**PAMP's:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

**DAMP's:** Patrones Moleculares Asociados a Daño.

**CD:** Células Dendríticas.

**NK:** Células Asesinas.

**TCR:** Receptor de Células T.

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

**APC:** Células Presentadoras de Antígeno.

**FcRn:** El Receptor de Fragmentos Cristalizables (Fc) neonatales.

**CBMC:** Células mononucleadas de sangre de cordón umbilical.

**SFB:** Suero Fetal Bovino.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema inmunitario

El sistema inmunitario es una organización de moléculas, células, tejidos y órganos con funciones especializadas que, en conjunto, interactúan entre sí para integrar una respuesta inmunitaria [2].

Su función principal es mantener un estado de homeostasis estableciendo mecanismos de defensa hacia los patógenos invasores, las células infectadas, tumorales y/o dañadas. Dicha defensa está coordinada tanto por el sistema inmune innato como por el sistema inmune adaptativo, que en términos generales, se distinguen en velocidad y especificidad de la reacción [2]. Así mismo, ambos sistemas presentan una variedad de receptores de reconocimiento y al ser activados inducen la expresión de genes asociados con el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmunitaria [3].

## 1.2 Sistema inmunitario innato

Cuando se entra en contacto con algún agente extraño, éste es detectado, en primera instancia, por la primera línea de defensa: el sistema inmunitario *innato* o *natural*. Esta defensa se encuentra conformada por barreras físicas y químicas (epitelios y mucosas), células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células que liberan mediadores inflamatorios (eosinófilos, basófilos y mastocitos), células dendríticas (CD), células asesinas (NK) y proteínas sanguíneas (componentes del complemento) [2]. La activación de este repertorio innato establece mecanismos de defensa tales como: el sistema de complemento; la migración dirigida de células hacia al sitio de infección; la fagocitosis y la generación de una respuesta inflamatoria [3].

El sistema inmune innato distingue las moléculas propias de las extrañas. Además de que reconoce específicamente moléculas características de grupos de microorganismos patógenos, llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), tales como tipos de lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos que no se encuentran en las células del hospedero [2]. Estos patrones son reconocidos por medio de *receptores de reconocimiento de patrones* (PRR's). Sin embargo, el sistema inmune innato no genera células de memoria inmunológica hacia estos componentes [2].

El sistema innato también reconoce moléculas de estrés celular o daño tisular mediante receptores patrones moleculares asociados a daño (DAMP's).

Los PRR, pueden ser solubles o estar presentes en la superficie o en el interior celular. Además, al reconocer estas firmas moleculares, transducen señales que activan la defensa innata, en particular a los fagocitos.

A pesar de que el sistema inmunitario innato tiene todos estos componentes y mecanismos celulares que permiten montar una respuesta al instante o durante las primeras horas; la diversidad de patrones moleculares es limitada, y por tanto, la respuesta también. Sin embargo, la defensa innata coordina la llegada del sistema inmune adaptativo y es arma del mismo, que induce, entre otros, una respuesta más robusta [2].

### **1.3 Sistema inmunitario adaptativo**

La comunicación celular entre el sistema inmune innato y el sistema inmunitario *adaptativo* o *adquirido*, se da principalmente a través de las células dendríticas y las citocinas. Estas últimas son mediadores solubles que estimulan diferentes procesos celulares como la activación, diferenciación, proliferación y quimiotaxis de las células que integran ambos sistemas. Las citocinas incluyen a factores de crecimiento, interferones, interleucinas, quimiocinas y monocinas [4].

Las células que generan esta respuesta inmunitaria son los linfocitos B y los linfocitos T. Los mecanismos de acción del sistema inmune adaptativo (humorales y celulares) están operados de forma altamente específica para cada agente extraño en particular y para generar memoria inmunológica hacia este [2]. El alza de especificidad del sistema inmune adaptativo en comparación con el sistema inmune innato, se debe al reconocimiento específico de moléculas específicas de cada reto, denominados antígenos [5]. Los linfocitos B reconocen antígenos de diversas moléculas, como azúcares, lípidos y proteínas, mientras que los linfocitos T sólo fragmentos peptídicos presentados por células presentadoras de antígenos en las moléculas de histocompatibilidad.

En los procesos humorales participan los linfocitos B; que en general, reconocen a los antígenos directamente por medio del receptor de células B (BCR, siglas en inglés), lo que los conduce a su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Los anticuerpos permiten marcar moléculas y organismos para su neutralización o eliminación [2].

Existen además, mecanismos celulares, como las células citotóxicas, que permiten la defensa contra agentes intracelulares.

## 1.4 Linfocitos T

Los linfocitos T se encargan de eliminar a células infectadas o dañadas o de coordinar la respuesta inmune [2]. Los linfocitos T, en conjunto con las demás células del sistema inmune se generan en la médula ósea. Sin embargo, estos son los únicos que migran hacia el timo para terminar su proceso de maduración antes de salir a la circulación periférica [1]. Al llegar a los órganos linfoides periféricos, son retenidos en la zona T donde pueden o no reconocer algún antígeno de clase peptídico a través del complejo denominado receptor de células T (TCR, siglas en inglés), el cual se encarga de transducir la señal de detección al interior de la célula [6].

La expresión de la molécula correceptora CD8 caracteriza al subconjunto de las células T citotóxicas que participan en la eliminación de células infectadas, tumorales o dañadas, permitiendo la eliminación de los reservorios de infección, como son virus y bacterias que algunas veces sobreviven dentro de los fagocitos [5]. En cambio, la expresión la molécula CD4 caracteriza a las células cooperadoras o T helper (del inglés, Th), las cuales se subdividen a su vez en diferentes subpoblaciones tales como Th1, Th2, Th17 y Treg. Cada clase celular Th tiene un fenotipo y función efectora distinta (tabla 1). Sin embargo para simplificar, las células T cooperadoras modulan y coordinan la respuesta de otras células inmunes mediante la secreción de citocinas [6] [7]. Sin embargo, los linfocitos se producen en un estado virgen, y no son capaces de ninguna acción inmune hasta que son activadas y se diferencian en células efectoras o de memoria. Éstas últimas son las responsables de responder de manera más vigorosa y repetida a un antígeno ya reconocido, lo que se conoce como respuesta inmunitaria secundaria [2].

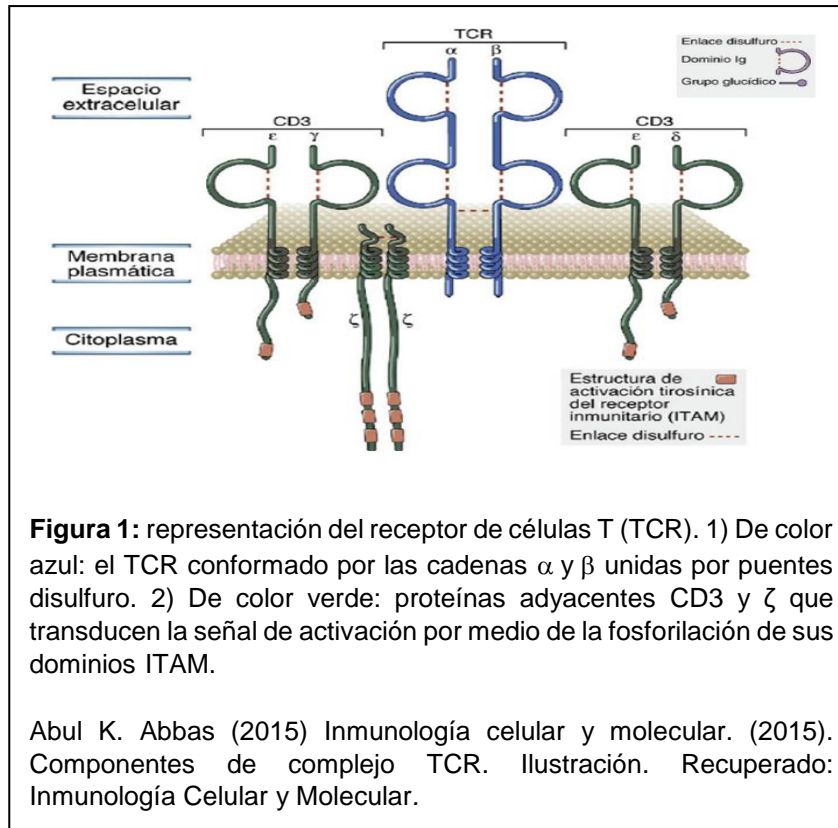
Subpoblación de células T cooperadoras (Th)	Función efectora
<b>Células Th1:</b> inducidas por la producción de IFN $\gamma$ e IL-12.	-Eliminación de patógenos intracelulares. -Producen IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-10.

<b>Células Th17:</b> inducidas por la presencia de TGF $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-23.	Eliminación de patógenos extracelulares. -Producen IL17.
<b>Células Th2:</b> inducidas por la síntesis de IL-4 e IL-2.	-Eliminación de helmintos. -Producen IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10.
<b>Células T reguladoras (Tregs):</b> inducidas en ambientes con TGF $\beta$ e IL-2.	Mantenimiento de la homeostasis del organismo y la tolerancia periférica. -Producen TGF $\beta$ e IL-10.

**Tabla 1:** resumen de los diferentes tipos efectoras de células T cooperadoras y sus funciones. Cada uno forma parte de este grupo, por la expresión en su membrana del correceptor CD4<sup>+</sup>

La activación de los linfocitos T depende del reconocimiento del antígeno por el TCR y por otros receptores que reconocen un estado de alarma inmunológica a través de coestimuladores y citocinas. El TCR está localizado en la membrana citoplasmática, y en la mayoría de las células T es un heterodímero conformado de dos cadenas polipeptídicas transmembrana llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas covalentemente entre sí mediante puentes disulfuro. Las porciones extracelulares de ambas cadenas contienen un dominio variable (V), N terminal, y una región constante (C); las regiones V de estas dos cadenas poseen secuencias que son altamente variables entre los diferentes clones de células T, lo que refleja su papel en el reconocimiento del antígeno [8].

Del lado contrario, las fracciones intracelulares tanto de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  poseen pequeñas colas citoplasmáticas C-terminales de 5 a 12 aminoácidos de longitud, las cuales por su tamaño carecen de actividades enzimáticas intrínsecas, pero funcionan como traductores de señales de otras proteínas asociadas físicamente al TCR [8]. La sinapsis inmunológica se transduce por proteínas adyacentes al TCR unidas no covalentemente; entre estas están el marcador de células T conocido como CD3, el cual es un heterodímero del tipo  $\epsilon$ - $\gamma$  y  $\epsilon$ - $\delta$ , así también como del homodímero  $\zeta$   $\zeta$ . En los dominios citoplasmáticos de las cadenas que forman el CD3 y  $\zeta$ , existen regiones con *motivos de activación basados en tirosina (ITAM)*, los cuales son ricos en tirosinas y pueden ser *fosforiladas* en el proceso de transducción de señales de activación intracelular [9].



## 1.5 Activación de linfocitos T

La activación de linfocitos T es un mecanismo altamente regulado, que conduce a la ampliación clonal y la diferenciación de las células T vírgenes en células T efectoras y de memoria [2].

El inicio de este proceso requiere de tres señales: 1) reconocimiento específico; 2) estimulación de moléculas coestimuladoras y 3) producción de citocinas específicas [2].

El reconocimiento se logra cuando el TCR reconoce a un péptido presentado por el *Complejo Mayor de Histocompatibilidad* (MHC) de las células dendríticas. La función de las CD es capturar por fagocitosis o endocitosis al organismo o antígeno intruso, para mostrar fragmentos peptídicos de éste como antígenos. Las CD son parte de las *Células Presentadoras de Antígeno* (APC) y las principales encargadas de activar a los linfocitos T vírgenes. No obstante, existen otras células con la capacidad de presentar antígenos como los macrófagos y los linfocitos B, aunque esta presentación tiene principalmente funciones efectoras.



La alta afinidad del TCR por el antígeno permite la primera señal de activación; en donde una interacción fuerte y prolongada entre el TCR y el péptido asociado al MHC, favorece la transmisión de señales, mientras que exposiciones cortas resultan en recepciones truncadas [5]. Al mismo tiempo, esta primera señal debe venir acompañada de la estimulación (o inhibición) de receptores coestimuladores en el linfocito T, lo que favorece o anula la segunda señal de activación. Adicionalmente las citocinas secretadas por otras células presentes, se consideran una tercera señal, que orientan la diferenciación que debe seguir el linfocito T [9].

Las señales insuficientes por el TCR o la falta de coestimulación resultan en una activación abortiva y anergia, que genera que la célula T ya no responda a futuras estimulaciones, o muerte.

La señal coestimuladora ocurre simultáneamente al reconocimiento del antígeno por el TCR, y es necesaria para tener un reconocimiento competente. Esta señal depende de la APC y de su expresión de ligandos coestimuladores como B7.1 y B7.2 que son reconocidos por el receptor coestimulador CD28 del linfocito T. Sin la expresión de estos ligandos no se puede dar la activación, y el linfocito T, a pesar de experimentar la primera señal, entra a un estado de anergia por la ausencia de señales coestimuladoras [3]. Dicho estado puede resultar irreversible, a menos que el linfocito reciba fuertes señales de interleucina 2 (IL-2). Además, las señales inducidas por CD28 promueven la síntesis de Bcl-2 y Bcl-XL, proteínas antiapoptóticas o de supervivencia, que conducen a un aumento en la tasa metabólica, necesaria para que los linfocitos T experimenten expansión clonal [5]. Así también, los niveles de producción de la IL-2 aumentan, lo que permite que las células T salgan de la fase G<sub>0</sub>, entren y progresen en el ciclo celular [10].

Asimismo, existen otras moléculas de adhesión que participan en extender el tiempo de reconocimiento y de transducción de señales. Entre estas están los correceptores CD8 y CD4 ya mencionados, los cuales se asocian a regiones no polimórficas de las moléculas del MHC I y II, respectivamente. Además de mantener esta unión con el MHC, ambos están asociados en su región intracitoplasmática con la molécula Lck, que es una cinasa de tirosina que fosforila los motivos ITAM, en donde la fosforilación de los residuos de tirosina de ζζ desencadena la vía de activación en interior celular [2] [9].

Por otro lado, la presencia de citocinas y el tipo de MHC de clase I o II son requeridos para determinar la función efectora de célula T (tabla. 1): para el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>

cooperadores se puede favorecer la conversión en células de tipo Th1 (expuestas a la citocina IL-12), Th2 (en presencia de IL-4), Th17 (por IL-6 e IL-23) y T reguladoras (TGF- $\beta$  e IL-2) [7] [11].

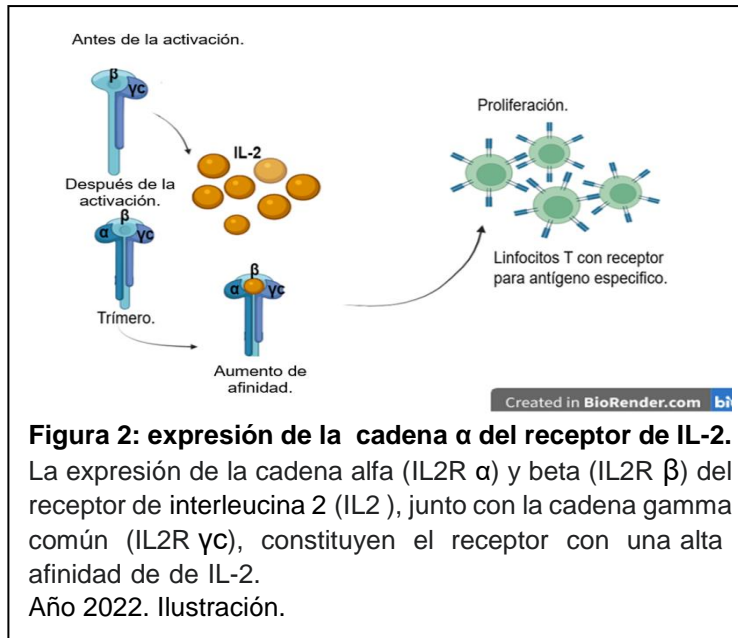
## **1.6 Expansión clonal de linfocitos T**

El proceso de expansión clonal consiste en la proliferación de células T o B, que reconocieron al antígeno, ante las tres señales de activación [2].

Cuando los linfocitos T se activan presentan cambios de expresión en las moléculas de superficie características de activación. Ejemplo de esto es la expresión del marcador temprano de activación, CD69. La función de esta proteína transmembranal es retener al linfocito T dentro del ganglio linfático el tiempo necesario para que experimente cambios químicos y morfológicos que se requieren para una expansión clonal y diferenciación completa. Esto sucede por la inhibición del receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR1), el cual regula la salida de los linfocitos T de estos órganos [2]. También expresan IL-2 que es el principal factor de crecimiento que permite la proliferación celular.

Los linfocitos T en estado virgen (sin antígeno reconocido), son de tamaño pequeño con un diámetro celular de 7 a 8  $\mu\text{m}$ . El núcleo es grande y visible, con cromatina compactada, y el espacio citoplasmático reducido. Por el contrario, los linfocitos efectoros (con antígeno reconocido) miden de 12 a 16  $\mu\text{m}$ . El citoplasma es más exuberante y el núcleo es más irregular. Las variaciones en la morfología pueden corresponder a las diferentes etapas de su ciclo (reposo y activación) [12] [13].

El proceso de expansión clonal es favorecido por la recepción de señales de proliferación, como citocinas, principalmente la IL-2. La estructura del receptor de IL-2 se conforma de dos cadenas de base: IL-2 $\beta$  e IL-2 $\gamma$ c y después de la activación, una cadena IL2 $\alpha$ . La expresión de IL-2 $\alpha$ , también llamado CD25, aumenta la afinidad por la IL-2, clasificada como una citocina promotora de proliferación celular [2]. Así mismo, los linfocitos T expresan otros ligandos como CD40, que les permite tener la capacidad de interactuar con los linfocitos B y macrófagos, y la activación de células dendríticas que las convierte en mejores células presentadoras de antígeno [2].



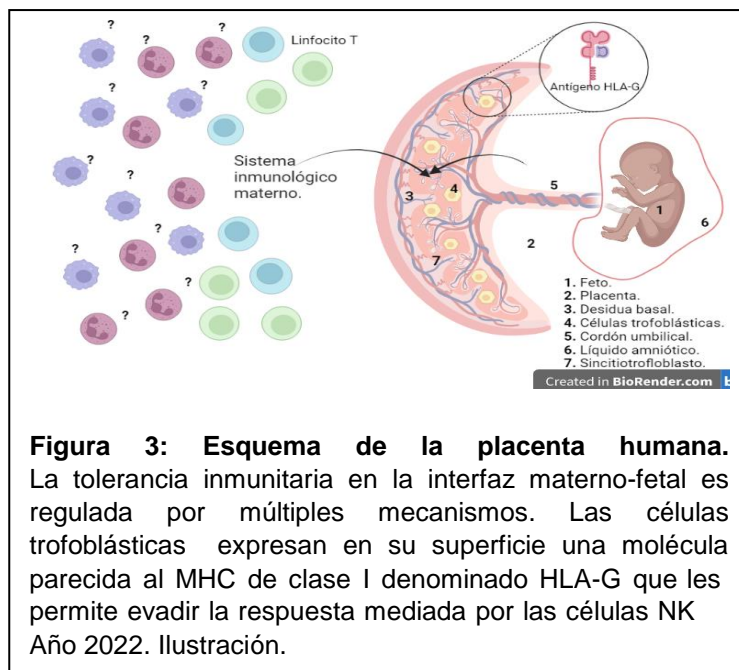
## 1.7 Sistema inmune neonatal

En las diferentes etapas que comprenden el desarrollo temprano, el sistema inmunológico es regulado para mantener una transición y adaptación suave, de un entorno casi estéril a uno entorno rico en antígenos. Esto requiere de modificaciones tanto en el sistema inmune innato como del adaptativo, que solo ocurren en esta etapa y la caracterizan. Durante la gestación, hay una interacción de dos sistemas inmunitarios distintos, el materno y el fetal; que genera el establecimiento de un ambiente tolerante y una dependencia mayor sobre el sistema inmune innato. Esta tolerancia se mantiene durante la etapa neonatal, para hacer una transición suave a un ambiente rico en antígenos. Otras características del sistema inmune neonatal son la presencia de linfocitos casi exclusivamente vírgenes, un sesgo a la producción del tipo celular Th2 efector y un conjunto activo de células inmunosupresoras. Además, los linfocitos neonatales tienen un transcriptoma característico que las predispone en el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a la tolerancia y en el caso de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a una respuesta tipo innata, con expresión de péptidos antimicrobianos e inflamación tipo neutrófilos [1].

### 1.7.1. Inmunidad gestacional

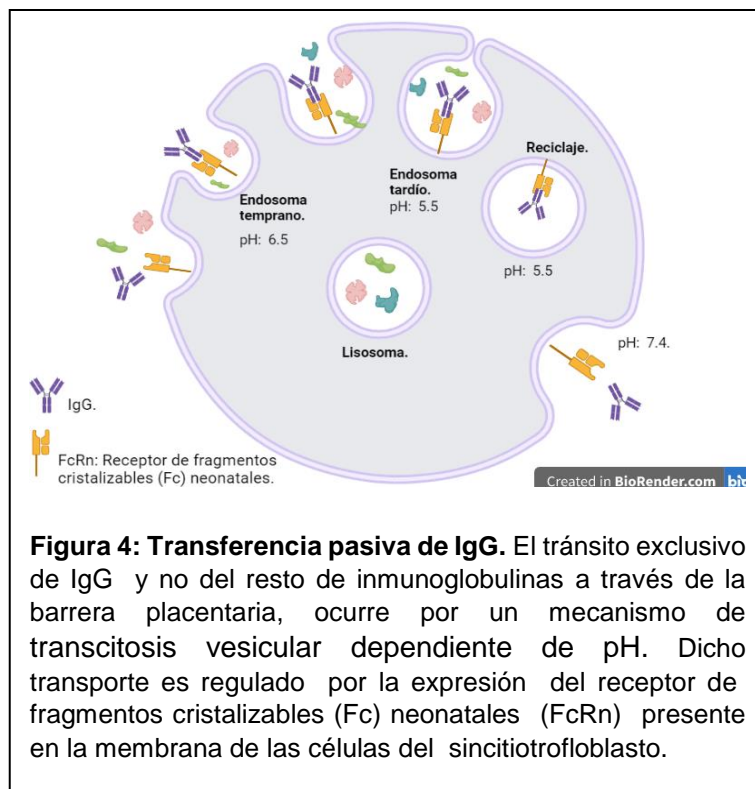
El período de gestación inicia en el momento de la concepción y finaliza en el nacimiento. Durante este tiempo el establecimiento de un equilibrio inmunológico materno-fetal es esencial para el progreso completo del embarazo. Por un lado, el sistema inmunológico materno presenta cambios que permitan la defensa contra los antígenos extraños del medio ambiente, pero no contra los aloantígenos fetales de origen paterno en el útero. La activación de factores fetales, maternos, placentarios y mecanismos de tolerancia en la interfaz materno-fetal previenen el rechazo del feto, tal como ocurriría con el rechazo de un trasplante semialogénico [14]. La activación de estos mecanismos en el útero y no a nivel sistémico, evitan que la madre esté más expuesta a infecciones [15]. Además, diferentes patologías como la preeclampsia, eclampsia, abortos espontáneos se encuentran asociados con la pérdida de tolerancia [16]. Asimismo, por el lado fetal, el sistema inmune neonatal debe desarrollar la capacidad de atacar a futuros patógenos, que son completamente desconocidos, mientras permanece tolerante a los antígenos propios y maternos.

Dentro del útero, la interfaz materno-fetal se conoce como *placenta*; que es un compartimento casi estéril e inmunológicamente favorable, donde ocurre el intercambio de gases, la absorción de nutrientes y la excreción de productos de desecho entre la madre y el feto [17]. La placenta está conformada por dos unidades: la *decidua* o componente materno y el *trofoblasto* que se deriva de tejidos embrionarios; la formación de la decidua en el endometrio ocurre mediante una reacción de decidualización, estimulada por los niveles altos de progesterona. Sus funciones incluyen: la nutrición del embrión, la secreción de hormonas, proteínas y otras moléculas que controlan la invasión embrionaria [18]. A su vez, el trofoblasto constituye un conjunto de células que forman la capa externa protectora del blastocisto y permiten su adherencia a la pared uterina. Estas células contribuyen a la tolerancia inmunitaria de la interfaz materno-fetal, debido a su falta de expresión de genes del MHC de clase II, no pueden presentar aloantígenos paternos a los linfocitos T. Además, la expresión en su superficie una molécula parecida al MHC de clase I denominado HLA-G, les permite evadir la respuesta mediada por las células NK [15] [19].



De igual manera, la morfología hemocorionica de la placenta humana que permite a la sangre materna tener contacto directo con el trofoblasto, participa en los mecanismos de inmunidad fetal, mediante la transferencia pasiva de anticuerpos maternos. De los 5 isotipos de inmunoglobulinas primarias, solo la IgG atraviesa la barrera placentaria [20]. El tránsito exclusivo de IgG y no del resto de inmunoglobulinas, se debe a la expresión del *receptor de fragmentos cristalizables (Fc) neonatales* (FcRn) presente en la membrana de las células del sincitiotrofoblasto. El FcRn está conformado por una cadena pesada (compuesta de 3 dominios  $\alpha$  extracelulares y un dominio transmembrana) que se asocia de forma no covalente con una beta microglobulina, similar a la estructura de receptores MHC de clase I. Este receptor, mediante un mecanismo de transcitosis dependiente de pH, incorpora a la IgG en el tráfico vesicular. Primero, la IgG se asocia al FcRn y la alta afinidad entre estas dos moléculas depende de un pH levemente ácido de 5.0 a 6.5, que endocita y mantiene íntegra a la inmunoglobulina, evitando su desviación con otras moléculas hacia los lisosomas para su degradación. A medida que la vía endosomal avanza, la IgG se transporta hacia la membrana, donde el contenido de la vesícula se exocita y su retención por el FcRn se pierde por el cambio de pH a 7.4 (figura 4). Esta clase de reciclaje mediado por el FcRn, es el responsable de la abundancia y duración de IgG en la circulación.

Los niveles de IgG varían conforme el embarazo avanza; a partir de la 12<sup>a</sup>–15<sup>a</sup> semana de gestación, inicia la transferencia de esta inmunoglobulina, sin embargo, entre la 32<sup>a</sup> semana las concentraciones que circulan son de alrededor de ~ 400 mg/mL, e incrementan a ~ 1,000 mg/mL al término del embarazo [15]. El aumento de anticuerpo en las últimas semanas de gestación, es necesario para proporcionar inmunidad a corto plazo y protección contra infecciones al recién nacido durante los primeros meses de vida. Sin embargo, esto se encuentra alterado en los neonatos de nacimiento prematuro, debido a que no reciben las concentraciones de anticuerpo suficientes que se transfieren al término del embarazo.



### 1.7.2 Inmunidad neonatal

Los desafíos que enfrenta el sistema inmune neonatal en la etapa intrauterina no son los mismos que en la etapa posnatal. Cuenta con la protección por IgG que pasaron a través de la placenta y de IgA que pasan a través del calostro y la leche materna. Sin embargo, no existe inmunidad celular pasiva y los linfocitos T del recién nacido son los responsables de su inmunidad celular.

*El calostro es la leche que las mujeres producen los primeros días después del parto. Este fluido es producido por las glándulas mamarias (GM), antes de que se modifiquen gradualmente sus propiedades iniciales y se convierta en leche madura [21]. La importancia de su ingesta por el lactante es debido a la proporción de nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, inmunoglobulinas, citocinas, factores antimicrobianos, y de células tales como; macrófagos, neutrófilos, CD y linfocitos B. A modo de ejemplo de su importancia, la IgA sérica es la más presente en el calostro, con niveles de alrededor de ~300 mg/mL [22]. Su síntesis empieza cerca del momento del parto, en las GM por las células plasmáticas que migran por vía sanguínea desde el tracto gastrointestinal hacia las GM [23]. Entre las funciones que este tipo de inmunoglobulina tiene está la defensa que proporciona en las mucosas respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias y de otros fluidos como las lágrimas y la saliva. Es una inmunoglobulina que permite neutralizar antígenos y patógenos (evitando su entrada y adherencia al epitelio), siendo uno de los mecanismo que da protección contra infecciones en los recién nacidos. Asimismo, el traspaso de IgA del mismo modo que la transferencia pasiva de IgG, aporta experiencia y memoria sérica materna temporal al sistema inmune neonatal.*

Anteriormente, se creía que la respuesta del sistema inmune neonatal durante la etapa posnatal, dependía mayormente de la inmunidad innata ya codificada en la línea germinal, que de la adquirida de carácter virgen debido a la baja exposición de antígenos que se da en el útero. Sin embargo, en los últimos años, esto ha sido parcialmente aceptado. Se ha visto que los neonatos humanos presentan diferencias en la capacidad inmune de las células T. Tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> presentan una respuesta particularmente baja en las respuestas inmunes adaptativas mediadas por las células Th1 y alta en las respuestas mediadas por células Th2 [4].

Se han encontrado niveles altos de la IL-4 en la sangre de cordón umbilical, la cual participa en la diferenciación al tipo celular Th2. A nivel epigenético se comprobó, la hipermetilación del promotor del gen IFN- $\gamma$ , el cual induce una diferenciación Th1. Por el contrario, el locus de IL-13 se encontró desmetilado, lo que pudiera favorecer el fenotipo efector Th2 [24]. Las respuestas adaptativas restringidas y redirigidas hacían la defensa contra los parásitos, dejan a los neonatos vulnerables a infecciones virales y bacterianas. La infección neonatal sigue siendo un foco de alarma común, con cerca de 7 millones de casos y 700,000 muertes por año [4].

## 1.8 Tolerancia

El sistema inmune se caracteriza por ser capaz de diferenciar lo propio de lo extraño, es decir reconocer a diferentes antígenos extraños, responder a ellos y eliminarlos sin reaccionar contra antígenos del mismo individuo [3]. La tolerancia inmunológica se define como la incapacidad de producir una respuesta específica frente a un antígeno, ya sea propio o extraño. Como ya se ha descrito anteriormente, el neonato nace con un sistema inmune altamente tolerante, que es esencial para su supervivencia y varía en cada una de las etapas tempranas.

Los mecanismos de tolerancia del sistema inmune neonatal a la hora de nacer, se deben de reprogramar y pasar de mecanismos protectores pasivos a protectores activos. Sin embargo, tanto en la etapa prenatal como la posnatal, la tolerancia inmunitaria regula el grado de las respuestas [15].

En la etapa posnatal el sistema inmune neonatal establece una ventana de tolerancia necesaria para interactuar con los diferentes organismos del medio ambiente, adaptarse a los comensales y empezar a diferenciar a los patógenos oportunistas. Dicha ventana también es una de las razones de sensibilidad a infecciones en los recién nacidos [25]. Esta tolerancia depende tanto de características celulares de sus mismas células, como de un ambiente inmunoregulador, que en parte está establecido por las *Células T Reguladoras* (Treg's) y *Células Eritroides Inmaduras Nucleadas* (NIEC). Sus funciones inmunosupresoras les permiten suprimir la actividad de otras células inmunes, así como también su proliferación [26]. Además, dichas células se han encontrado en mayor proporción en la sangre de cordón umbilical tanto de neonatos murinos y humanos [27], y se reducen en número a medida que pasan los días después del nacimiento [27].



## 2. ANTECEDENTES

En este estudio, nos enfocaremos en caracterizar la activación, mediante la expresión del marcador de activación CD69 y la proliferación celular depletando dos estirpes de células inmunosupresoras, las células Treg y las células eritroides CD71<sup>+</sup>, por lo que empezaré describiéndolas.

### 2.1 Células T reguladoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> + Foxp3<sup>+</sup>

Las células T reguladoras (T reg's) forman parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores y se identifican por expresar la cadena de IL-2 $\alpha$  del receptor de IL-2 o CD25<sup>+</sup> y el factor transcripcional Foxp3<sup>+</sup>. Son importantes para el mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio en la periferia, ya que se ha observado que la deficiencia en estas células está relacionado con enfermedades autoinmunes [5].

Entre sus mecanismos reguladores es el que se encuentra mediado por su baja producción de IL-2 y su expresión constitutiva de CD25<sup>+</sup> por lo que dependen en gran medida de la IL-2 exógena para su proliferación y supervivencia, de modo que suprimen a las demás células T efectoras en parte privándoles de su suministro de IL-2. Además, también modulan a la activación por contacto célula-célula, mediante la expresión de CTLA-4 (que es el Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico). CTLA4 es un inhibidor que se asocia a los coestimuladores B7.1 y B7.2 presentes en la APC y evita la 2<sup>a</sup> señal de activación de los linfocitos T. Así mismo, producen citocinas inmunosupresoras como la IL-10 y/o TGF- $\beta$  [2].

Los linfocitos Tregs se generan aproximadamente a las 13 semanas de gestación y el mayor número de Tregs está en el segundo trimestre del embarazo, favoreciendo la tolerancia materno-fetal [28]. En relación a esto, se ha demostrado que las células T fetales proliferan rápidamente a antígenos maternos y propios en ausencia de células Tregs [28]. Además, se ha visto que los niveles de TGF- $\beta$  (citocina que potencia el fenotipo Treg) son más altos en los ganglios linfáticos fetales que en los adultos, lo que conduce a una diferencia en la cantidad de células T reguladoras entre neonatos y adultos. Estas proporciones altas son exclusivas de la etapa neonatal [28]. Con respecto al nacimiento, dichas células aumentan los primeros 10 días de vida y disminuyen conforme los días pasan [29]. Estudios utilizando sangre de cordón umbilical humano muestran que las

células T vírgenes tienen un mayor sesgo a diferenciarse en células Tregs tras el encuentro con el antígeno [28], y que esto podría estar inducido por una mayor expresión del factor transcripcional Helios (IKZF2), el cual aumenta la expresión de Foxp3 al unirse al promotor de Foxp3 [29].

## **2.2. Células eritroides inmaduras nucleadas CD71<sup>+</sup>**

Anteriormente, se consideraba que la única función de los eritrocitos era el transporte de oxígeno. Sin embargo, estudios recientes de estas células han demostrado otras funciones como las interacciones con las células inmunes [26].

Las Células Eritroides Inmaduras Nucleadas (NIEC), son identificadas por la expresión del receptor de transferrina o CD71<sup>+</sup> y la glicoporina A o CD235a. Estas células solamente se encuentran durante y después del embarazo. Son capaces de inhibir la proliferación de células T y B [26]. Además, inducen niveles altos de TGF- $\beta$ , que promueve el aumento de la conversión de células T vírgenes en células Treg [30], así que ambos tipos celulares trabajan a la par para mantener la tolerancia neonatal [30].

En cuanto a su función inmunosupresora actúan únicamente los primeros días de vida del neonato, permitiendo una impronta inmune neonatal, que se refiere a la permisividad del sistema inmune a ser moldeado por la exposición microbiana durante una “ventana de oportunidad”, la cual es requerida para una colonización suave de comensales en el tracto gastrointestinal del recién nacido [26].

Entre sus mecanismos supresores más estudiados es el que se encuentra mediado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen, y que tienen un efecto en la actividad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Se ha visto que en presencia de las NIEC, disminuye la cantidad de IFN- $\gamma$  que producen las células T efectoras, mientras que en la inhibición de las NIEC, la producción de IFN- $\gamma$  aumenta, restableciendo la actividad de las células T [30]. Aunque todavía no está descrito el mecanismo de activación de las NIEC CD71<sup>+</sup>, la presencia de estas células se relaciona con proporcionar un entorno que favorezca el inicio del establecimiento de comensales en el neonato durante el paso a través del canal del parto. Sin embargo, se ha demostrado que el número y la frecuencia de NIEC CD71<sup>+</sup> de recién nacidos de mujeres que se sometieron a un trabajo de parto prematuro espontáneo son similares a los de los recién nacidos a término, pero no son tan bajos como los nacidos

de mujeres que dieron a luz en ausencia de trabajo de parto [31].

### **2.3 Diferencias debidas al modo de nacimiento**

Se ha planteado la hipótesis de que el nacimiento por parto vaginal proporciona señales de desarrollo importantes y permisivas, necesarias para establecer la maduración inmunológica y fisiológica, en preparación para la vida posnatal [32]. Esto debido a las diferencias que presenta el modo de parto vaginal en comparación con el de cesárea. La duración del nacimiento por parto vaginal tiene un intervalo de tiempo de 8 h a 12 h, el cual está sujeto a estrés físico (fuerzas dinámicas) y oxidativo (ambiente hipóxico), niveles altos de hormonas (estrógeno), incluyendo la hormona del estrés (cortisol), colonización microbiana vaginal, entre otros. Mientras que el nacimiento por cesárea tiene una duración de 30 minutos a 1 h, donde no ocurren todos estos eventos, provocando el desarrollo de un sistema inmune alterado, que resulta en la predisposición a desarrollar afecciones como alergias, desordenes respiratorios e inflamatorios [32].

Estudios recientes sobre el modo de parto por cesárea se ha relacionado con las sibilancias pulmonares tempranas, los cuales son sonidos agudos y silbantes que se producen durante la respiración a causa de un bloqueo parcial en los conductos respiratorios. Esto ocurre en los recién nacidos por la colonización bacteriana en las vías respiratorias [33], ya que la colonización de bacterias nasales de los neonatos nacidos por cesárea son similares durante los primeros 6 meses a las de los neonatos nacidos por parto vaginal. Sin embargo, a los 12 meses de edad la tasa de colonización bacteriana de las vías respiratorias es más alta en los bebés nacidos por cesárea en comparación con los de parto vaginal, lo que muestra una eliminación más lenta de bacterias en las vías respiratorias durante el primer año de vida de los bebés por cesárea [33].

Por otro lado, se ha considerado que el estrés del trabajo de parto promueve la producción de diferentes citocinas, y que una alteración de este proceso natural podría resultar en efectos duraderos sobre el sistema inmunológico en desarrollo. Estudios recientes utilizando sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por cesárea, muestran una respuesta reducida de TNF- $\alpha$  e IL-6 hacia la estimulación de TLR1-2. Esto significa que la falta de trabajo de parto normal da lugar a una disminución de la producción de citocinas proinflamatorias [34]. En relación a esto, se especula que el perfil microbiano dominado por *S. aureus* y *S. pneumoniae* (patógenos oportunistas) en los neonatos por cesárea, se

debe a la baja producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en respuesta a través de la vía TLR2 (con TLR1 como un correceptor esencial). Estos TLRs se encargan del reconocimiento de bacterias Gram positivas, como *S. aureus* y *S. pneumoniae* [34].

A nivel epigenético, también existen variaciones en la metilación del DNA de las células de sangre de cordón umbilical de recién nacidos por cesárea en comparación con los nacidos por parto vaginal. El análisis del epigenoma mostró que el nivel de metilación de 148 sitios CpG de un total de 212 posiciones diferenciales de metilación del ADN (posiciones que exhibían una diferencia del 10% o más en la metilación del ADN entre los dos grupos comparados), fue mayor en el grupo de cesárea que en el de parto vaginal [35]. De este mismo análisis, un total de 22 genes mostraron diferencias entre cesárea y parto vaginal, de los cuales seis genes tenían un estado de metilación más bajo en el grupo cesárea que en el grupo parto vaginal y 16 genes tenían un nivel de metilación más alto en el grupo cesárea que en el grupo parto vaginal [35]. De estos últimos, en los de cesárea la metilación de cinco genes se asociaron con enfermedades del sistema inmunológico; dichos genes fueron, el de la subunidad catalítica delta del fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), el de la proteína CXXC 5 (CXXC5), el del receptor de linfotoxina  $\beta$  (LTBR), el de la protoxina Spi-1 (SPI1) y el del inhibidor de serina proteasa B9 (SERPINB9) [35].

En contraste con lo anterior, existen genes expresados diferencialmente en madres según el modo de parto. Las madres con trabajo de parto mostraron un aumento en la expresión de genes implicados en las vías de los péptidos antimicrobianos (AMP), principalmente el del gen inhibidor de la peptidasa 3 (PI3), en comparación con las madres que tuvieron cesárea [35].

Además, la exposición a la microbiota vaginal permite la colonización inicial de la piel y del intestino del recién nacido. Los neonatos que nacen por trabajo de parto, presentan poblaciones bacterianas indiferenciadas en su piel, cavidades bucales y nasofaríngeas e intestino que son semejantes a la microbiota vaginal materna [33]. Por el contrario, los recién nacidos por cesárea tienen una microbiota inicial diversa y oportunista, por bacterias que se originan en el hospital, medio ambiente y piel no materna. En consecuencia los neonatos nacidos por cesárea, tienen a menudo más estancias hospitalarias prolongadas y pasan más tiempo separados de sus madres, lo que puede ocasionar un retraso en la lactancia materna [33]. Así mismo, la colonización bacteriana intestinal neonatal prepara el sistema inmunológico y cambia el equilibrio entre las células T CD4<sup>+</sup> efectoras tipo Th1 y Th2. Por lo tanto, la colonización intestinal desviada de los bebés nacidos por cesárea

puede prolongar la inmadurez inmunitaria posnatal y desregular la preparación inmunológica adecuada, aumentando el riesgo de enfermedades autoinmunes [36].

Se ha puesto en discusión que la susceptibilidad a infecciones en los recién nacidos no se debe a una falta total del entrenamiento de las células del sistema inmune adaptativo, sino a un estado inmunosupresor activo que pudiera en parte deberse a la presencia de células eritroides CD71<sup>+</sup> y T reguladoras que regulan las respuestas exacerbadas al nacer.

En la tabla 5, se muestran las vías de señalización enriquecidas de sangre total de un transcriptoma de neonatos nacidos por cesárea y en la tabla 6, las correspondientes a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Se encontraron genes que participan en las vías de síntesis de nucleótidos que se relacionan con una mayor actividad del ciclo celular. De ese mismo estudio se hizo el transcriptoma de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y se identificó la sobreexpresión de genes implicados en el ciclo celular [37]. El estudio muestra que linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los neonatos nacidos por cesárea tienen diferencias inmunológicas que posiblemente influyan en las predisposiciones a estados inflamatorios que se han descrito antes [37].

	A	B	C	D	E	F
1	KEGG pathway	KEGG BRITE	# genes in PW	statistic	p-value	adj p (q-value)
2	hsa00240 Pyrimidine metabolism	Nucleotide metabolism	92	1084875	0.0004	0.0384
3	hsa00030 Pentose phosphate pathway	Carbohydrate metabolism	27	372610	0.0006	0.0384
4	hsa04010 MAPK signaling pathway	Signal transduction	256	2689867	0.0042	0.1331
5	hsa04210 Apoptosis	Cell growth and death	84	967012	0.0046	0.1331
6	hsa04962 Vasopressin-regulated water reabsorption	Excretory system	42	487460	0.0052	0.1331

**Figura 5:** vías de señalización identificadas en neonatos nacidos por cesárea relacionadas con el ciclo celular.

	A	B	C	D	E	F
1	KEGG pathway	KEGG BRITE	# genes in PW	statistic	p-value	adj p (q-value)
2	hsa03430 Mismatch repair	Replication and repair	23	886981	0.001	0.0352
3	hsa04110 Cell cycle	Cell growth and death	123	4124265	0.002	0.0352
4	hsa00280 Valine, leucine and isoleucine degradation	Amino acid metabolism	44	1612022	0.002	0.0352
5	hsa03420 Nucleotide excision repair	Replication and repair	43	1584920	0.002	0.0352
6	hsa03030 DNA replication	Replication and repair	36	1423491	0.002	0.0352

**Figura 6:** vías de señalización identificadas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos nacidos por cesárea relacionadas con el ciclo celular.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hoy en día la mortalidad neonatal causada por infecciones continúa siendo un problema que se enfrenta a nivel mundial. De acuerdo a las estimaciones reportadas en 2019 por El Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF); de las muertes totales de niños menores de 5 años, el 47% son neonatales y el 24% de éstas fueron debido a infecciones [38]. Por otro lado, a nivel estatal se tiene registro de que por cada 1000 nacimientos, 19 neonatos mueren [38], lo que muestra una situación importante que atender. Además, se debe de agregar que la falta de información sobre los factores que desregulan el sistema inmunológico en el nacimiento por cesárea en comparación con el nacimiento por parto vaginal, propicia el aumento del modo-de parto por cesárea.

De acuerdo a un estudio realizado por la Secretaria de Salud de México en el 2020, el número de nacimientos por cesáreas (508 402) superó el número de partos vaginales (498 748) [39].

Cada vez hay más estudios que demuestran las diferencias entre el sistema inmunológico de los neonatos y el de los adultos. Los bebés presentan una mayor susceptibilidad a infecciones severas por virus y bacterias debido a las características de su sistema inmune, que tiene respuestas inmunitarias más activas por parte de la inmunidad innata que de la adaptativa; tiene una menor activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectores; hay una falta de memoria inmunológica; se encuentran en un ambiente tolerogénico mediado por células inmunosupresoras activas y tiende a tener desregulaciones por factores físicos o químicos que ocurren durante y después del embarazo. Por lo tanto, estudiar las características del sistema inmune neonatal nos permitiría establecer nuevas estrategias de investigación que ayudarían a entender y atender mejor a esta población.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

Es importante hacer la caracterización de la respuesta inmune neonatal, debido al alto porcentaje de mortalidad y morbilidad que presenta la etapa neonatal. Asimismo, es importante conocer si las células supresoras tienen diferente afectación en la sangre de los

neonatos nacidos por parto vaginal o cesárea. Esto es relevante debido a que aumento del número de nacimientos por cesárea a nivel nacional reportado por la Secretaria de Salud de México, es alarmante. Se debe de prestar una mayor atención al sistema inmunológico neonatal para poder entender y atender a la población neonatal. Además, la etapa neonatal es el inicio de nuestra historia inmunológica y ésta tendrá un impacto en la salud general durante toda la vida.

## **5. OBJETIVOS**

### **General:**

Determinar el efecto que tienen las células CD71<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> sobre la activación y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras la activación por el TCR.

### **Particulares:**

1. Determinar el efecto que tiene la depleción de células CD71<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en CBMCs sobre la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras la activación por el TCR.
2. Determinar el efecto que tiene la depleción de células CD71<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en CBMCs sobre la expresión de CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras la activación por el TCR.

## **6. HIPÓTESIS**

La depleción de células eritroides inmaduras CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical permitirá una mejor activación de las células T neonatales. Pudiera encontrarse una desregulación de la función de estas células supresoras en los linfocitos de neonatos nacidos por cesárea, teniendo una menor función supresora.

## 7. METODOLOGÍA

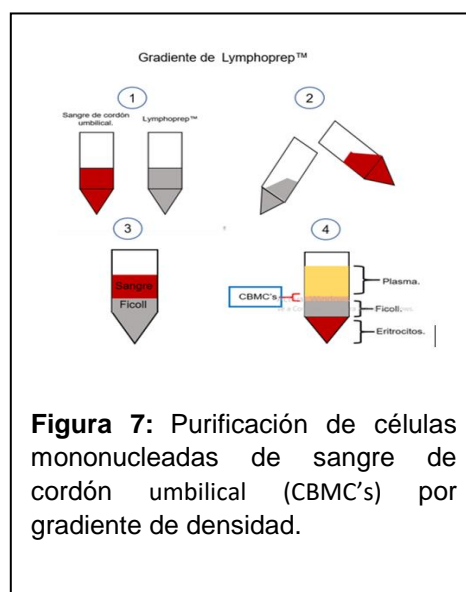
Para probar o descartar la hipótesis establecida de este proyecto, se procedió a realizar la siguiente metodología. Las muestras de sangre de cordón umbilical se obtuvieron de neonatos nacidos por parto natural y por cesárea, que fueron donadas por las madres de neonatos nacidos en el Hospital General de Temixco, Mor., *Enfermera María de la Luz Delgado (Independencia 320, Ruben Jaramillo, 62587)*. Esto con la autorización de Servicios de Salud Morelos y el consentimiento informado de las madres.

Se obtuvieron las muestras después del alumbramiento y antes de la expulsión de la placenta. Para colectar las muestras de parto vaginal, se recolectó la sangre en el momento del corte del cordón y se depositó en tubos falcón estériles con 700  $\mu$ L de EDTA que funciona como anticoagulante. Las de cesárea se obtuvieron por punción de la vena umbilical y se depositaron en bolsas de sangre de barrera, esto con la ayuda de los médicos, para mantener el ambiente estéril durante las cesáreas. Se excluyeron aquellas muestras que presentaban coágulos sanguíneos.

Las muestras de sangre no fueron restringidas por el sexo del neonato, y las edades gestacionales estuvieron en un rango de 37 a 40 semanas de gestación. Únicamente se consideraron los neonatos clínicamente sanos, se excluyeron aquellos que sus madres presentaban alguna infección urinaria, enfermedad de transmisión sexual (ITS) y/o preeclamsia, para evitar la activación anticipada del sistema inmunitario.

### 7.1 Purificación de las células de sangre de cordón umbilical de neonatos por parto natural y por cesárea

El mismo día de la recolección de la sangre de cordón umbilical, se procedió a hacer la purificación de las *Células Mononucleares de Sangre de Cordón Umbilical* (CBMC's). Estas células contienen principalmente linfocitos T y B, células NK y células eritroides inmaduras. La separación en gradiente por densidad se llevó a cabo con el uso de *Lymphoprep* que permite la separación de componentes de muestras sanguíneas mediante la formación de



**Figura 7:** Purificación de células mononucleadas de sangre de cordón umbilical (CBMC's) por gradiente de densidad.



fases por densidad. Para esto, se utilizaron dos tubos falcón estériles, en el primero se mezcló inmersión un volumen aproximado de 20 mL de sangre con 15 mL de buffer de fosfatos (PBS) 1X, mientras que en el segundo se agregó 10 mL de Lymphoprep. Como se ejemplifica en la fig. 7 ambos tubos se inclinaron para proceder pasar la muestra de sangre al tubo con Lymphoprep sin romper el gradiente que se estaba formando. Posteriormente, para lograr la separación en fases se centrifugó a 20 °C durante 30 min. a 1400 rpm con  $g = 9$ ,  $g = 0$ . De dicha separación, se procedió aislar la interfase que correspondía a las CBMC's, mientras que el demás contenido (suero, plasma y eritrocitos) se desechó. A continuación, las CBMC's se centrifugaron durante 10 min. a 1400 rpm con  $g = 9$ ,  $g = 9$  para lavar las células, el sobrenadante se decantó y el pellet se re suspendió. Así mismo, se realizó un paso de adherencia a plástico para eliminar las células adherentes (tales como monocitos): las CBMC's se sembraron en cajas Petri (60 x 15 mm) con 10 mL de medio (proporción celular  $1 \times 10^8$ ), *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 5% suplementado con suero fetal bovino (SFB) y se dejaron reposar durante una noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

## 7.2 Depleción celular de células CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> y CD71<sup>+</sup>

Para evaluar el efecto de las células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> y de las células eritroides inmaduras nucleadas CD71<sup>+</sup> en la activación y proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, se llevó a cabo una depleción celular de estas células para determinar si su ausencia permite una mejor activación y proliferación de los linfocitos T, o no.

Esto se hizo mediante el uso de perlas magnéticas (*Pierce Streptavidin Magnetic*) acopladas a los anticuerpos de purificación: Anti-CD25 (*Purified Anti-Human CD25 BC96*) y Anti-CD71 (*Purified Mouse Anti-Human CD71 M-A712*). Los grupos en los que se estuvieron evaluando la activación y proliferación se muestran en la tabla 2: La proporción celular de CBMC's que se ajustó para cada grupo se muestra en la tabla 2:

Grupos de depleción celular	Proporción celular
<b>Grupo 1:</b> CBMC's (sin depleción).	$3 \times 10^7$ células.
<b>Grupo 2:</b> CBMC's (depleción -CD71).	$1.5 \times 10^7$ células.
<b>Grupo 3:</b> CBMC's (depleción -CD25).	$1.5 \times 10^7$ células.
<b>Grupo 4:</b> CBMC's (depleción -CD71 y -CD25).	$3 \times 10^7$ células.
	Población Total: $9 \times 10^7$ células.

**Tabla 2:** Población celular para cada grupo de depleción celular.

Para lograr una depleción correcta, se evaluó en el laboratorio la cantidad de anticuerpo que se requería para eliminar a las células CD71+ y CD25+. Los anticuerpos de purificación se incubaron previamente durante una noche con perlas magnéticas asociadas con proteína A/G en 1 mL de solución de FACS (999  $\mu$ L de PBS + 1  $\mu$ L de SFB) a 4°C en agitación. Las concentraciones y volúmenes de perlas magnéticas y anticuerpos se hicieron por duplicado (tubo 1 y 2) y son mostradas en la siguiente tabla:

Grupos de depleción celular	Perlas magnéticas (Pierce Streptavidin Magnetic)	Anticuerpos de purificación
<b>Grupo 1:</b> CBMC's (sin depleción).	10 $\mu$ L (2).	
<b>Grupo 2:</b> CBMC's (depleción -CD71).	20 $\mu$ L (2).	Anti-CD71 = 0.5 mg/mL
<b>Grupo 3:</b> CBMC's (depleción -CD25).	10 $\mu$ L (2).	Anti-CD25 = 0.5 mg/mL
<b>Grupo 4:</b> CBMC's (depleción -CD71 y -CD25).	20 $\mu$ L (2).	Anti-CD71 = 0.5 mg/mL Anti-CD25 = 0.5 mg/mL
	Total: 60 $\mu$ L.	

**Tabla 3:** Concentraciones de anticuerpos de purificación y cantidades de perlas magnéticas.

Al día siguiente a la incubación se realizó un lavado de 5 min para retirar el anticuerpo de purificación que no se asoció a las perlas magnéticas, colocando la solución de perlas con anticuerpos en un rack magnético. Al terminar el tiempo, el sobrenadante se desechó, y finalmente se añadieron las proporciones celulares establecidas de CBMC's (tabla 2) que fueron incubadas durante 1 hora a 4°C en agitación. Esto para permitir que los anticuerpos de purificación específicos se asocien a los receptores extracelulares de las células a depletar. Las células no depletadas se incubaron con perlas magnéticas sin anticuerpos. Al concluir el tiempo, se unieron al rack magnético los tubos con sus correspondientes depleciones. Después de 5 min. Se tomaron las muestras y se colocaron en un tubo nuevo dejando aquellas células que se unieron al imán del rack (células eritroides inmaduras nucleadas CD71+ y células T reguladoras CD4+ CD25+ FoxP3+). Por último, se incubaron las CBMC's ya depletadas durante 2 horas a 4°C en agitación, se realizaron cinco lavados para garantizar las purezas de las muestras y se sembraron en cajas de 24 pozos con 1 mL

de RPMI 5% (proporción celular  $1 \times 10^7$ ). La proporción celular de CBMC's aproximada después de la depleción se muestra en la tabla 4:

Grupos de depleción celular	Proporción celular
<b>Grupo 1:</b> CBMC's (sin depleción).	$3 \times 10^7$ células.
<b>Grupo 2:</b> CBMC's (depleción -CD71).	$1.5 \times 10^7$ células.
<b>Grupo 3:</b> CBMC's (depleción -CD25).	$1.5 \times 10^7$ células.
<b>Grupo 4:</b> CBMC's (depleción -CD71 y -CD25).	$3 \times 10^7$ células.
	Población Total: $9 \times 10^7$ células.

**Tabla 4:** Población celular después de la depleción de cada grupo.

### 7.3 Estimulación celular: anti-CD3 y anti-CD28 para la evaluación de activación de linfocitos T

Para evaluar el efecto de la ausencia de células reguladoras en la activación de linfocitos T, se requirió una proporción celular de  $2 \times 10^6$  para cada muestra de las 4 evaluaciones: (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25), las cuales se dividieron en dos partes:

1. Con estimulación anti-CD3 y anti-CD28.
2. Sin estimulación.

Para realizar la estimulación se utilizaron los anticuerpos dirigidos al TCR (Anti-CD3 (*Purified Anti-Human OKT3*)) y a la molécula coestimuladora (Anti-CD28 (*Purified Anti-Human CD28.2*)) entrecruzados con un anticuerpo de entrecruzamiento (*Goat anti mouse BLOSS*). Las concentraciones utilizadas para los anticuerpos de estimulación se muestran en la tabla:

Anticuerpos de estimulación	Concentración
Anti-CD28.	0.5 mg/mL
Anti-CD3.	0.5 mg/mL
Entrecruzador.	1 mg/mL

**Tabla 4:** concentración de anticuerpos de estimulación.

Los anticuerpos de estimulación se añadieron directamente solo a las muestras establecidas para estimular, y ambas muestras (sin estimulación y estimulación CD3-CD28)

fueron incubadas durante 24 horas; que corresponde al intervalo de tiempo de activación de los linfocitos T y de la expresión de marcadores de activación temprana, tales como la proteína transmembranal inducible, CD69.

Al concluir el tiempo de incubación se procedió a detener la estimulación con un lavado con 1 mL de solución de FACS. Se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Por último, a cada muestra se añadió 1 mL de PBS para iniciar el protocolo de tinción multiparamétrica.

#### **7.4 Tinción celular multiparamétrica de marcadores extracelulares: para la evaluación de la activación de linfocitos T por la expresión de CD69**

Las tinciones de marcadores de superficie se hicieron para comprobar la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, inducida por la estimulación con los anticuerpos Anti-CD3 y Anti-CD28, en presencia o ausencia de células reguladoras (CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> y CD71<sup>+</sup>).

Las muestras (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25) suspendidas en 1 mL de buffer de fosfatos se llevaron a centrifugar a 3500 rpm por 5 min., se decantó el sobrenadante y se añadieron a cada una (sin estimulación y estimulación CD3-C28) los anticuerpos de tinción: 40 µL del alícuota (1 µL de Live/Dead™ (*Fixable Violet Dead Cell Stain Kit*) + 999 µL de PBS), 2 µL de CD69 FITC (*FN50 GeneTex*), 1 µL de CD4 PercP Cy 5.5 (TOMBO), 1 µL de CD8 APC (TOMBO) (tabla 5), finalmente se incubaron 30 min. a 4°C en oscuridad.

<b>Anticuerpos de tinción</b>	<b>Concentración</b>
Anti-CD69	0.1 mg/mL
Anti-CD4	0.25 µg/5µl
Anti-CD8	0.06 µg/5µl

**Tabla 5:** concentración de anticuerpos de tinción.

Después de la incubación, se realizó un lavado con 1 mL de solución de FACS a 3500 rpm, por 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Por último, las muestras teñidas (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25) se fijaron con 30 µL de paraformaldehído 1.5% y 270 µL de FACS, a 4°C en oscuridad para su conservación hasta nuevo uso.

## 7.5 Marcaje con Carboxifluoresceina (CFSE) para la evaluación de proliferación de linfocitos T

Para evaluar el efecto que tiene la depleción celular en la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, se llevó a cabo una tinción con CFSE durante 96 horas. Esto nos permitió visualizar mediante citometría de flujo las poblaciones celulares que proliferaron y no proliferaron. El fundamento de la tinción con Carboxifluoresceina (CFSE), se basa en las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la esta molécula. En un inicio de la tinción, se añade la molécula en forma de Carboxifluoresceina diacetilada (CFSA), que en esta conformación no es fluorescente, pero es permeable y atraviesa muy fácilmente la membrana plasmática; al llegar al citoplasma sus grupos esteres son cortados por estererasas, lo que impide su salida de la célula y que tenga fluorescencia. Por último, experimenta otro corte, que deja libre a su grupo carboxílico, el cual se puede asociar a cualquier grupo amino y fluoresce. Por lo tanto, la fluorescencia del CFSE nos permite evaluar la proliferación o división celular, ya que entre más divisiones celulares ocurran la intensidad fluorescencia es menor, debido a la dilución del CFSE en cada división.

Para el ensayo del marcaje con Carboxifluoresceina, se requirió una proporción celular de  $3 \times 10^7$  para cada muestra de las 4 evaluaciones: (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25). La proporción celular es importante, debido a que una cantidad de células menor no sobrevive a la toxicidad del CFSE, lo que provocaría la muerte de estas.

El protocolo del marcaje de CFSE se llevó a cabo en oscuridad. Las muestras (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25) re suspendidas en 1 mL de RPMI se precipitaron a 3500 rpm durante 5 minutos, se les decantó el medio y se re suspendió el pellet. A continuación, se realizó un lavado con 1 mL de PBS para retirar las proteínas sobrantes del medio, y evitar que las moléculas del CFSE se asociarán a proteínas que no correspondían a las CBMC's. Se centrifugaron de nuevo a 3500 rpm por 5 minutos, se re suspendieron y se les añadió a cada muestra un volumen de 995  $\mu$ L de buffer de fosfatos y 5  $\mu$ L de Carboxifluoresceina (CFSE, *Invitrogen*, 200 mM); en este paso se dejaron en incubación 5 minutos, con el cuidado de no sobrepasar ese tiempo por la toxicidad del CFSE. Al concluir el periodo de incubación, se detuvo el marcaje de CFSE con 200  $\mu$ L de SFB concentrado, se disminuyeron las revoluciones y se centrifugaron a 1500 rpm, 5 minutos. El sobrenadante se decantó y se añadió 1 mL de solución de FACS para que las proteínas sobrantes del CFSE ahora se asociaran a las proteínas del FACS (999  $\mu$ L de PBS + 1  $\mu$ L SFB). A continuación, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se

decantó el sobrenadante y se re suspendió el pellet. Por último, cada muestra de las 4 evaluaciones: (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25), se dividieron en dos partes con una proporción celular de  $2 \times 10^6$ . Se sembraron en cajas de 24 pozos con 1 mL de RPMI 5%:

1. Con estimulación anti-CD3 y anti-CD28.
2. Sin estimulación.

### **7.6 Estimulación celular: anti-CD3 y anti-CD28 para la evaluación de proliferación de linfocitos T**

La estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 para evaluar la proliferación de linfocitos T, se llevó a cabo exactamente igual que para la activación de estos. Se utilizaron los anticuerpos Anti-CD3 (*Purified Anti-Human OKT3*) y Anti-CD28 (*Purified Anti-Human CD28.2*) entrecruzados con un anticuerpo de entrecruzamiento (*Goat anti mouse BLOSS*) (tabla 4):

Los anticuerpos de estimulación se añadieron directamente solo a las muestras establecidas para estimular, y ambas muestras (sin estimulación y estimulación anti-CD3/anti-CD28) fueron incubadas durante 96 horas.

Al concluir los cuatro días de incubación, se procedió a detener la estimulación con 1 mL de solución de FACS. Se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Por último, a cada muestra se añadió 1 mL de PBS para iniciar el protocolo de tinción celular.

### **7.7 Tinción celular multiparamétrica de marcadores extracelulares: para la evaluación de proliferación de linfocitos T**

Las tinciones de marcadores de superficie se hicieron para comprobar la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> inducida por la estimulación con anticuerpos Anti-CD3 y Anti-CD28, en presencia o ausencia de células reguladoras (CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> y CD71<sup>+</sup>). Las muestras (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25) suspendidas en 1 mL de buffer de fosfatos se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min., se decantó el sobrenadante y se añadieron a cada una (sin estimulación y estimulación CD3-CD28) los anticuerpos de tinción: 40 µL del alícuota (1 µL de Live/Dead™ (*Fixable Violet Dead Cell Stain Kit*) + 999 µL de PBS), 1 µL de anti-CD4 PercP Cy 5.5 (TONBO) y 1 µL de anti-CD8 APC (TONBO) (tabla 6), finalmente se incubaron 30 min. a 4°C en oscuridad.

Anticuerpos de tinción	Concentración
Anti-CD4	0.25 µg/5µl
Anti-CD8	0.06 µg/5µl

**Tabla 5:** concentración de anticuerpos de tinción.

Después de la incubación, se realizó un lavado con 1 mL de FACS a 3500 rpm, por 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Por último, las muestras teñidas (Grupo 1: SD; Grupo 2: -CD71; Grupo 3: -CD25 y Grupo 4: -CD71 y -CD25) se fijaron con 30 µL de paraformaldehído 1.5% y 270 µL de FACS, a 4°C en oscuridad para su conservación hasta nuevo uso.

### **7.8 Evaluación de la activación y proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo**

El análisis de las células fijadas se realizó en un citómetro de flujo Attune NxT (A24858) de Thermo Fisher. Las muestras fueron adquiridas con al menos 20,000 eventos sobre las células de interés, se utilizó también la compensación de los fluoróforos para restar el solapamiento de los espectros de emisión. Los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo v10.0.7.

### **7.9 Análisis estadístico de la activación y proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>**

El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de prueba de Fisher. Con un alpha o valor significativo por debajo de 0.05. La prueba de hipótesis utilizada se eligió para saber si existe asociación entre dos variables. En otras palabras, si las proporciones de una variable son diferentes en función del valor de la otra variable. El análisis se hizo con ayuda de los softwares GraphPad Prism V8 y Microsoft Excel.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas de nacimientos de término por cesárea y parto vaginal

Para proceder a realizar los experimentos, se tomaron en cuenta los antecedentes maternos y las características de los neonatos al nacer. Aquellas madres con morbilidades como Diabetes Tipo 1 y 2, o gestacional; hipertensión o hipotensión; infecciones urinarias y de transmisión sexual (ETS); infecciones respiratorias; obesidad, entre otros, fueron descartados del estudio. Así mismo, las muestras de sangre de cordón umbilical procesadas fueron obtenidas de neonatos sanos que no presentaron procesos patológicos al nacer, con la finalidad de evitar desviaciones en los resultados.

La siguiente tabla corresponde al grupo de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea que participaron en este trabajo.

Neonatos por parto vaginal	Sexo	Capurro (SDG)	Temperatura (°C)	Peso (Kg)	Apgar
1	Masculino	41	37.5 °C	3.170 kg	8/9
2	Masculino	41	36.6 °C	2.685 kg	8/9
3	Femenino	37	36.4 °C	2.780 kg	9/9

**Tabla 6: Datos de los bebés nacidos por cesárea y parto.** Se muestran las principales características que se miden en los recién nacidos para evaluar su estado de salud.

Neonatos por cesárea	Sexo	Capurro (SDG)	Temperatura (°C)	Peso (Kg)	Apgar
1	Masculino	40	37.4 °C	2.965 kg	8/9
2	Femenino	37	36.4 °C	2.700 kg	9/9
3	Femenino	41	36.5 °C	2.850 kg	9/9



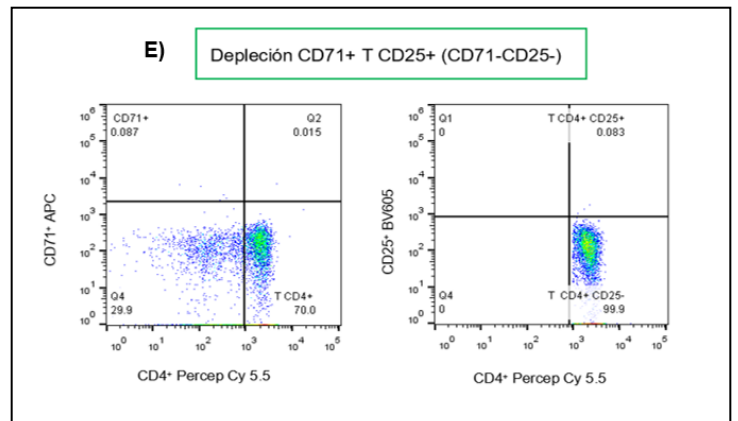
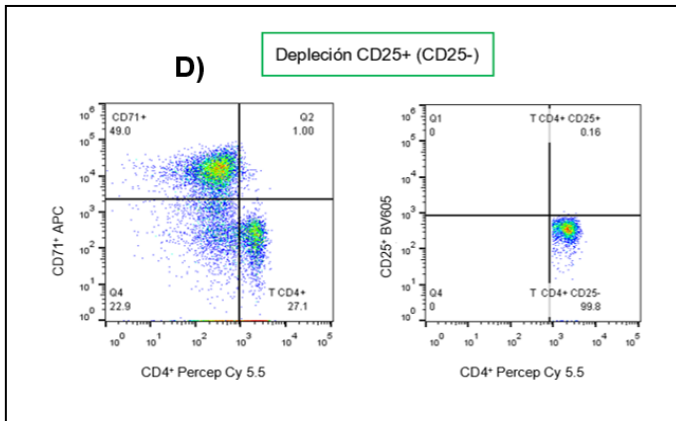
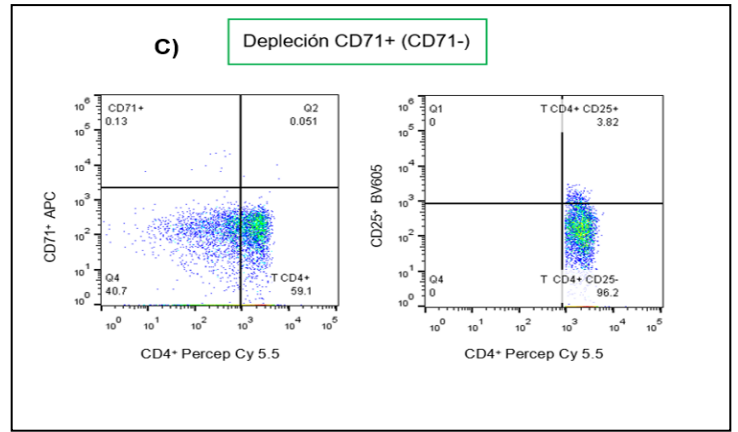
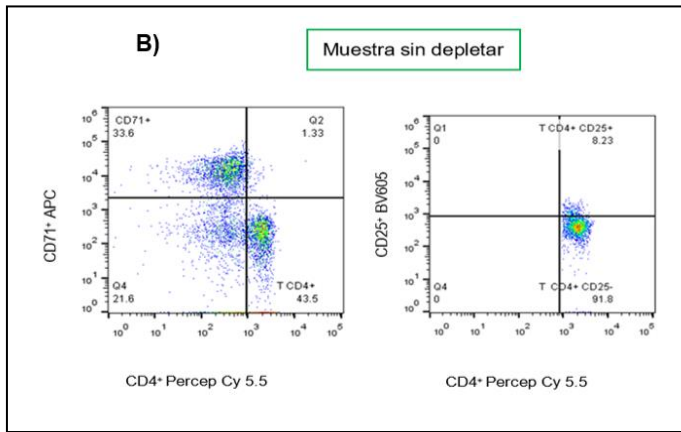
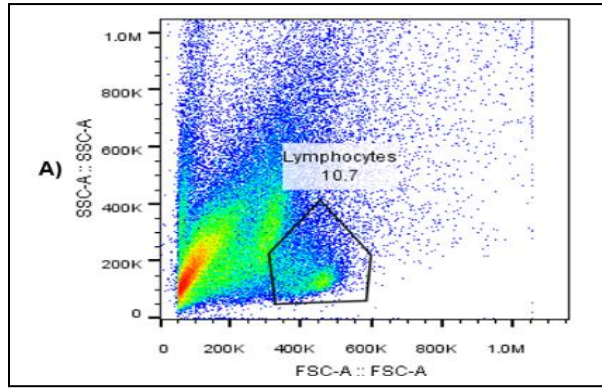
El estudio fue limitado a neonatos con edad gestacional completa. El capurro se refiere a las semanas de gestación (SDG) al nacer. En la tabla se puede observar el rango de 37 a 41 SDG que tuvieron los neonatos de parto vaginal y de 37 a 41 SDG los de cesárea. La temperatura rectal que presentaba el recién nacido era un indicativo patológico, aquellos con una temperatura arriba de 37.7 °C, fueron excluidos. Los neonatos de este estudio presentaron una temperatura alrededor de 36.5°C y 37.5°C.

El peso del neonato es otro foco patológico, aquellos con un peso arriba de 4kg, fueron descartados. El APGAR es un examen que se realiza al primer y quinto minuto después del nacimiento, y determina que tan bien tolero el neonato el nacimiento. Los valores oscilan de 0 a 10. De acuerdo a los valores registrados estuvieron entre 8 y 9, tanto en los neonatos de parto vaginal como de cesárea, por lo tanto, fueron tolerables al nacimiento.

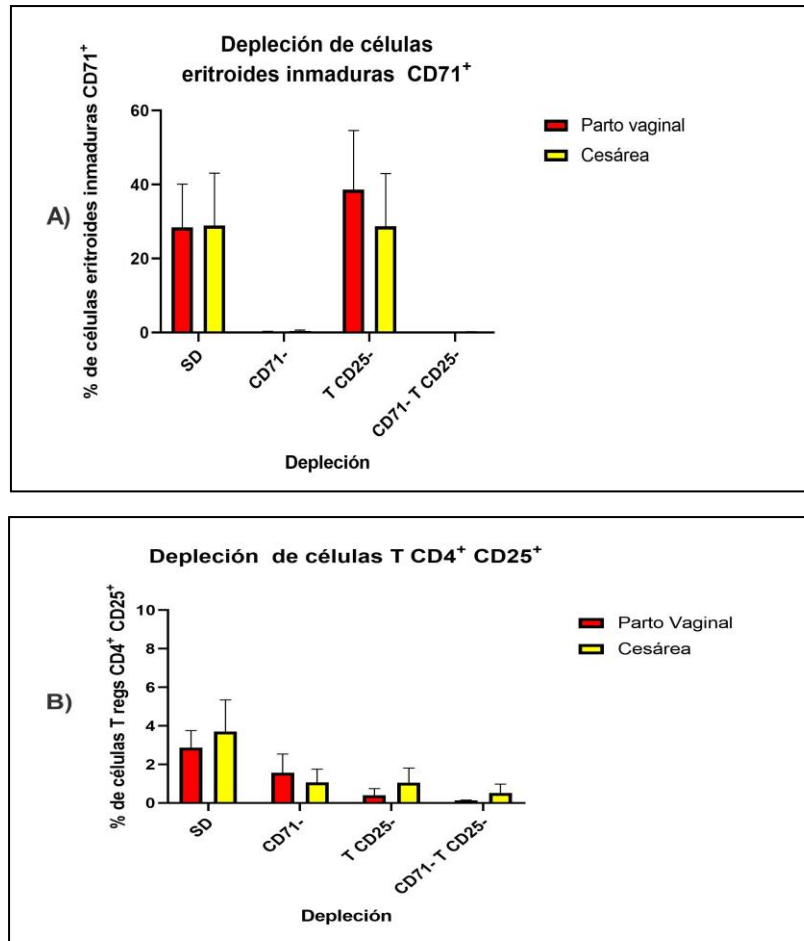
## **8.2 Evaluación de la depleción de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y de células eritroides CD71<sup>+</sup>**

La muestra de sangre de cordón umbilical proporciona una diversidad de tipos celulares, tales como los linfocitos (T, B y NK), monocitos y granulocitos, células eritroides, entre otros. Las células inmunosupresoras ya descritas forman parte de este conjunto celular, principalmente las células eritroides inmaduras CD71<sup>+</sup> que solo se encuentran en la etapa temprana del nacimiento. Para evaluar la ausencia o presencia de dichas células eritroides y T reguladoras en las depleciones hechas, realizamos el etiquetado fluorescente con anticuerpos dirigidos a los receptores CD71<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, respectivamente, que son considerados los marcadores moleculares. Esto nos permitió saber la pureza de cada muestra con su respectiva depleción, necesaria para saber el efecto de su actividad en la activación y proliferación de linfocitos T.

A continuación, se presenta la estrategia de selección de T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y de eritroides CD71<sup>+</sup> a partir de dichos marcadores (figura 8), en un análisis hecho en FlowJo v10.0.7. Así también se muestra en una gráfica de barras el porcentaje de las purezas de las muestras utilizadas (figura 9).



**Figura 8. Estrategia de selección de células eritroides CD71+ y T reguladoras CD4+ CD25+.** A) Selección por región o "gate" de células de tamaño correspondiente a los linfocitos y células eritroides inmaduras. Los Dot plot muestran la depleción de células eritroides CD71+ y células T CD4+ CD25+ de las evaluaciones realizadas, las cuales fueron cuatro: B) sin depleción como control. C) depleción de CD71- D) depleción de CD4-CD25- y E) depleción de CD71, CD4-CD25.



**Figura 9. Porcentaje de células eritroides CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en las cuatro condiciones evaluadas.** Las gráficas de barras representan el promedio y la desviación estándar de tres replicados de parto vaginal (rojo) y cesárea (amarillo). **A)** porcentaje de células eritroides CD71<sup>+</sup> presentes en cada depleción y sin depletar. **B)** porcentaje de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> presentes en cada depleción y sin depletar.

El panel A de la figura 9, podemos ver el porcentaje de células eritroides inmaduras CD71<sup>+</sup> antes y después de ser eliminadas. A nivel basal (control sin depletar) podemos observar que los neonatos nacidos por parto vaginal tienen una ligera disminución de estas células, en comparación con los neonatos de cesárea. Sin embargo, se tuvo una dispersión más alta en los de cesárea. Por otro lado, la depleción de las células CD71<sup>+</sup> en esa condición (sin CD71-) y en la condición doble depleción (sin CD71- T CD25-) se logró. Así también, se puede observar que la eliminación de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o reguladoras, indujo un aumento en el número de células eritroides CD71<sup>+</sup> de los neonatos por vía vaginal, mientras que la cantidad en los de cesárea se mantuvo.

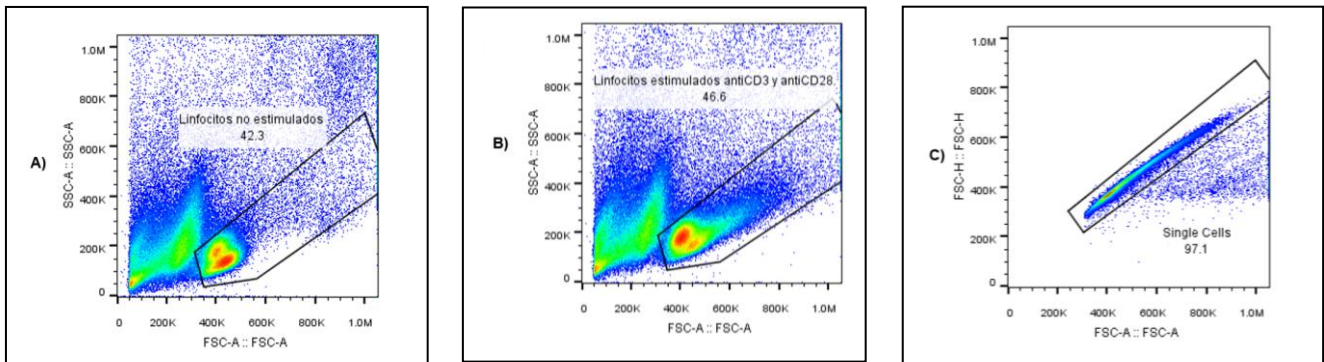
En el panel B de la figura 9, podemos ver el porcentaje de células T reguladoras o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de cada depleción.

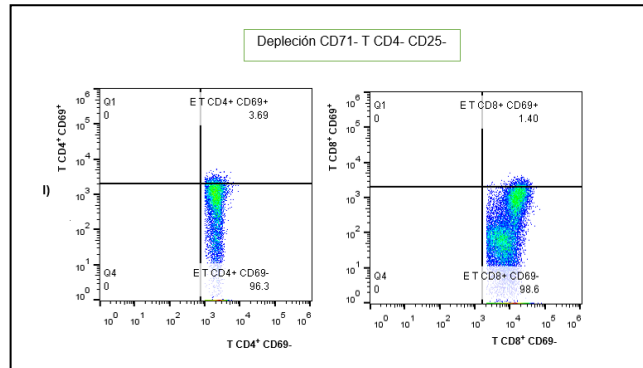
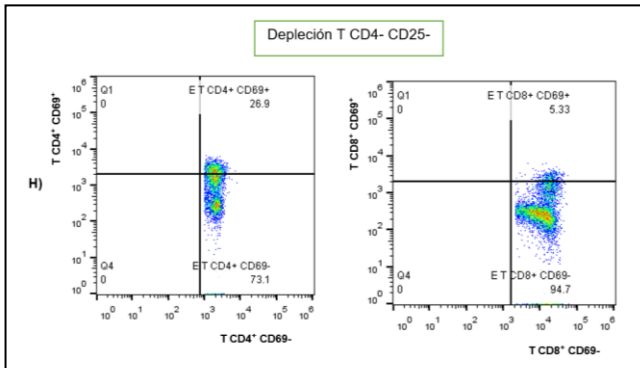
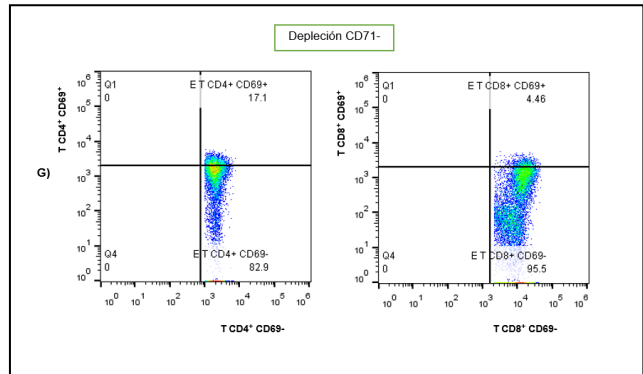
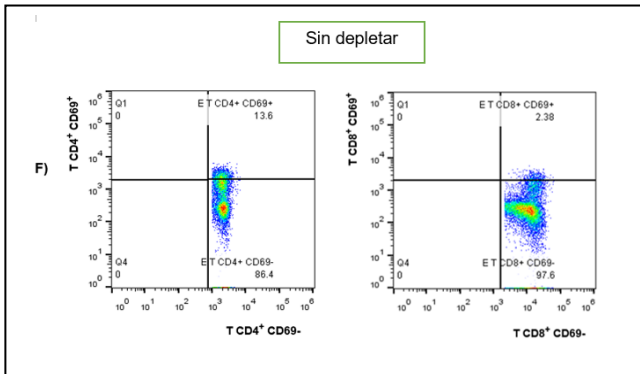
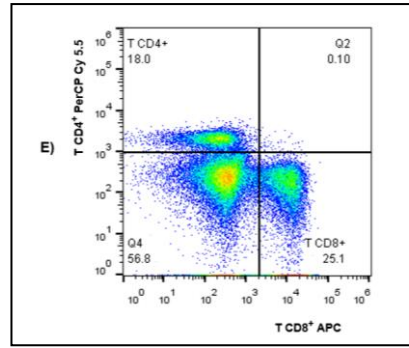
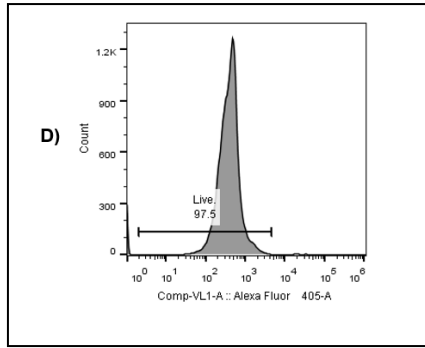
A nivel basal, la proporción de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en los neonatos es baja. Los neonatos de cesárea tenían una pequeña cantidad mayor de estas células, en comparación con los de parto vaginal. La eliminación de dichas células fue más de la mitad en esa condición (sin T CD25-). Además, cuando se eliminaron las células eritroides CD71<sup>+</sup>, las células T reguladoras disminuyeron en número. Esto mismo también sucedió en el doble-depleción (sin -CD71 -T CD25).

### 8.3 Efecto de la depleción celular de células supresoras sobre la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en células de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal

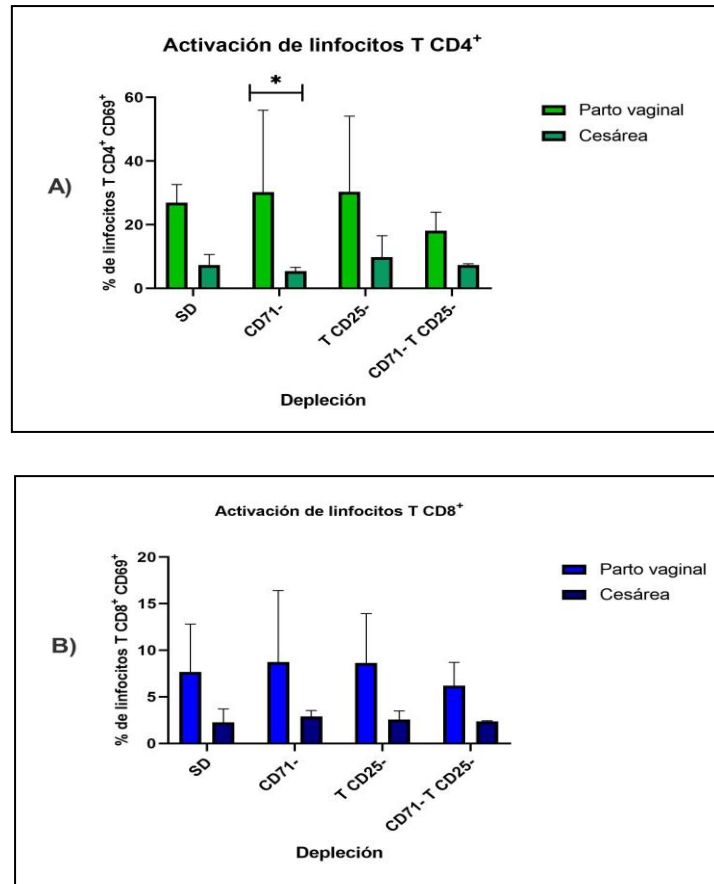
Para evaluar la activación celular, se midió la expresión de CD69, que es un marcador temprano de la activación. Nos interesamos en evaluar si las células eritroides CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> disminuyen o no, la activación de los linfocitos T.

Para evaluar esto, después de haber realizado los cuatro tratamientos, se estimularon las células durante 24 horas a los linfocitos T con anti-CD3/anti-CD28, que simulan in vitro la estimulación celular, y se midió la expresión de CD69 en las regiones de células T CD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup>. También, se tuvieron controles sin estimular que siguieron todo el procedimiento. Los linfocitos T activados se identificaron por ser CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (figura 10), lo que nos permitió graficar el porcentaje de estos como el porcentaje de cambio con respecto al control (figura 11).





**Figura 10. Estrategia de selección de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>.** **A)** Selección de la región de células de tamaño correspondiente a los linfocitos no estimulados. **B)** Selección de la región de células de tamaño correspondiente a los linfocitos estimulados. **C)** Selección de células únicas (singuletes). **D)** Selección de la población celular viva. **E)** Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> seleccionados a partir de la población viva. **F)** Linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> en la condición sin depletar. **G)** Linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> en la condición sin CD71- **H)** Linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> en la condición sin T CD4- CD25- y **I)** Linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> en la condición sin CD71- T CD4- CD25-.



**Figura 11. Comparación de la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en los dos modos de nacimiento.** Se grafica la media y desviación estándar entre el nacimiento por vía vaginal y por cesárea. El asterisco representa significancia. Ambas poblaciones celulares fueron estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28  
**A)** Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> en cada condición: sin depletar; sin CD71<sup>-</sup>; sin CD25<sup>-</sup> y sin CD71<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>. **B)** Porcentaje linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> en cada condición: sin depletar; sin CD71<sup>-</sup>; sin CD25<sup>-</sup> y sin CD71<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>.

En el panel A de la figura 11, podemos ver la cantidad de células T CD4<sup>+</sup> (en porcentaje), que se activaron después de la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. Estas células fueron identificadas por ser T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, tanto en las muestras de neonatos nacidos por parto vaginal como en las muestras de cesárea. En la condición sin depletar (SD) o basal, se tuvo una mayor activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> derivados de neonatos vía vaginal, mientras que esta activación no se vio con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de cesárea. En ausencia de células eritroides CD71<sup>+</sup> (CD71<sup>-</sup>), la cantidad de células T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> de parto natural, se mantiene con respecto al control, pero con una desviación estándar alta. Por el contrario, no se observa una mayor proporción de células T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> con respecto al control (SD)

en los linfocitos de cesárea. Similar a la condición sin CD71-, en la condición sin T regs (T CD25-) podemos ver una desviación alta y una cantidad de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> que no aumenta, ni tampoco disminuye en parto vaginal. Sin embargo, se observa una mayor proporción de células T CD4<sup>+</sup> activadas derivadas de neonatos por cesárea, con respecto al control en ésta condición. Además, en ausencia de las dos poblaciones (CD71-T CD25-), la activación de células T CD4<sup>+</sup> se redujo, ya que hay una menor cantidad de éstos en los dos modos de nacimiento, principalmente de parto vaginal.

Del mismo modo, en el panel B de la figura 11, se observa la activación de células T, pero de CD8<sup>+</sup>, después de haber sido estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28. Las cuatro condiciones tuvieron un efecto similar en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de neonatos por parto vaginal, no se observa una mayor activación de éstos con respecto al control, y también, con respecto a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de este mismo modo de nacimiento (Fig. 11 panel A). Se puede señalar que, la ausencia de células eritroides CD71<sup>+</sup> y T CD25<sup>+</sup>, genera una ligera disminución en la activación de las células T CD8<sup>+</sup> de neonatos nacidos de parto natural (no estadísticamente significativa). Sin embargo, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de neonatos de cesárea no presentaron cambios en la activación con ninguna de las depleciones. La cantidad de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> en general fue baja.

En relación a esto último, observamos que la activación de los linfocitos T derivados de neonatos por cesárea no fue favorecida por la presencia o ausencia de células supresoras. Debido a que, hay una menor proporción de T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, a excepción de la condición sin T CD25, para el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que no se repite para linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

#### **8.4 Efecto de la depleción celular en la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> respecto al modo de nacimiento**

Anteriormente describimos el proceso de expansión clonal de los linfocitos T, que corresponde a una fase determinante para la eliminación del antígeno. Debido a que, bajo la estimulación antigénica, los linfocitos T crecen y se dividen en múltiples clonas capaces de potenciar distintos mecanismos dirigidos hacia éste. Sin embargo, este proceso puede ser detenido por células supresoras.

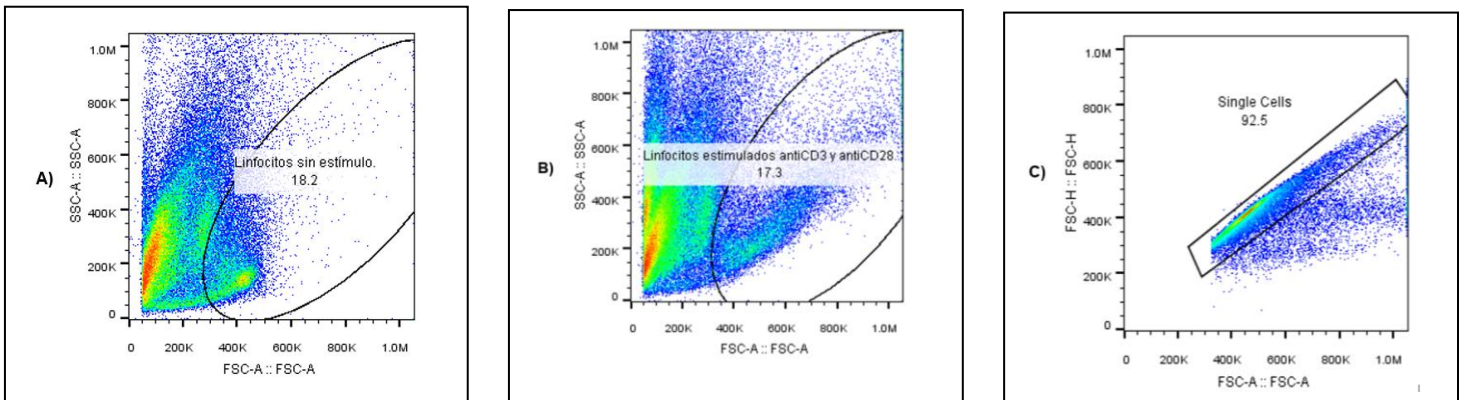
Para evaluar esto, se realizó un ensayo de proliferación de los linfocitos neonatales con la medición de fluorescencia de la Carboxifluoresceína (CFSE). Dicha molécula nos permite

evaluar la división celular, debido a que al entrar a las células, forma uniones covalentes con grupos aminos, que le impiden salir de la célula y en cada división celular se va diluyendo, permitiéndonos medir cada división celular.

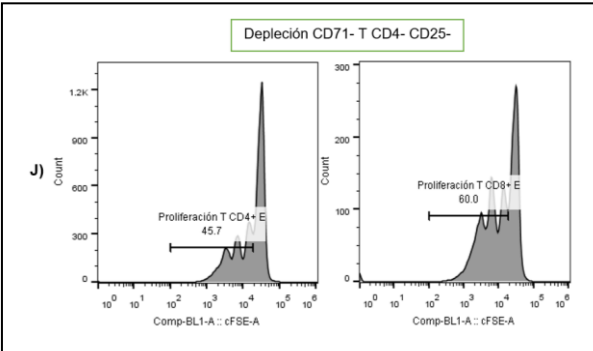
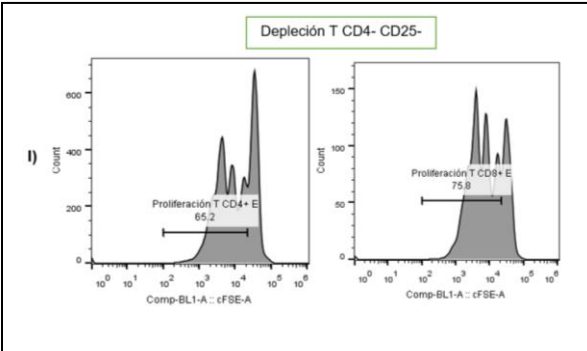
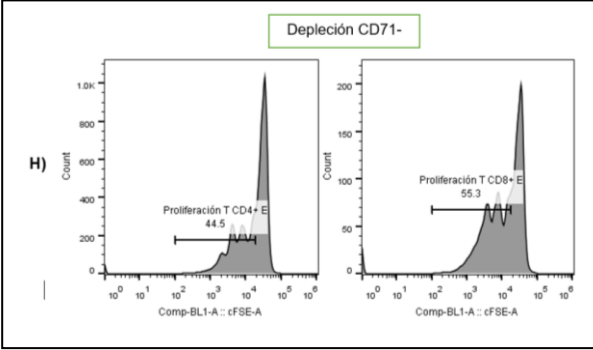
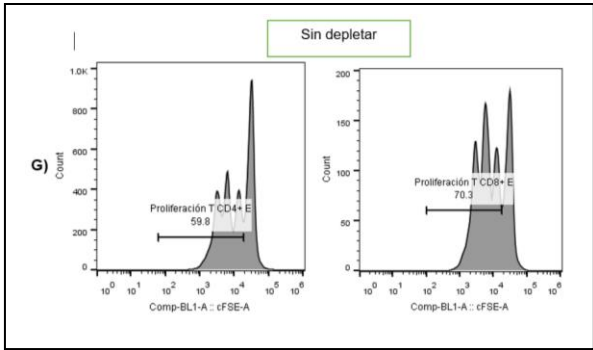
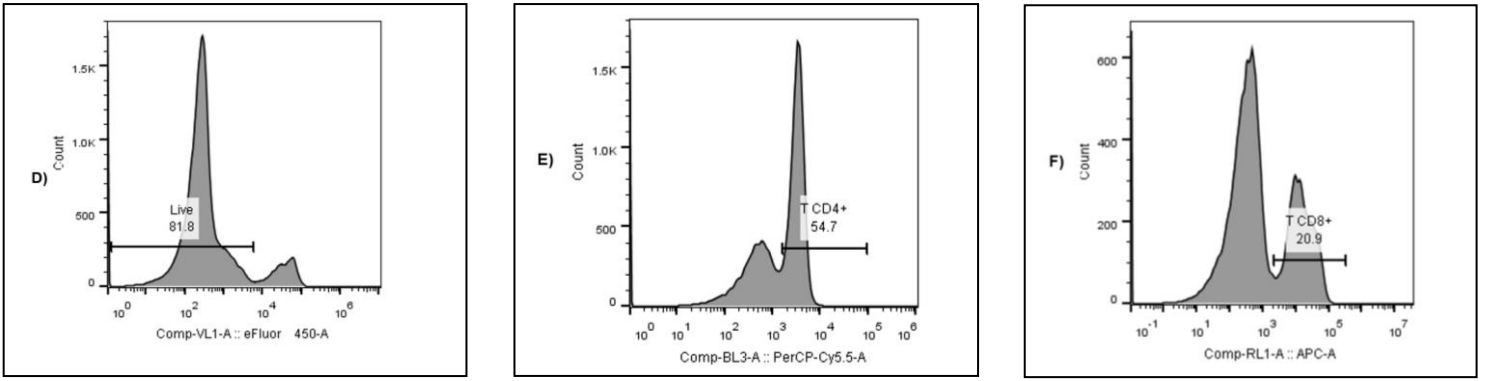
Después de eliminar o no las células supresoras, estimulamos a las células durante 96 horas a los linfocitos T con anti-CD3/anti-CD28. Así también, se tuvieron controles sin estimular. La determinación bajo que condición de las cuatro evaluaciones induce una mayor o menor proliferación, requirió identificar a la población de linfocitos tanto CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por sus marcadores moleculares e identificar a las células que diluyeron la carboxifluoresceína (figura 13). De estas últimas células, solo eran aquellas que proliferaron a partir de una primera generación (G0). De este modo, se seleccionaron por un gate restrictivo que dejará fuera a las células de la G0, las cuales son identificadas por tener la mayor intensidad de fluorescencia (figura 13, G-J). Finalmente, se calculó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la región seleccionada y se dividió entre el número de células de esa misma región. El valor resultante de la IMF fue graficado (figura 14).

Valores altos de fluoresceína, indicaban una menor proliferación de células T en esa condición, mientras que valores bajos correspondían a una alta proliferación.

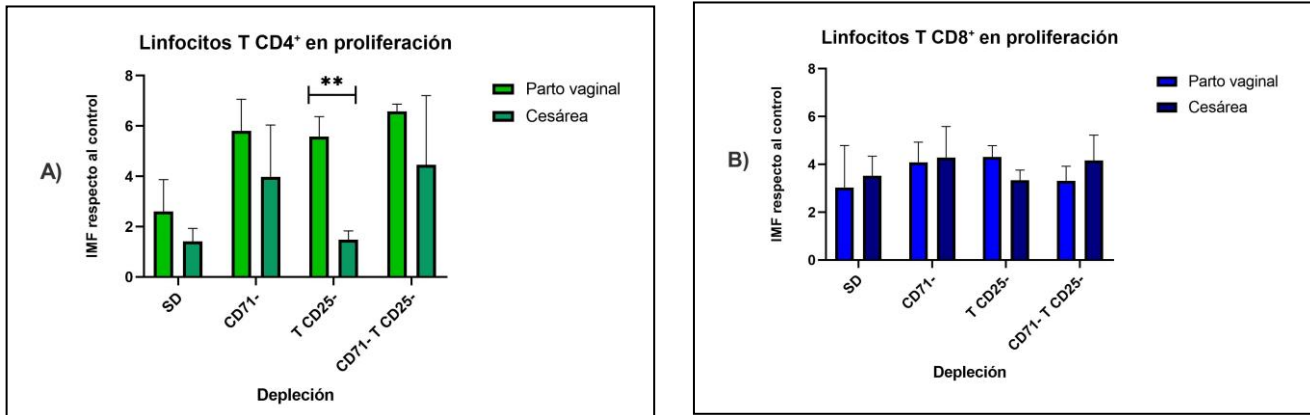
A continuación, se presenta la estrategia de selección de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que proliferaron y diluyeron la carboxifluoresceína, en un análisis hecho en FlowJo v10.0.7 (figura 13).







**Figura 13. Estrategia de selección de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> que proliferaron.** **A)** Selección de la región de células de tamaño correspondiente a los linfocitos no estimulados. **B)** Selección de la región de células de tamaño correspondiente a los linfocitos estimulados. **C)** Selección de células únicas (singuletes). **D)** Selección de la población celular viva. **E)** y **F)** Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> seleccionados a partir de la población viva. **G)** Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> proliferantes en la condición sin depletar. **H)** Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> proliferantes en la condición sin CD71- **I)** Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> proliferantes en la condición sin T CD4- CD25- y **J)** Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> proliferantes en la condición sin CD71- T CD4- CD25-.



**Figura 14. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> que diluyeron la Carboxifluoresceína en ausencia o presencia de eritroides CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>.** Se grafica la media y desviación estándar entre el nacimiento por vía vaginal y por cesárea. El asterisco representa significancia. **A)** IMF de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> proliferantes de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea en las cuatro condiciones evaluadas. **B)** IMF de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea en las cuatro condiciones evaluadas.

En la figura 14 panel A, se muestra la IMF de aquellos linfocitos T CD4<sup>+</sup> que diluyeron el CFSE por entrar a una fase de expansión clonal, luego de la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. Se puede observar que en presencia de células eritroides CD71<sup>+</sup> y T regs (SD), el valor de la IMF es más bajo que en las demás condiciones. En otras palabras, hubo una mayor proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en presencia de células supresoras. Este resultado fue similar en las células de ambos modos de nacimiento. La depleción de células eritroides CD71<sup>+</sup>, no tuvo un efecto positivo en la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>, el valor de la IMF fue más alto respecto al control para ambos modos de nacimiento, indicando un menor número de células que diluyeron el CFSE o proliferaron. Sin embargo, en ausencia de T reguladoras (T CD25<sup>-</sup>), se tuvo una mayor proliferación en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> derivados de neonatos nacidos por cesárea. El valor de IMF fue casi igual que respecto al control (SD). Por el contrario, en esta misma condición (T CD25<sup>-</sup>), los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de parto vaginal no proliferaron más.

Asimismo, en la última condición (sin CD71<sup>-</sup> T CD25<sup>-</sup>), tampoco hubo cambios significativos en IMF mayores al control (SD). Este patrón se vio en las células T CD4<sup>+</sup> tanto de parto vaginal como de cesárea.

Del mismo modo, la figura 14 (B), se muestra la IMF de aquellos linfocitos T CD8<sup>+</sup> que diluyeron el CFSE al proliferar. Las cuatro evaluaciones presentan un valor de intensidad

de fluorescencia parecido al control (SD), siendo el valor de la condición sin depletar ligeramente más bajo que las demás aunque no estadísticamente significativo. Esto indica, que en presencia de células supresoras, no aumentó la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Esto se observa tanto en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de vía vaginal y de cesárea. Como ya fue mencionado, el valor de IMF no fue tan diferente en cada depleción. Mostrando que no hay un efecto en la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en ausencia o presencia de células supresoras.

## 9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, evaluamos la activación y proliferación de los linfocitos T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, circulantes de la sangre del cordón umbilical, obtenida de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea.

El objetivo de la evaluación fue conocer el efecto regulatorio con la depleción de células eritroides inmaduras CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, que en la etapa temprana se encuentran presentes y mantienen la tolerancia inmunológica de los recién nacidos. Las funciones supresoras de estas células, actúan sobre las fases de la respuesta inmune adaptativa, incluyendo la activación y expansión clonal de los linfocitos T.

Sin embargo, también existen algunas características ya reportadas de las células neonatales, tales como: respuestas inmunes bajas en comparación con adultos; respuestas tolerables o lumbral de activación alto. Estas características intrínsecas de las células neonatales, podrían o no, establecer un ambiente inmunomodulador independiente de células supresoras. Así también, tanto el ambiente inmunomodulador como las características intrínsecas de las células no son mutuamente excluyentes.

En este estudio, para observar un efecto de una mayor o menor activación y proliferación de los linfocitos T, en ausencia o presencia de las células eritroides inmaduras CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, se lograron purificar y cultivar células mononucleadas de sangre de cordón umbilical. Se ajustaron las proporciones de CBMCS suficientes para hacer las cuatro evaluaciones y se lograron depletar a las células en cada uno de los casos: 1. Sin depleción; 2. Sin CD71<sup>-</sup>; 3. Sin CD4<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> y 4. Sin CD71<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>. Esto nos permitió poder llevar a cabo los experimentos de activación y proliferación. Finalmente, se lograron establecer tres estrategias distintas de análisis por citometría de flujo.

Con la primera estrategia identificamos a las células eritroides inmaduras CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en cada depleción. De acuerdo a la literatura, estas células comienzan a generarse aproximadamente a las 13 semanas de gestación y alcanzan un mayor número en el segundo trimestre del embarazo, permitiendo la tolerancia materno-fetal [62]. No es de extrañarse que el porcentaje de células eritroides CD71<sup>+</sup> a nivel basal (en la condición sin depletar) estuviera alto en los resultados que obtuvimos. Pues la producción de éstas y de precursores del linaje eritroide aumentan durante el embarazo

para cubrir la demanda de suministro de sangre por parte de la madre y el feto [63]. Además, la eritropoyesis extramedular (EE), consiste en un proceso celular donde se generan eritrocitos fuera de los compartimentos de la médula ósea. Dicho proceso puede ser inducido por niveles altos de la hormona eritropoyetina. Así también, por hormonas de estrés. La producción de estas dos clases de hormonas es normal en el embarazo, lo que podría explicar el alto número de células eritroides CD71<sup>+</sup> en la sangre de cordón umbilical [64]. En caso contrario, la proporción de células T regs es mucho menor en comparación con las eritroides CD71<sup>+</sup>. No obstante, esto no determina que tengan una menor participación supresora sobre los linfocitos T.

La segunda estrategia del análisis por citometría, nos permitió medir el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> neonatales, que se activaron después de la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28. Esta evaluación se logró hacer en linfocitos T de neonatos nacido por parto vaginal y cesárea.

Los resultados obtenidos, refutaron la hipótesis establecida de este estudio. Pues afirmábamos que la eliminación de células eritroides inmaduras CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> resultaría en una mejor activación de las células T. Así también, considerábamos que las células supresoras de neonatos nacidos por cesárea, podrían estar desreguladas y tener una menor función supresora. Al decir esto último, esperábamos un mayor porcentaje de linfocitos activados en los neonatos de cesárea. Sin embargo, en las condiciones que hicimos estos experimentos, la depleción de células supresoras no permitió una mayor activación en las células de cesárea y tampoco en las células de parto vaginal. En general, observamos una menor activación de las células de neonatos nacidos por cesárea. Estos resultados son atípicos en contraste con otros estudios ya realizados en el laboratorio (datos no publicados) y por otros investigadores, ya que se ha visto que las células provenientes de neonatos nacidos por cesárea, tienen un umbral de activación bajo en comparación con las células derivadas de neonatos que nacieron vía vaginal [5]. Así también, se ha visto que son más reactivas y responsivas en comparación con las células del otro modo de nacimiento [6]. En relación a esto, posiblemente no observamos este mismo comportamiento que en el de los demás estudios, porque las células de neonatos por cesárea, pudieron haber tenido una activación parcial durante el proceso de manipulación. Al ser células más reactivas, la incubación con los anticuerpos de purificación y perlas magnéticas, en 1 mL de medio a 4 °C por 3 horas, fue una condición estresante, que pudiera haber provocado una respuesta anticipada a nuestra estimulación con anti-

CD3 y anti-CD28. Sin embargo, por falta de señales coestimuladoras, las células de neonatos por cesárea, pudieran haber entrado en un estado de anergia. Lo que impidió después que fueran activadas con nuestro estímulo.

La última estrategia del análisis por citometría de flujo, nos permitió medir aquellas células T en proceso de expansión clonal o proliferación homeostática. Ambos procesos celulares son esenciales para montar una respuesta inmunitaria, principalmente adquirida. Así también, se encuentran altamente regulados y pueden ser detenidos por células supresoras.

Esto lo logramos calculando el MIF de linfocitos T que diluyeron la Carboxifluoresceína. En un principio teníamos planeado contar el número de generaciones celulares que surgieron a partir de la primera generación (G0), lo que nos proporcionaba saber si los linfocitos T proliferaban más o menos en las condiciones con o sin células eritroides CD71<sup>+</sup> y T regs. Sin embargo, por dificultades de tinción del uso de CFSE, tuvimos que cambiar la estrategia. Así que, seleccionamos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> que proliferaron con un gate que empezará después del pico de intensidad de fluorescencia más alta del CFSE. De este modo, nos aseguramos de descartar a la G0. Posteriormente, calculamos el IMF de las células que estuvieron dentro de este gate. Por último el valor del IMF fue dividido por el número de células dentro de esta misma región. Este análisis también incluyó hacer la comparación entre los linfocitos T de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea.

En los resultados obtenidos pudimos darnos cuenta que, en presencia de células eritroides CD71<sup>+</sup> y T regs (condición sin depletar), se tuvo una mayor proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> derivados de neonatos nacidos por vía vaginal y por cesárea, aunque por la desviación estándar, el resultado no fue estadísticamente significativo. La eliminación de células eritroides CD71<sup>+</sup> no mostró un efecto positivo en la proliferación de éstos. Por el contrario, en la ausencia de células T reguladoras (sin T CD4-CD25<sup>-</sup>), los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonato nacidos por cesárea se dividieron más, pero esto no ocurrió con las células T CD4<sup>+</sup> de parto vaginal. Como ya hemos descrito antes, las células T reguladoras son importantes para el mantenimiento de la tolerancia. Su capacidad supresora directa (por contacto célula-célula) o indirecta (producción de citocinas proinflamatorias; expresión constitutiva del receptor de IL-2), interrumpen la proliferación de los linfocitos T [70]. Por lo tanto, el resultado pudiera ser válido. Por otro lado, observamos que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ambos modos de nacimiento, en ausencia de células supresoras, no proliferaron.

Asimismo, mientras que la presencia o ausencia de células supresoras, provoca un comportamiento distinto en la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>. En los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tanto de vía vaginal como de cesárea, no sucedió esto. No se observó proliferación de éstos. No obstante, los resultados no fueron estadísticamente significativos y hacen faltan más evaluaciones para poder determinar esto.

## 10. CONCLUSIÓN

Está claro que se necesitan más muestras para reducir la alta dispersión y poder hacer análisis estadísticos más concretos de los datos. De este modo podríamos conocer de manera clara el efecto regulatorio de las células eritroides CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> sobre la activación y proliferación de los linfocitos T neonatales. Asimismo, tenemos que reducir al máximo el tiempo de depleción celular y ajustar el protocolo para evitar el estrés celular durante este proceso y tener datos más confiables. Sin embargo, estos resultados sugerirían que las características intrínsecas de los linfocitos neonatales, más que el ambiente inmunosupresor son responsables de la baja respuesta de las células T neonatales. El ambiente inmunosupresor activo por células eritroides CD71<sup>+</sup> y T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, no fue muy importante en nuestras evaluaciones, al menos in vitro, in vivo podría ser diferente.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hernández-Acevedo Gerson, López-Portales Oscar, Gutiérrez-Reyna Darely, Cuevas-Fernández Erick, Kempis-Calanis Linda A., Labastida-Conde Rosario G., Aguilar-Luviano Oscar B., Ramírez-Pliego Oscar, Spicuglia Salvatore, Lino-Alfaro Bárbara, Chagolla-López Alicia, González de la Vara Luis E., Santana María Angélica. *Protein complexes associated with  $\beta$ -catenin differentially influence the differentiation profile of neonatal and adult CD8+ T cells.*-J-Cell-Physiol.234:18639-18652-2019.
- [2] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman & Shiv Pillai. Inmunología Celular y Molecular. 8º Ed. Sanunders-Elsevier (2018). *Propiedades y generalidades de las respuestas inmunitarias. Inmunología Celular y Molecular.*
- [3] Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. KUBY Inmunología. (2018). 8º Ed.-MACMILLAN.
- [4] Martínez, CJV (2022). *Evaluación de la Proliferación Homeostática, Ampliación Clonal y Activación en Linfocitos T CD4+ y CD8+ de neonatos de Término Nacidos por Cesárea y Parto Vaginal.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- [5] Baños, AC (2021). *Evaluación de la Expresión de Genes Asociados a Tolerancia en Linfocitos T CD8+ de Neonatos y Adultos Humanos.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- [6] Villanueva, JAS (2019). *Modulación de la activación de linfocitos T CD8+ de neonatos humanos por especies reactivas de oxígeno.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- [7] Nurieva, R. I., & Chung, Y. (2010). *Understanding the development and function of T follicular helper cells. Cellular & Molecular Immunology, 7(3), 190–197.* doi:10.1038/cmi.2010.24
- [8] Brandan, Nora Luponio, Alberto González, Juan José González Roibón, Nilda Klinzuk, Sofía. . *Linfocitos T.* <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/linfot.pdf>
- [9] Peña, J. (sf). *Receptor de Células T.* InmunoSalud. [https://www.inmunosalud.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=72&catid=41&Itemid=497](https://www.inmunosalud.net/index.php?option=com_content&view=article&id=72&catid=41&Itemid=497).
- [10] Pareja, EI (2008). *11. Maduración, Activación y Diferenciación de los Linfocitos T.* Curso de Inmunología General. [https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap\\_11.htm](https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_11.htm).
- [11] Cavanagh, M. (sin fecha). *T Cell Activation.* <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/activaci%C3%B3n-de-la-c%C3%A9lula-t#:~:text=Las%20mol%C3%A9culas%20de%20CD4%20y,en%20los%20%C3%B3rganos%20linfoides%20se>.
- [12] Vizcaíno., J. M. S. (2010). *Diferenciación de lo Propio, Especificidad y Memoria.* <http://apps.sanidadanimal.info/cursos/inmunologia/ca022.htm>.
- [13] Robled, G. B. V. (Ed.). (2012). *Linfocitos.* (Vol. 52). Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un096i.pdf>.
- [14] Gamboa, LSTD (2014). *Perinatal immunology.* Femenine, 8.
- [15] Torres, S. (2012). *Pregnancy.* Elsevier, 98–102.
- [17] Jordana Auad J. Cerutt Lonnie Cooper. Natalia Andrea Lozano. (2019). *Structure of the placenta and its impact on the transfer of maternal-fetal immunity: a review in domestic mammals.* Revista Methodo, 12. [https://doi.org/10.22529/me.2019.4\(2\)06](https://doi.org/10.22529/me.2019.4(2)06).
- [18] Angela P. Cada vid, J. E. O. (2015). *Inmunobiología de la reproducción: Inmunología de la relación materno-fetal.* Revista Colombiana de Obs, 43, 248–252.
- [19] Stephania Vázquez-Rodríguez, Patricia Bouchan-Valencia, Marco Antonio González-Jiménez, Lidia Yuriria Paredes-Vivas, Rocío Calixto-González, Arturo Cébulo-Vázquez. (2016). *Mecanismos de Tolerancia Inmunológica en el Embarazo.* Perinatol Reprod Hum, 25,-39 45.
- [20] Luz García Cruz. Juan Manuel Zaragoza Benítez., M. J. P. P. R. D. B. P. M. (2015). *El Sistema Inmune del Recién Nacido.* Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas. , 12, 7.

<https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2003/al032e.pdf>.

- [21] Malerba, M. C. (2017). *Uso de Calostro como Terapia Inmunológica en Recién Nacidos Prematuros*. *Enfermería Neonatal*, 25, 8.
- [22] Corteguera, R. R. (2015). *Valor Inmunológico de la Leche Materna*. *Revista Cubana de Pediatría*, 67. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75311995000200006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75311995000200006).
- [23] Víctor Guzmán MV, M.Sc, Martha Olivera-Angel1 MV, Dr.Sci.Agr. (2020). Capítulo 2. Calostrogénesis, Digestión y Absorción del Calostro. *La Lactancia Vista Desde Múltiples Enfoques. Primera Parte: Biología e Inmunología* (pp.-17–27).
- [24] Debock, I., & Flamand, V. (2014). *Unbalanced Neonatal CD4+ T Cell Immunity*. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00393.
- [25] Crofts, F., Miller, A. (2020). *Challenges for the Newborn Immune Response to Respiratory Virus Infection and Vaccination*. *Vaccines*
- [26] Elahi, S. (2014). New Insight into an Old Concept: Role of Immature Erythroid Cells in Immune Pathogenesis of Neonatal Infection. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00376
- [27] Pagel J., Härtel C. (2020). *Increased Regulatory T Cells Precede the Development of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants*. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.565257.
- [28] Rackaityte E., Halkias, J. (2020). *Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation*. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00588.
- [29] Hayakawa S., Ohno, Kobayashi, M. (2017). *Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period*. *Clinical & Experimental Immunology*, 190(2), 268–279. doi:10.1111/cei.13008.
- [30] Elahi S., Mashhour S. (2020). *Immunological consequences of extramedullary erythropoiesis: immunoregulatory functions of CD71+ erythroid cells*. *Haematologica*, haematol.2019.243063. doi:10.3324/haematol.2019.243063.
- [31] Elahi S., Oyegbami O. (2020). *CD71+ Erythroid Cells in Human Neonates Exhibit Immunosuppressive Properties and Compromise Immune Response Against Systemic infection in Neonatal Mice*. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.597433.
- [32] Tribe R. Kennedy, H. (2018). *Parturition and the perinatal period: can mode of delivery impact on the future health of the neonate?* *The Journal of Physiology*. doi:10.1113/jp275429.
- [33] Cho, Norman M. (2013). *Cesarean section and development of the immune system in the offspring*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(4), 249254. doi:10.1016/j.ajog.2012.08.009.
- [34] Liao S Huang J. (2017). *Caesarean Section is associated with reduced perinatal cytokine response, increased risk of bacterial colonization in the airway, and infantile wheezing*. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-07894-2.
- [35] Chen Q., Zhang J. (2021). *The impact of cesarean delivery on infant DNA methylation*. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 21(1). doi:10.1186/s12884-021-03748.
- [36] Kothiyal P., Hourigan, S. (2020). *Differences in maternal gene expression in Cesarean section delivery compared with vaginal delivery*. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-74989-8.
- [37] Laimighofer, M., Lickert, R., Fuerst, R., Theis, F. J., Winkler, C., Bonifacio, E., Krumsiek, J. (2019). *Common patterns of gene regulation associated with Cesarean section and the development of islet autoimmunity – indications of immune cell activation*. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-42750-5.
- [38] Developed, E., Group, IN., Mortality, C. & Estimation, M. *Child Mortality 2019*. (2019).
- [39] Subsistema de información sobre nacimientos (Sinac). *Secretaría de salud. Registro de cesáreas*. (2020).