



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“Evaluación de la expresión de genes diferencialmente expresados en linfocitos T CD4+ de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

PRESENTA:

PAULINA LÓPEZ VALENCIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CELULAR Y DE SISTEMAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.

ENERO, 2024.

**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN
LINFOCITOS T CD4⁺ DE NEONATOS NACIDOS POR
CESÁREA Y PARTO VAGINAL.”**

Miembros del comité tutorial:

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama (Presidente).

Laboratorio de Inmunología Viral
Facultad de Medicina UAEM

Dr. Iván Martínez Dunker Ramírez (Secretario).

Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular
Centro de Investigación en Dinámica Celular

Dra. María Angélica Santana Calderón (Vocal).

Laboratorio de Inmunología Celular y de Sistemas
Centro de Investigación en Dinámica Celular

Dr. Armando Hernández Mendoza (Suplente).

Laboratorio de Bioinformática y Genómica Evolutiva
Centro de Investigación en Dinámica Celular

Dr. Otoniel Rodríguez Jorge (Suplente).

Laboratorio de Inmunología Celular y de Sistemas
Centro de Investigación en Dinámica Celular.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades y personal de Servicios de Salud Morelos, de las unidades: Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, Hospital General de Cuernavaca, Hospital General de Temixco y la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación por las facilidades otorgadas para la realización de muestreo en campo. Esto se realizó mediante el Convenio de Colaboración SSM-UAEM DVA/0385/2022, con expediente 1372/1706.

A CONAHCYT y el Instituto Nacional de Perinatología por otorgarme una beca, a través del proyecto “Análisis de aprendizaje automático integrativo de datos clínicos, funcionales y ómicos para identificar biomarcadores tempranos de enfermedades neonatales: hacia una medicina de precisión para enterocolitis necrosante y sepsis” CF 2019/11632

A mis padres, quienes me han apoyado de manera incondicional durante toda mi vida, siempre dándome lo mejor posible e incluso sacrificando muchas cosas por el bienestar tanto mío como el de mi hermana. Les agradezco por su amor, cariño, comprensión y paciencia. Si pudiera pagarles en esta vida, no me alcanzaría ni en cien más.

A mis yayos Silvia y Jesús, mis abuelitos Enrique y Susana, que se han dedicado desde que nací a consentirme y protegerme, por inculcarme desde niña valores como el respeto, la honradez y la responsabilidad.

A mi hermana, por siempre sacarme una sonrisa, darme ánimos y alentarme a no rendirme. A mi familia y amistades, por su inquebrantable apoyo, cariño y motivación a lo largo de mi preparación académica.

A la Dra. Angélica Santana, por abrirme las puertas de su laboratorio, por apoyarme siempre con una sonrisa en la cara y con la mejor actitud. Sin usted y su buen corazón, nada de esto hubiera sido posible.

Al Dr. Otoniel Rodríguez por su apoyo y ser un excelente ejemplo a seguir. A mis compañeros del laboratorio Linda, Francisco, Yari y Jonathan, al técnico del laboratorio Biol. Óscar Ramírez por toda la ayuda y los consejos que me brindaron. Quiero extender un agradecimiento muy especial a Ale y Carlos por todo su apoyo en la parte experimental, por su disposición y paciencia.

RESUMEN

El sistema inmune de un recién nacido no es “defectuoso” o “inmaduro”, es más bien un sistema moldeado a las necesidades del nacimiento, producto del ambiente intrauterino en el cuál se desarrolló. Se caracteriza por ser inmunotolerante lo cual, en consecuencia, lo hace susceptible a infecciones generadas por virus y bacterias. El modo de nacimiento tiene influencia en el sistema inmune del bebé, ya que las condiciones fisiológicas que se experimentan en ambos modos de nacimiento, cesárea o parto, no son las mismas.

El transcriptoma de linfocitos T CD4⁺ neonatales mostró una expresión diferencial entre las células de neonatos nacidos por cesárea y las células de neonatos nacidos por parto vaginal. Entre estas diferencias, se encontró que entre los genes que se encuentran sobreexpresados en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, hay genes relacionados a la función inmune, mientras que entre los que se encuentran sobreexpresados en neonatos nacidos por cesárea, hay genes relacionados al ciclo celular, adhesión y motilidad celular. En este trabajo evaluamos la expresión de una selección de estos genes en condición basal y en presencia de un estímulo que simula el encuentro de la célula con un antígeno (anti-CD3/CD28).

Se pudieron evaluar seis genes en linfocitos T CD4⁺ de neonatos, en tres muestras de neonatos nacidos por parto vaginal y tres nacidos por cesárea. Se observaron diferencias en la expresión de los genes ICAM1, CD40, RAPGEF6, KLF9, NOTCH2NLC y TNFRSF4, aunque por el número de muestras no se alcanzó en todos ellos significancia estadística. También se observaron cambios en la expresión de los genes en función de su estimulación, en algunos de ellos, se incrementó su expresión en ambos tipos celulares (CD40, TNFRSF4 y RAPGEF6) y en los genes ICAM1 y KLF9 sólo hubo un aumento en su expresión después de la estimulación en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal. Un hallazgo interesante fue que el gen NOTCH2NLC disminuyó su expresión en respuesta al estímulo en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea y parto. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el modo de nacimiento sí tiene un impacto en la expresión génica, tanto a nivel basal, como en respuesta a la estimulación.

Introducción

Sistema inmune

El sistema inmune es un conjunto de componentes celulares y químicos que proporcionan las defensas necesarias para proteger al organismo de sustancias extrañas, tales como agentes infecciosos o células tumorales¹. Esta protección es a través de la respuesta inmune, donde las células que conforman el sistema inmune responden de manera coordinada y colectiva a sustancias extrañas (infecciosas o no infecciosas) y productos de células propias dañadas o malignas (tumores). Sin embargo, en algunas patologías se desencadenan respuestas a células propias, estas respuestas son denominadas respuestas autoinmunes o a componentes no nocivos del ambiente, en respuestas alérgicas. La inmunología es la ciencia que estudia las respuestas inmunes en el marco de los eventos celulares y moleculares que ocurren en el organismo ante el encuentro de moléculas extrañas.

El sistema inmune se divide esencialmente en 2 líneas de defensa: inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa ante el primer encuentro con patógenos, donde rápidamente detecta y elimina una gran variedad de patógenos, a través de los patrones moleculares específicos de éstos. Sin embargo, el reconocimiento de estos patrones moleculares no es específico a un microorganismo, aunque se ha reportado una memoria epigenética de algunas células del sistema innato³, no hay células de memoria específicas. Entre los componentes moleculares del sistema inmune innato, están las opsoninas, como algunas lectinas, anticuerpos naturales y algunas moléculas de complemento. Entre los componentes celulares, se encuentran las células fagocíticas, las células NKs (*natural killer*), los granulocitos, así como las células cebadas, eosinófilos y basófilos, y las células dendríticas, que hacen el puente con la inmunidad adaptativa. Cabe mencionar que, la respuesta inmune

innata se efectúa dentro de las primeras horas de la infección². En esta tesis, nos enfocamos a un tipo celular de la inmunidad adaptativa, por lo que describiré más ampliamente el sistema inmune adaptativo.

Sistema Inmune adaptativo

Cuando la inmunidad innata no logra erradicar una infección, entra en acción la inmunidad adaptativa, que se adapta a retos específicos y surge en la evolución a partir de vertebrados.

La respuesta inmune adaptativa es específica y diversa, ya que puede reconocer un número muy diverso de antígenos (alrededor de 10^7 clonas diferentes). De todo ese repertorio, se dividen únicamente las clonas que reconocen a un antígeno particular, mediante un proceso denominado selección clonal. Un antígeno introducido es reconocido específicamente por algunos linfocitos, activándolos y generando una respuesta inmunitaria^{2, 4}. Otra característica importante de la respuesta adaptativa es la memoria, la cual se debe a que cada exposición de un antígeno genera linfocitos de memoria frente a este antígeno. Estos son capaces de reconocer a ese mismo antígeno en una segunda exposición, generando una respuesta más rápida y potente.

Las células de la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos. Las poblaciones de células inmunes se pueden dividir en subpoblaciones en base a sus funciones y de acuerdo con su estado de diferenciación, maduración y activación. La respuesta inmune adaptativa es mediada por dos poblaciones celulares principales: linfocitos T y linfocitos B.¹ Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa se divide en celular y humoral, dependiendo si son las células las que eliminan a los antígenos o son anticuerpos. Los linfocitos T coordinan el tipo de respuesta inmune y, en el caso de los linfocitos T CD8⁺, son los efectores de las respuestas celulares inmunitarias. Se llaman linfocitos T porque maduran en el timo. En cuanto a los linfocitos B, son los responsables de la secreción de anticuerpos, que maduran en la médula ósea.⁵ Cabe mencionar que, en todas las respuestas adaptativas hay producción de anticuerpos y en la mayoría, la participación de los linfocitos T.

Los linfocitos T, después de su maduración en el timo, salen a la circulación y se dirigen a los órganos linfáticos periféricos secundarios para su encuentro con el antígeno, presentado por las células dendríticas. Si las células reconocen fuertemente a un antígeno, en un contexto de alarma inmunológica, pueden diferenciarse en linfocitos de memoria o efectores. Se consideran linfocitos vírgenes hasta su encuentro con un antígeno que reconozcan, y pueden vivir en circulación entre 7 y 9 años y autorrenovarse mediante proliferación homeostática⁶. Los linfocitos T, se dividen en dos grandes poblaciones, los linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺ y otras poblaciones minoritarias⁵, que no se considerarán aquí. El presente trabajo se centrará en linfocitos T CD4⁺ neonatales.

Linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ son las células de la inmunidad adaptativa que se encargan de coordinar este tipo de respuesta. Reconocen señales de las células presentadoras de antígeno (APC) y el ambiente de citocinas. Las citocinas son proteínas pequeñas, producidas por células de un tipo específico. Son importantes en la activación, diferenciación, quimiotaxis y proliferación de las células del sistema inmune³⁰. Una vez reconocidas las células presentadoras de antígeno y las citocinas se diferencian en linfocitos T efectores y de memoria. Los linfocitos T efectores pueden comunicarse con macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y linfocitos T CD8⁺ para organizar la respuesta adaptativa.

La diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ se da como resultado de la interacción del TCR y CD4, como co-receptor, con un antígeno asociado con el MHC clase II presentado por una APC y otras moléculas de superficie y solubles, que funcionan como co-estimuladores o inhibidores de la activación. Una interacción fuerte induce una cascada de señalización que lleva a la activación y posterior diferenciación de los linfocitos en diferentes fenotipos, como: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y Treg. El fenotipo de diferenciación depende del ambiente de citocinas presentes, así como la concentración de antígenos, el tipo de células APC y las moléculas co-

estimuladoras. Este conjunto de señales se adapta al tipo de patógenos y en algunas ocasiones a diversas enfermedades de carácter inmunológico⁵.

La diferenciación del fenotipo Th1 es inducida por las citocinas IL12 e IFN γ , y se caracteriza por expresar el factor transcripcional firma T-bet, que es el principal factor de transcripción que promueve la producción de interferón γ y reprime la diferenciación al fenotipo Th2 y Th17⁵. Este fenotipo está involucrado con la eliminación de patógenos intracelulares³⁶.

La diferenciación del fenotipo Th2 es inducida por IL4, que induce al factor de transcripción STAT6 que regula positivamente la expresión del factor de transcripción firma, GATA3, que a su vez inhibe la diferenciación al fenotipo Th1 al interactuar con T-bet^{5,6}. El fenotipo Th2 monta una respuesta inmune a parásitos extracelulares como los helmintos³⁶.

TGF- β en combinación con IL4 induce la diferenciación del fenotipo Th9, así como IRF4 que se une directamente al promotor de IL9, que se distingue por ser la citocina secretada por el fenotipo Th9⁵. Se ha asociado este fenotipo también para combatir parásitos³⁷.

La diferenciación al fenotipo Th17 está mediada por IL6, IL21, IL23 y TGF- β , así como el factor de transcripción firma ROR γ t. Esta diferenciación se da en un proceso de 3 etapas: diferenciación mediada por TGF- β , IL-1 β e IL6, amplificación por IL21 y estabilización por IL23⁶. Este fenotipo es responsable de inducir una respuesta inmune bacterias extracelulares y hongos³⁸.

El fenotipo Th22 ha sido recientemente identificado, éste secreta la citocina IL22 en grandes cantidades, es por eso que se le nombra a este fenotipo Th22, también secreta las citocinas: IL13, IL26 y TNF- α , y el factor de transcripción que induce esta diferenciación es AhR. Cabe mencionar que el fenotipo Th22 tiene un papel en combatir bacterias y promover la reparación de tejidos³⁵.

Por último, el fenotipo regulador (Treg), es inducido por la señalización de TGF- β en combinación con IL2, y están involucrados los factores de transcripción Smad2 y Smad3 que inducen a FOXP3 para la diferenciación a Treg. Este fenotipo se encarga del mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios y no propios³⁹.

Inmunidad neonatal

Los primeros meses de vida para un humano son cruciales para su supervivencia, ya que no cuentan con un sistema inmune totalmente preparado ante los patógenos del ambiente. Es por eso que es uno de los periodos más vulnerables de la vida, con una alta tasa de morbilidad y mortalidad^{7,10}. Según el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), en el 2021 se registraron 2.3 millones de muertes neonatales, es decir durante el primer mes de vida⁸.

El sistema inmune del recién nacido responde principalmente de manera innata y se protege por los anticuerpos que pasaron de la madre a través de la placenta y pasan a través de la leche materna⁷.

Los órganos linfoides de los neonato no están totalmente funcionales, por lo que son más vulnerables a un amplio espectro de enfermedades infecciosas y no infecciosas¹². El sistema inmune del recién nacido es producto del ambiente en el que se desarrolló durante la gestación. En el útero, el sistema inmune fetal debe desarrollar la capacidad de reconocer patógenos desconocidos para un encuentro futuro, mientras que se debe mantener tolerante a antígenos propios y maternos. Esto resulta en la inmunomodulación durante el embarazo y se extiende a los primeros días de vida⁴⁰. El sistema inmune neonatal se encuentra en un estado tolerogénico, responde principalmente de manera innata, lo que hace que el recién nacido sea más susceptible a infecciones por virus y bacterias.

En un principio, el estado tolerogénico neonatal era atribuido a la inmadurez y a la carencia de memoria inmunológica, sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que la inmunidad neonatal es caracterizada por ser dinámica, tolerante y altamente regulada, orquestada por componentes celulares y moleculares competentes¹².

Como se mencionó anteriormente, el presente trabajo se centrará en linfocitos T CD4⁺ neonatales, por lo que resulta importante explicar las características particulares que tienen estas células en los neonatos.

Linfocitos T CD4⁺ neonatales

En el recién nacido, la mayoría de los linfocitos T tiene un fenotipo virgen, de los cuales la mayoría son emigrantes recientes del timo RTEs (Recent Thymic Emigrants), por sus siglas en inglés. Estas son células que expresan CD31. A diferencia, los adultos, conforme envejecen, expresan una cantidad cada vez menor de células T CD31⁺ vírgenes.^{8,9} Los RTEs y las células T CD4⁺ vírgenes neonatales producen IL8 importante mediadora en la respuesta inmune innata, su producción en los linfocitos T neonatales tiene un papel proinflamatorio e inmunoprotector.⁶

La transición del nacimiento es un reto inmunológico muy importante, ya que implica el paso de un ambiente estéril al mundo exterior, que es un ambiente colonizado por patógenos y otros microbios. Esto hace que el sistema inmune del recién nacido se caracterice por ser tolerante, que pueda adaptarse a los estímulos sin que sean peligrosos o pongan en riesgo la vida del individuo. Los linfocitos T CD4⁺ son considerados inmunotolerantes en esta etapa, sin embargo, cuentan con algunas funciones protectoras. Los linfocitos T CD4⁺ neonatales, se caracterizan por una alta producción de IL8, una respuesta innata inflamatoria^{6,10} y un fenotipo predominante Th2 sobre el Th1.¹⁰⁻¹²

Estudios experimentales de células T CD4⁺ de sangre periférica y del cordón umbilical muestran una preferencia por diferenciarse hacia el fenotipo Th2, el cual responde secretando IL4, IL5 e IL13, y una menor producción de citocinas del fenotipo Th1 (IFN γ , y TNF α)^{10,12}. La prevalencia del fenotipo Th2 en neonatos parece estar relacionado con el nivel de metilación de los promotores de estos genes, donde en el loci de citocinas Th2 se encuentra hipometilado, favoreciendo la transcripción de estos genes¹³. Además, en las células de cordón umbilical hay una mayor metilación del DNA en el promotor del gen IFN γ , generando una deficiencia en la producción de esta citocina y en la respuesta citotóxica¹⁰. El que esté más presente el fenotipo Th2 ocasiona que los neonatos sean más susceptibles a infecciones y a virus^{10,12}, pues el fenotipo Th1 responde ante patógenos intracelulares.

Cabe mencionar que los linfocitos T citotóxicos neonatales son menos responsivos y tienen una sobreexpresión de genes relacionados al ciclo celular, con una alta tasa de proliferación homeostática¹⁴. Se ha demostrado que las funciones inmunes clásicas están disminuidas en linfocitos T CD4⁺ neonatales, en cambio presentan una sobreexpresión de genes relacionados al metabolismo glucolítico y al ciclo celular¹⁰. Además, los linfocitos T CD4⁺ neonatales muestran una mayor proliferación, tanto homeostática, como en respuesta al estímulo¹⁰. En resumen, los linfocitos T neonatales y fetales responden diferente a los linfocitos del adulto.

Las vías de señalización de TCR (CD4, CD3, TCR α , TCR β , LAT, LCK e ITK) se encuentran reguladas negativamente lo que hace que la respuesta al antígeno sea menor¹⁰. Otras vías de la inmunidad innata, como la de los TLRs se encuentra igual o incluso más activa, y pueden llevar a la activación de las vías de AP1 y NF κ B. Además, los linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, expresan péptidos antimicrobianos. Los genes regulados negativamente en los linfocitos T CD4⁺ neonatales son atribuidos a la inaccesibilidad a la cromatina, mientras que los que se encuentran sobreexpresados en adultos tienen una fuerte asociación con marcadores de cromatina abiertos como H3K4me3⁴². Por lo tanto, las diferencias en el acceso a la cromatina son determinantes para el nivel de la expresión génica en linfocitos T CD4⁺ neonatales⁴³.

Por otra parte, se ha demostrado que existe una relación entre la forma de nacimiento (parto vaginal o parto por cesárea) y la colonización del intestino con el desarrollo del sistema inmune y también en las características específicas de las células T CD4⁺ ¹⁶.

Nacimiento por cesárea y parto

En 2021, la Organización Mundial de la Salud comunicó un incremento de nacimientos por cesárea medicamente innecesarios. A nivel global, 1 de cada 5 nacimientos son por cesárea, representando el 21% de los nacimientos.

En Latinoamérica y el Caribe la tasa es de 4 de 10 nacimientos son partos por cesárea, representando el 43% de todos los nacimientos. Para el 2030 se espera

un aumento a un 54% de nacimientos por cesárea.¹⁷ En México, la tasa es mucho más alta, superando el 48% en el 2019²².

Las cesáreas son procedimientos críticos y necesarios cuando los nacimientos por parto vaginal pueden ser riesgosos, y cada institución médica debe asegurar su acceso a toda mujer que lo necesite. Sin embargo, no todas las cesáreas que se realizan son llevadas a cabo por razones médicas. Estos procedimientos quirúrgicos innecesarios pueden tener desventajas para la madre y el recién nacido¹⁷.

En países desarrollados, la muerte materna tiene una tasa baja, a diferencia de países de bajos recursos, en los cuales la muerte materna tiene un índice alto²¹. En México, según el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Notificación Inmediata de Muertes Maternas, durante el 2018 se registraron 710 defunciones⁵³.

La morbilidad materna severa aguda (SAMM, Severe Acute Maternal Morbidity) por sus siglas en inglés, la cuál está definida por la presencia de complicaciones como hemorragia, requerir histerectomía o transfusión sanguínea, ruptura uterina, complicaciones relacionadas con la anestesia, paro cardíaco, shock obstétrico, fallo renal agudo, infección durante el puerperio, ventilación asistida o intubación y hematomas; es notablemente mayor después de una cesárea que de un parto por vía vaginal²⁰. Es importante tener en cuenta que los nacimientos por parto vaginal igual conllevan riesgos tales como lesión vaginal, dolor abdominal y perineal durante el parto y 3 días posterior a éste, hemorragia postparto y shock obstétrico²⁰, sin embargo, el riesgo es menor en comparación de un nacimiento por cesárea.

Por otra parte, los efectos psicológicos no han sido ampliamente estudiados, sin embargo, se han reportado que en mujeres que han alumbrado por cesárea se encuentran menos satisfechas dentro de un periodo inmediato después del nacimiento en comparación con las mujeres que alumbraron por parto vaginal²³. Esto puede ser debido, en las cesáreas programadas, a la ausencia de la hormona oxitocina, que participa en la unión psicológica entre la madre y el recién nacido ²³⁻

Existen riesgos para la mujer en embarazos subsecuentes después de una cesárea, tales como riesgo de requerir histerectomía, placentación anormal, ruptura uterina, muerte fetal y nacimientos antes de término²⁴. Estos riesgos se incrementan si el siguiente embarazo es en un intervalo menor a 6 meses. Además, la prevalencia de la mortalidad y morbilidad materna es mayor después de un nacimiento por cesárea que por vía vaginal.

Como se mencionó anteriormente, la cesárea es un procedimiento quirúrgico que salva vidas cuando está medicamente indicado, sin embargo, puede tener consecuencias en el desarrollo del bebé. En cesáreas realizadas antes de las 39 semanas de embarazo se incrementa el riesgo de que el recién nacido padezca de alguna enfermedad del tipo respiratorio e hipoglicemia²⁵. Es un hecho que el neonato nacido por cesárea no está expuesto a las mismas condiciones fisiológicas que un neonato nacido por vía vaginal. Estas condiciones alteran la fisiología del bebé, trayendo consigo consecuencias a largo y corto plazo para su salud. Entre los riesgos a corto plazo en un nacimiento por cesárea se encuentran, alteración en el desarrollo del sistema inmune, alergias, asma y una reducción en la diversidad del microbioma intestinal²⁵. Además de estas patologías, también se han identificado otras más relacionadas al alumbramiento por cesárea que se han observado en la etapa adulta, éstas tienen características de síndrome metabólico tales como, adiposidad, incremento en la presión sanguínea, diabetes tipo 1, asma, incremento en la masa corporal, cambios en la función del hígado, problemas neurológicos y enfermedades gastrointestinales de tipo autoinmune²⁰.

Por otra parte, la carencia de exposición a la microbiota vaginal y anal durante el parto genera disbiosis intestinal en el neonato¹⁸.

En resumen, el modo de alumbramiento tiene un impacto sobre el neonato y su salud, ya sea por vía vaginal (espontáneo, inducido, instrumental o una combinación de éstos) o por cesárea (planeada o de emergencia), que afectan directamente sobre su desarrollo.

Se han hipotetizado diferentes mecanismos biológicos que buscan explicar el impacto del modo de parto. Entre estas, se encuentra la inadecuada transferencia

del microbioma materno al neonato durante el parto, ya que la evidencia existente explica que tiene un impacto directo sobre el desarrollo y diferenciación del sistema inmune del bebé^{7,16,20}, y en un futuro, haciéndolo susceptible a ciertas enfermedades.

Por otra parte, la exposición reducida a hormonas del estrés y fuerzas mecánicas, que sólo se presentan cuando hay trabajo de parto y no en cesárea programada, contribuyen al desarrollo del sistema inmune neonatal. Las hormonas del estrés se consideran importantes para el desarrollo del eje hipotálamo-pituitaria, maduración del sistema inmune, maduración de órganos y neurogénesis²⁰.

Por último, se han observado diferentes modificaciones epigenéticas. Durante la cesárea, el uso de oxitocina sintética y antibióticos tienen diferentes efectos sobre el proceso de remodelado del epigenoma neonatal trayendo consigo consecuencias para la salud del neonato a la larga. Se han observado un incremento en el patrón de metilación del DNA en células madre y leucocitos de recién nacidos por cesárea en comparación de nacidos por vía vaginal. Los efectos de estos cambios epigenéticos no son observados en primera instancia, sin embargo, pueden tener implicaciones en un futuro, donde la expresión genética en combinación con la exposición ambiental puede predisponer a padecer algunas enfermedades inflamatorias^{19,20,26,27}.

Antecedentes

La inmunidad adaptativa está definida por la diferenciación de linfocitos T vírgenes a células capaces de montar una respuesta, es decir, a células efectoras. Una vez que los linfocitos T se activan, se empiezan a producir más citocinas.

Los neonatos muestran un estado linfopénico al nacer, es decir, carecen de una cantidad suficiente de linfocitos, por lo que, se promueve la proliferación homeostática. Ésta se define por el aumento de número de células vírgenes, en compensación de la disminución de células sin presencia de estímulo ni diferenciación celular.

En la tesis de maestría de Ventura, C. 2022³¹, se evaluaron las diferencias en la activación y proliferación celular de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y por cesárea. Él evaluó la proliferación celular en presencia y ausencia de estímulo, a través del uso de citometría de flujo, usando el reactivo CFSE, que permite observar la proliferación celular. Se observó que los linfocitos T CD4⁺ de las células de neonatos nacidos por cesárea proliferaron más cuando fueron estimuladas con CD3/CD28, en comparación con las células de neonatos nacidos por parto, como se muestra en la imagen 1. El incremento de frecuencia celular debido a la proliferación de linfocitos T en presencia del estímulo CD3/CD28 en neonatos nacidos por cesárea sugeriría una menor ventana de tolerancia inmunológica en los neonatos nacidos por cesárea.

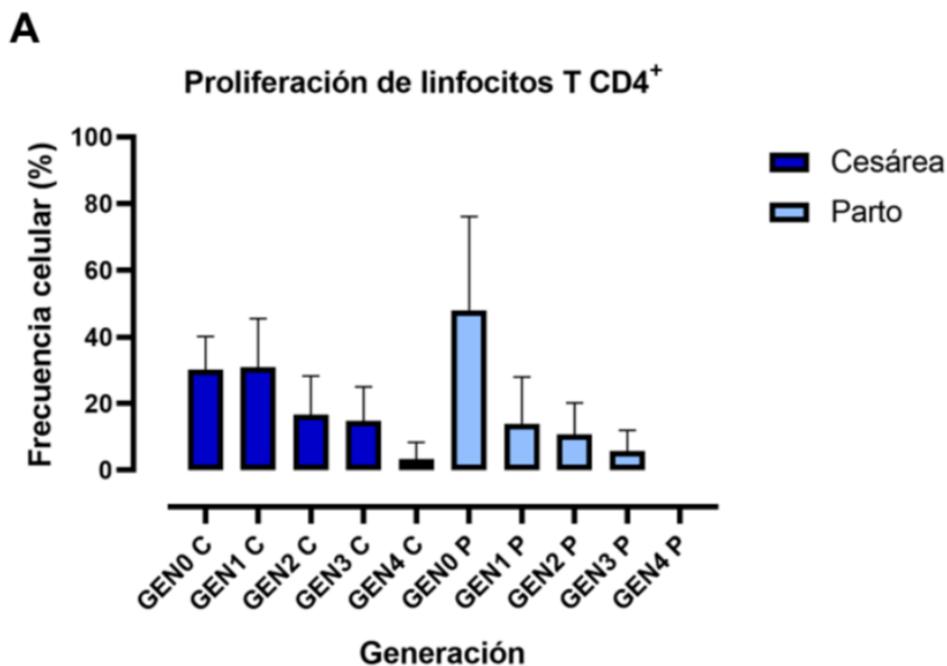


Figura 1. Proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados con CD3/CD28. A) Frecuencia celular de las generaciones de linfocitos medidas con CFSE. Tomado de Ventura, C. 2022³¹, tesis de maestría.

Por otra parte, en Kempis-Calanis³³ et al, se evaluó el perfil transcriptómico de células T CD4⁺ de adultos y neonatos nacidos por parto vaginal, demostrando que las células neonatales tienen un transcriptoma característico. Entre las

características de las células T CD4⁺ neonatales, están la sobreexpresión de genes relacionados a diversas vías metabólicas como es la vía de la glucólisis aeróbica, proliferación, inflamación innata, motilidad celular, funciones regulatorias y control de señalización celular, además de una sobreexpresión en factores de transcripción relacionados a la hiperproliferación. De 60,676 genes analizados en la base de datos Ensembl, un total de 1999 genes se encontraron diferencialmente expresados entre las células de neonatos y adultos. Así mismo, con el uso de la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), se identificaron siete vías de señalización, que engloban los genes diferencialmente expresados. En cambio, los genes sobreexpresados en adulto no están significativamente enriquecidos en ninguna vía de señalización.

Las vías de señalización enriquecidas en células neonatales son: i) desregulación transcripcional en cáncer ii) genes sobreexpresados en precursores de los linfocitos T inmaduros y hematopoyesis, iii) hiperproliferación, iv) neutrófilos y actividades antimicrobianas, v) señalización celular, vi, vii) vía de señalización *RAS*.

Los genes que se encuentran sobreexpresados en adulto están más involucrados en las funciones celulares, en mantener la estructura y estabilidad del genoma.

Estos resultados fueron confirmados por cambios en la expresión de algunas proteínas en condiciones basales, proliferación y cambios en la expresión de algunos genes después de la activación celular.

En la tesis doctoral de Kempis-Calanis³⁴ et al, se analizó el transcriptoma de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, de neonatos prematuros y a término nacidos por cesárea y por parto vaginal. Al comparar las firmas transcritómicas de linfocitos T en neonatos prematuros y término, nacidos por cesárea y parto vaginal, los resultados sugieren que los linfocitos T CD4⁺ sufren cambios mayores a nivel transcripcional debido a la vía de nacimiento (cesárea contra parto) que debido a la edad gestacional.

Al comparar los linfocitos T CD4⁺ de neonatos a término nacidos por cesárea y por parto vaginal, se muestra en un análisis por PCA que la expresión génica de células

de neonatos que nacieron por cesárea y parto vaginal claramente se encuentran separados y agrupados según el modo de nacimiento, indicando una expresión diferencial de entre estos genes. (Figura 2 panel A). Al evaluar la expresión diferencial de genes con un log fold change mayor 1 y un p value ajustado menor a 0.05, de los cuales se encontró un total de 600 genes diferencialmente expresados. De estos genes, 402 genes se encuentran sobreexpresados en las células de neonatos nacidos por parto vaginal y 198 en las células de neonatos nacidos por cesárea, como se muestra en el panel B.

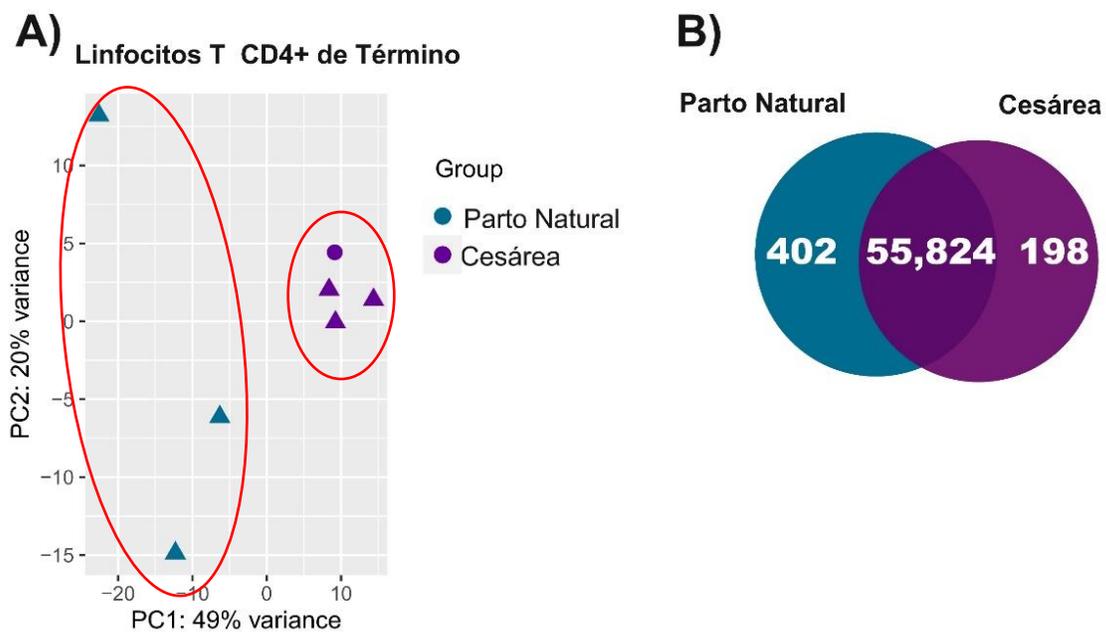


Figura 2. Comparación de linfocitos T CD4 de neonatos de término nacidos por cesárea y nacidos por parto vaginal a nivel basal. Tomado de Kempis-Calanis, tesis doctoral.

Ahora, al realizar la anotación funcional de los genes diferencialmente expresados según el tipo de nacimiento, se puede observar que los genes sobreexpresados en células provenientes de neonatos nacidos por parto vaginal, se encuentran agrupados en las vías de señalización de TNF, NF κ B, IL17, MAPK, moléculas de adhesión celular, entre otras. Mientras que los genes sobreexpresados en células

provenientes de nacimientos por cesárea, se encuentran agrupados en la vía de la transducción del gusto.

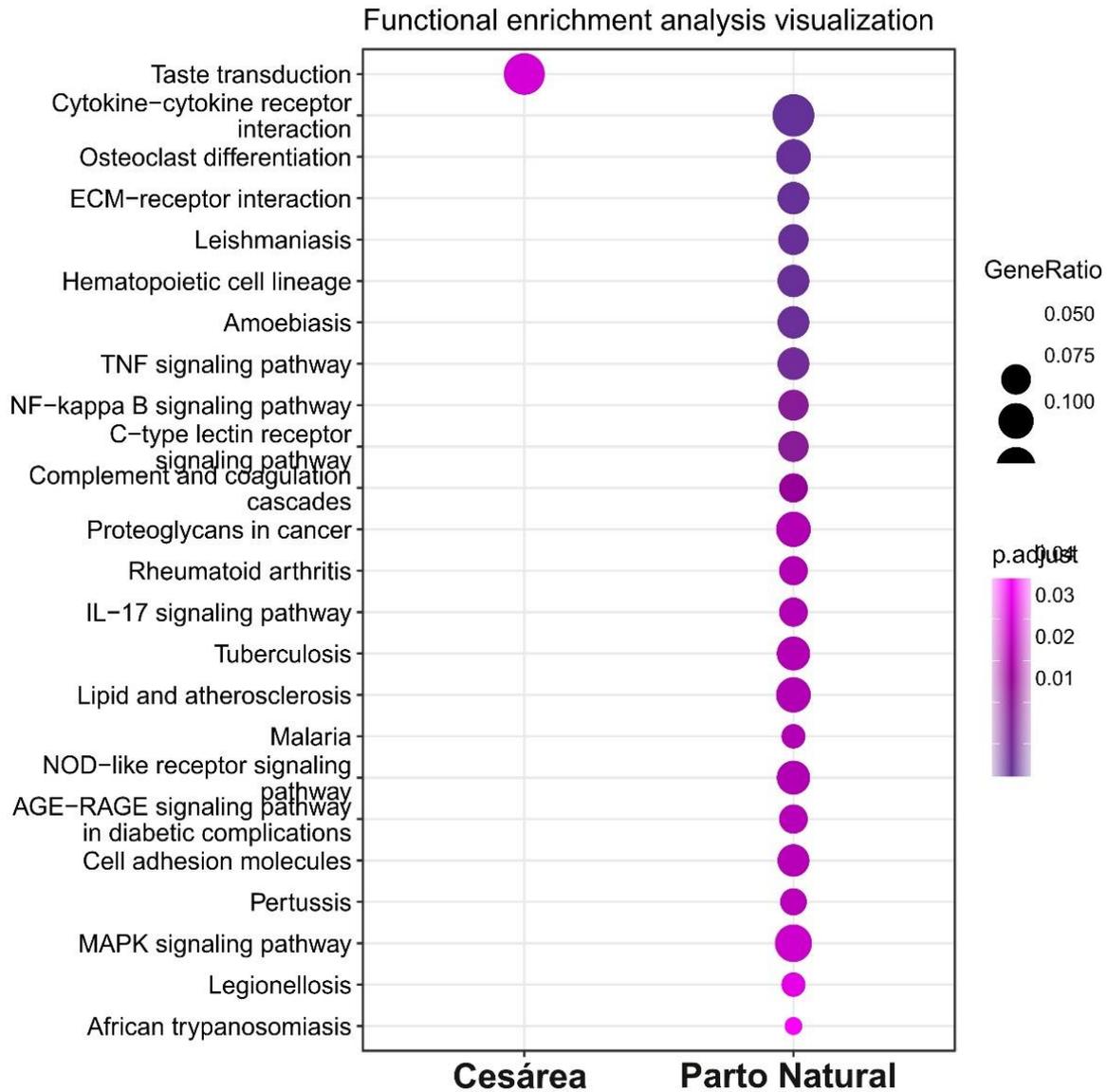


Figura 3. Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados según el tipo de nacimiento. Tomado de Kempis-Calanis, tesis doctoral.

A partir este análisis del transcriptoma se identificó una expresión diferencial de genes, de los cuales se seleccionaron los siguientes genes que están relacionados con división celular, adhesión y ciclo celular (ITGA11, KLF9, RAPGEF6, MCC y

NOTCH2NLC) encontrados sobreexpresados en las células de neonatos nacidos por cesárea, mientras que en los de parto vaginal se encuentran factores transcripcionales y receptores de membrana que favorecen la función inmune de los linfocitos T CD4⁺ (TBX21, CD40, ICAM1, TNFRSF4 y GFI1). El presente proyecto se centrará en evaluar su expresión a nivel basal y después de la estimulación de linfocitos T CD4⁺, como una aproximación a entender si las funciones de estos linfocitos están alteradas.

A continuación, listo brevemente los genes que propusimos evaluar:

ITGA11 codifica para una integrina alfa, une el tejido muscular a la matriz extracelular, participa en la unión de colágeno y en la actividad de su receptor⁴⁵.

KLF9 es un factor de transcripción que se une a los elementos de la caja GC localizados en el promotor. La unión de este factor a un solo elemento de la caja GC inhibe la expresión del mRNA, mientras que si se une de manera tándem a elementos repetidos de la caja GC activa la transcripción⁴⁵.

RAPGEF6 Permite varias funciones, incluida la actividad de unión a proteínas dependiente de GTP; la actividad del factor de intercambio de nucleótidos de guanilo; y la actividad de unión al ácido fosfatídico. Implicado en el ensamblaje de microvellosidades; regulación positiva de la actividad GTPasa; y localización de proteínas en la membrana plasmática. Se encuentra localizado en varios componentes celulares, incluyendo la membrana plasmática apical, el centrosoma y la vesícula endocítica⁴⁵.

MCC regula negativamente la progresión del ciclo celular, es un regulador de la vía de señalización de WNT, desacetila y reprime la vía de señalización de β -catenina⁴⁵.

NOTCH2NLC, permite la unión del ión de calcio, involucrado en la regulación positiva de la vía de señalización de NOTCH, la cual promueve la diferenciación neuronal⁴⁵.

GFI1 codifica para una proteína de dedos de zinc nuclear que funciona como un represor transcripcional, regula la diferenciación de neutrófilos, promueve la proliferación de los linfocitos y es requerido para el desarrollo de granulocitos⁴⁵.

TBX21 es miembro de una familia de genes que comparten un dominio de unión a DNA, el T-box. Estos genes codifican para factores de transcripción implicados en la regulación de procesos del desarrollo. Su expresión se correlaciona con la expresión de IFNG en el fenotipo Th1 y células NK, sugiriendo que tiene un rol en la diferenciación del fenotipo Th1 a partir de precursores de células Th⁴⁵.

CD40 este gen es miembro de la superfamilia de receptores TNF, codifica para una proteína que es un receptor de las células APC, es esencial en una gran variedad de respuestas inmunes e inflamatorias, como: desarrollo de los linfocitos B de memoria, formación del centro germinal y el intercambio de inmunoglobulinas dependiente de linfocitos T⁴⁵.

ICAM1 este gen codifica para una glicoproteína de membrana celular que se expresa en células del sistema inmune, tiene un papel de receptor de señalización y unión de complejos proteicos⁴⁵.

TNFRSF4 La proteína codificada por este gen es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Se ha demostrado que este receptor activa NFκB a través de su interacción con proteínas adaptadoras. Es un coestimulador implicado en la inmunidad de los linfocitos T⁴⁵.

En resumen, seleccionamos este grupo de genes sobre-expresados en células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea, ya que tienen una relevancia en el ciclo celular y la respuesta inmune durante la gestación. Hay que considerar que las células de neonatos nacidos por cesárea representan el estado que guarda el sistema inmune neonatal previo al nacimiento.

Entre ellos, elegimos genes que funcionan como reguladores de ciclo celular (**KLF9**, **MCC**), lo que se esperaría para mantener la tolerancia de los linfocitos en el útero. También genes que participan en la migración hacia la piel (**ITGA11** es un receptor del colágeno). Hay que considerar que durante este periodo hay colonización hacia la piel y las mucosas. Por otra parte, el gen **RAPGEF6** facilita la función de RAP1, que es un mediador importante en la activación de la afinidad de las integrinas, que promueve la unión entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno.

Finalmente, **NOTCH2NLC** es un regulador positivo de las señales de NOTCH que participa en la expresión de genes muy importantes en la diferenciación de las células T CD4⁺ hacia todos los fenotipos.

Por otra parte, en las células T CD4⁺ de los neonatos nacidos por parto natural, elegimos genes sobre-expresados que están más asociados con la respuesta inmune, entre ellos el gen del factor transcripcional firma de los linfocitos Th1, **T-bet (TBX21)**; **GFI1** que promueve la proliferación de los linfocitos; **ICAM1**, que participa en la unión entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T; y el co-receptor OX-40 (**TNFRSF4**), que participa en activación de los linfocitos T.

Sin embargo, los antecedentes que tenemos de la respuesta inmune de células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea en comparación con la de las células de neonatos nacidos por parto natural, es que las células de los neonatos nacidos por cesárea proliferan más y se activan más. Por lo tanto, proponemos que el nacimiento genera una activación parcial de los linfocitos T CD4⁺. Esto tendría como consecuencia, la expresión basal de genes relacionados con la respuesta inmune, pero también el aumento del umbral de activación de los linfocitos T CD4⁺.

Objetivos generales

Evaluar la expresión de genes diferencialmente expresados en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal en estado basal y tras la activación a través de CD3/CD28.

Objetivos particulares

1. Evaluar por RT-qPCR la expresión de genes seleccionados, que se encontraron sobreexpresados en el estudio de transcriptoma de células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea (ITGA11, KLF9, RAPGEF6, MCC y NOTCH2NLC), en estado basal y tras la activación a través de CD3/CD28.

2. Evaluar por RT-qPCR la expresión de genes seleccionados, que se encontraron sobreexpresados en células T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal (TBX21, CD40, ICAM1, TNFRSF4 y GFI1), en estado basal y tras la activación a través de CD3/CD28.

Hipótesis

Los genes que se encontraron diferencialmente expresados entre los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea o parto vaginal en el transcriptoma, también se encontrarán diferencialmente expresados al evaluarlos por RT-qPCR. Además, esperamos que la activación de las células T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea tendrá como consecuencia la inhibición de la expresión de los genes que regulan el ciclo celular (KLF9 y MCC) y la migración a la piel (ITGA11) y un incremento en la expresión de los genes relacionados con activación (RAPGEF6 y NOTCH2NLC). Mientras que en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto, se activará una expresión ligeramente mayor de sus genes característicos o ningún cambio.

Metodología

Obtención de las células

Se colectaron 10 muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos a término por parto vaginal (5) y por cesárea (5), que además gozaban de un buen estado de salud al momento del nacimiento al igual que la madre. Estas muestras se tomaron del cordón umbilical después del nacimiento del bebé y antes de la expulsión de la placenta en tubos falcón estériles que contienen anticoagulante. Para la colección de sangre de los neonatos nacidos por cesárea, se realizó una punción a la vena del cordón umbilical y en el caso de parto natural fue cuando el cordón umbilical fue cortado, sin necesidad de punción. Ambos procedimientos no suponen ningún riesgo para el recién nacido ni para la madre. Antes de realizar la

colección de la muestra, se le informó a la madre sobre el procedimiento y se pidió su consentimiento firmado.

Para la estandarización de las técnicas, se usaron células de sangre periférica de adulto.

Purificación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes

Posterior a su colección, la sangre fue procesada para obtener las células mononucleadas (CBMCs) a partir de la sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea. Esto se hace a través del uso de Ficoll, que es un polisacárido hidrofílico altamente ramificado, que genera un gradiente de densidad por centrifugación, separando por fases la muestra, entre esas fases se encuentra una capa blanca que contiene las células de interés. Se incubaron por 24h con medio RPMI para que las células adherentes se eliminen. Para el aislamiento de linfocitos T CD4⁺, se utilizó el kit RossetSep (StemCell technology). Después, se cultivaron en medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino, glutamina y antibiótico. Luego, se realizó una estimulación de una parte de las muestras (dejando algunas como control) con anticuerpos anti-CD3 (OKT3, TONBO) y anti-CD28 (CD28.2 TONBO) (2 μ L) y Goat anti-mouse IgG (BIOSS) (1 μ L) durante 24h.

Citometría de flujo

El análisis se realizó con un citómetro de flujo modelo Attune NxT (A24858) de la marca ThermoFisher™. Para evaluar la pureza de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ purificadas, se usaron anticuerpos acoplados a fluoróforos para CD3-FITC (TONBO) y CD4-APC (TONBO), para evaluar la activación de los linfocitos, se utilizó el anticuerpo anti-CD69 FITC (TONBO) y para evaluar si había presencia de contaminación de células maternas, usamos un anticuerpo acoplado a CD45RO-FITC (TONBO). Los datos fueron analizados con el software FlowJo X.

Obtención del RNA y síntesis de cDNA

Se obtuvo el RNA de las células con el reactivo TRIzol (Life Technologies), siguiendo el protocolo y las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA se realizó una cuantificación con el espectrofotómetro QuBit (ThermoFisher). Para comprobar la calidad del RNA se evaluó su integridad mediante gel de agarosa 1%. Posteriormente, se sintetizó con OligoDT y transcriptasa reversa RevertAid (Thermo Scientific™), de igual forma, siguiendo el protocolo e instrucciones correspondientes.

RT-qPCR

Una vez obtenido el cDNA, se amplificó por PCR tiempo real (RT-qPCR) con el uso de un intercalador fluorescente (SYBR Green, NZYtech) por 2 h. Para todos los genes, se realizó una curva estándar con diluciones seriadas de cDNA. Esta curva se utilizó para obtener la expresión relativa de cada gen, que se relacionó con el gen de la $\beta 2$ microglobulina, como control. Se utilizó el equipo con el uso del software Step One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y los datos se analizaron con el software StepOne software v2.3

Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism 9, Microsoft Excel, además de RStudio, utilizando las paqueterías ggplot2, gridExtra y dplyr. Los datos fueron evaluados usando la prueba U de Mann Whitney para datos no pareados (Parto vs Cesárea) y Wilcoxon (Basal vs Estimulado) para datos pareados. También se realizó la prueba de T de student. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$, CI: 95%.

RESULTADOS:

Diseño de primers de los genes de interés

El diseño de primers de los genes que se encuentran diferencialmente expresados en el transcriptoma de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea se llevó a cabo con el programa Primer-BLAST, utilizando la isoforma más larga de la secuencia del mensajero, con un tamaño del producto entre 130 a 350 bp, que los primers amplificaran de exón a exón, que la diferencia entre el forward y reverse fuera no mayor a 4 bases, un nivel de GC entre 50% y 60%, que no formaran *hairpins*, dímeros u otros amplicones y solo amplificaran para el gen de interés, esto se comprobó con ayuda de los programas MFE primer 3.0 y UCSC in silico pcr, además de primer-BLAST donde fueron diseñados principalmente.

Al realizar las amplificaciones de cada primer, algunos genes (TBX21, GF11, ITGA11 y MCC) no se obtuvo una amplificación como la esperada, incluso tras haber diseñado nuevos primers y probar varias condiciones en el PCR, por lo que finalmente nos quedamos con los siguientes primers (Tabla 1):

Cabe mencionar que, aunque se diseñaron los primers para ITGA11, TBX21, MCC y GF11, incluso se diseñaron dos pares de primers para cada uno de estos genes, no hubo amplificación, por lo que ya no se pudieron evaluar.

GENES (Cesárea)	SECUENCIA DE PRIMERS	GENES (Parto)	SECUENCIA DE PRIMERS
KLF9	CCACCGAATCTGGGTCGAGT AGGGCCGTTACCTGTATGC	CD40	ACCCTTGGACAAGCTGTGAGA AAGACCAGCACCAAGAGGATGG
RAPGEF6	TGGCTTGAACCTGGCATCTG GCCACCTCTTCTCCTCTGTC	ICAM1	AGCTTCGTGTCCTGTATGGC ACAGAGGTAGGTGCCCTCAA
NOTCH2NLC	CGAGATGGCTATGAACCCTGTGT GTCCATTGGCACTCCTTACCTGT	TNFRSF4	ACACCTACCCCAGCAACGAC AGGGGGCACAGTCAACTCC

Tabla 1. Secuencias forward y reverse de los primers de los genes de interés.

Estandarización de los genes de interés

La RT-qPCR es la técnica comúnmente utilizada debido a su exactitud, sensibilidad, reproducibilidad y facilidad de uso, es por eso que para los experimentos de esta tesis se eligió esta técnica.

Para poder evaluar la expresión de genes por RT-qPCR es necesario la realización de curvas estándar, esto para determinar la eficiencia de reacción para cada par de primers. Estas se realizan a través de diluciones seriadas.

En la figura 4, se muestran 6 curvas de estandarización de los primers de los genes de nuestro interés, con las ecuaciones de la recta obtenidas a partir de las curvas de amplificación para cada par de primers evaluados. Las curvas se realizaron en diluciones seriadas de 1:2 y de 1:5 con un Pool de muestras de cDNA, dichas muestras fueron evaluadas previamente con un gen de referencia ($\beta 2$ microglobulina) para verificar su eficiencia. Se optó por utilizar un Pool de muestras para asegurar la cantidad de cDNA para todos los genes a estandarizar y que hubiera templado del gen, por lo que este pool contenía células T tanto de neonatos como de adultos, a nivel basal y estimuladas. Cada dilución seriada se preparó con el mismo Pool de muestras. Para la dilución 1:2, se utilizó 1 μl del Pool de muestras con 1 μl de agua estéril, para la dilución 1:5, se utilizó 1 μl del Pool de muestras y 4 μl de agua estéril. Para los genes CD40 e ICAM1 se utilizó la dilución 1:5 para todos los experimentos, para los genes TNFRSF4, NOTCH2NLC, KLF9 y RAPGEF6 se utilizó la dilución 1:2. Las ecuaciones de la recta obtenidas se utilizaron posteriormente para calcular la concentración relativa de cada gen en los diferentes cDNAs obtenidos de las células, además que se obtuvo un R^2 arriba de 0.91, asegurando la eficiencia y reproducibilidad de los datos.

Los gráficos mostrados en la figura 4 fueron realizados en RStudio con la paquetería *ggplot2*.

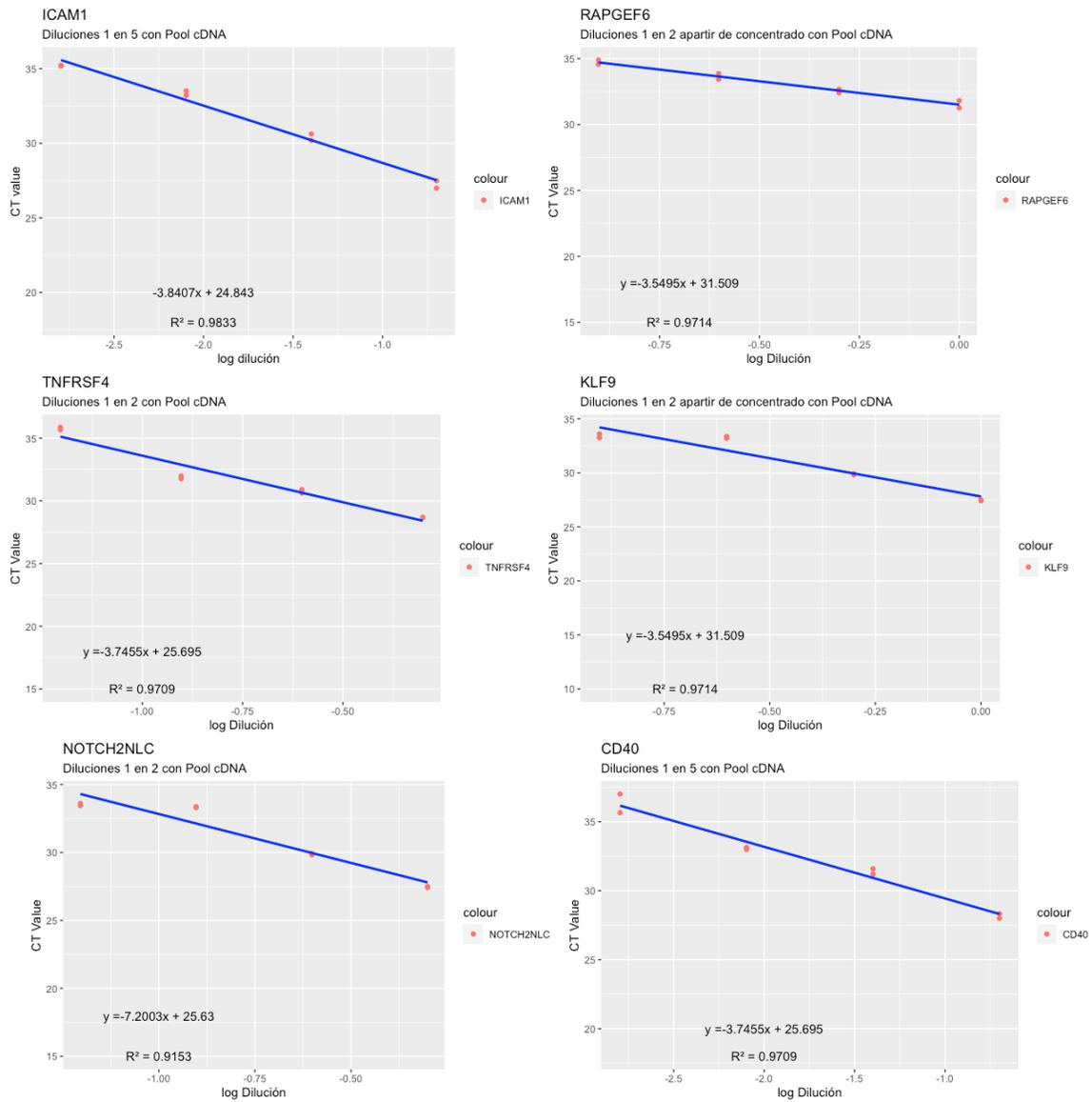


Figura 4. Curvas de estandarización de los genes de interés, de los genes sobreexpresados en el transcriptoma en células de neonato nacido por cesárea (NOTCH2NLC, RAPGEF6 y KLF9) y células de neonato nacido por parto vaginal (TNFRSF4, ICAM1 y CD40).

Colecta de muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea.

Se recolectaron un total de 6 muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos por parto vaginal (3) y cesárea (3), de las cuales 4 son provenientes de neonatos masculinos y 2 de neonatos femeninos. En este trabajo se recolectaron 4 muestras adicionales, pero no se lograron obtener cantidades suficientes de RNA para hacer la evaluación. El promedio de peso, temperatura, talla y semanas de gestación de los neonatos es de 3.165kg, 36.58°C, 49.5 cm y 40 semanas de gestación respectivamente. La colecta de estas muestras fue a través del permiso de Servicios de Salud Morelos, en el Hospital General de Temixco, Morelos “Enf. Ma. De La Luz Delgado Morales”, gracias a la participación de médicos, enfermeras y personal del hospital. Se colectaron muestras únicamente de neonatos nacidos a término, además que las madres no mostraran signos de infección, obesidad, hipertensión, enfermedades de transmisión sexual o diabetes durante el embarazo, es decir, que tuvieran de manera general un estado de salud bueno antes del alumbramiento.

Modo de nacimiento	Sexo	Peso	Temperatura	Talla	Apgar	Semanas de gestación
Parto vaginal	Femenino	3.400 kg	36.9 C	51 cm	8/9	41
	Masculino	3.560 kg	36.9 C	51 cm	8/9	41
	Femenino	2.380 kg	37.2 C	46 cm	8/9	38
Cesárea	Masculino	3.295 kg	36.5 C	51 cm	8/9	38
	Masculino	2.700 kg	35.5 C	47 cm	8/8	40
	Masculino	3.655 kg	36.5 C	51 cm	8/9	42

Tabla 2. Registro de datos de los recién nacidos. Se muestra la valoración del estado de salud del recién nacido con sus principales parámetros, éstos fueron evaluados entre los 5 y 10 minutos posteriores al nacimiento.

Purificación de linfocitos T CD4⁺

Una vez obtenidas las muestras se realizó primero la purificación de células mononucleadas y posteriormente la purificación de linfocitos T CD4⁺, como se menciona en la metodología.

Para evaluar la pureza de las muestras se realizó una doble tinción a los marcadores de membrana específicos para linfocitos CD4⁺ con anti CD4-APC y anti CD3-FITC, para células de memoria con los anticuerpos anti CD45RO-FITC y anti CD69-FITC para evaluar la activación de las células.

A continuación, se muestra la estrategia de *gating* empleada para evaluar todas las muestras obtenidas.

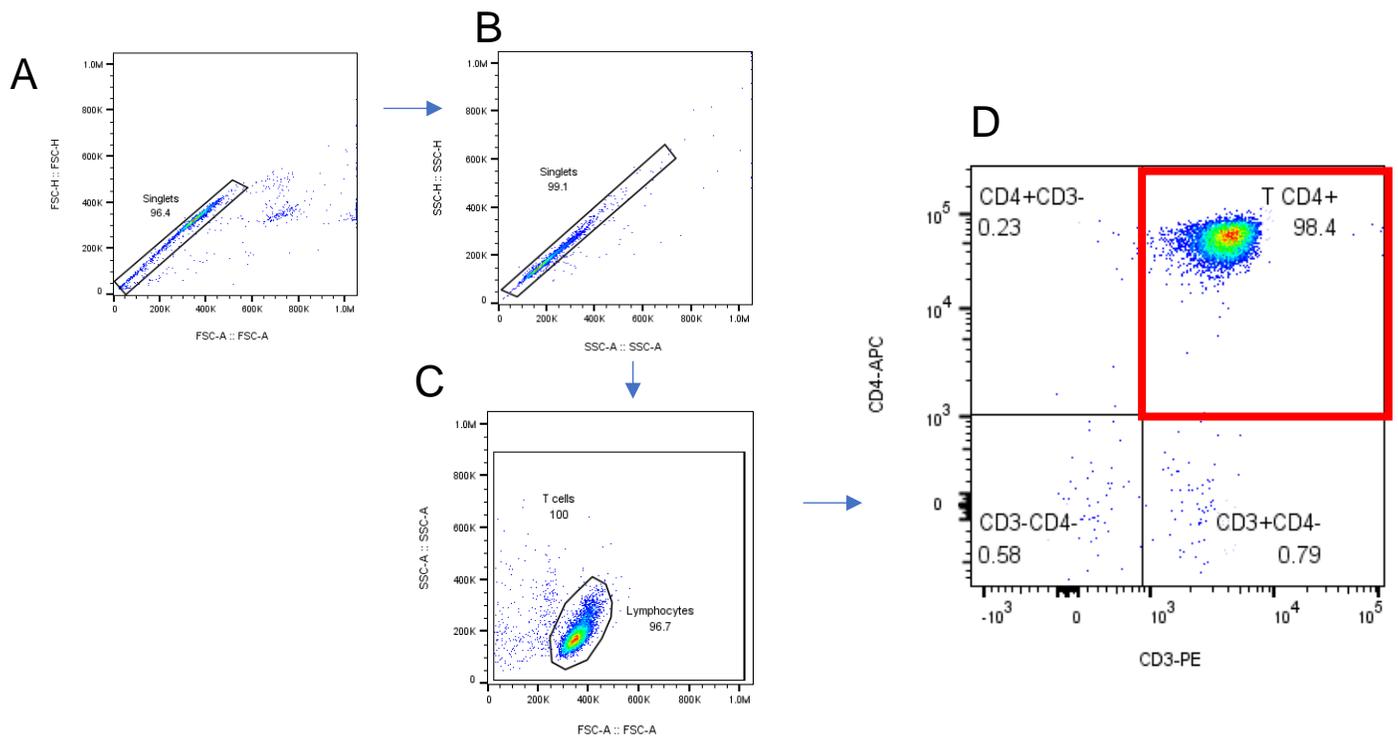


Figura 5. Estrategia de *gating*. Selección de linfocitos T CD4⁺.

En el panel A, se realiza la selección de células únicas (singletes), excluyendo los dobletes. En el panel B, se muestra el segundo *gate*, se muestra scatter vs scatter. El tercer *gate*, se mide el tamaño vs la granularidad, permitiendo definir nuestra población celular, linfocitos T (Panel C). D) Cuarto *gate*, muestra la pureza de la muestra, en el cuadrante de las doble positivas CD4⁺ CD3⁺.

Los porcentajes de pureza obtenidos para todas las muestras fueron entre el 90.8% y 97.8%, además que todas las muestras tuvieron un porcentaje menor de 5% de CD45RO y CD69, siendo ambos CD45RO^{low} y CD69^{low}.

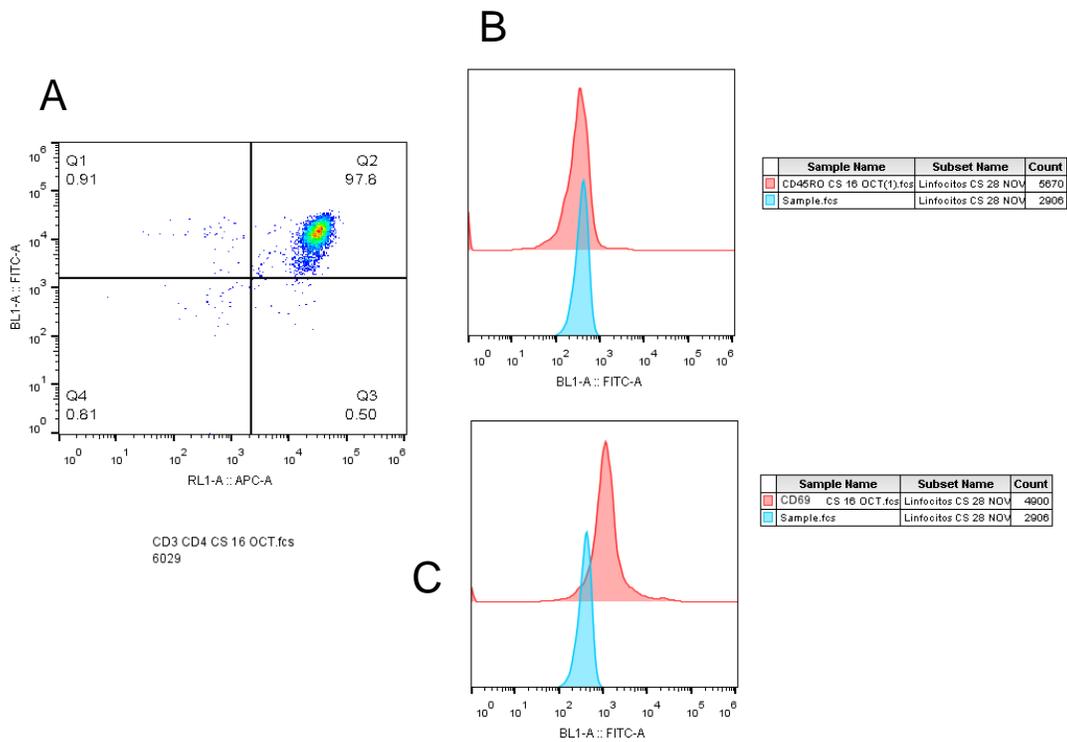


Figura 6. Ejemplo de pureza de una muestra de cesárea. A) Pureza obtenida después del uso del kit especializado de purificación RossetSep, para el aislamiento de linfocitos T CD4⁺. En el panel B se muestra un histograma de la tinción con CD45RO (rojo) en comparación la muestra sin teñir (azul). En el panel C, se muestra la tinción con CD69 (rojo) en comparación con la muestra sin teñir (azul).

Estimulación de linfocitos T CD4⁺

Una vez obtenidas las muestras de linfocitos T CD4⁺, se prosiguió con la estimulación de ellos, tal como se menciona en la metodología. A todas las muestras se realizó una extracción de RNA con el protocolo de extracción con TRIzol. Para evaluar su integridad, se cargaron y corrieron en un gel de agarosa al 1% (figura 7).

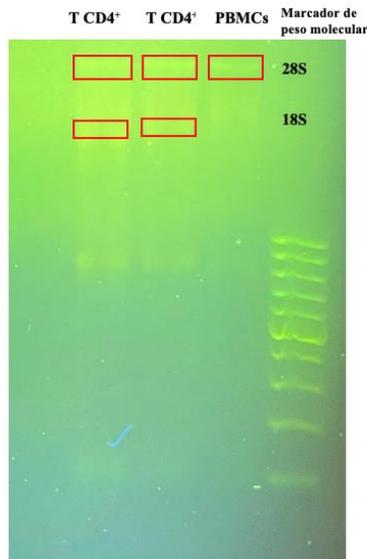


Figura 7. Gel de Agarosa al 1%. En la figura 7 se muestra un gel de agarosa al 1% con el cual se evaluó la integridad del RNA de muestras de linfocitos TCD4⁺ y de PBMCs. (Figura representativa)

En la figura 7 se muestran 3 muestras, de las cuales 2 muestran una buena integridad del RNA.

Evaluación de la expresión de los genes diferencialmente expresados en el transcriptoma de neonatos nacidos por vía vaginal y cesárea

Las qPCR en tiempo real fueron realizadas en la termocicladora de tiempo real StepOne Real-Time (Applied Biosystems™), utilizando placas de 48 pozos, las reacciones fueron preparadas utilizando los primers estandarizados, cDNA concentrado o diluido (diluciones 1:2 y 1:5), dependiendo el caso para cada gen. Cada muestra se corrió en duplicado y para cada gen, un control negativo con agua estéril. En ninguno de los genes hubo amplificación de los controles negativos, indicando que no hubo presencia de contaminaciones al momento de preparar las reacciones de PCR. Además de comprobar la integridad del RNA, se evaluó la eficiencia del cDNA, por lo que previo a su análisis en los genes de nuestro interés, se evaluaron con un gen de referencia, con el gen de la $\beta 2$ microglobulina. En la tabla 3, se muestran los valores de CT (Cycle Threshold) del gen de referencia $\beta 2$

microglobulina con un threshold de 0.1. Para todas las muestras colectadas el CT de la $\beta 2$ microglobulina fue entre 13.1 y 16.6.

B2M		
MUESTRA	ESTIMULO	CT
PARTO 3 AGO	CD3+CD28	16.3942795
PARTO 3 AGO	SIN ESTIMULO	16.4007721
PARTO 21 AGO	CD3+CD28	16.1206875
PARTO 21 AGO	SIN ESTIMULO	16.5514523
PARTO 4 SEP	CD3+CD28	15.528203
PARTO 4 SEP	SIN ESTIMULO	13.1607065
CS 9 NOV	CD3+CD28	16.2201443
CS 9 NOV	SIN ESTIMULO	16.3099442
CS 23 NOV	CD3+CD28	15.8976192
CS 23 NOV	SIN ESTIMULO	16.167532
CS 28 NOV	CD3+CD28	16.6825581
CS 28 NOV	SIN ESTIMULO	15.4902859

Tabla 3. Cycle Threshold de $\beta 2$ Microglobulina en las muestras de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal (3) y por cesárea (3).

Una vez comprobada la eficiencia de la reacción de cDNA para cada muestra con el gen de referencia, se continuó con la evaluación de los genes.

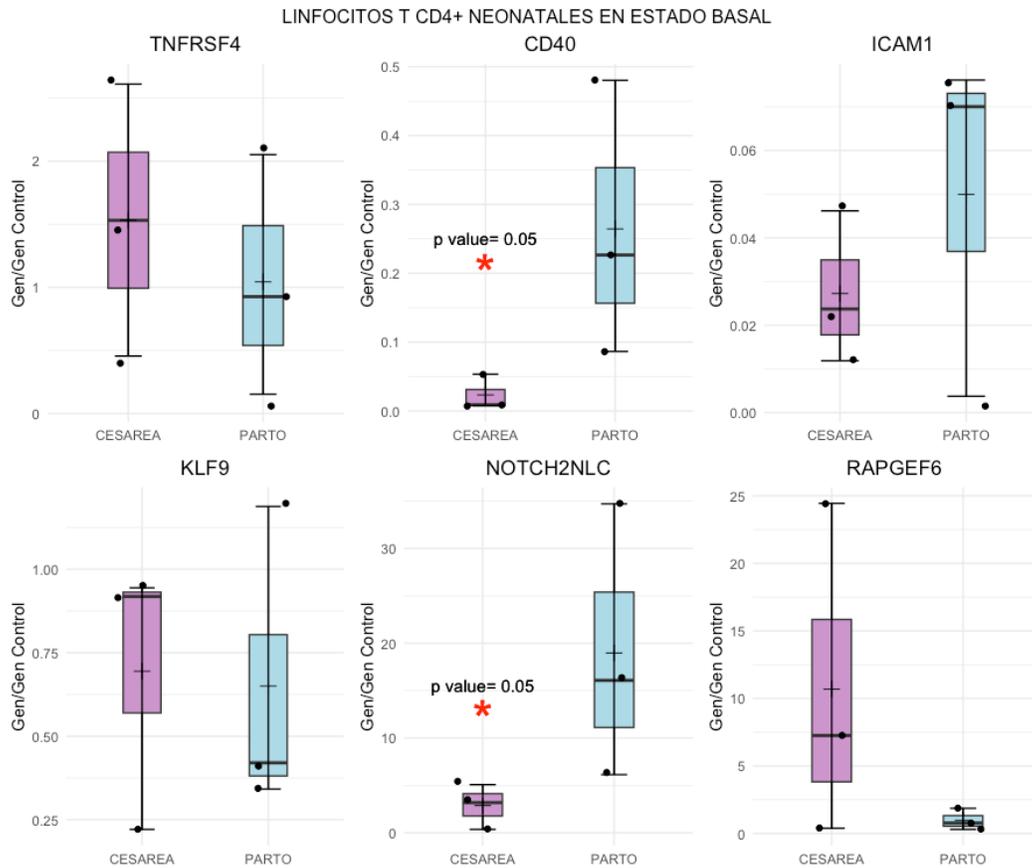
Primeramente, evaluamos los genes en estado basal para ver cómo es su expresión diferencial en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal. En la gráfica 1 vemos esta comparación en los 6 genes de interés.

En el caso de los genes sobreexpresados en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, se observa que sí hay tendencias a diferencias en cuánto al modo de nacimiento, así como se planteó en la hipótesis. ICAM1 y CD40 muestran una mayor expresión en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, y TNFRSF4 en linfocitos T CD4⁺ de neonato nacido por cesárea. Dónde sólo CD40 alcanzó un nivel de significancia menor a 0.05. (p value > 0.05)

En cuánto a los genes que se encuentran sobreexpresados en el transcriptoma en linfocitos T CD4⁺ de neonato nacido por cesárea, se observa que el gen KL9 no muestra diferencias en cuánto al modo de nacimiento, sin embargo, los genes

RAPGEF6 y NOTCH2NLC sí, sólo éste último alcanza una diferencia significativa ($p \text{ value} > 0.05$). Hay un aumento en la expresión de RAPGEF6 en linfocitos T CD4⁺ de neonato nacido por cesárea, tal como se observó en el análisis del transcriptoma. Por el contrario, el gen NOTCH2NLC muestra una mayor expresión en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal.

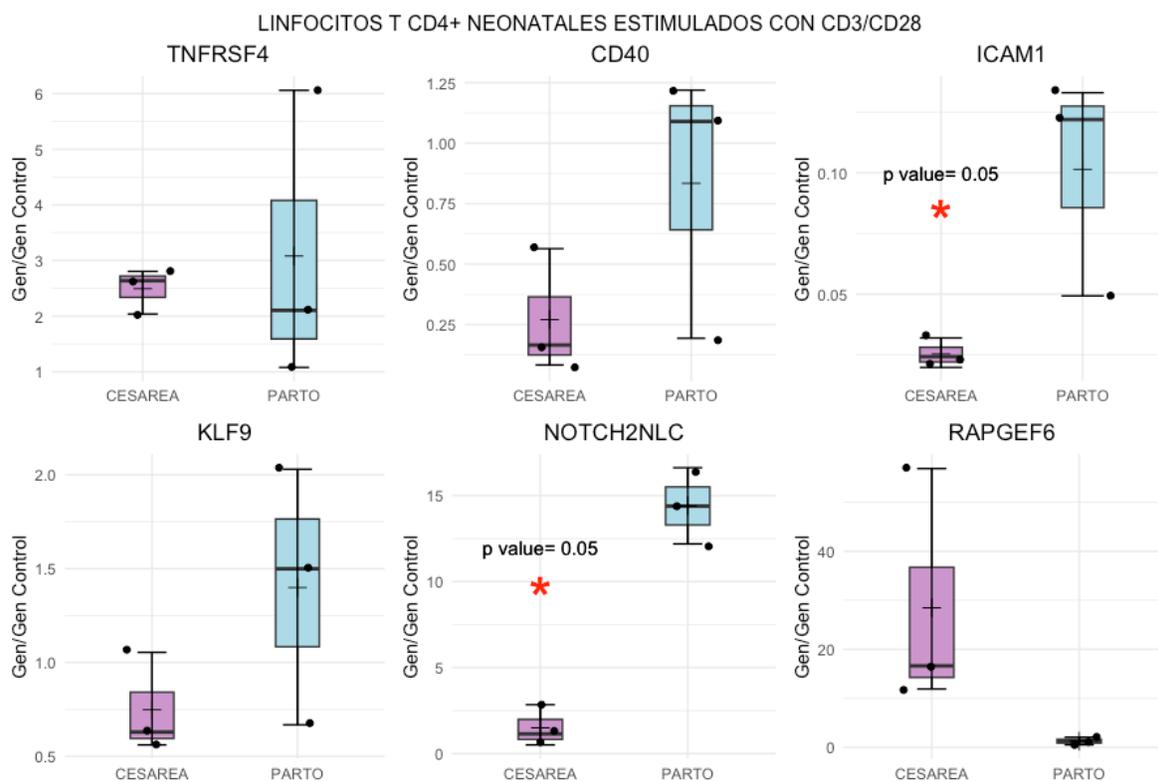
Cabe mencionarse que debido al número de muestras y la dispersión de los datos, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los genes.



Gráfica 1. Comparación de acuerdo al modo de nacimiento en muestras en estado basal. La expresión de cada gen fue normalizada con el gen de referencia B2M ($\beta 2$ microglobulina), los datos se presentan como el incremento en la expresión relativa de los genes en células en estado basal. Las cajas de bigotes representan la distribución, promedio y mediana de las muestras.

*= $p \text{ value} > 0.05$. Gráficas elaboradas con RStudio, usando las paqueterías *ggplot2*, *gridExtra* y *dplyr*. $n = 3$

Posteriormente, se evaluó la expresión génica en muestras estimuladas por 24h con el estímulo anti-CD3/CD28 y se realizó una comparación de acuerdo al modo de nacimiento con los resultados obtenidos. En la gráfica 2, se observa nuevamente a los 6 genes de interés. Se observa que, de 6 genes, en 5 si hay tendencias a diferencias en su expresión en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto y cesárea (NOTCH2NLC, KLF9, RAPGEF6, CD40 e ICAM1), mientras que en TNFRSF4 no se observan diferencias en la expresión. En cuanto a los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal hay un aumento en la expresión de los genes CD40 e ICAM1 (genes que se encuentran sobreexpresados en linfocitos T CD4⁺ en neonatos nacidos por parto vaginal), así como NOTCH2NLC y KLF9 (genes que se encuentran sobreexpresados en linfocitos T CD4⁺ en neonatos nacidos por cesárea). Ahora hay un aumento considerable en la expresión de RAPGEF6 en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea.



Gráfica 2. Comparación de acuerdo al modo de nacimiento en muestras estimuladas con CD3/CD28. La expresión de cada gen fue normalizada con el gen

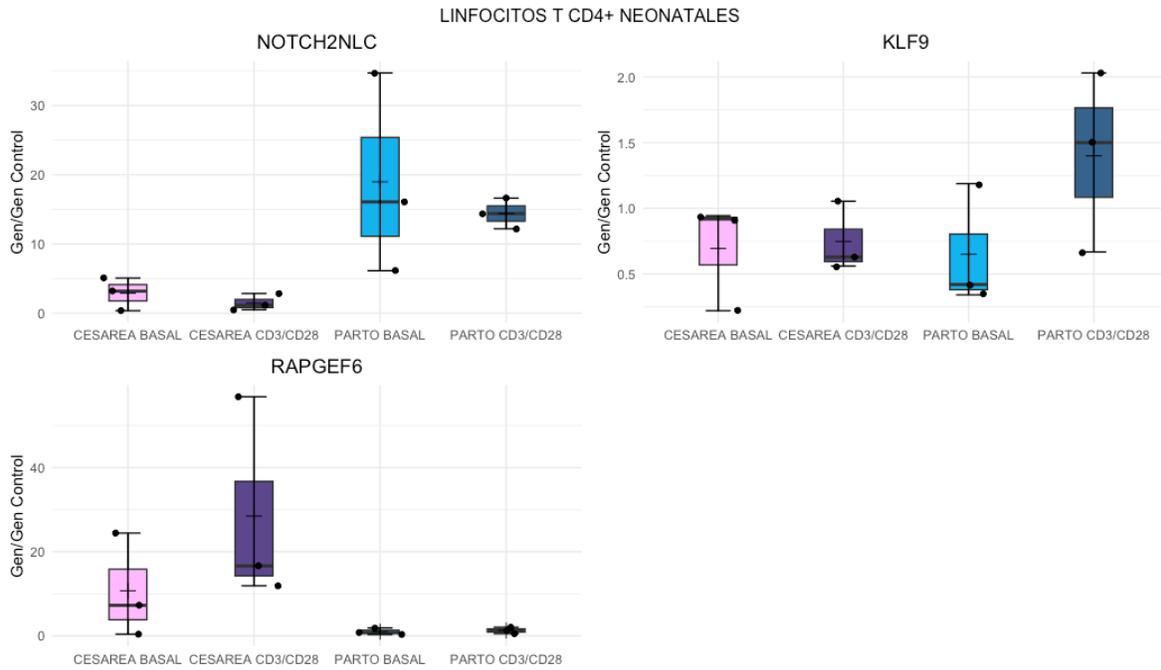
de referencia B2M, los datos se presentan como el incremento en la expresión relativa de los genes en células en estado basal. Las cajas de bigotes representan la distribución, promedio y mediana de las muestras.

*= p value > 0.05. Gráficas elaboradas con RStudio, usando las paqueterías ggplot2, gridExtra y dplyr. n= 3

Por último, se realizó un análisis comparando la expresión diferencial de genes en linfocitos T CD4⁺ neonatales en estado basal y estimulados con anti-CD3/CD28 para cada modo de nacimiento (Gráficas 3 y 4). En el caso del gen NOTCH2NLC (gráfica 3), se observa que hubo una disminución en su expresión tras estimular los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea; en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal no se observan grandes diferencias en su expresión.

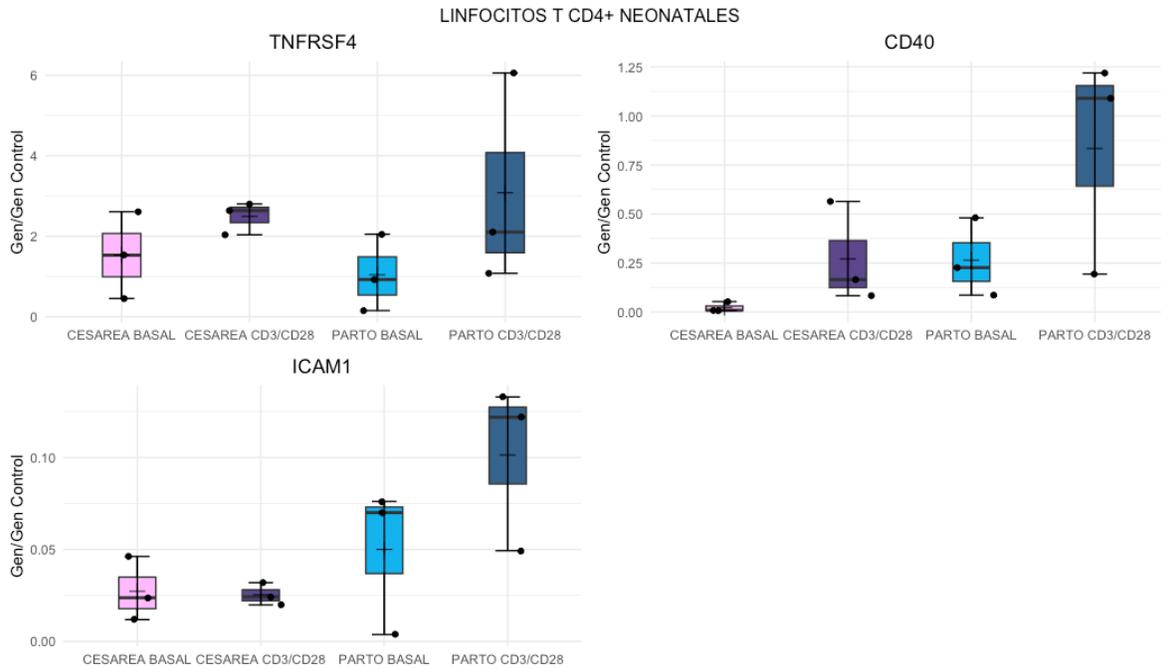
Para el gen KLF9 (gráfica 3), sólo hay un aumento en su expresión en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, mientras que los linfocitos TCD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea la expresión es prácticamente igual. El último gen de la gráfica 3, RAPGEF6 se observa que no hay diferencias en la expresión al estimular linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, mientras que los linfocitos provenientes de neonatos nacidos por cesárea si hay. En la gráfica 4, se observan 3 genes que se encuentran sobreexpresados en el transcriptoma en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal. En los 3 genes que se muestran TNFRSF4, CD40 e ICAM1, si hay un aumento en su expresión en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal al estimularlos con anti-CD3/CD28. Mientras que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea sólo los genes TNFRSF4 y CD40 si muestran un aumento en su expresión al ser estimulados.

Nuevamente nos referimos a tendencias, ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 3. Comparación de la expresión de genes sobreexpresados en cesárea en muestras en estado basal y estimuladas con CD3/CD28. La expresión de cada gen fue normalizada con el gen de referencia B2M, los datos se presentan como el incremento en la expresión relativa de los genes en células en estado basal. Las cajas de bigotes representan la distribución, promedio y mediana de las muestras.

*= p value > 0.05. Gráficas elaboradas con RStudio, usando las paqueterías ggplot2, gridExtra y dplyr. n= 3



Gráfica 4. Comparación de la expresión de genes sobreexpresados en parto vaginal en muestras en estado basal y estimuladas con CD3/CD28. La expresión de cada gen fue normalizada con el gen de referencia B2M, los datos se presentan como el incremento en la expresión relativa de los genes en células en estado basal. Las cajas de bigotes representan la distribución, promedio y mediana de las muestras.

*= p value > 0.05. Gráficas elaboradas con RStudio, usando las paqueterías ggplot2, gridExtra y dplyr. n= 3 .

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la expresión de 6 genes de 10 que se habían planteado en un principio, debido a que no logramos obtener expresión en los otros 4 genes. Dichos genes se escogieron porque se encontraron sobreexpresados en el transcriptoma de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea (Kempis-Calanis 2022). Los 4 genes que no se lograron evaluar como se mencionó en la sección de resultados, no amplificaron debidamente a pesar de que fueron rediseñados y probados en diversas condiciones del cDNA. El que no hayan amplificado se puede deber a las estrictas especificaciones con las que se diseñaron, ya que al momento de seleccionar los mejores diseños de cebadores, las opciones eran limitadas.

Por otra parte, de los genes que fueron evaluados podemos remarcar que, los genes que se encuentran sobreexpresados en las células de neonatos nacidos por parto vaginal (ICAM1, CD40 y TNFRSF4) si hay un aumento en su expresión en presencia del estímulo anti-CD3/CD28. El que en estos genes haya un aumento en su expresión en presencia del estímulo, y el que haya una mayor expresión en los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal, podría deberse a una respuesta más eficiente a la inflamación ya que estos genes están involucrados en los procesos regulatorios de la inflamación.

Al evaluar los genes que se encontraron sobreexpresados en el transcriptoma en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea obtuvimos un resultado inesperado. Encontramos que el gen de NOTCH2NLC se encontró sobreexpresado en los linfocitos provenientes de neonatos nacidos por parto vaginal. Aunque las técnicas de secuenciación masiva y RT-qPCR miden la expresión génica, hay que considerar que tienen diferencias importantes en tanto al tamaño del amplicón que se evalúa. Los *reads* de la secuenciación masiva que usamos miden alrededor de 75 bases, mientras que en los primers para el PCR son amplicones de alrededor de 200 bases y consideran saltos de exón, es decir el mRNA maduro. Es posible encontrar diferencias entre estas dos técnicas, porque la secuenciación masiva sólo considera que haya transcripción, mientras que en el

RT-qPCR ya está considerada la maduración del mRNA y su estabilidad, ambos procesos celulares muy regulados. Existen elementos reguladores en el mRNA que no son evidentes de tan solo de ver la secuencia, éstos se encuentran codificados por las modificaciones químicas de los nucleótidos en el mRNA, un ejemplo es m⁶A, que es el nucleótido químicamente modificado más abundante en el mRNA, implicado como regulador maestro en muchas vías de señalización celular, splicing, modificaciones epigenéticas y en la estabilidad del mRNA.⁵²

En la hipótesis se planteó que los genes que se encuentran sobreexpresados en células de neonato nacido por cesárea tendrían un efecto diferente al planteado en los genes de parto, para el gen KLF9, se hipotetizó que habría una disminución al estimular las células, no obstante la expresión de este gen se mantuvo constante. Es posible que el tiempo de estimulación no fue suficiente para observar cambios, por lo que, al aumentar el tiempo de estimulación pudieramos observar algún cambio en la expresión de KLF9. También es posible que se mantenga esta expresión y que la mayor proliferación de las células de neonatos nacidos por cesárea sea independiente a su posible regulación negativa por KLF9.

También en la hipótesis se propuso que los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea se observaría un incremento en la expresión de RAPGEF6 y NOTCH2NLC. Si bien si hubo un incremento en la expresión del gen RAPGEF6, en el gen NOTCH2NLC, fue el caso contrario, hubo una disminución. En los linfocitos T, Notch tiene un rol importante en la diferenciación celular en las diferentes etapas del desarrollo, además tiene una función reguladora en la diferenciación de los fenotipos de los linfocitos T, hacia los fenotipos Th1 o Th2, esto dependiendo de la naturaleza de las citocinas presente y los ligandos de Notch involucrados.⁴⁷ En investigaciones recientes, se ha demostrado que al estimular T CD4⁺ vírgenes con anti-CD3 y anti- CD28 hay una disminución en la expresión de los ligandos de Notch ya que CD3 actúa como un regulador negativo, mientras que CD28 regula positivamente su expresión⁴⁸. Lo cual es consistente con los resultados mostrados donde tanto en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal y cesárea hay una disminución de la expresión de este gen en las células estimuladas con CD3/CD28. Ahora, la activación de NOTCH parece ser independiente a sus ligandos

(tipo delta o Jagg), sin embargo se ha demostrado que en linfocitos T CD4⁺ hay una regulación selectivamente positiva por los ligandos del tipo delta que favorecen la diferenciación hacia el tipo Th1,⁴⁷ por lo que esto podría explicar el por qué hay una mayor expresión de NOTCH2NLC en las células de neonato nacido por parto vaginal. En trabajos de investigación del laboratorio, se ha demostrado que los linfocitos de neonatos nacidos por parto vaginal tienen un perfil más tolerogénico en comparación con los linfocitos de neonatos nacidos por cesárea.

Al evaluar el gen TNFRSF4 (también llamado OX40 y CD134), que se encuentra sobreexpresado en el transcriptoma de linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos en parto vaginal, se observa que hay un aumento en la expresión de este gen en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea, esto en estado basal. La explicación a esto podría ser porque en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes las señales de OX40-OX40L (ligando de OX40), dirigen preferentemente a través de la producción de interleucina 4 (IL-4) la diferenciación hacia el fenotipo Th2. Los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea tienen una tendencia hacia el fenotipo Th2, esto se ha observado en trabajos del laboratorio. Una vez activadas los linfocitos T, las señales de OX40-OX40L son capaces de generar una señal coestimuladora fuerte potenciando ambas respuestas efectoras, tanto Th1 como Th2, lo cual es coherente con lo observado una vez estimuladas las células.⁵¹

Por último, el P value es el valor comúnmente utilizado para evaluar e interpretar datos en la investigación biomédica. Una muestra pequeña puede impactar negativamente en este valor, por lo que cabe mencionar que es necesario aumentar el número de muestras de sangre de cordón umbilical para obtener valores estadísticos. Sin embargo, el valor P es más bien considerado como un espectro, no una métrica binaria significativa o no significativa, por lo que se debe considerar el tamaño de la muestra, la magnitud del efecto, el error sistemático y aleatorio en conjunto con el valor P en sí.⁴⁹ En este respecto, el aumento en el tamaño de la muestra sería importante para observar si las tendencias observadas son efectivamente diferencias significativas.

CONCLUSIÓN

En esta tesis sugerimos que el modo de nacimiento sí tiene un impacto sobre la expresión de los genes, tanto a nivel basal, como en presencia del estímulo CD3/CD28.

Los genes que se encontraron sobreexpresados en linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por parto vaginal (CD40, TNFRSF4 e ICAM1) sí tienen una mayor expresión cuando son estimulados en células provenientes de neonatos nacidos por parto vaginal, y en comparación con los linfocitos T CD4⁺ de neonatos nacidos por cesárea.

El gen NOTCH2NLC tuvo una expresión basal mayor en los neonatos nacidos por parto vaginal que en aquellos nacidos por cesárea, este resultado es opuesto al observado en el transcriptoma.

El gen NOTCH2NLC tiene una mayor expresión en estado basal que en estado estimulado, debido a que al estimular el TCR con CD3, éste actúa como regulador negativo en Notch, lo que pudiera disminuir su expresión.

Los genes RAPGEF6 y KLF9 se encuentran relacionados a la diferenciación, mantenimiento y adhesión celular, éstos están expresados en una mayor (RAPGEF) o igual proporción (KLF9) en linfocitos T CD4⁺ estimulados de neonatos nacidos por cesárea en comparación con los de parto.

La expresión diferencial de los genes evaluados podría deberse a la exposición diferencial de niveles de oxígeno, hormonas y estrés, en el proceso de nacimiento vaginal. Que pudieran tener un impacto en el epigenoma y por lo tanto provocar diferencias en la expresión de genes.

A manera de conclusión, se logró llevar a cabo toda la metodología y obtener resultados relevantes que pudieran ser útiles para futuras investigaciones, y así elucidar preguntas sobre cómo el modo de nacimiento afecta la respuesta inmune del bebé.

Bibliografía

1. Smith DA, Germolec DR. **Introduction to immunology and autoimmunity.** Environ Health Perspect. 1999;107 Suppl 5(Suppl 5):661-665. doi:10.1289/ehp.99107s5661
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Cellular and Molecular Immunology.** 9th edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2017
3. Cooper MD, Alder MN. **The evolution of adaptive immune systems.** Cell. 2006;124(4):815-822. doi:10.1016/j.cell.2006.02.001
4. Bonilla FA, Oettgen HC. **Adaptive immunity.** J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2 Suppl 2):S33-S40. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017
5. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. **CD4⁺T cells: differentiation and functions.** Clin Dev Immunol. 2012;2012:925135. doi:10.1155/2012/925135
6. van den Broek T, Borghans JAM, van Wijk F. **The full spectrum of human naive T cells.** Nat Rev Immunol. 2018;18(6):363-373. doi:10.1038/s41577-018-0001-y.
7. Albrecht M, Arck PC. **Vertically Transferred Immunity in Neonates: Mothers, Mechanisms and Mediators.** Front Immunol. 2020;11:555. Published 2020 Mar 31. doi:10.3389/fimmu.2020.00555
8. United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. **Levels and Trends in Child Mortality: Report 2022.** Geneva, Switzerland: United Nations Children's Fund; 2022
9. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, et al. **Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines.** Nat Immunol. 2011;12(3):189-194. doi:10.1038/ni0311-189
10. A., Kempis-Calanis L. et al. **Unique Characteristics of Neonatal T Cells.** Medical Research Archives, [S.l.], v. 11, n. 1, jan. 2023. ISSN 2375-1924. Available at: <{HYPERLINK"<https://esmed.org/MRA/mra/article/view/3568>"\t"_new"}>. Date accessed: 31 mar. 2023.
11. Ygberg S, Nilsson A. **The developing immune system - from foetus to toddler.** Acta Paediatr. 2012;101(2):120-127. doi:10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x
12. Basha S, Surendran N, Pichichero M. **Immune responses in neonates.** Expert Rev Clin Immunol. 2014;10(9):1171-1184. doi:10.1586/1744666X.2014.942288
13. Webster RB, Rodriguez Y, Klimecki WT, Vercelli D. **The human IL-13 locus in neonatal CD4⁺ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture.** J Biol Chem. 2007;282(1):700-709. doi:10.1074/jbc.M609501200
14. Risdon G, Gaddy J, Horie M, Broxmeyer HE. **Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(6):2413-2417. doi:10.1073/pnas.92.6.2413
15. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, et al. **Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines.** Nat Immunol. 2011;12(3):189-194. doi:10.1038/ni0311-189

16. Neu J, Rushing J. **Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis.** Clin Perinatol. 2011;38(2):321-331. doi:10.1016/j.clp.2011.03.008
17. Organización Mundial de la Salud. (2021, 16 de junio). **Caesarean section rates continue to rise, amid growing inequalities in Access.** Organización Mundial de la Salud <https://www.who.int/news/item/16-06-2021-caesarean-section-rates-continue-to-rise-amid-growing-inequalities-in-access>
18. Kiilerich P, Cortes R, Lausten-Thomsen U, Borbye-Lorenzen N, Holmgaard S, Skogstrand K. **Delivery Modality Affect Neonatal Levels of Inflammation, Stress, and Growth Factors.** Front Pediatr. 2021;9:709765. Published 2021 Sep 22. doi:10.3389/fped.2021.709765
19. Almgren M, Schlinzig T, Gomez-Cabrero D, et al. **Cesarean delivery and hematopoietic stem cell epigenetics in the newborn infant: implications for future health?** Am J Obstet Gynecol. 2014;211(5):502.e1-502.e5028. doi:10.1016/j.ajog.2014.05.014
20. Sandall J, Tribe RM, Avery L, et al. **Short-term and long-term effects of caesarean section on the health of women and children.** Lancet. 2018;392(10155):1349-1357. doi:10.1016/S0140-6736(18)31930-5
21. Litorp H, Kidanto HL, Nystrom L, Darj E, Essén B. **Increasing caesarean section rates among low-risk groups: a panel study classifying deliveries according to Robson at a university hospital in Tanzania.** BMC Pregnancy Childbirth. 2013;13:107. Published 2013 May 8. doi:10.1186/1471-2393-13-107
22. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, et al. **Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19. Resultados Nacionales.** Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2020.
23. DiMatteo MR, Morton SC, Lepper HS, et al. **Cesarean childbirth and psychosocial outcomes: a meta-analysis.** Health Psychol. 1996;15(4):303-314. doi:10.1037//0278-6133.15.4.303
24. Vadnais M, Sachs B. **Maternal mortality with cesarean delivery: a literature review.** Semin Perinatol. 2006;30(5):242-246. doi:10.1053/j.semperi.2006.07.014
25. Tita AT, Landon MB, Spong CY, et al. **Timing of elective repeat cesarean delivery at term and neonatal outcomes.** N Engl J Med. 2009;360(2):111-120. doi:10.1056/NEJMoa0803267
26. Dahlen HG, Kennedy HP, Anderson CM, et al. **The EPIIC hypothesis: intrapartum effects on the neonatal epigenome and consequent health outcomes.** Med Hypotheses. 2013;80(5):656-662. doi:10.1016/j.mehy.2013.01.017
27. Almgren M, Schlinzig T, Gomez-Cabrero D, et al. **Cesarean delivery and hematopoietic stem cell epigenetics in the newborn infant: implications for future health?** Am J Obstet Gynecol. 2014;211(5):502.e1-502.e5028. doi:10.1016/j.ajog.2014.05.014
28. Wells JC, Wibaek R, Poullas M. **Global epidemiology of use of and disparities in caesarean sections.** Lancet. 2019;394(10192):24-25. doi:10.1016/S0140-6736(19)30715-9

29. Boatman AA, Schlottheuber A, Betran AP, et al. **Within country inequalities in caesarean section rates: observational study of 72 low and middle income countries.** *BMJ.* 2018;360:k55. Published 2018 Jan 24. doi:10.1136/bmj.k55
30. Santana MA, Esquivel-Guadarrama F. **Cell biology of T cell activation and differentiation.** *Int Rev Cytol.* 2006;250:217-274. doi:10.1016/S0074-7696(06)50006-3
31. Ventura, C.J, **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.** 2022
32. Hinks TSC, Hoyle RD, Gelfand EW. **CD8+ Tc2 cells: underappreciated contributors to severe asthma.** *Eur Respir Rev.* 2019;28(154):190092. Published 2019 Nov 20. doi:10.1183/16000617.0092-2019
33. Kempis- Calanis et al, **Neonatal CD4+ T cells are predisposed toward proliferation and yet a limited immune response.** 2022
34. Kempis- Calanis et al. **Transcriptomic analysis of CD4+ and CD8+ T cells from premature and full term neonates, born by caesarian section and Natural Birth.** 2023
35. Jiang Q, Yang G, Xiao F, et al. **Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases.** *Front Immunol.* 2021;12:688066. Published 2021 Jul 6. doi:10.3389/fimmu.2021.688066
36. Del Prete G. **Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy.** *Allergy.* 1992;47(5):450-455. doi:10.1111/j.1398-9995.1992.tb00662.x
37. Angkasekwinai P. **Th9 Cells in Allergic Disease.** *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(5):29. Published 2019 Mar 26. doi:10.1007/s11882-019-0860-8
38. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. **Phenotypic and functional features of human Th17 cells.** *J Exp Med.* 2007;204(8):1849-1861. doi:10.1084/jem.20070663
39. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. **Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.** *Immunological Reviews.* 2006;212:8–27.
40. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, et al. **Innate Immunity of Neonates and Infants.** *Front Immunol.* 2018;9:1759. Published 2018 Jul 30. doi:10.3389/fimmu.2018.01759
41. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. **Protecting the newborn and young infant from infectious diseases: lessons from immune ontogeny.** *Immunity* (2017) 46(3):350–63. doi:10.1016/j.immuni.2017.03.009
42. Bermick JR, Issuree P, denDekker A, et al. **Differences in H3K4me3 and chromatin accessibility contribute to altered T-cell receptor signaling in neonatal naïve CD4 T cells.** *Immunol Cell Biol.* 2022;100(7):562-579. doi:10.1111/imcb.12561
43. Shi X, Ma W, Duan S, et al. **Single-cell transcriptional diversity of neonatal umbilical cord blood immune cells reveals neonatal immune**

- tolerance.** Biochem Biophys Res Commun. 2022;608:14-22. doi:10.1016/j.bbrc.2022.03.132
44. Lee D, An J, Park YU, et al. **SHPRH regulates rRNA transcription by recognizing the histone code in an mTOR-dependent manner.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(17):E3424-E3433. doi:10.1073/pnas.1701978114
45. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TOP3B>
46. Sinnott BD, Park B, Boer MC, Lewinsohn DA, Lancioni CL. **Direct TLR-2 Costimulation Unmasks the Proinflammatory Potential of Neonatal CD4+ T Cells.** J Immunol. 2016;197(1):68-77. doi:10.4049/jimmunol.1501297
47. Brandstadter JD, Maillard I. **Notch signalling in T cell homeostasis and differentiation.** Open Biol. 2019;9(11):190187. doi:10.1098/rsob.190187.
48. Mitra A, Shanthalingam S, Sherman HL, et al. **CD28 Signaling Drives Notch Ligand Expression on CD4 T Cells.** Front Immunol. 2020;11:735. Published 2020 May 7. doi:10.3389/fimmu.2020.00735
49. Thiese MS, Ronna B, Ott U. **P value interpretations and considerations.** J Thorac Dis. 2016;8(9):E928-E931. doi:10.21037/jtd.2016.08.16
50. Haydinger CD, Ashander LM, Tan ACR, Smith JR. **Intercellular Adhesion Molecule 1: More than a Leukocyte Adhesion Molecule.** Biology (Basel). 2023;12(5):743. Published 2023 May 19. doi:10.3390/biology12050743
51. Fu Y, Lin Q, Zhang Z, Zhang L. **Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity.** Acta Pharm Sin B. 2020;10(3):414-433. doi:10.1016/j.apsb.2019.08.010
52. Murakami S, Jaffrey SR. **Hidden codes in mRNA: Control of gene expression by m6A.** Mol Cell. 2022;82(12):2236-2251. doi:10.1016/j.molcel.2022.05.029
53. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. (s.d). **MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA NOTIFICACIÓN INMEDIATA DE MUERTES MATERNAS.** Secretaría de Salud. https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/15_Manual_Muertes_Maternas_Lineamientos.pdf



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CONTROL ESCOLAR DE LICENCIATURA



VOTOS DE APROBATORIOS



**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. LOPEZ VALENCIA PAULINA** con número de matrícula **10030056** cuyo título es:

“Evaluación de la expresión de genes diferencialmente expresados en linfocitos T CD4+ de neonatos nacidos por cesárea y parto vaginal.”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 30 de abril de 2024

Atentamente

Por una humanidad culta

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

**DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA
DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ
DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA
DR. OTONIEL RODRÍGUEZ JORGE**

**(PRESIDENTE)
(SECRETARIO)
(VOCAL)
(SUPLENTE)
(SUPLENTE)**

MIE/VRRC/eae



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo certificados.titulacionesiicba@uaem.edu.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



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

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2024-05-03 09:57:03 | FIRMANTE

f96W+ZBr10CUex2AxFOwRCo/G9OmjVdDyZy8kF0bY271CZkoE14OmKlzaYQsvu6lZHK/jbPalvJm2F5gR2XXmG9UsHnVLF0l1DKRYK6kyDxLr+0B2ZKcol82O1dd+C/tqdaJq0BEkd6O3d/GTXVHa91XmL7mnpYacF1bAbXHQInkRdr20qYqMoRSoza21jEcigk2gYlZVe4nnCqSFVvolofjczyFPSs+zjNOaMbB6MJauvBTcf22A0OvmyG4umB5w8vI/8tZqnhZBRWjHl7oO8rJox9Pvem8dUEoAvCZGU1CbO9lQDLlewTi2KWKF4jR8g+S7rcTQQSejsyOGWvVcg==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2024-05-03 10:18:19 | FIRMANTE

Q8iCbeCqcuDfL89ldeAud0ZD1wPaE/A6CiYyGO7H/N4TPz1Zj09wBgKcv9dEhSckvYma6NVV8T9F1tz0ssYoWTTxWyt0BXV+js4aRdtH3hSERk1abDz9Esj9MNUjxCREJkiYd5ow270wPbfhDDyiu9OV8ja4sv9vqg/zyaqgM37Etf7cWWj4T8SnlwpmTnNe/h66Rnhk3qcud73Va9y6mMa9gACBnMKrVWpEzpdA5iibZhs5JozP2mAhYc9tK7JkDJ678/q/MLjuvAEqMctPvtyDf5ZUyuUTWvmXuZybK6e1uaQAkh4CjB/qD40q9BhvBMeDFXxgnVWSwRakfm9+g==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2024-05-03 10:49:27 | FIRMANTE

G0wkjxfNPgavTK4pwS4IPf5DMd6Uk7Hpgg/14BuDhQAVreShQ6lKH0npGn/4m1vCPY9M6ZBqgkPxcu9wiPGDANYGDhYcqt8a/CTmm0oSA16cW4eZCGLpP2y2rtIP4ozoyk++NvUNSFxNWKUAlhvKJ3hGy24Tp6LzKzUVGxTjyE/ZAKul/UdY+0EGYPyatpBFyC+SkHEH8tOOmQzoORV20+GwDUZki8WrTqlKNvYIG8oSyECzGTt6CGDve6miSPFPNQNlWP+7MFYjXftjikdncM7P0Hp6zdEFUbgYwplw6BfZVl3FfvPcGijEZ9q8pYlSt19ZZl0LZ0GOQsYzW6w==

OTONIEL RODRIGUEZ JORGE | Fecha:2024-05-03 11:52:29 | FIRMANTE

rVq3zGPIBrpbO6nA4FUoopLN5f3i/gEyFSRC6msipSBSmnnqHCifG9fy7ysKsyQYDf/6WkvOxw+BjBVJb6xnVvJJT5Ng3QHR07to+Hm+ tqWtbB47ozL7PKx3dHfjGQhfU5ZY9LA9Ef4ahwvOYcdJ9IDCZ/13Ld3HGnSekujatN3+h2cXnZ9Ws1ayF0RdSTYLyoo9K0ZoVPwntoetnGHRfVzC05o+NLZ4pNWNFl0nfsQFaC38bAS07VNTcVq0kOAOZyktPQkOh8v4CM+cxZXHCNf63L6FzN88JgzuisEI9xfq7C6Jhl+EOP5J09PjpUDA2FC8rQ78Hl/1g9n1oCA==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2024-05-03 12:44:06 | FIRMANTE

N1uLudDhzhZ9EEyqWDH9qOAnkN8XJDSvGwBTbtvocrkL+3HVPejpbO61JtSVLVIknfiqCEgEPDUUppyVQYhqjcg5aRgy7sgFtNS5Dw8XA81SdwRePhF9vS4Y919RZeWdX5ixWIdDR61QhZ0/3RjWj7UVm2tYC8RkmbS4HZDT02AN16ml+WDa0DqzSxgaKUs+B6dzcNq7p6oTJyzPhfCMQ+iSOSuZnwcZHRWjExzIB8ZnptBEmdDUI1SIM3xIMF4xs32P0B9LpV4eEbzd3dQU2LE8kelwv6s1JuWBAHY0HJh32sslo9VSOCI4P2VJ17T1UkzlgqWmNulWvx2luHjmw==

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



G0PwoLf4b

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/S9HuoUrjoKoKpgA5fWb4CFdjIw3bQNjT>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029